



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FUNDAMENTAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

ABINOAN DA SILVA RODRIGUES

**ESTUDO DE PROCESSOS EXTRATIVOS PARA DETERMINAÇÃO DE
HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS EM AMOSTRAS DE
PETRÓLEO E PEIXE, E DE FTALATOS EM AMOSTRAS AMBIENTAIS E
ALIMENTARES**

Recife

2025

ABINOAN DA SILVA RODRIGUES

**ESTUDO DE PROCESSOS EXTRATIVOS PARA DETERMINAÇÃO DE
HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS EM AMOSTRAS DE
PETRÓLEO E PEIXE, E DE FTALATOS EM AMOSTRAS AMBIENTAIS E
ALIMENTARES**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação no Departamento de Química Fundamental da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para a obtenção do título de doutora em Química.

Área de concentração: Química Analítica

Orientadora interna: Prof^a. Dr^a. Ana Paula Silveira Paim

Orientador externo: Prof. Dr. José Licarion Pinto Segundo Neto

Recife

2025

.Catalogação de Publicação na Fonte. UFPE - Biblioteca Central

Rodrigues, Abinoan da Silva.

Estudo de processos extractivos para determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em amostras de petróleo e peixe, e de ftalatos em amostras ambientais e alimentares / Abinoan da Silva Rodrigues. - Recife, 2025.

147f.: il.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Programa de Pós-Graduação em Química, 2025.

Orientação: Profa. Dra. Ana Paula Silveira Paim.

Coorientação: Prof. Dr. José Licarion Pinto Segundo Neto.

1. Águas; 2. Bebidas; 3. Peixe; 4. Contaminação; 5. Ftalatos; 6. HPAs. I. Paim, Ana Paula Silveira. II. Segundo Neto, José Licarion Pinto. III. Título.

UFPE-Biblioteca Central

ABINOAN DA SILVA RODRIGUES

**ESTUDO DE PROCESSOS EXTRATIVOS PARA DETERMINAÇÃO DE
HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS EM AMOSTRAS DE
PETRÓLEO E PEIXE, E DE FTALATOS EM AMOSTRAS AMBIENTAIS E
ALIMENTARES**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação no Departamento de Química Fundamental da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para a obtenção do título de doutora em Química.

Aprovada em: 28/02/2025

BANCA EXAMINADORA

Dra. CASSIANA CAROLINA MONTAGNER (Examinadora)

Universidade Estadual de Campinas

Dr. MARIA DA CONCEIÇÃO BRANCO DA SILVA (Examinadora)

Universidade do Porto

Dra. MARIA JOSE DE FILGUEIRAS GOMES (Examinadora)

Universidade Federal Rural de Pernambuco

Dra. CLAUDETE FERNANDES PEREIRA (Examinadora)

Universidade Federal de Pernambuco

Dra. ANA PAULA SILVEIRA PAIM (Presidente)

Universidade Federal de Pernambuco

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida e direcionamento em todos os momentos. Em especial, agradeço a Deus por me conduzir durante a pesquisa e elaboração deste trabalho.

A minha família, em especial a minha mãe, Lourdes Rodrigues, e irmã Adna Rodrigues, pelo apoio e incentivo incondicionais.

Aos orientadores prof Licarion Pinto e prof^a Ana Paula Paim, pela orientação, paciência e disponibilidade durante o curso do projeto.

Ao suporte do Laboratório de Espectroanalítica Aplicada (LEA- UFPE) e do Laboratório de Metabonômica e Quimiometria (LabMeQ-UFPE), onde desenvolvi a maior parte do trabalho. Em especial, menciono os integrantes Suennia Senna, Felipe Cunha, Jéssica Bruna e Julyane Melo, pelo acolhimento e amizade; tornando o ambiente de trabalho leve e agradável.

Ao suporte fornecido pelo Laboratório de Medicamentos, Técnicas, Energias e Soluções Ambientais (LaMTESA – UFRPE), na pessoa do professor Jandyson e sua estudante Thayane, nos permitindo acesso à infraestrutura do laboratório e viabilizando a realização de análises no instrumento GC-MS.

Ao Grupo de Química Ambiental, da Universidade Federal do Paraná (UFPR). Em especial, agradeço ao prof. Dr. Marco Tadeu Grassi e ao Dr. Rafael Garrett Dolatto, pelo acolhimento e partilha de conhecimentos no tratamento de amostras ambientais, treinamento e viabilidade de análises no GC-MS da Instituição.

Ao Grupo de pesquisa em (bio)sensores da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, coordenado pelas Prof^a Dr^a Maria Conceição Branco da Silva e Prof^a Dr^a Célia Amorim e a Dr^a Edite Cunha. Agradeço especialmente pela recepção e a oportunidade de desenvolver meu Doutorado-Sanduíche na Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto (FFUP) – financiado pelo Programa PrInt-CAPES. Durante este período adquiri experiência na área de extração de ftalatos em águas, síntese e uso de solventes eutéticos.

Ao Programa de Pós-graduação em Química da Universidade Federal de Pernambuco, Central Analítica da UFPE(DQF), ao Conselho de Desenvolvimento e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa e à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pelo auxílio financeiro.

RESUMO

Esta tese descreve o desenvolvimento de métodos analíticos para a extração e pré-concentração de contaminantes orgânicos em matrizes ambientais, com foco na determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) em peixes, e de ftalatos em águas residuais e bebidas. A quantificação de HPAs foi realizada utilizando cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS), tendo sido analisadas 24 amostras de filés de peixe liofilizadas, coletadas em diferentes pontos do litoral pernambucano afetados pelo derramamento de óleo, entre junho/2021 e dezembro/2020. O método de dispersão da matriz em fase sólida (MSPD) foi eficaz para extrair HPAs de alta massa molecular (como fluoranteno, pireno, benzo[a]antraceno, criseno, benzo[b]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno, benzo[a]pireno, indeno [1,2,3 -cd]pireno, dibenz[a,h]antraceno e benzo[g,h,i]períleno), enquanto o método de microextração em fase líquida assistida por ar e aprimorada por ultrassom (UE-AA-LLME) mostrou melhor desempenho para HPAs de baixa massa molecular (naftaleno, 2-metilnaftaleno, acenaftíleno, 1-metilnaftaleno, acenafteno, fluoreno, fenantreno e antraceno), com taxas de recuperação variando de 60% a 120%. As análises indicaram que os níveis de HPAs nas amostras de peixes locais estavam em conformidade com as normas de segurança alimentar da Comissão Europeia N° 2023/915. Para a extração de ftalatos foram empregados os solventes eutéticos profundos (DES) e quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por UV (HPLC-UV). A mistura de mentol e citronelol (1:1) alcançou taxas de recuperação de 95% a 98%. Amostras da Estação de Tratamento de Águas Residuais (ETAR) do Freixo, no Porto, apresentam os compostos dietil ftalato (3,55 com limites de detecção na faixa de 0,4 a 4,4 $\mu\text{g L}^{-1}$) e di-isobutil ftalato (2,67 $\mu\text{g L}^{-1}$) apenas nas águas antes do tratamento. No efluente da ETAR do Freixo, todos os ftalatos quantificados apresentaram-se abaixo do limite de detecção. A investigação de ftalatos em bebidas do comércio local, mostra preocupação sobretudo a respeito de café, chá gelado e suco de limão acondicionados em recipiente plástico, devido a concentrações de di-n-butylftalato e di(2-etyl-hexil)ftalato em níveis superiores aos permitidos pelo Regulamento da Comissão Européia N° 10/2011 (EU, 2011). Os métodos desenvolvidos nesta tese aprimoram as técnicas de monitoramento ambiental para análise de contaminantes orgânicos, contribuindo para a avaliação de riscos à saúde pública e ao meio ambiente.

Palavras-chave: Águas; bebidas; Contaminação; DES; ftalatos; GC-MS; HPLC; HPAs; peixe

ABSTRACT

This thesis describes the development of analytical methods for the extraction and preconcentration of organic contaminants in environmental matrices, with a focus on the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in fish, and phthalates in wastewater and beverages. The quantification of PAHs was carried out using gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS), and 24 samples of freeze-dried fish fillets were analyzed. These samples were collected at different sites along the coast of Pernambuco affected by the oil spill, between June 2021 and December 2020. The matrix solid-phase dispersion (MSPD) method was effective for the extraction of high-molecular-weight PAHs (such as fluoranthene, pyrene, benzo[a]anthracene, chrysene, benzo[b]fluoranthene, benzo[k]fluoranthene, benzo[a]pyrene, indeno[1,2,3-cd]pyrene, dibenz[a,h]anthracene, and benzo[g,h,i]perylene), whereas ultrasound-enhanced air-assisted liquid–liquid microextraction (UE-AA-LLME) showed superior performance for low-molecular-weight PAHs (naphthalene, 2-methylnaphthalene, acenaphthylene, 1-methylnaphthalene, acenaphthene, fluorene, phenanthrene, and anthracene), with recovery rates ranging from 60% to 120%. The analyses indicated that PAH levels in local fish samples were in compliance with the food safety standards established by European Commission Regulation N° 2023/915. For the extraction of phthalates, deep eutectic solvents (DES) were employed, followed by quantification by high-performance liquid chromatography with UV detection (HPLC-UV). The menthol–citronellol mixture (1:1) achieved recovery rates between 95% and 98%. Samples from the Freixo Wastewater Treatment Plant in Porto contained diethyl phthalate ($3.55 \mu\text{g L}^{-1}$) and di-isobutyl phthalate ($2.67 \mu\text{g L}^{-1}$) only in the influent waters prior to treatment. In the WWTP effluent, all quantified phthalates were below the limit of detection. The investigation of phthalates in beverages from the local market raised particular concern regarding coffee, iced tea, and lemon juice packaged in plastic containers, due to concentrations of di-n-butyl phthalate and di(2-ethylhexyl)phthalate exceeding the limits established by European Commission Regulation N° 10/2011 (EU, 2011).

The methods developed in this thesis improve environmental monitoring techniques for the analysis of organic contaminants, thereby contributing to the assessment of risks to public health and the environment.

Keywords: Water; beverages; contamination; DES; phthalates; GC-MS; HPLC; PAHs; fish

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Funcionários da Prefeitura de Tamandaré (PE) trabalham para remoção de óleo bruto na praia dos Carneiros, no dia 18/10/2019	24
Figura 2 - Intemperização do óleo bruto no mar.....	26
Figura 3 - Redução da dimensionalidade dos dados pela PCA. Os dados originalmente em três dimensões são descritos por duas PCs. A PC1 a componente principal 1 detém mais informação estatística que a PC2, e estas são ortogonais entre si	40
Figura 4 - Representação da transformação de PCA sobre um conjunto de dados originais (matriz X).	40
Figura 5 - Representação dos diferentes tipos de <i>outliers</i> , identificados pela ROBPCA, culminando na disposição das amostras no mapa de diagnóstico para <i>outliers</i>	43
Figura 6 – Fluxograma com as etapas da extração de compostos aromáticos em petróleo: Fracionamento.....	52
Figura 7 – Metodologia para extração de HPAs em peixe: Saponificação- UE-AA-LLME	54
Figura 8 - Metodologia para extração de HPAs em peixe: Saponificação-QuEChERS	55
Figura 9 – Metodologia para extração de HPAs em peixe: MSPD.....	57
Figura 10 - Metodologia para extração de ftalatos usando DES.....	60
Figura 11 - Estrutura química dos HPAs metilados, e que foram monitorados no presente estudo	63
Figura 12 – Cromatograma ilustrando a separação obtida a partir do método escolhido, considerando a injeção de um mix de HPA 1000 ng mL ⁻¹	64
Figura 13 - Gráfico de resíduos para o ajuste do modelo para 2-metilnaftaleno.....	67
Figura 14 - Perfil cromatográfico (TIC) do (A) do padrão de HPAs 1000 ng mL ⁻¹ contendo bifenila (5000 ng mL ⁻¹); e frações de petróleo, extraídas por fracionamento, sendo Fração 1(B), Fração 2 (C), Fração 3 (D) e Mistura das frações (E). Em (F) encontram-se as mesmas frações sobrepostas, sendo: Fração 1(em preto), Fração2 (em rosa), Fração 3 (em azul) e mistura das frações (em marrom).....	69

Figura 15 - Montagem para os testes de saponificação em banho maria, com tubos de ensaio macro vedados com Parafim, e termômetro digital	71
Figura 16 - Resultado dos testes iniciais para saponificação-DLLME. (A) Massa de peixe e mistura KOH (2 mol L ⁻¹): CH ₃ OH antes do aquecimento; (B) O mesmo sistema após 30 minutos de aquecimento; (C) Resultado após saponificação (Teste 2) e DLLME; (D) Resultado após Saponificação (Teste 3) e DLLME, com adição de 0,5g de NaCl.....	74
Figura 17 - Resultado da melhor condição de extração de HPAs em peixe por Saponificação-UE-AA-LLME, com base na inspeção visual, após 1h de saponificação e banho ultrassônico durante a extração.....	75
Figura 18 - Ensaios de recuperação (%) para UE-AA-LLME com (a) 30 min, (b) 1h ou (b) 2h de saponificação e etapa de banho ultrassônico	77
Figura 19 - Ensaios de recuperação para UE-AA-LLME com (a) 30 min, (b) 1h ou (b) 2h de saponificação, sem banho ultrassônico	78
Figura 20 - Perfil cromatográfico (TIC) do (A) mix de padrão de HPAs 1000 ng mL ⁻¹ e (B) perfil médio de HPAs extraídos usando o método de saponificação-QuEChERS em peixe cavala.....	82
Figura 21 - Perfil cromatográfico (TIC) do (A) mix de padrão de HPAs 1000 ng mL ⁻¹ e (B) perfil médio de extraído preliminar de saponificação-QuEChERS em peixe cavala ...	83
Figura 22 – (A) Resultado do teste inicial e (B) da melhor metodologia para Saponificação-QuEChERS. Na melhor metodologia a fase superior mais pigmentada indica que a extração foi mais significativa.....	84
Figura 23 - Ensaios de recuperação (%) para QuEChERS com (A) 30 min, (B) 1h ou (C) 2h de saponificação, sem banho ultrassônico	85
Figura 24 – Estudo do efeito de matriz para (A) 1-Metilnaftaleno e (B) Fluoreno. Considerando a curva analítica (Curva), e as metodologias UE-AA-LLME (L), UE-AA-LLME com etapa de ultrassom (LU) e QuEChERS (Q), com saponificação durante 1h. ..	87
Figura 25 - Ensaios de recuperação (%) de HPAs em peixe após extração por MSPD.....	89
Figura 26 - Recuperação de p-Terfenil após extração por MSPD, em peixes da espécie cavala (CV4A,12 e 48), oparu (O3), pampo (PP1,2 e 3), saramunete (S), tainha (TP3) e xaréu (XA7).	90

Figura 27 - (A) Visualização dos dados brutos e (B) dos dados autoescalados de peixe (Cavala), primeira fração de petróleo (PetroFrac_1), segunda fração de petróleo (PetroFrac_2), terceira fração de petróleo (PetroFrac_3) e mistura das três frações (PetroMix).....	92
Figura 28 - HCA com cálculo de distância Euclidiana (A) pelo método dos vizinhos mais próximos e (B) método dos vizinhos mais distantes de peixe (Cavala), primeira fração de petróleo (PetroFrac_1), segunda fração de petróleo (PetroFrac_2), terceira fração de petróleo (PetroFrac_3) e mistura das três frações (PetroMix).	94
Figura 29 - Gráfico de autovalores para os cálculos de PCA robusta (ROBPCA)	95
Figura 30 - Distância de score versus distância ortogonal, para identificação de amostras anômalas	96
Figura 31 - Gráfico biplot representando scores (□) e loadings (●) em CPCA	97
Figura 32 - Gráfico biplot representando scores (□) e loadings (●) em ROBPCA.....	97
Figura 33 - Gráfico de autovalores para os cálculos de (A) ROBPCA e (B) CPCA para o perfil de HPAs em 24 amostras de peixe.....	99
Figura 34 - Identificação de amostras anômalas, considerando os analitos recuperados pelo método UE-AA-LLME com ultrassom. Para 24 amostras de peixe	99
Figura 35 - Cromatogramas individuais das amostras da pampo (A) PP1(B) PP2 e (C) PP3	100
Figura 36 - Cromatogramas de pampo sobrepostos, em recorte.....	101
Figura 37 - Gráficos de score para (a) PC1 vs. PC2, (c) PC1 vs. PC3 e gráficos Biplot para (c) PC1 vs. PC2 e (d) PC1 vs. PC3 para os HPAs de baixa massa molar extraídos de amostras de peixes com método EU-AA-LLME.	103
Figura 38 - Gráfico de scores (a) PC1 vs. PC2 vs. PC3 e Gráficos biplot (b) PC1 vs. PC2 e (c) PC1 vs. PC3 para os HPAs de alta massa molar extraídos de amostras de peixes com o método de MSPD.	104
Figura 39 - Montagem do sistema para preparo das misturas eutéticas, consistindo de chapa de aquecimento e sistema de agitação magnética.	105
Figura 40 - Teste para avaliar a solubilidade do solvente eutético em água. Sendo estes DES menos densos que a água, eles se depositam na fase superior do tubo	106

Figura 41- Estação de Estação de Tratamento de Águas Residuais (ETAR) do Freixo, situada na margem norte do Rio Tinto, no Porto, Portugal. 111

Figura 42 - Bebidas adquiridas no comércio local do Porto, utilizadas para análise dos ftalatos. Foram avaliados sucos, chás gelados, cafés e refrigerantes, acondicionados em recipientes de metal, plástico e/ou papel 114

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Método cromatográfico aplicado à separação de HPAs, a partir de um mix de padrões com concentração 10 ng mL ⁻¹	50
Tabela 2 - Método cromatográfico utilizado para leitura dos extraídos por MSPD	58
Tabela 3 – Programa de temperatura fornecido pela coluna GC Zebron SemiVolatile ...	63
Tabela 4 - Tempos de retenção (TR) e razão m/z de quantificação e o íon de confirmação selecionados no modo SIM.....	65
Tabela 5 - ANOVA para o 2-metilnaftaleno.....	66
Tabela 6 - Parâmetros de validação do método cromatográfico para determinação de HPA	67
Tabela 7 - Concentrações de HPAs (ng mL ⁻¹) nas frações extraídas de petróleo sem fortificação na amostra coletada em Itapuama.....	68
Tabela 8 - Teor de HPA, em µg kg ⁻¹ , em filé após UE-AA-LLME	81
Tabela 9 - Concentrações de HPAs (ng mL ⁻¹) em peixe sem fortificação. Análise de teste preliminar para Saponificação- QuEChERS.....	83
Tabela 10 - Teor de HPA, em µg kg ⁻¹ , em filé seco após procedimento MSPD	91
Tabela 11 – Avaliação da etapa de salting-out, para extração com solventes eutéticos... 108	
Tabela 12 - Parâmetros de validação do método HPLC-UV, para determinação de ftalatos	109
Tabela 13 - Parâmetros de linearidade para método GC-MS/MS, para determinação de ftalatos.....	110
Tabela 14 - Análise do teor de ftalatos, após extração por DES e análise por HPLC, em amostras coletadas na Estação de Tratamento de Águas Residuais do Freixo (ETAR) ...	111
Tabela 15 - Análise do teor de ftalatos, após extração por DLLME e análise por GC-MS/MS, em amostras coletadas na Estação de Tratamento de Águas Residuais do Freixo (ETAR)	112
Tabela 16 - Teores de ftalatos em águas residuais, antes e após tratamento na ETAR, conforme determinado por outros autores.	113

Tabela 17 – Concentrações de ftalatos ($\mu\text{g L}^{-1}$) em bebidas comercializadas no Porto, após extração com DES e detecção por HPLC-UV 115

Tabela 18 – Concentrações de ftalatos ($\mu\text{g L}^{-1}$) em bebidas comercializadas no Porto, após extração com DLLME e detecção por GC-MS/MS 116

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância (do inglês, <i>Analysis of variance</i>)
CPCA	Análise de Componentes Principais Clássica (do inglês <i>Classical Principal Component Analysis</i>)
DLLME	Microextração líquido-líquido dispersiva (do inglês <i>dispersive liquid–liquid microextraction</i>)
GC-MS	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (do inglês, <i>Gas Chromatography Mass Spectrometry</i>)
HCA	Análise de Agrupamentos Hierárquica (do inglês, <i>hierarchical cluster analysis</i>)
HPA	Hidrocarboneto policíclico aromático
MAE	Extração assistida por microondas (MAE, do inglês <i>microwave-assisted extraction</i>)
MSPD	Dispersão da matriz em fase sólida (do inglês, <i>matrix solid phase dispersion</i>)
NIPALS	Mínimos Quadrados Parciais Não-Iterativos (do inglês, Non-Iterative Partial Least Squares)
QuEChERS	Método de extração rápido, fácil, barato, eficaz, robusto e seguro (do inglês, <i>quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe</i>)
RobPCA	Análise de componentes principais robusta (do inglês <i>Robust Principal Component Analysis</i>)
SVD	Decomposição de valores singulares (do inglês, <i>Singular Value Decomposition</i>)
EU-AA-LLME	Microextração líquido-líquido assistida por ar e aprimorada por ultrassom (do inglês, <i>Ultrasound-enhanced air-assisted liquid–liquid microextraction</i>)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA E REVISÃO DA LITERATURA.....	22
2.1 DERRAMAMENTO DE ÓLEO NO BRASIL E O CASO DE 2019	22
2.2 PETRÓLEO E OS HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS (HPA).....	25
2.3 ANÁLISE DE HPA EM PEIXE E MÉTODOS DE EXTRAÇÃO.....	29
2.4 FTALATOS EM ÁGUAS RESIDUAIS E BEBIDAS, E MÉTODOS DE EXTRAÇÃO COM SOLVENTES EUTÉTICOS (DES)	34
2.5 ANÁLISE EXPLORATÓRIA DOS DADOS.....	39
2.5.1 <i>PCA clássica</i>	39
2.5.2 <i>PCA robusta (RobPCA)</i>	42
2.5.3 <i>HCA</i>	44
2.6 IMPUTAÇÃO DE DADOS FALTANTES	45
3 METODOLOGIA.....	47
3.1 INSTRUMENTAÇÃO.....	47
3.2 MATERIAIS E REAGENTES	48
3.3 AMOSTRAS.....	49
3.4 MÉTODO GC-MS PARA HPAs.....	50
3.5 EXTRAÇÃO DE HPA EM PETRÓLEO.....	50
3.6 EXTRAÇÃO DE HPA EM PEIXE	52
3.6.1 <i>Extração de HPAs em peixe: Saponificação- UE-AA-LLME</i>	53
3.6.2 <i>Extração de HPAs em peixe: Saponificação-QuEChERS</i>	55
3.6.3 <i>Extração de HPAs em peixe: Dispersão em fase sólida (MSPD)</i>	56
3.7 ANÁLISE EXPLORATÓRIA DOS DADOS.....	58
3.8 EXTRAÇÃO DE FTALATOS EM ÁGUAS COM USO DE SOLVENTES EUTÉTICOS (DES) E ANÁLISE POR HPLC-UV	59
3.8.1 <i>Síntese de DES e método de extração</i>	59

3.8.2 Método GC-MS/MS para ftalatos	60
3.9 Validação dos métodos para determinação de HPA e Ftalatos	61
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
4.1 MÉTODO GC-MS PARA HPAs.....	63
4.2 EXTRAÇÃO DE HPA EM PETRÓLEO.....	68
4.3 EXTRAÇÃO DE HPA EM PEIXE	71
4.3.1 Extração em fase líquida: Saponificação- UE-AA-LLME	71
4.3.2 Extração em fase líquida: Saponificação-QuEChERS	81
4.3.3 Extração em fase sólida: Dispersão em fase sólida (MSPD).....	88
4.4 ANÁLISE EXPLORATÓRIA DOS DADOS.....	92
4.4.1 Análises preliminares	92
4.4.2 Análise exploratória nos peixes analisados.....	98
4.5 EXTRAÇÃO DE FTALATOS EM ÁGUAS COM USO DE SOLVENTES EUTÉTICOS (DES) E ANÁLISE POR HPLC-UV	104
4.5.1 Síntese de DES e método de extração	104
4.5.2 Validação dos métodos cromatográficos	109
4.5.3 Análise de amostras reais, por HPLC-UV e GC- MS/MS	110
5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	118
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	119
APÊNDICE A	132
APÊNDICE B	133
APÊNDICE C	135
APÊNDICE D	137
APÊNDICE E	146

“O Senhor é quem dá sabedoria; da sua boca procedem o conhecimento e o entendimento.”

(BÍBLIA SAGRADA, Provérbios 2:6)

1 INTRODUÇÃO

Desastres ambientais causados por derramamentos de petróleo têm gerado graves impactos ao ecossistema e à população global (DHAKA; CHATTOPADHYAY, 2021). O Brasil vivenciou, em agosto de 2019, o maior acidente de derramamento de óleo em sua costa, com manchas de petróleo venezuelano de alta densidade atingindo mais de 1000 localidades ao longo de diversos estados, incluindo Pernambuco (G1 PERNAMBUCO, 2022; IBAMA, 2020; MARINHA DO BRASIL, 2021). A resposta tardia das autoridades agravou os danos ambientais e socioeconômicos, prejudicando pescadores artesanais, cuja subsistência foi interrompida (DISNER; TORRES, 2020; MARINHA DO BRASIL, 2021; SILVA; RODRIGUES, 2020). Em 2022, novos fragmentos de óleo, provenientes do Golfo do México, reacenderam a preocupação com a contaminação petrolífera no litoral pernambucano, reforçando a necessidade de monitoramento contínuo (MCTI, 2022; SEMAS, 2022).

O petróleo líquido, composto por uma complexa mistura de substâncias com potenciais efeitos carcinogênicos e mutagênicos, tem como principais componentes os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs). A Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (US EPA) classificou 16 HPAs como poluentes prioritários devido à sua toxicidade (PAZ *et al.*, 2017), com alguns apresentando ação carcinogênica comprovada (LERDA, 2011). Em conformidade, o Regulamento da Comissão Européia N° 2023/915 (EU, 2023) determina o teor máximo permitido de benzo(a)pireno em peixe defumado e produtos defumados da pesca a concentração de $2,0 \mu\text{g kg}^{-1}$ de peso fresco, e a soma de benzo[a]pireno, benz[a]antraceno, benzo[b]fluoranteno e criseno possui o teor máximo permitido de $12,0 \mu\text{g kg}^{-1}$.

Devido ao consumo generalizado de peixes e sua exposição direta a fontes de contaminação aquática, torna-se essencial o desenvolvimento de metodologias eficientes para a determinação de HPAs nesse alimento (PAZ *et al.*, 2017). Para tal, é necessário otimizar métodos de preparo de amostras, seguidos da determinação dos analitos por técnicas de detecção apropriadas (MCNAIR; MILLER, 2009). A cromatografia gasosa hifenada à espectrometria de massas (GC-MS) é uma técnica simples, versátil e de excelente resolução, sendo bastante empregada para determinação de HPAs em peixes (BEYER *et al.*, 2010; MAHUGIJA; NJALE, 2018; MITTENDORF *et al.*, 2010) e petróleo (HASHEMI-NASAB; PARASTAR, 2020). Sendo escolhida como principal técnica utilizada neste trabalho.

Além da contaminação por petróleo, o descarte de plásticos representa uma crescente ameaça à saúde humana e ao meio ambiente, evidenciando a urgência de métodos de controle eficazes. Amplamente utilizados em embalagens e brinquedos, os plásticos constituem 85% dos resíduos que chegam aos oceanos (MANO; MENDES, 2004; ROMÃO; SPINACÉ; PAOLI, 2009) e contêm ftalatos. Os ftalatos são compostos químicos frequentemente empregados como plastificantes em recipientes para alimentos, cosméticos e medicamentos. Esses compostos estão associados a sérios riscos à saúde, incluindo carcinogênese, desenvolvimento de asma e distúrbios do espectro autista, devido ao seu potencial neurotóxico (TRASANDE; LIU, B.; BAO, 2022; VENTRICE, P. *et al.*, 2013).

O Regulamento da Comissão Européia Nº 10/2011 (EU, 2011), estabelece a aplicação e limite de migração específica (MLE) para di-n-butilftalato (DBP, 0,3 mg kg⁻¹), benzil-butil ftalato (BBP, 30 mg kg⁻¹) e di(2-etil-hexil) ftalato (DEHP, 1,5 mg kg⁻¹). Além destes, o di-isononil ftalato (DINP) e di-isodecil ftalato (DIDP) têm uso permitido em situações específicas; e a soma destes não deve ultrapassar o MLE de 9 mg kg⁻¹. O Órgão de Registro, Avaliação, Autorização e Restrição de Substâncias Químicas (REACH, [s.d.]) classifica o DBP, BBP e DEHP como substâncias altamente tóxicas para seres humanos e para a vida aquática. A referida diretiva restringe o uso de DEHP em materiais plásticos que não estejam em contato com alimentos e proíbe sua aplicação em produtos de uso único, como tampas e selos (ATSDR, 2022; VENTRICE, P. *et al.*, 2013).

Para a separação e detecção de ftalatos em plásticos e alimentos, as técnicas de cromatografia líquida e gasosa são amplamente utilizadas, exigindo metodologias eficientes para extração e pré-concentração (AIGNASSE *et al.*, 1995; AL-NATSHEH *et al.*, 2015; BABU-RAJENDRAN *et al.*, 2018; GONZÁLEZ-SÁLAMO *et al.*, 2018). Os solventes eutéticos profundos (DES) emergem como uma alternativa promissora aos solventes orgânicos convencionais, apresentando baixa toxicidade, baixa volatilidade, alta estabilidade térmica e fácil síntese ou preparo. Esses solventes são obtidos pela combinação de diferentes precursores, como cloreto de colina, uréia e glicose (EL ACHKAR; FOURMENTIN; GREIGE-GERGES, 2019).

O presente trabalho apresenta soluções inovadoras e de baixa toxicidade para a extração e pré-concentração de contaminantes orgânicos em matrizes ambientais. O trabalho tem foco em HPAs presentes em peixes e ftalatos em águas, oferecendo avanços na análise de impacto ambiental e segurança alimentar.

A primeira parte do trabalho contribui para o avanço de estratégias aplicadas ao tratamento de peixes com elevado teor de lipídios, uma matriz reconhecidamente desafiadora do ponto de vista analítico e ainda insuficientemente explorada na literatura científica. Colabora com o levantamento de dados sobre os impactos ambientais decorrentes de derramamentos de óleo em Pernambuco, permitindo a extração de 16 HPAs prioritários e dois HPAs metilados (2-metilnaftaleno e 1-metil naftaleno), com quantificação por GC-MS e análises exploratórias para interpretação dos resultados. A segunda parte deste trabalho apresenta uma alternativa rápida e de baixa toxicidade, baseada no uso dos DES, para a extração de DEP, DBP, DEHP, BBP, DiBP e do adipato de di-(2-etyl-hexila) (DEHA) em bebidas e águas residuais, ampliando o conhecimento sobre sistemas de DES eficazes para a extração de ftalatos em matrizes aquosas.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA E REVISÃO DA LITERATURA

2.1 DERRAMAMENTO DE ÓLEO NO BRASIL E O CASO DE 2019

Assim como em outras partes do mundo, acidentes envolvendo derrame de petróleo têm castigado a região costeira do Brasil e seu entorno, ao longo do tempo. Têm provocado intoxicação, asfixia, redução da iluminação dos corpos d'água impedindo a fotossíntese e disponibilidade de oxigênio – culminando na morte de várias espécies – além de afetar economicamente a vida dos locais que dependem da pesca e turismo (DHAKA; CHATTOPADHYAY, 2021).

No Brasil, o primeiro derrame em grande escala foi registrado em março de 1975. No episódio, um navio cargueiro fretado pela Petrobrás provocou o vazamento de cerca de 6 mil toneladas de óleo bruto nas águas da Baía de Guanabara (RJ). Desde 1975, dezenas de outros eventos foram registrados, sendo provocados pelo tráfego de navios cargueiros ou até mesmo pelo mal funcionamento de dutos nas plantas de exploração (AMBIENTEBRASIL, [s.d.]).

O **Quadro 1** sumariza alguns dos principais desastres ambientais envolvendo o derramamento de óleo bruto no Brasil.

Quadro 1 - Alguns dos principais acidentes com petróleo já registrados no Brasil

Período	Localização	Descrição
Mar/1975	Baía de Guanabara (RJ)	Cargueiro fretado pela Petrobrás derramou 6 mil toneladas de óleo na Baía de Guanabara.
Out/1983	Bertioga (SP)	3 milhões de litros de óleo vazaram de um oleoduto da Petrobrás em Bertioga.
Mai/1994	Vários municípios (SP)	2,7 milhões de litros de óleo atingiram 18 praias do litoral norte paulista.
Mar/2000	Tramandaí (RS)	Vazamento de cerca de 18 mil litros de óleo cru em Tramandaí (RS), durante tráfego de um navio petroleiro rumo ao Terminal Almirante Soares Dutra (Tedut), da Petrobras, na cidade.
Jul/2000	Araucária (PR)	Vazamento de 4 milhões de litros de óleo nos rios Barigüi e Iguaçu (PR), provocado por ruptura na tubulação da Refinaria Presidente Getúlio Vargas (Repar – Petrobrás). O acidente só foi detectado após duas horas, se tornando o maior desastre ambiental provocado pela Petrobras em 25 anos.
Mar/2016	Cubatão (SP)	Vazamento de petróleo no rio Cubatão, na cidade de Cubatão (SP).

Jun/2018	Baía de Todos os Santos (BA)	Vazamento de óleo por rompimento de duto da Petrobras contaminou a Baía de Todos-os-Santos (BA), afetando a vida de comunidades quilombolas.
Ago/2019	Litoral do Nordeste e Sudeste	Considerado um dos maiores acidentes com petróleo no Brasil, devido a extensão de áreas atingidas. Manchas de óleo bruto de alta densidade foram avistadas ao longo de toda a costa do Nordeste e Sudeste.
Jan/2022	Litoral do Ceará	No Ceará 64 praias de 13 municípios apresentaram manchas de óleo, com a retirada de 4 mil litros de petróleo cru. A causa do aparecimento das manchas ainda é desconhecida. Segundo análise da Marinha, o material deste ano seria diferente do encontrado em 2019. (CNN BRASIL, 2022)
Ago/2022	Pernambuco e Paraíba	Vestígios de óleo foram encontrados em praias de nove cidades pernambucanas e também no litoral da Paraíba. Ambientalistas apontam que o material que apareceu em 2022 seria diferente do óleo recolhido em 2019. Segundo a Secretaria Estadual de Meio Ambiente (SEMAS), o material estava na faixa de areia “em pequenos fragmentos e em formato de bolotas”

Fonte: (AMBIENTEBRASIL, [s.d.]; CNN BRASIL, 2022)

O derramamento de petróleo ocorrido em 2019

Em agosto de 2019 ocorreu um dos maiores desastres socioambientais em extensão do país, ocupando mais de 3000 km da costa brasileira. Neste ano, pelotas de óleo bruto de alta densidade foram observadas nas praias de Tambaba e Gramame, no município de Conde (Paraíba). Em poucos meses, manchas de mesma procedência foram vistas ao longo de toda costa do Nordeste e Sudeste (Rio de Janeiro e Espírito Santo).

O último relatório publicado pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA, 2020), em 20 de março de 2020, relata que manchas de óleo atingiram 1009 localidades, sendo 130 municípios, em 11 estados. Segundo a Marinha do Brasil, mais de 5 mil toneladas de petróleo foram retiradas da costa brasileira (MARINHA DO BRASIL, 2021). Constatou-se, através de análises de cromatografia gasosa (*fingerprint*), que o petróleo possui origem venezuelana, sendo um navio petroleiro grego responsabilizado pelo lançamento da substância oleaginosa no oceano (DISNER; TORRES, 2020; LOURENÇO *et al.*, 2020; MJSP, 2021; SOARES *et al.*, 2020).

No estado de Pernambuco (**Figura 1**), o petróleo atingiu diversas praias dos municípios de Tamandaré, Barreiros, Sirinhaém, Ipojuca, Cabo de Santo Agostinho, Jaboatão dos Guararapes, São José da Coroa Grande, Paulista, Goiana e Itamaracá. As praias atingidas são listadas no **APÊNDICE B**.

Figura 1 - Funcionários da Prefeitura de Tamandaré (PE) trabalham para remoção de óleo bruto na praia dos Carneiros, no dia 18/10/2019



Foto: Carlos Ezequiel Vannoni/Agência Pixel Press/Estadão Conteúdo)

Entre 17 de outubro e 01 de novembro de 2019, foram recolhidas 1.562 toneladas de óleo de praias e rios do Estado. O material coletado foi enviado para o Centro de Tratamento de Resíduos Pernambuco, em Igarassu, sendo aproveitado como combustível em fábricas de cimento (G1 PERNAMBUCO, 2022).

No entanto, a atuação tardia do poder público na apuração e implementação do Plano Nacional de Contingência, para mitigação dos impactos causados pelo incidente, intensificou os prejuízos sobre os habitats e comunidades locais (DISNER; TORRES, 2020; MARINHA DO BRASIL, 2021), evidenciando a vulnerabilidade financeira e alimentar dos pescadores artesanais de Pernambuco (SILVA; RODRIGUES, 2020).

Um estudo publicado por SILVA e RODRIGUES (2020) envolveu entrevistas com 44 pescadores artesanais de 9 regiões do estado de Pernambuco, através da aplicação de questionários. Dentre os entrevistados, 54,5% relataram ter passado por dificuldades financeiras causadas por impactos diretos do derramamento do petróleo ou pela quebra da cadeia produtiva do pescado. Durante o aparecimento das manchas do óleo, estes trabalhadores foram proibidos de pescar, vender ou consumir os pescados. Ainda assim, 65% dos entrevistados afirmaram ter mantido o consumo de pescado durante o momento da crise, e

destes, 72% afirmam que consumiam peixes apesar do medo de contaminação (SILVA; RODRIGUES, 2020).

No dia 31 de agosto de 2022, a Secretaria de Meio Ambiente e Sustentabilidade de Pernambuco (SEMAS, 2022) relatou o aparecimento de “vestígios de óleo, em pequenos fragmentos ou “bolotas” nas praias de Recife, Olinda, Jaboatão, Paulista, Igarassu, Goiana, Cabo, Itamaracá e Sirinhaém. E, mesmo que o material seja diferente do encontrado no ano de 2019, reforça a importância do monitoramento dos impactos ambientais causados pelo derramamento de óleo no litoral pernambucano.

2.2 PETRÓLEO E OS HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS (HPA)

O petróleo é um produto mineral de origem fóssil normalmente encontrado em bacias sedimentares, cuja composição pode apresentar características marcantes em função de sua origem geográfica (ROSTAMI; ABESSI; AMINI-RAD, 2019). Além da composição, fatores como pressão e temperatura fazem com que este se apresente em estado sólido, líquido ou gasoso (COKER, 2018).

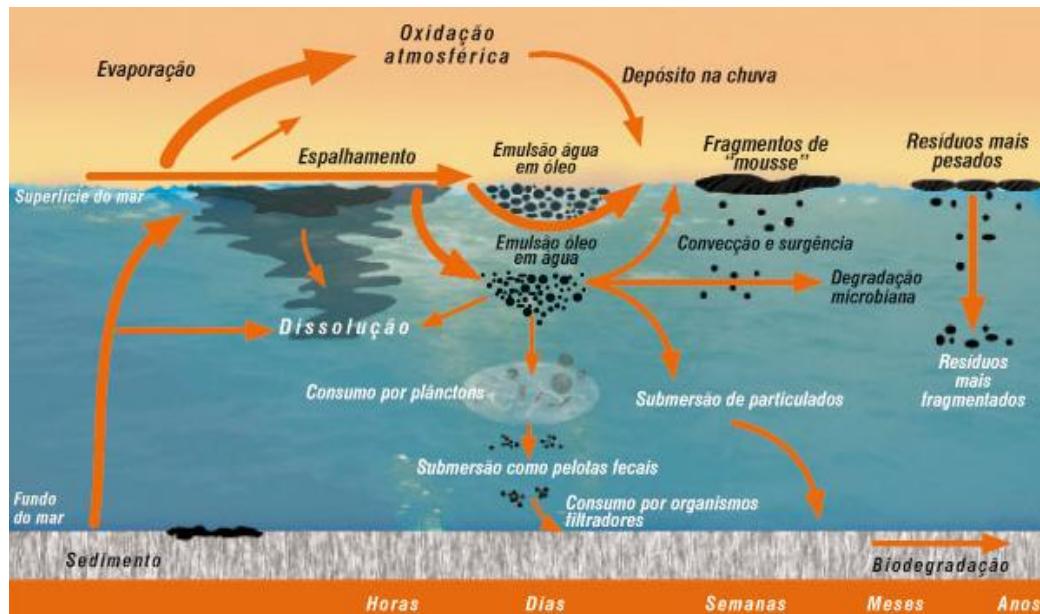
Quando em forma líquida, o petróleo é chamado de óleo bruto ou óleo cru, a fim de ser diferenciado do óleo refinado – que é o de maior interesse comercial. Os hidrocarbonetos leves compõem o gás natural de petróleo, enquanto que a fração dos hidrocarbonetos mais pesados resultam na sua forma semissólida. Dentre os produtos de interesse comercial, produzidos após refino do petróleo, destacam-se o diesel, gasolina, nafta, querosene de aviação, gás liquefeito de petróleo, material de pavimentação, lubrificantes e outros derivados (PETROBRÁS, 2022).

O óleo bruto é uma mistura complexa, de alta toxicidade e menos densa do que a água, cuja composição majoritária é atribuída aos hidrocarbonetos. Além dos hidrocarbonetos saturados e aromáticos, compostos orgânicos hetero funcionalizados contendo nitrogênio, oxigênio e enxofre também são significativos na sua composição, oriundos do material geológico (CHEN, G. *et al.*, 2018; WILL SCH *et al.*, 1997). Em menor quantidade, metais como vanádio e níquel também são encontrados (CHACÓN-PATIÑO *et al.*, 2021).

A lixiviação do óleo bruto durante atividades como mineração, transporte e combustão incompleta, é considerada a principal fonte de resíduos de petróleo na natureza. Quando em contato com o mar ou outros corpos d'água, o óleo bruto sofre uma série de transformações,

como dissolução, transferência, sedimentação, dispersão, evaporação, condições climáticas extremas e foto oxidação química (**Figura 2**), que alteram as propriedades do óleo ao longo do tempo (HETTITHANTHRI *et al.*, 2024).

Figura 2 - Intemperização do óleo bruto no mar



Fonte: (FURTADO, 2011)

Para determinar a origem do petróleo, faz-se necessária a análises dos isótopos estáveis de carbono combinada com a análise cromatográfica de biomarcadores, possibilitando a caracterização inequívoca; como a impressão digital de cada tipo de óleo. Os biomarcadores fósseis, presentes no óleo bruto, correspondem a moléculas presentes em organismos vivos que sofreram modificações mínimas ao longo do processo de formação do petróleo. Entre as principais classes de compostos investigadas, destacam-se os alcanos ramificados, e os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs). (OLIVEIRA *et al.*, 2020).

Os HPAs apresentam em sua estrutura dois ou mais anéis aromáticos fundidos, sendo geralmente classificados em duas categorias principais: HPAs de baixo peso molecular – que possuem 2 a 3 anéis aromáticos –, e HPAs de alto peso molecular, constituídos por 4 ou mais anéis aromáticos fundidos. Os compostos de baixo peso molecular são mais voláteis e apresentam toxicidade relativamente reduzida. Em contraste, os HPAs de alto peso molecular exibem maior estabilidade e toxicidade, em razão de sua resistência ao ataque nucleofílico, atribuída à elevada densidade de elétrons π presente nos anéis aromáticos. Essa característica

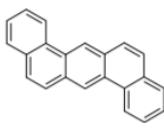
estrutural também lhes confere maior lipofilicidade, favorecendo processos de bioacumulação em organismos vivos (CHEN; INBARAJ; HSU, 2022; PATEL *et al.*, 2020).

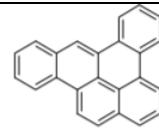
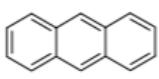
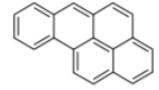
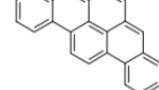
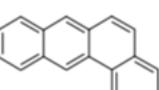
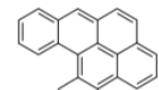
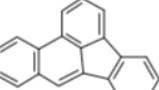
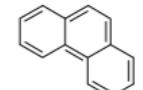
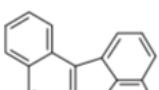
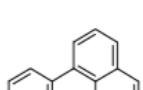
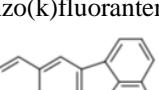
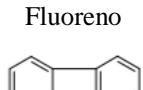
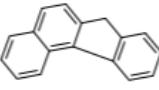
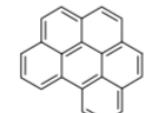
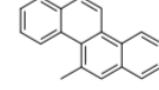
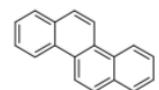
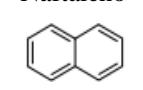
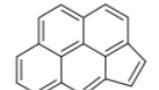
Os HPAs apresentam potencial ação carcinogênica e mutagênica (SETTE *et al.*, 2013), causando efeitos desastrosos ao meio ambiente e a saúde humana, afetando também a pesca e o turismo na região (DHAKA; CHATTOPADHYAY, 2021; ROSTAMI; ABESSI; AMINIRAD, 2019). A principal fonte de contaminação por HPAs em humanos se dá através da ingestão de alimentos contaminados, exposição cutânea e, em menor ocorrência, por inalação (FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ *et al.*, 2008).

Este fenômeno tem despertado a atenção de órgãos reguladores, a fim de garantir a segurança de alimentos que podem ser diretamente expostos a este tipo de contaminante, e assim estabelecer limites para a presença de HPAs em alimentos e no meio ambiente (LERDA, 2011).

O Regulamento da Comissão Européia N° 1881/2006 (EU, 2006a) lista quinze HPAs com feito cancerígeno em gêneros alimentícios (**Quadro 2**), de acordo com o Comitê Científico da Alimentação Humana (*EU Scientific Committee for Food*, SCF) (LERDA, 2011). Este regulamento foi atualizado pelo Regulamento europeu N° 2023/915 (EU, 2023) no que diz respeito aos teores máximos permitidos de benzo[a]pireno em peixe fumado e produtos fumados da pesca passaram a ser de 2,0 µg kg⁻¹ de peso fresco, e a soma de benzo[a]pireno, benzo[a]antraceno, benzo[b]fluoranteno e criseno podem chegar ao teor máximo de 12,0 µg kg⁻¹. Considerando-se os riscos associados à presença dos HPAs em alimentos e no ambiente, o **Quadro 2** apresenta os HPAs mais comumente investigados, a partir de recomendações dos órgãos reguladores europeus.

Quadro 2 - HPAs frequentemente monitorados de acordo com recomendações do Comitê Científico da Alimentação Humana (SCF) da UE, União Europeia (UE) e Agência de Proteção Ambiental dos EUA (EPA). Os HPAs com feito cancerígeno em gêneros alimentícios, de acordo com o Comitê Científico da Alimentação Humana (SCF) estão marcados com (*).

Órgão	Composto	Órgão	Composto
EPA	Acenafteno 	EPA, SCF, EU	Dibenzo[a,h]antraceno * 
EPA	Acenaftileno	SCF, EU	Dibenzo[a,e]pireno *

			
EPA	Antraceno 	SCF, EU	Dibenzo[a,h]pireno * 
EPA, SCF, EU	Benzo(a)pireno * 	SCF, EU	Dibenzo[a,i] pireno * 
EPA, SCF, EU	Benzo(a)antraceno * 	SCF, EU	Dibenzo[a,l]pireno * 
EPA, SCF, EU	Benzo(b)fluoranteno * 	EPA	Fenantreno 
SCF, EU	Benzo(j)fluoranteno * 	EPA	Fluoranteno 
EPA, SCF, EU	Benzo(k)fluoranteno * 	EPA	Fluoreno 
EU	Benzo(c)Fluoreno 	EPA, SCF, EU	Indeno[1,2,3-cd] pireno * 
EPA, SCF, EU	Benzo(g,h,i)perileno * 	SCF, EU	5-Metilcriseno * 
EPA, SCF, EU	Criseno * 	EPA	Naftaleno 
SCF, EU	Ciclopenta(c,d)pireno * 	EPA	Pireno 

Fonte: Adaptado de (EC., 2006; LERDA, 2011)

2.3 ANÁLISE DE HPA EM PEIXE E MÉTODOS DE EXTRAÇÃO

Segundo IKO AFÉ e colaboradores (2021), “o peixe é a fonte de proteína mais disponível comumente consumida em países em desenvolvimento”. A Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO) recomenda o consumo de 12 kg de pescado/ habitante/ ano. No Brasil, de acordo com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), o consumo de peixes pela população é, de aproximadamente 9 kg/ habitante/ ano. No entanto, nas comunidades ribeirinhas da região hidrográfica amazônica, esse valor chega a cerca de 150 kg de pescado/ habitante/ ano (MAPA, 2020).

Dessa forma, identificar e quantificar HPA em tecidos de peixe é fundamental para avaliar os riscos associados ao consumo desse alimento, a qualidade do produto e os impactos da contaminação ambiental (SUNDARAVADIVELU *et al.*, 2022). Em particular, muitos estudos se concentram nos 16 HPAs considerados prioritários pela União Européia: Naftaleno, Acenaftileno, Acenafteno, Fluoreno, Fenantreno, Antraceno, Fluoranteno, Pireno, Benzo[g,h,i]perileno, Benzo[a]antraceno, Criseno, Benzo[b]fluoranteno, Benzo[k]fluoranteno, Benzo[a]pireno, Indeno[1,2,3-cd]pireno, e Dibenz[a,h]antraceno. Sendo os sete últimos considerados potenciais carcinogênicos em humanos (US EPA, 1998; PAZ *et al.*, 2017).

A determinação de HPAs em peixes representa um desafio devido à complexidade desta matriz, que é composta por aproximadamente 0-84% de água, 15-24% de proteínas, 0,1-22% de gordura, 1-2% de minerais, incluindo 0,5% de cálcio, 0,25% de fósforo e 0,1% de vitaminas A, B, C e D. Por isto, pesquisadores de diferentes partes do mundo têm aplicado esforços no desenvolvimento de metodologias para a determinação de HPAs nesta matriz, com cada estratégia apresentando vantagens e limitações (ABRAHA *et al.*, 2018; BYRD; THILSTED; FIORELLA, 2021; SUNDARAVADIVELU *et al.*, 2022).

Um dos principais desafios para determinação de HPA em peixe é o elevado teor de gordura desta matriz, o que demanda procedimentos muitas vezes laboriosos e não são suficientes para a total remoção de gordura no extraído. Por sua vez, a presença de resíduos de gordura no extraído prejudica o sistema cromatográfico (em especial, cromatografia gasosa) e pode suprimir o sinal dos analitos (SLÁMOVÁ *et al.*, 2020).

As principais metodologias para extração de HPAs em peixe podem ser divididas em dois grupos: extração em meio líquido (DLLME e QuEChERS) e dispersão em meio sólido (MSPD). Na extração em meio líquido, busca-se a dissolução da matriz sem degradar os analitos (SLÁMOVÁ *et al.*, 2020). Já a dispersão em meio sólido ocorre geralmente pelo

rompimento da estrutura da matriz, ocasionado pela abrasão manual, utilizando adsorventes caros ou de disponibilidade limitada para análises de rotina, como C18 e Florisil. Além disto, técnicas mais sofisticadas como o uso de cartuchos comerciais, ou sistemas pressurizados de extração de fluidos automático, são frequentemente empregados para eluição dos analitos com solventes extractores, (BARCELLOS HOFF *et al.*, 2022; PENSADO *et al.*, 2005; PORTET-KOLTALO *et al.*, 2021).

Neste intuito, GHASEMZADEH-MOHAMMADI e colaboradores (2012) desenvolveram uma metodologia para extração assistida por micro-ondas (MAE, do inglês *microwave-assisted extraction*) seguida de microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME, do inglês *dispersive liquid–liquid microextraction*), para determinação de 16 HPAs em filé de peixe defumado, através da técnica de GC-MS com monitoramento de íon selecionado (SIM). Para realizar a MAE, 1g de filé congelado foi moído e fortificado com 1 mL de padrão de HPAs, homogeneizado e transferido para um recipiente de vidro. A fim de hidrolisar e saponificar a amostra, foram adicionados 12 mL da mistura aquosa KOH (2 mol L⁻¹):CH₃OH (50:50) e o recipiente selado foi submetido à radiação micro-ondas durante 2 minutos a 500 MHz. Após resfriamento, a mistura foi transferida para um tubo cônico, centrifugada (4000 rpm por 5 minutos) e foi feito o ajuste da fase aquosa para o pH neutro, com adição de HCl. Para precipitar as proteínas, foram adicionados 2 mL de solução de Carrez que consiste na solução de ferrocianeto de potássio e acetato de zinco (50:50). O tubo foi novamente submetido à centrifugação e a fase límpida transferida para outro tubo para realizar a DLLME. Na DLLME, a seguinte mistura foi rapidamente injetada: 100 µL de tetracloroetileno (C₂Cl₄) + 500 µL de acetona (CH₃(CO)CH₃) + 2 µL de bifenila (40 µg mL⁻¹). O tubo contendo a mistura foi agitado, centrifugado (4000 rpm por 10 minutos) e a fase depositada ao fundo, contendo C₂Cl₄, foi coletada e injetada no GC-MS. Os autores concluíram que o método proposto é preciso, rápido e confiável, permitindo a quantificação de HPAs em níveis muito baixos, com limites de detecção (LD) entre 0,11 e 0,43 ng g⁻¹. Além disto, foi obtida a faixa linear de 1–200 ng g⁻¹ para os analitos e R² > 0,981.

SLÁMOVÁ e colaboradores (2020) buscaram avaliar duas metodologias, através do método de adição de padrão, para permitir o isolamento e análise de 21 HPAs em peixe, queijo e linguiça defumados por GC-MS. Os métodos de extração avaliados foram: QuEChERS clássico e QuEChERS com uma etapa de limpeza adicional com remoção de lipídios (EMR), de estrutura não divulgada pelo fabricante. Ao final da etapa de extração duas técnicas de pré-concentração do extrato foram avaliadas: secagem sob fluxo de nitrogênio e uso de DLLME. Os autores concluíram que a melhor metodologia foi a que envolveu as

etapas: QuEChERS com EMR e pré-concentração por DLLME. Para isto, 1 g de peixe foi adicionado a um tubo cônico, juntamente com os padrões de $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ HPAs. No emprego do QuEChERS, ao tubo foram adicionados 5 mL de água e 10 mL de acetonitrila (CH_3CN) e a mistura homogeneizada por agitação. Em seguida, foi adicionada a mistura de 1,5 g de NaCl e 5 g de MgSO_4 e o tubo foi agitado e centrifugado. A limpeza foi realizada por EMR e continuou o procedimento do QuEChERS que consiste em após centrifugação, 5 mL do filtrado foram transferidos para outro tubo contendo o EMR + 5 mL de água. A mistura foi homogeneizada e centrifugada. O sobrenadante foi transferido para outro tubo e foram adicionados 0,4 g de NaCl + 1,6 g de MagSO_4 , seguido de homogeneização e centrifugação.

Na sequência 2 mL da fase superior foram transferidos para outro tubo cônico. Na etapa de pré-concentração, adicionou-se 6 mL de água + 0,2 mL de clorofórmio aos 2 mL da fase superior. O tubo foi agitado, centrifugado, a fase orgânica foi transferida para um vial e deixada para evaporar. Os resíduos foram dissolvidos em hexano antes da análise por GC-MS. Com esta metodologia, os autores obtiveram taxas de recuperação entre 50 e 120% para todos os HPAs avaliados, com valores de desvio padrão relativo (RSD) inferiores a 16,7% e LQ inferiores a $0,9 \mu\text{g kg}^{-1}$ (que é o limite máximo estipulado pelo Regulamento Nº 836/2011 da Comissão Europeia (EC, 2011). Embora o método envolva uma série de etapas, os autores garantem que sua execução é rápida, e que é ideal para determinação de HPAs em matrizes com alto teor de gordura, como peixes.

MAN e colaboradores (2020) buscaram avaliar os riscos à saúde pela contaminação de 16 HPAs em peixes de água doce cultivados usando dietas à base de resíduos alimentares e dietas comerciais. Para permitir o isolamento dos HPAs nos peixes, os autores recorreram à extração pelo método QuEChERS seguido de extração em fase sólida dispersiva (dSPE). As análises foram realizadas por GC-MS. Para realizar o método QuEChERS pesou-se 0,5g de peixe fresco em tubo cônico, em seguida foram adicionados 12 mL de água deionizada + 15 mL de CH_3CN . Em seguida, foi adicionada a mistura composta por 6 g de MgSO_4 + 1,3 g de NaCl. Os tubos foram agitados em vórtex (3 minutos) e centrifugados (4000 rpm por 5 minutos). Para o dSPE, 8 mL da fase superior, obtida após realizar o QuEChERS, foram transferidos para um tubo de dSPE de 15 mL para amostras gordurosas (Agilent Bond Elut). O tubo foi agitado e centrifugado e o sobrenadante foi filtrado com filtro de membrana PTFE de 0,20 mm antes da análise por GC-MS. Os autores utilizaram uma curva analítica na faixa de $0,120 \text{ ng mL}^{-1}$ a $1,000 \text{ ng mL}^{-1}$. Um padrão deuterado de HPAs (de concentração 320 ng g^{-1}) foi adicionado a todos os extraídos e padrões para construção da curva analítica. A mesma

metodologia para isolamento dos HPAs foi aplicada aos resíduos alimentares e às dietas comerciais de controle, consumidas pelos peixes. O método proposto permitiu baixos níveis de recuperação – em torno de 25% – indicando não ser eficiente para a determinação de HPAs na matriz escolhida. Ainda assim, os autores assumiram que os peixes cultivados com dietas à base de resíduos alimentares eram comparativamente mais seguros para consumo humano, do que os peixes comprados no Mercado da região chinesa.

IKO AFÉ e colaboradores (2021) estudaram os efeitos da contaminação causada por 15 HPAs e 10 aminas biogênicas presentes em peixes defumados por um processo tradicional do Benin. O estudo teve por objetivo avaliar os riscos potenciais para os consumidores de seu país. As análises foram realizadas usando a técnica de cromatografia líquida de alta performance (HPLC) com detector de fluorescência. Os autores se basearam em um método de extração relatado previamente (BRASSEUR et al., 2007), que consistiu na extração dos analitos por saponificação seguida da extração por DLLME (com ciclohexano, C₆H₁₂), seguida da etapa de limpeza utilizando cartuchos de extração em fase sólida (SPE, do inglês *solid phase extraction*). No entanto, a etapa de extração foi feita utilizando o equipamento extrator de solvente acelerado (ASE 200, Dionex Corporation). Para realizar o preparo, a 1 g de peixe moído (enriquecido com padrão contendo 16 HPAs) e liofilizado, foram adicionados 50 mL de uma solução KOH 2 mol L⁻¹ preparada com etanol/H₂O (v:v, 9:1). A mistura foi colocada sob refluxo durante 30 minutos, adicionou-se 50 mL de C₆H₁₂ e o refluxo mantido por mais 10 minutos. Após este período, foram adicionados 100 mL de água. Os HPAs foram extraídos em C₆H₁₂ e a fase orgânica foi seca pela adição de sulfato de sódio anidro, filtrada e evaporada até a secura. Então, o extraído foi redissolvido em 500 µL de C₆H₁₂. Na etapa de limpeza, o extraído redissolvido foi carregado em cartucho de SPE e eluído em hexano. No entanto, antes da injeção no HPLC o solvente da amostra foi substituído por CH₃CN. A curva analítica para HPAs foi construída na faixa de concentração de 2,5 a 400 pg µL⁻¹, mas para benzo[j]fluoranto e indeno[1,2,3-cd]pireno a curva teve faixa de concentração de 10 a 1600 pg µL⁻¹. E, em cada padrão foi feita adição do padrão deuterado DiP-d14. Por fim, os autores obtiveram limite de quantificação (LQ) para os HPAs de 0,1 µg kg⁻¹ de peso fresco. No entanto, para benzo[j]fluoranto e indeno[1,2,3-cd] pireno o LQ foi de 0,5 µg kg⁻¹ de peso fresco. Os autores concluíram que os peixes analisados apresentaram teores de HPAs além do limite de segurança estabelecido pela União Européia (EC, 2006), representando riscos à saúde do consumidor beninense.

A partir da abordagem do uso mínimo de solventes, surge o método de microextração líquido-líquido assistida por ar e aprimorada por ultrassom (UE-AA-LLME) como uma alternativa que não utiliza um dispersor de solvente, sendo apenas o solvente extrator adicionado à amostra aquosa. A emulsão é formada pelas ondas ultrassônicas. A transferência de massa entre o solvente extrator e a fase aquosa ocorre por meio de movimentos repetidos de ejeção e sucção dentro de uma seringa, reduzindo assim o tempo de extração. Apesar dessas vantagens, essa metodologia tem sido aplicada em matrizes mais simples, como água de rio e urina (BARFI *et al.*, 2015; ZHOU *et al.*, 2022), mas apresenta grande potencial para ser explorada na extração de HPAs em peixes.

Em um número de trabalhos expressivamente menor, encontramos o emprego do MSPD no preparo de amostra para determinação de HPA em pescado. Neste sentido, OLSON, MEYER e PORTIER (2014) propuseram uma adaptação ao método tradicional de MSPD, a fim de quantificar HPA em filé de Gulf menhaden (*Brevoortia patronus*); um peixe de alto teor lipídico. No MSPD, 2,5 g de peixe liofilizado foi disperso em uma mistura sílica: C18 (1:1), com adição de 2-5 g de sulfato de sódio (como agente secante) e 1 mL de fenantreno-d10, padrão de recuperação. Em seguida, foram adicionados 50 mL de diclorometano e a mistura foi sonicada por 30 min. Após sonicação, a amostra foi filtrada através de um filtro Fisherbrand® por gravidade e foram adicionados 10 g de sulfato de sódio. Os recipientes usados na etapa de liofilização e sonicância foram rinsados com o mesmo solvente, para evitar perdas do material entre as etapas. O filtro usado foi acoplado a um coletor a vácuo, que foi acionado após finalizada a filtração por gravidade. O eluente resultante foi transferido para um balão, com o auxílio do diclorometano usado na rinsagem dos recipientes anteriormente mencionados, e levados ao sistema de rotaevaporação para remoção do excesso de solvente. Após este processo, o material residual do balão foi ressuspenso e diluído ao volume total de 15 a 25 mL, com hexano. Uma alíquota de 10 mL foi transferida para outro recipiente e armazenado por longo período, a fim de permitir a sedimentação de partículas após a extração. A sedimentação foi utilizada como uma etapa de limpeza. Por fim, alíquotas de 1 mL deste extraído foram separadas para análise por GC-MS, sendo previamente à análise, fortificadas com 10 µL de padrão interno. Como resultado, a metodologia proposta permitiu a média de recuperação de 88%, com limites de detecção na faixa de 0,4 a 4,4 ng g⁻¹ de massa seca de tecido. No entanto, torna-se evidente a necessidade de filtros e equipamentos específicos, para permitir a reprodução desta metodologia em laboratórios de rotina.

BARCELLOS HOFF e colaboradores (2022) avaliaram o emprego de alguns ingredientes à base de mandioca (amido de mandioca, tapioca e pérolas de tapioca) como matriz para dispersão em fase sólida (MSPD) seguida por extração líquida pressurizada. Esta alternativa de adsorvente verde e de baixo custo foi proposta a fim de permitir a determinação de indeno[1,2,3-cd]pireno, benzo[g,h,i]períleno e benzo[a]pireno em peixe e mexilhão, por HPLC acoplada à espectrometria de massas ou eletroforese. No procedimento descrito pelos autores, 2,0 g de amostra foi misturado à cada produto de mandioca avaliado, e foi iniciado o processo manual para dispersão e homogeneização da matriz em almofariz. Em seguida a mistura foi transferida para um cartucho de extração (Q-cup®) contendo membranas de filtração, acoplada ao sistema de extração pressurizada. A CH₃CN foi utilizada como solvente de extração e limpeza. Um dos critérios para a escolha do material foi a capacidade remoção de gorduras, avaliada através de análises por ressonância magnética nuclear de baixa resolução. Dentre as alternativas avaliadas como fase sólida, o amido de mandioca apresentou igual ou melhores resultados que o polímero comercial (Q-matrix® Hydra) adotado como referência. Para avaliar a eficiência de extração e a capacidade de atingir baixos limites, os autores consideraram como parâmetros a intensidade do sinal analítico (área de pico) e capacidade de remover interferentes da matriz.

2.4 FTALATOS EM ÁGUAS RESIDUAIS E BEBIDAS, E MÉTODOS DE EXTRAÇÃO COM SOLVENTES EUTÉTICOS (DES)

O consumo desenfreado de plásticos tem se mostrado uma ameaça crescente para a saúde humana e o meio ambiente. Estes materiais são normalmente derivados do petróleo bruto (MAFAT *et al.*, 2024) e têm sido empregados na confecção de diferentes tipos de embalagem, brinquedos infantis e peças de montagem. No entanto, após seu tempo de uso, os plásticos passam a compor parte significativa dos resíduos sólidos urbanos e 85% dos resíduos que chegam aos oceanos (MANO; MENDES, 2004; ROMÃO; SPINACÉ; PAOLI, 2009). Segundo o relatório da Organização das Nações Unidas, de 2021, estima-se que o volume de resíduos plásticos nos oceanos poderia triplicar até o ano de 2040 (UNITED NATIONS ENVIRONMENT PROGRAMME (UNEP), 2021). Como agravante da poluição plástica, alguns dos aditivos presentes em sua composição são reconhecidamente perigosos e tóxicos para o homem e os ecossistemas, como é o caso dos ftalatos (VENTRICE, P. *et al.*, 2013).

Os ftalatos são uma classe de compostos químicos amplamente usada como flexibilizantes na fabricação de plásticos. Estão presentes em embalagens de alimentos, cosméticos e medicamentos. Em menor proporção, são também adicionados a xampus, loções e outros produtos de cuidados pessoais, a fim de preservar o perfume. Contudo, estudos apontam que alguns ftalatos apresentam efeitos tóxicos ao sistema reprodutivo, respiratório, atuam como disruptores endócrinos, e podem migrar para o produto acondicionado (EFSA JORNAL, 2005). Os ftalatos podem apresentar efeito carcinogênico, desencadeamento da asma e até mesmo distúrbios do espectro de autismo – devido à potencial ação neurotóxica (TRASANDE; LIU, B.; BAO, 2022; VENTRICE, P. *et al.*, 2013).

Neste sentido, o uso dos ftalatos é controlado principalmente pela legislação sobre materiais em contato com alimentos. Através da Diretiva da Comissão Européia N° 10/2011 (EU, 2011), são estabelecidos as aplicações e o limite de migração específica (MLE) para di-n-butilftalato (DBP, 0,3 mg kg⁻¹), benzil-butil ftalato (BBP, 30 mg kg⁻¹) e di(2-etil-hexil) ftalato (DEHP, 1,5 mg kg⁻¹). Além destes, o di-isonoril ftalato (DINP) e di-isodecil ftalato (DIDP) tem uso permitido em situações específicas, e a soma destes não deve ultrapassar MLE de 9 mg kg⁻¹, e o di-isobutil ftalato (DIBP) é sujeito a proibição. Estes ftalatos são considerados como extremamente preocupantes para saúde humana e vida aquática, pelo Órgão de Registro, Avaliação, Autorização e Restrição de Substâncias Químicas da União Européia (REACH, [s.d.], 2006). As Diretivas N° 2007/19/EC (EU, 2007) e 10/2011 (EU, 2011) restringem o uso do DEHP em materiais plásticos que não estão em contato com alimentos gordurosos, enquanto proíbe para aplicações de uso único (como tampas ou selos) (Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR), 2022; Ventrice et al., 2013).

Com efeito, um estudo, sugere que a exposição diária aos ftalatos pode contribuir com o número de cem mil mortes precoces anuais, de pessoas entre 55 e 60 anos, nos Estados Unidos. O estudo também destaca que, quando presentes em embalagens de PVC, os ftalatos podem migrar para o alimento após longo período de exposição, sendo a migração acelerada pelo aquecimento (TRASANDE; LIU.; BAO, 2022). Portanto, existe a necessidade do controle mais rigoroso dos ftalatos que ainda são permitidos para confecção de embalagens para alimentos e outros bens de consumo (THE GUARDIAN, 2021).

Diferentes técnicas analíticas têm sido empregadas para a determinação de ftalatos em plásticos, águas residuais e em vários alimentos (ABBASI *et al.*, 2024; NDHLALA; NCUBE; STADEN, VAN, 2012; WANG, Cong *et al.*, 2023; WANG, Xiaoyu *et al.*, 2023). Entre essas técnicas, destacam-se HPLC, GC, MS e a ressonância magnética nuclear (RMN)

(AIGNASSE *et al.*, 1995; AL-NATSHEH *et al.*, 2015; BABU-RAJENDRAN *et al.*, 2018; GENAY *et al.*, 2017; GONZÁLEZ-SÁLAMO *et al.*, 2018; WU *et al.*, 2021). Vale ressaltar que, para todas estas técnicas, são necessárias estratégias específicas de extração e preparo da amostra, que normalmente envolvem várias etapas (NDHLALA; NCUBE; STADEN, VAN, 2012).

Para a extração e pré-concentração de ftalatos, a busca por solventes mais “sustentáveis” tem despertado grande interesse na área da Química verde. Nesse sentido, os solventes eutéticos (DES, do inglês *Deep Eutectic Solvents*) vêm se destacando como uma alternativa promissora aos solventes orgânicos convencionais.

Os DES são formados pela mistura de um composto doador de hidrogênio e outro composto receptor de ligação de hidrogênio, na proporção adequada, geralmente sob aquecimento e agitação; até a formação de um líquido homogêneo. O resultando em um composto com ponto de fusão mais baixo do que seus componentes individuais (HU *et al.*, 2024). Esses solventes apresentam vantagens como baixa toxicidade, baixa volatilidade, alta estabilidade térmica e condutividade, além de serem facilmente sintetizados. A maioria dos solventes eutéticos é menos densa que a água e possui alta viscosidade (KAVALIAUSKAS; OLŠAUSKAITĖ; PADARAUSKAS, 2022).

Os materiais de partida utilizados para a síntese dos DES são variados, incluindo cloreto de colina, ureia, glicose, mentol, glicerol e outros (EL ACHKAR; FOURMENTIN; GREIGE-GERGES, 2019; KAVALIAUSKAS; OLŠAUSKAITĖ; PADARAUSKAS, 2022). Devido às diversas vantagens mencionadas, diferentes reagentes podem ser usados para a síntese de DES. Os DES têm sido empregados na extração de diferentes analitos orgânicos, como os ftalatos, em diferentes matrizes aquosas. Alguns autores apresentam diferentes métodos de extração utilizando DES, com nomenclaturas como microextração líquido-líquido por emulsificação (ELLME), micro-extração líquido-líquido assistida por vórtex (VA-LLME) ou DLLME, a depender da densidade do solvente em relação à fase aquosa.

KAVALIAUSKAS e colaboradores (2022) avaliaram seis misturas eutéticas hidrofóbicas, para extração de ftalatos (por ELLME) e parabenos em águas de efluentes por DLLME. Como receptores de ligação de hidrogênio foram considerados mentol, cloreto de tetrabutil amônio e cloreto de tetrahexil amônio. Como doadores de ligação de hidrogênio foram usados ácido trifluoroacético e hexafluor isopropanol. Para a composição dos DES foi considerada a proporção 1:2 (razão molar) do composto doador e receptor. Os autores observaram que os DES baseados em cloreto de tetrahexil amônio apresentaram as mais altas

eficiências de extração (>90%) para os ftalatos em soluções aquosas. Além disto, estes DES apresentaram desempenho consideravelmente melhor do que os solventes clorados convencionais (CH_2Cl_2 , CHCl_3 e C_2Cl_4).

O procedimento de extração acontece em um tubo cônico de vidro de 10 mL, onde foram adicionados 5 mL de solução contendo padrão de ftalatos e parabenos em concentração 2,5 mg L⁻¹ e 0,2 mL de solvente eutético, respectivamente. A mistura foi agitada manualmente (1 min), formando uma emulsão. Em seguida, a mistura foi submetida a centrifugação (300 rpm, 5 min) e a fase de DES (sobrenadante) foi coletada, pelo método de extração DLLME, e analisada por HPLC. Foi utilizada amostra real de efluente, previamente filtrada em filtro de fibra de vidro de 0,7 µm. Em um tubo cônico de vidro de 10 mL foram adicionados 5mL da amostra de água enriquecida com naftaleno a 20 µg L⁻¹ e 50 µL do solvente eutético (cloreto de tetrahexil amônio: ácido trifluoroacético na proporção 1:2). O sistema foi agitado manualmente por 30 segundos e, em seguida, submetido à centrifugação a 3000 rpm por 5 min. A fase aquosa superior foi cuidadosamente aspirada do tubo. A fase eutética (remanescente no fundo do tubo) foi dissolvida em 50 µL de CH_3CN e analisada por HPLC. O estudo e aplicação de DES de densidade maior que a água ainda é mais escasso, reduzindo as extrações por DLLME (KAVALIAUSKAS; OLŠAUSKAITĖ; PADARAUSKAS, 2022).

ÖZGÜR e colaboradores (2023) aplicaram o método de microextração líquido-líquido de emulsificação (ELLME) para extração de BBP e DEHP em água mineral, suco de fruta e águas residuais. A melhor eficiência de extração foi obtida com o uso da mistura eutética hidrofílica composta por cloreto de colina: fenol (1:2, razão molar). As amostras foram aquecidas em seus respectivos recipientes de acondicionamento a diferentes temperaturas, e depois arrefecidas à temperatura ambiente. Para o processo de ELLME, em um tubo cônico de vidro de 20 mL foram adicionados 1 mL do solvente eutético, 1 mL de tetrahidrofurano (THF) como solvente emulsificante, e 10 mL de uma solução denominada de branco de preparo, contendo solução padrão 2 mg L⁻¹ de DEHP + BBP. A mistura foi submetida à agitação em vórtex a 1200 rpm por 30 s, produzindo uma solução turva, e centrifugada a 3000 rpm por 5 min para separação das fases. Por fim, a fase eutética (sobrenadante) foi coletada, transferida para um frasco de GC de 2 mL e preenchido até 500 µL com metanol (CH_3OH) antes da injeção de 1 µL no cromatógrafo. O método proposto apresentou os limites de quantificação de 0,036 mg L⁻¹ para o BBP e 0,005 mg L⁻¹ para o DEHP.

No entanto, é interessante destacar que a propriedade hidrofílica dos DES, limita sua aplicação em amostras aquosas, sendo mais amplamente abordados na literatura os DES hidrofóbicos (NIU et al., 2023).

NIU e colaboradores (2023) avaliaram seis DES para extração dos ftalatos DEP, DMP, DBP e DPP (di n-pentil ftalato) em águas e bebidas por DLLME, sendo a análise realizada por GC com ionização por chama (GC-FID). Dentre os DES hidrofóbicos testados, a melhor eficiência de extração foi observada para a composição formada por p-cresol e n-butil lactato. A extração por DLLME foi realizada em tudo cônico de 15 mL. Ao tubo foram adicionados 10 mL da solução aquosa com concentração definida dos ftalatos e o pH da solução foi ajustado para 10. Foram adicionados 0,2 g de *p*-cresol e o sistema agitado em vórtex durante 50 s para favorecer a dissolução. Foram adicionados 20 µL de n-butil lactato e a solução se tornou turva, pois a formação das gotículas minúsculas e finas indicaram a formação do DES. Para favorecer a síntese do DES e a migração do analito para a fase orgânica, o sistema foi submetido a agitação em vórtex durante 1 min e no ultrassom por 8 min. Por fim, o sistema foi centrifugado a 10.000 rpm durante 8 min e a fase do DES foi coletada do fundo do tubo cônicos, após remoção da fase aquosa superior. O volume de 1 µL da fase DES foi injetada no sistema GC-FID. As condições otimizadas do DLLME, permitiram alcançar baixos limites de detecção (LDs) de 0,5 a 2 µg L⁻¹ para os analitos, e percentagem de recuperação de 76,17% a 118,09%.

CONDE-DÍAZ e colaboradores (2023) avaliaram a presença de quinze ftalatos (entre estes o DBP, DEHP e adipato de bis(2-etilhexil), DEHA) em águas subterrâneas, água do mar e águas residuais, aplicando o método de micro-extração líquido-líquido assistida por vórtex (VA-LLME) usando o solvente eutético hidrofóbico à base de mentol: carvacrol e deteção por UHPLC-MS. A extração foi realizada em tubo cônicos de vidro de 15 mL, ao qual foram adicionados 10 mL de amostra, 1g de NaCl e o pH ajustado para 2, com uma solução HCl 6 mol L⁻¹. Em seguida, 100 µL de DES foi adicionado à solução usando uma micropipeta e o sistema agitado em vórtex por 1 min. Em seguida, a amostra foi centrifugada a 3000 rpm por 10 min. O volume de 10 µL da fase extratora eutética (sobrenadante) foi recolhida com o auxílio de uma micropipeta e diluído para 200 µL com a fase móvel. Por fim, 5 µL desta solução foi injetada no sistema cromatográfico para quantificação. O método proposto permitiu teores de recuperação entre 72-119% para os analitos e limites de quantificação entre 0,91 e 8,09 µg L⁻¹.

2.5 ANÁLISE EXPLORATÓRIA DOS DADOS

A quimiometria é uma área de estudo que utiliza métodos matemáticos, estatísticos e computacionais para resolução e interpretação de problemas de interesse químico. O termo “quimiometria” foi inicialmente utilizado na década de 70, abrangendo três principais subáreas de investigação: planejamento de experimentos, calibração multivariada e o reconhecimento de padrões (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2006; SOUZA; POPPI, 2012).

Os métodos para reconhecimento de padrões buscam identificar semelhanças e tendências nos dados, a partir do conjunto de informações significativas. Quando o método utiliza informação de classes estabelecidas para as amostras, um modelo de classificação é construído e o método é chamado supervisionado. Por outro lado, os métodos não supervisionados, ou de análise exploratória, são aqueles nos quais a informação de classe não é conhecida ou não informada. Os dois métodos mais utilizados para análise exploratória de dados multivariados são: a Análise por Componentes Principais (do inglês, *principal component analysis*, PCA) e a Análise de Agrupamentos Hierárquica (do inglês, *hierarchical cluster analysis*, HCA) (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2006; FERREIRA, 2016).

2.5.1 PCA clássica

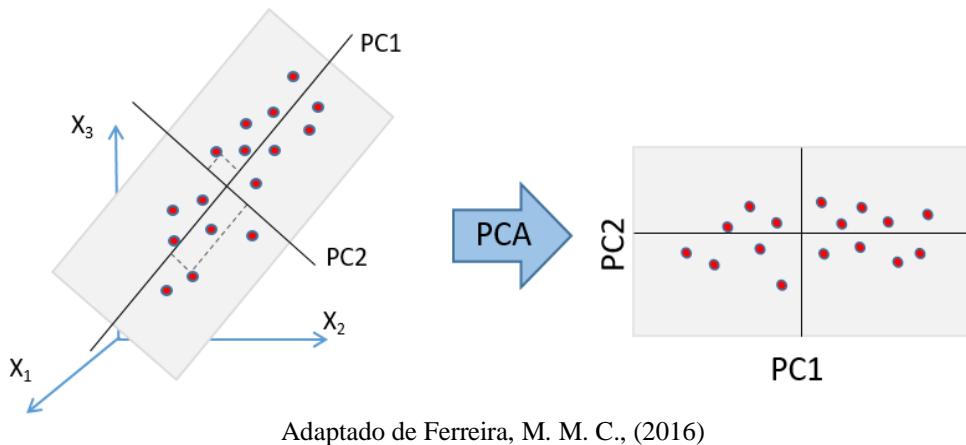
A primeira formulação estatística da PCA foi feita por Pearson em 1901. A descrição do método como o conhecemos atualmente, se deve aos trabalhos desenvolvidos por Hotelling na área da psicologia, por volta de 1930. No entanto, só a partir da década de 70 a PCA teve sua aplicação expandida a dados químicos; revolucionando o tratamento dados multivariados nesta área (BRO; SMILDE, 2014; WOLD; ESBENSEN; GELADI, 1987).

WOLD e colaboradores (1987) destacaram que a PCA é uma ferramenta interessante que permite observar semelhanças entre os objetos e identificar amostras anômalas (*outliers*). Para isto, os dados em questão precisam ser, se necessário, pré-processados e organizados em forma de uma matriz; na qual as amostras (ou objetos) são dispostos em linha e as variáveis (ou características monitoradas) dispostas em colunas (WOLD; ESBENSEN; GELADI, 1987).

O método de PCA permite a redução (ou compressão) da dimensionalidade de um conjunto de dados para um espaço de dimensão menor, preservando a relação entre as

amostras. Para reduzir a dimensionalidade dos dados, o método faz combinações lineares das n -variáveis originais, agrupando-as e reduzindo as variáveis que carregam informação redundante (correlacionada), de forma que o erro quadrático médio seja o menor possível. As novas variáveis (eixos) obtidas são as componentes principais (PCs) que, além de serem ortogonais entre si (não carregam informação correlacionada), são geradas em ordem decrescente de máxima variância. Assim, a PC1 é definida na direção de maior projeção dos dados originais. Ortogonal a esta, a PC2 é definida na direção de maior informação não explicada por PC1, e assim sucessivamente serão construídas todas as componentes principais (**Figura 3**) (FERREIRA, M. M. C., 2016; MOITA NETO; MOITA, 1998).

Figura 3 - Redução da dimensionalidade dos dados pela PCA. Os dados originalmente em três dimensões são descritos por duas PCs. A PC1 a componente principal 1 detém mais informação estatística que a PC2, e estas são ortogonais entre si



Matematicamente, a PCA decompõe uma matriz de dados pré-processados $X(I \times J)$, em outros três elementos: matriz de scores, matriz de pesos (ou *loadings*) e uma matriz de resíduos (**Figura 4**).

Figura 4 - Representação da transformação de PCA sobre um conjunto de dados originais (matriz X).

$$X = TL^T + E = \hat{X} + E$$

$$\begin{matrix} X \\ (I \times J) \end{matrix} = \begin{matrix} T \\ (I \times A) \end{matrix} \begin{matrix} L \\ (A \times J) \end{matrix} + \begin{matrix} E \\ (I \times J) \end{matrix}$$

Adaptado de BRO; SMILDE (2014)

Onde a matriz de scores (T) descreve a disposição das amostras nos eixos das componentes principais. A matriz de pesos (L) traduz o grau de influência das variáveis originais sobre as componentes principais, e é calculada como sendo os cossenos dos ângulos entre as variáveis originais e as PCs (novos eixos), que apesar de poder ser visualizado facilmente para um caso de variáveis discretas é de visualização mais complexa em dados contínuos como os cromatográficos e espectroscópicos. A matriz de scores pode ser escrita como $T=XR$, sendo R a matriz de transformação dos dados originais para o eixo das PCs. Admitindo que o resíduo é o menor possível, e considerando a relação $X = TL^T$, observamos que a matriz de transformação é a própria matriz de pesos. Da matriz de pesos são extraídos os autovetores, da matriz de covariância dos dados $S = 1/(n-1) \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(x_i - \bar{x})'$. Os autovalores extraídos dos scores indicam, em ordem descrecente de importância, o número de PCs usados para a explicação da variância dos dados originais (HUBERT; ENGELEN, 2004). Por sua vez, a matriz de resíduos (E) contém as variações aleatórias não explicadas pelo produto das matriciais TL^T . (BRO; SMILDE, 2014; SOUZA, A. M. DE; POPPI, 2012).

O cálculo de scores e pesos da PCA clássica (CPCA, do inglês *Classical Principal Component Analysis*) é comumente realizado a partir de dois principais algoritmos: NIPALS (do inglês, *Nonlinear Iterative Partial Least Squares*) e SVD (do inglês, *Singular Value Decomposition*). O algoritmo SVD decompõe a matriz X como produto de outras três matrizes: $X = U S V^T$, sendo as matrizes U e S quadradas e ortonormais, e S uma matriz diagonal que contém os autovalores na diagonal e os demais elementos iguais a zero. Através do SVD todas as PCs são calculadas ao mesmo tempo; os scores são definidos pelo produto matricial U S, enquanto que os pesos são representados na matriz transposta de V (V^T) (SOUZA, A. M. DE; POPPI, 2012). Este método é considerado o mais preciso para o cálculo de PCA, não considerando a existência de uma matriz de resíduos (FERREIRA, M. M. C., 2016).

Diferente do SVD, o algoritmo NIPALS calcula os scores e pesos de forma iterativa e em ordem decrescente de variância explicada. A primeira etapa do cálculo iterativo consiste no cálculo de score da primeira PC. A partir destes scores, os pesos (p) são calculados pela relação $p=tX/t^Tt$ e em seguida normalizados para comprimento 1. A partir deste resultado, os scores (t) são calculados pela relação $t=Xp/ p^Tp$ e o resultado é comparado com os scores iniciais. O processo de cálculo iterativo de scores e pesos será repetido até que os scores obtidos por último sejam semelhantes aos scores anteriores, ou no caso de serem alcançadas o número de iterações pré estabelecidas.

Ao ser alcançada a convergência, a matriz de resíduo (E) é determinada pela relação $E = X - tp^T$ finalizando o cálculo para a primeira PC. Para o cálculo das seguintes PCs, as etapas serão repetidas, utilizando sempre a matriz de resíduos anterior como matriz de entrada para o cálculo do score subsequente (SOUZA, A. M. DE; POPPI, 2012). Este método é mais recomendado para conjunto de dados com muitas variáveis, e que sejam correlacionadas.

Na abordagem clássica, a variância (que está sendo maximizada) e a matriz de covariância (que está sendo decomposta) são bastante influenciadas pela presença de amostras anômalas. Assim, a presença de amostras mais distantes (anômalas) desloca a direção das primeiras PCs de forma equivocada. (HUBERT; ENGELEN, 2004; HUBERT; ROUSSEEUW; BRANDEN, VANDEN, 2005). Na CPCA, um gráfico de diagnóstico comumente utilizado para identificar *outliers* se baseia nos parâmetros Q residual *versus* T² de Hotteling, e são consideradas anômalas as amostras que possuem deslocamento pronunciado em ambos os eixos.

2.5.2 PCA robusta (RobPCA)

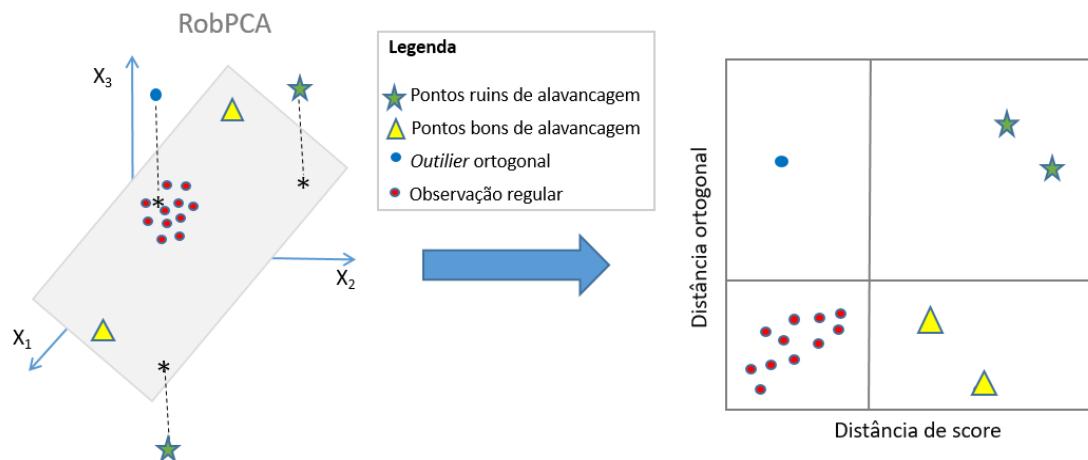
A PCA robusta (RobPCA, do inglês *Robust Principal Component Analysis*) surgiu com a proposta de solucionar a principal limitação da CPCA; a busca por PCs na direção de máxima variância menos suscetíveis a amostras anômalas. Para isto, um primeiro grupo de métodos propôs a substituição da matriz de covariância clássica por um estimador de covariância robusto. Estes métodos geraram bons resultados, mas eram restritos a dados de dimensões reduzidas. O segundo grupo de métodos, utiliza a técnica de busca por projeções (do inglês, *projection pursuit*). Esta técnica maximiza a dispersão das amostras e busca projeções lineares de menor dimensão definindo as direções das PCs, onde os dados são projetados (OSSANI, 2019). Este grupo de métodos é aplicável a dados com muitas amostras e/ou variáveis, tornando-se bastante aplicável à análise de dados químicos (HUBERT; ROUSSEEUW; BRANDEN, VANDEN, 2005).

Outra propriedade da RobPCA, enquanto método robusto, é que este permite identificar e categorizar *outliers* em três grupos; de forma a separá-los, de maneira mais criteriosa, da distribuição regular dos pontos. De acordo com (HUBERT; ROUSSEEUW; BRANDEN, VANDEN, 2005), os *outliers* podem ser categorizados como pontos bons de alavancagem (*good leverage points*). Estes bons pontos de alavancagem aumentam a dispersão dos dados porque embora estejam próximas ao plano PC possuem alta distância de score da região de maior densidade de pontos. Os *outliers* ortogonais possuem grande

distância ortogonal do plano de PCA, e por isso só sua projeção no plano pode ser observada. O último tipo de outlier são os pontos ruins de alavancagem (*bad leverage points*), que além de possuir alta distância ortogonal do plano PCA, suas projeções são distantes da região de maior densidade de pontos.

Na RobPCA, um gráfico de diagnóstico comumente utilizado para identificar *outliers* se baseia nos parâmetros distância ortogonal (*OD*) versus distância de score (*SD*) das observações no subespaço da PCA, e são consideradas anômalas as amostras que possuem deslocamento pronunciado em ambos os eixos (**Figura 5**).

Figura 5 - Representação dos diferentes tipos de *outliers*, identificados pela ROBPCA, culminando na disposição das amostras no mapa de diagnóstico para *outliers*



Adaptado de (HUBERT; ENGELEN, 2004)

O cálculo da *OD* é ilustrado na **Eq. 1** e representa a diferença entre a observação de um objeto (x_i) e sua projeção (\hat{x}_i) no subespaço da PCA (HUBERT; ENGELEN, 2004).

Eq. 1

$$OD_i = \|x_i - \hat{x}_i\|$$

Em paralelo, o cálculo de *SD* na **Eq.2** considera o subespaço de PCA e relaciona, a partir da informação dos autovalores (l_j), a correlação espacial da observação em relação a obsevação regular (t_{ij}^2) (HUBERT; ROUSSEEUW; BRANDEN, VANDEN, 2005).

Eq.2

$$SD_i = \sqrt{\sum_{j=1}^k \left(\frac{t_{ij}^2}{l_j}\right)}$$

2.5.3 HCA

A análise de agrupamentos hierárquico (HCA) foi proposta originalmente por Jhonson em 1967, e produz um gráfico chamado dendrograma. A análise por HCA é aplicável a dados lineares e não lineares. O gráfico em dendrograma permite observar similaridades e diferenças entre as amostras, por avaliar todas as variáveis ao mesmo tempo no mesmo gráfico, isto difere do mecanismo da PCA. O HCA é um método não supervisionado que permite encontrar agrupamentos no espaço n -dimensional, projetando-os em um gráfico bidimensional. Assim, objetos mais semelhantes estarão agrupados em pontos mais próximos entre si. E amostras mais diferentes pertencerão a agrupamentos mais distantes (GRUVAEUS; WAINER, 1972; MOITA NETO; MOITA, 1998).

Para a construção do gráfico, o tipo de distância (ex. Euclidiana, Manhattan ou Mahalanobis) e critério para ligação entre os grupos (método do vizinho mais próximo ou mais distante) devem ser definidos previamente. (FERREIRA, M. M. C., 2016; GRANATO *et al.*, 2018; MOITA NETO; MOITA, 1998; TOBIAS *et al.*, 1999).

O cálculo da distância Euclidiana é o mais simples e mais utilizado, onde a distância entre dois pontos é representada pela reta que os une. Considerando os pontos $P = (p_1, p_2)$ e $Q = (q_1, q_2)$ no espaço bidimensional, a distância Euclidiana entre estes é determinada pelo teorema de Pitágoras como sendo $d_{PQ} = \sqrt{(p_1 - q_1)^2 + (p_2 - q_2)^2}$. No espaço multidimensional R^k , o cálculo pode ser expresso como produto interno de vetores: $d_{P,Q} = \sqrt{[(\mathbf{x}_p - \mathbf{x}_q)^T (\mathbf{x}_p - \mathbf{x}_q)]^{1/2}}$, sendo \mathbf{x}_p e \mathbf{x}_q vetores coluna de dimensão ($K \times 1$). A distância de Manhattan, ou *city block*, considera que entre cada dois pontos existe um ângulo reto, em analogia aos quarteirões da cidade de Manhattan. Matematicamente, no plano bidimensional, a distância de Manhattan entre os pontos P e Q é a soma dos módulos das diferenças de deslocamento entre as coordenadas. No espaço multidimensional R^J , o cálculo pode ser expresso como produto interno de vetores: $d_{PQ} = \sum_{j=1}^J |\mathbf{x}_{pj} - \mathbf{x}_{qj}|$ (FERREIRA, M. M. C., 2016; MOITA NETO; MOITA, 1998).

A distância de Mahalanobis, inclui em seu cálculo o inverso da matriz de variância-covariância, $Var = \frac{1}{(n-1)} \cdot X^T X$, que é uma matriz quadrada de dimensões ($K \times K$). A distância de Mahalanobis é calculada como sendo $d_{PQ} = \sqrt{[(\mathbf{x}_p - \mathbf{x}_q)^T Var^{-1} (\mathbf{x}_p - \mathbf{x}_q)]^{1/2}}$, sendo X a matriz de dados. Esta métrica considera a dispersão (elíptica) dos dados em torno da região

centróide. Vale destacar que o cálculo pela métrica de Mahalanobis só é aplicável a um conjunto de dados onde o número de amostras é maior que o número de variáveis. Caso contrário, a matriz de covariância não se torna inversível. Quando distância de Mahalanobis é aplicada a variáveis autoescaladas e não correlacionadas, a expressão se converte na distância Euclidiana pelo fato de a matriz de correlação ser uma matriz identidade (FERREIRA, M. M. C., 2016).

A métrica para cálculo das distâncias é aplicada para todas as amostras, o critério de ligação entre os grupos é definido e o dendrograma é construído. No método do vizinho mais próximo (ou *simple link*) a distância entre dois grupos será calculada considerando os elementos mais próximos entre os grupos em questão. Por outro lado, no método do vizinho mais distante (*complete link*) a distância entre dois grupos será calculada considerando os objetos mais distantes entre os grupos avaliados. Esta análise permite identificar se há a sobreposição de classes, quando o diagrama de *cluster* formado apresenta diferença quando usado o *simple link* e o *complete link* (FERREIRA, M. M. C., 2016; GRANATO *et al.*, 2018; TOBIAS *et al.*, 1999).

No dendrograma, as amostras são comumente representadas em um eixo versus o índice de similaridade. Para os pontos P e Q, o índice de similaridade é dado pela relação $S_{PQ} = 1 - \frac{d_{PQ}}{d_{máx}}$, sendo d_{PQ} a distância entre os pontos e $d_{máx}$ a maior distância entre um par de pontos arbitrário. (FERREIRA, M. M. C., 2016; MOITA NETO; MOITA, 1998).

Diferente dos métodos baseados na redução da dimensionalidade por PCs, a análise por HCA considera todas as variáveis, sendo um método de grande importância na análise inicial de dados multivariados.

2.6 IMPUTAÇÃO DE DADOS FALTANTES

Os dados faltantes referem-se à ausência de informações para uma variável específica, sendo comuns em estudos clínicos. Essa situação pode ocorrer quando, por exemplo, um paciente se recusa a responder perguntas desconfortáveis, devido a falhas no equipamento de análise (HEYMANS; TWISK, 2022; IAVINDRASANA *et al.*, 2009). A identificação do mecanismo de dados faltantes é uma etapa crítica para a tomada de decisões. Rubin (1976) classificou esses dados em três categorias:

1. MCAR (*missing completely at Random*): a ausência de dados ocorre completamente ao acaso, e isto não está relacionado com as variáveis avaliadas ou resultados;
2. MAR (*missing at Random*): a probabilidade de ausência dos dados está relacionada a outras variáveis.
3. MNAR (*missing not at Random*): a probabilidade dos dados faltantes se relaciona à própria origem dos dados.

Na literatura, diversos métodos são utilizados para lidar com dados ausentes, e o mais comum a exclusão total dos dados ou das variáveis afetadas. No entanto, as principais desvantagens ao se adotar esta metodologia incluem a desconsideração de informações potenciais e viés nos resultados. Por esta razão, múltiplas imputações preservando a estrutura dos dados faltantes são preferíveis, ao invés da exclusão destes (IAVINDRASANA *et al.*, 2009).

Neste trabalho foi realizada a imputação de dados pelo método dos vizinhos mais próximos (KNN do inglês, *k nearest neighbors*), a fim de estimar concentrações para HPAs que estavam abaixo do LQ, após quantificação por cromatográfica.

A imputação por KNN projeta os dados no espaço multidimensional, calcula a distância entre todas as amostras pela distância Mahalanobis e estima os valores faltantes pela média dos valores dos *k* vizinhos mais próximos. O cálculo das médias pode ser ponderado, atribuindo menor peso às amostras mais distantes da amostra problema, e o número de vizinhos considerados no cálculo deve ser otimizado conforme o caso específico. No entanto, o uso de poucos vizinho ($k=3$) oferece melhor equilíbrio entre a precisão e a preservação do conjunto dos dados (BERETTA; SANTANIELLO, 2016).

Com base nesses preceitos, DARZÉ e colaboradores (2023) desenvolveram um aplicativo *web* de código aberto, em ambiente R usando o pacote *Shiny* que, além da redução de dimensionalidade e análise exploratória de dados quimiométricos, realiza a imputação de dados faltantes utilizando o algoritmo KNN (DARZÉ *et al.*, 2023).

3 METODOLOGIA

3.1 INSTRUMENTAÇÃO

Para separação e quantificação dos HPA, foi utilizado um GC-MS (Shimadzu, modelo QP2010 SE Plus, Japão), com sistema de injeção automática. O detector seletivo de massas opera com um impacto de elétrons de 70 eV, com intervalo de varredura de 0,5ms e com fragmentos de m/z de 100 a 300 Da. O equipamento operou com hélio como gás de arraste, volume de injeção de 1 µL e modo *splitless*, com coluna do tipo Zebron™ ZB-SemiVolatiles, GC Cap. Coluna 30 m x 0.25 mm x 0.25 µm, Ea 5% Fenil-arileno 95% Dimetilpolissiloxano (Enviro-Inert), 30 m x 0.25 mm x 0.25 µm (Phenomenex, USA).

Para diferentes etapas no preparo das amostras foi utilizada uma centrífuga refrigerada (Novatecnica, modelo NT825, São Paulo, Brasil) e vórtex (Velp Scientifica, Europa). Para a saponificação das amostras de peixe também foi utilizada uma chapa de aquecimento (Fisatom, modelo 752A, Brasil), na qual foi montado um sistema de banho maria com bêquer, tubos de ensaio macro e termômetro digital tipo espeto (Incoterm, China), a fim de permitir o controle da temperatura.

Para remoção da umidade dos filés de peixe, foi utilizado um liofilizador (Savant, modelo MicroModulyo, USA), alocado no Centro Regional de Ciências Nucleares do Nordeste (CRCN). Após liofilização, as amostras foram maceradas usando um almofariz com pistilo previamente descontaminados com $\text{CH}_3(\text{CO})\text{CH}_3$. Para evaporação do solvente no preparo por MSPD, foi utilizado um rotaevaporador a vácuo (Marca Martin Christ, modelo RVC 2-18CD plus).

Para síntese dos DES foi utilizada uma chapa de aquecimento (à 80 °C) com agitação magnética e, para favorecer a etapa de extração, foi utilizada a centrífuga (Thermo Scientific, modelo Heraeus Multifuge X1R)

Para separação e determinação de ftalatos, a análise cromatográfica foi realizada utilizando um sistema HPLC, modelo LC-4000, sistema integrado (Jasco, Japão), equipado com um amostrador automático AS-4050, uma bomba PU-4180 e um detector fluorescência (modelo FP-2020) da mesma marca. Foi utilizada a coluna Luna C18 Phenomenex (250 mm x 4,6 mm, tamanho da partícula 5 µm) com uma pré-coluna C18 de 5 cm, termostatizada a 35 °C. A detecção foi realizada com comprimentos de excitação 230 e emissão 320 nm.

3.2 MATERIAIS E REAGENTES

Todas as soluções foram preparadas usando água ultrapura obtida de um sistema Milli-Q (resistividade 18,2 MΩ.cm a 25 °C, Direct- Q® 3 UV, Milli-Q, Millipore, Molsheim, França) e todos reagentes foram de grau analítico.

Os solventes disponibilizados em grau P.A foram bi-destilados antes de serem empregados no preparo de padrões ou no preparo das amostras. Além disto, todos os extraídos analisados foram previamente filtrados em filtro seringa de Nylon 13 mm, 0,22 µm (Allcrom, São Paulo, Brasil).

Um mix padrão contendo naftaleno, 2-metilnaftaleno, 1-metilnaftaleno, acenaftileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoreno, pireno, benzo[a]antraceno, criseno, benzo[b]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno, benzo[a]pireno, indeno[1,2,3-cd]pireno, dibenzo[a,h]antraceno e benzo[g,h,i]períleno (Merck, ref. CRM47543, Alemanha) em uma concentração de 2000 µg mL⁻¹ foi usado para preparar uma solução estoque de 20 µg mL⁻¹ de HPA em diclorometano (Synth, São Paulo, Brasil). Para a análise preliminar, uma curva analítica na faixa de concentração de 1 a 1000 ng mL⁻¹ foi preparada diluindo a solução estoque de HPA. Uma solução de 5000 ng mL⁻¹ de bifenil (Sigma-Aldrich, EUA), em diclorometano, foi usada como padrão interno devido a indisponibilidade dos padrões deuterados no início do trabalho.

Posteriormente, uma curva analítica foi preparada na faixa de concentração de 1 a 300 ng mL⁻¹ usando a solução estoque de 20 µg mL⁻¹ de HPA em diclorometano. Uma solução estoque de 1000 µg mL⁻¹ contendo naftaleno-d8, acenafteno-d10, fenantreno-d10 (Sigma-Aldrich, EUA) foi usada como padrão interno. Uma solução estoque de *p*-Terfenil-d14 (ref. CRM 48418, Sigma-Aldrich, EUA) de 2500 ng mL⁻¹ (em hexano) foi usada como padrão de recuperação. O mix deuterado e o padrão de recuperação foram adicionados à curva analítica e às amostras analisadas por GC-MS.

Para a saponificação de amostra de peixe, foi utilizada solução de hidróxido de potássio (KOH) 2 mol L⁻¹ (Neon, São Paulo, Brasil), CH₃OH grau HPLC (Chromasolv, Sigma-Aldrich, Alemanha) e uma solução de ácido clorídrico (HCl) 5 mol L⁻¹ (Dinâmica, São Paulo, Brasil) foi empregada para correção de pH. Nas extrações por LLME, foi utilizado C₂Cl₄ e CH₃(CO)CH₃. Para o método QuEChERS, CH₃CN grau HPLC/UV (Dinâmica, São Paulo, Brasil), acetato de sódio (CH₃COONa) anidro (Dinâmica, São Paulo, Brasil) e sulfato de magnésio (MgSO₄) (Dinâmica, São Paulo, Brasil) como agente secante.

No preparo da amostra de petróleo foram utilizados os seguintes reagentes: n-hexano ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$) (Química Moderna, São Paulo, Brasil), CH_3OH grau HPLC e diclorometano (CH_2Cl_2) (Synth, São Paulo, Brasil). Entre a manipulação de replicatas de uma mesma amostra, as seringas, ponteiras e filtros foram descontaminados com alíquotas com CH_3CN sendo, por fim, descartados.

Para a síntese dos DES, foram utilizados os seguintes reagentes da Sigma-Aldrich: Propilenoglicol, cloreto de colina, ácido láctico, glucose, mentol, β -citronelol, cânfora, ácido fórmico, ácido acético, timol e ácido láurico. Estes reagentes foram selecionados considerando-se composições de DES de baixa toxicidade e os reagentes facilmente disponíveis no laboratório onde a pesquisa foi conduzida.

Para os ensaios envolvendo extração de ftalatos nas amostras aquosas, foram adquiridos os seguintes reagentes da Sigma-Aldrich: Benzil butil ftalato (BBP), dibutil ftalato (DBP), dietil ftalato (DEP), dietil hexil adipato (DEHA), dietil hexil ftalato (DEHP), diisobutil ftalato (DIBP) e dimetil ftalato (DMP). Para a análise dos DES por HPLC-UV, foi utilizado CH_3CN como fase móvel. Para extração de ftalatos por DLLME foram utilizados metanol e n-hexano, como mistura extratora.

3.3 AMOSTRAS

Para os estudos preliminares de extração de HPAs foi utilizada uma amostra de petróleo coletada em setembro de 2019 na praia de Itapuama, Pernambuco. A amostra foi mantida acondicionada em recipiente fechado e sob refrigeração.

Para a definição do preparo de amostra foi utilizado um filé de peixe da espécie cavala (*Scomberomorus cavalla*), por ser pelágico costeiro, bastante abundante e de alto valor comercial na região nordeste do Brasil (PITOMBEIRA; GOMES; MARTINS, 1973). O peixe foi adquirido na praia de Maracaípe, Pernambuco, em junho de 2022. Apenas o filé foi liofilizado durante 48h. O filé liofilizado foi armazenado sob refrigeração e macerado antes de ser utilizado. A melhor condição de preparo, foi aplicada de filés de peixe das espécies cavala (*Scomber scombrus*), oparu (*Pomacanthus paru*), pampo (*Trachinotus goodei*), saramunete (*Pseudupeneus maculatus*), tainha (*Mugil liza*) e xaréu (*Caranx lugubris*), coletadas entre junho de 2021 e dezembro de 2022, conforme listado no **APÊNDICE A**.

Para os ensaios envolvendo extração de ftalatos, foram utilizadas amostras de água provenientes da Estação de Tratamento de Águas Residuais (ETAR) do Freixo, no Porto-

Portugal. As alíquotas foram coletadas de um ponto antes e após a Estação de Tratamento, em novembro de 2023 e maio de 2024. Também foram analisados ftalatos em 14 bebidas (entre água mineral, refrigerantes, sucos de frutas e chás gelados), adquiridas no comércio local do Porto, e acondicionadas em embalagens de diferentes materiais (plástico, papelão e lata).

3.4 MÉTODO GC-MS PARA HPAs

O método originalmente fornecido pelo manual da coluna de GC é designado para a separação de HPA em um padrão multicomponente de concentração de 25.000 ng mL⁻¹. No entanto, este método – com corte do solvente a 2,8 min, modo *Split* 10:1 com injeção de 1 µL a 280 °C, vazão de 1,4 mL min⁻¹ e intervalo de varredura: 0,25 ms – foi ajustado para que o mesmo estivesse adequado à separação de analitos em níveis ambientais.

Para separação de HPAs nas amostras de peixe e óleo bruto, foi aplicado o método cromatográfico ilustrado na **Tabela 1**. O corte do solvente em 3,0 min, modo *Splitless* com injeção de 1µL a 280 °C. A vazão de 1,53 mL min⁻¹ e intervalo de varredura: 0,50 ms, com tempo total de programação de 17,53 min.

Tabela 1 - Método cromatográfico aplicado à separação de HPAs, a partir de um mix de padrões com concentração 10 ng mL⁻¹

Taxa (°C min ⁻¹)	Temperatura final (°C)	Tempo de espera (min)
–	80	0,50
30	260	0,00
6	295	0,00
25	325	4,00

3.5 EXTRAÇÃO DE HPA EM PETRÓLEO

Para o preparo da amostra de petróleo, foi feita uma adaptação do procedimento de extração por fracionamento descrito por HASHEMI-NASAB e PARASTAR (2020). amostras de petróleo foram avaliadas sem fortificação, para fins qualitativos.

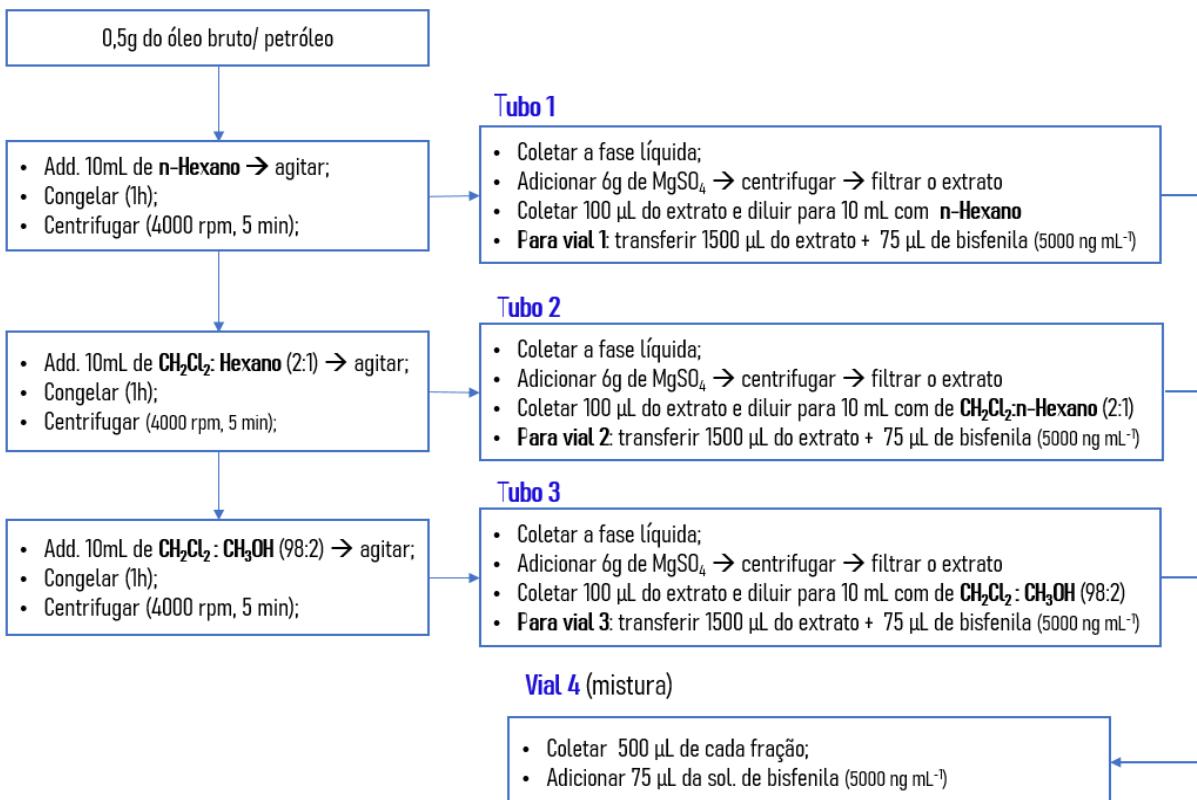
Ao tubo Falcon contendo 0,5 g de petróleo foram adicionados 10 mL de n-hexano, para extração dos hidrocarbonetos alifáticos. O tubo foi fechado, agitado em vórtex por 1 minuto e refrigerado por 1h no freezer para facilitar a separação da fração lipídica. Em seguida, o tubo foi centrifugado a 4000 rpm por 5 min, e a fase líquida do extraído em n-hexano foi transferida para outro tubo Falcon com o auxílio de uma pipeta. À fase líquida, foram adicionados 6,0 g de MgSO₄ anidro, como agente secante. O tubo foi agitado em vórtex por 1 minuto, submetido à centrifugação e a fase orgânica foi filtrada com filtro seringa. Em seguida, 100 µL da fase filtrada foram transferidos para um balão volumétrico de 10 mL, e o volume aferido com o solvente correspondente. Finalmente, 1500 µL do extraído diluído foram transferidos para um vial devidamente etiquetado, adicionando-se 50 µL do padrão interno de bifenila (5000 ng mL⁻¹). O conteúdo deste vial correspondeu à primeira fração de extraídos do petróleo.

Ao tubo contendo o resíduo sólido da amostra, foram adicionados 10 mL da mistura CH₂Cl₂: n-hexano (2:1), a fim de realizar a extração dos hidrocarbonetos aromáticos. Todas as etapas de separação de fração lipídica, secagem e filtração seguintes à adição dos solventes foram repetidas. O volume de 1500 µL do extraído diluído foram transferidos para um vial devidamente etiquetado, adicionando-se 50 µL do padrão interno de bifenila (5000 ng mL⁻¹). O conteúdo deste vial correspondeu à segunda fração de extraídos do petróleo.

Ao tubo contendo o resíduo sólido da extração anterior, foram adicionados 10 mL da mistura CH₂Cl₂: CH₃OH (98: 2), a fim de permitir a extração dos hidrocarbonetos polares. Todas as etapas de separação de fração lipídica, secagem e filtração seguintes à adição dos solventes foram repetidas. Assim, foi obtida a terceira fração de extraídos do petróleo,

Para avaliar a composição da mistura dos extraídos, adicionou-se a um vial 500 µL de cada uma das três frações dos extraídos, totalizando neste vial 1500 µL e em seguida foram adicionados 75 µL do padrão de bifenila. Para simplificar e tonar o procedimento de extração mais interpretável o mesmo foi ilustrado no fluxograma da **Figura 6**.

Figura 6 – Fluxograma com as etapas da extração de compostos aromáticos em petróleo: Fracionamento



Fonte: A autora (2022)

O experimento foi inicialmente realizado em triplicata, a fim de determinar a concentração natural dos HPAs na amostra de petróleo.

Todos os *vials* foram armazenados sob refrigeração até o momento da análise por GC-MS. Entre as injeções das amostras no GC, a agulha do injetor foi descontaminada sendo lavada com uma solução de acetato de etila: n-hexano (1:1).

3.6 EXTRAÇÃO DE HPA EM PEIXE

Neste tópico foram avaliadas metodologias de extração em fase líquida (QuEChERS e EU-AA-LLME) e de extração em fase sólida (MSPD), sendo todas estas aplicadas ao filé de peixe previamente liofilizado e macerado. Antes da extração, fez-se necessária a saponificação do peixe.

3.6.1 Extração de HPAs em peixe: Saponificação- UE-AA-LLME

O método UE-AA-LLME foi aplicado para melhorar a extração de HPAs com menor massa molar. Após vários testes, constatou-se que uma etapa de saponificação para hidrólise da gordura antes da extração em meio líquido era obrigatória para potencializar as recuperações. O processo de saponificação e extração foram adaptados de trabalhos anteriores de ROSTAMPOUR e colaboradores (2017). O preparo de amostra foi realizado em filé de peixe previamente liofilizado durante 48h e macerado.

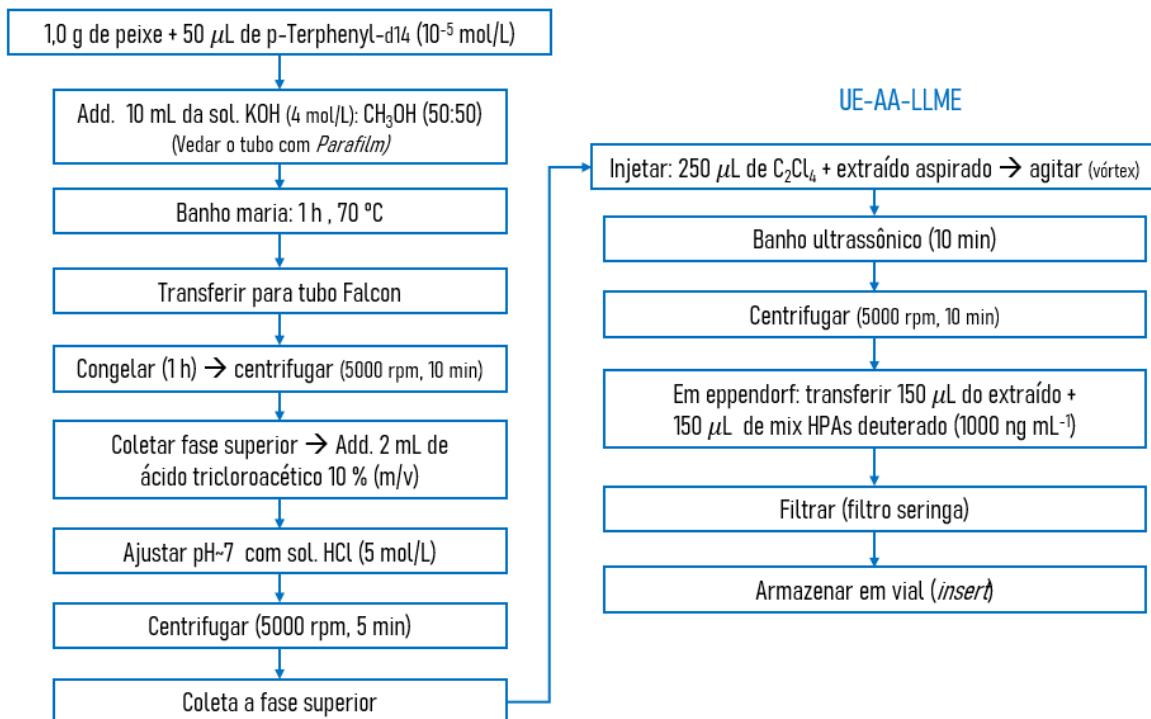
Para saponificação, 1,0 g do peixe liofilizado e 50 µL de solução 2500 ng mL⁻¹ de p-terfenil-d14 (2500 ng mL⁻¹) foram adicionados a um macro tubo de ensaio. Em seguida, 10 mL de uma solução de KOH 4 mol L⁻¹: CH₃OH (50:50) foram adicionados como solução hidrolisante. O tubo foi selado com *Parafilm®* e mantido em banho-maria a 70 °C por 1 hora. Após resfriamento, a mistura foi transferida para um tubo plástico cônico de 50 mL (Falcon, Corning), resfriado por 1 hora e depois centrifugado a 5000 rpm por 10 minutos. A fase superior foi transferida para outro tubo e foram adicionados 2 mL de ácido tricloroacético a 10% (m v⁻¹) para precipitar proteínas e outras macromoléculas (FIC *et al.*, 2010; REICHELT *et al.*, 2016). O pH do digerido foi ajustado para 7 utilizando solução de HCl 5,0 mol L⁻¹. O sistema foi centrifugado novamente e a fase superior transferida para outro tubo Falcon®.

Para a UE-AA-LLME, uma alíquota da amostra saponificada foi aspirada para uma seringa descartável, juntamente com 250 µl de C₂Cl₄. A ponta da seringa foi selada e o conjunto agitado cuidadosamente, a fim de promover a homogeneização da mistura. A agulha foi acoplada à seringa e a mistura foi rapidamente injetada no tubo Falcon® original. A solução foi aspirada e disposta sucessivamente no tubo, melhorando significativamente as recuperações para HPAs de baixo peso molecular (RAHMANI *et al.*, 2017). O tubo foi então submetido à agitação em vórtex durante 1 minuto, seguido de banho ultrassônico por 10 minutos.

Utilizando uma micropipeta, a fase sedimentada foi coletada e misturada com igual volume da mistura da solução padrão de HPAs deuterados (1000 ng mL⁻¹). O sobrenadante foi facilmente separado da fase de extração devido à formação de uma película em quantidade considerável de KCl (resultante da reação entre KOH e HCl durante a etapa de saponificação). A fase aquosa foi descartada. A fase orgânica foi coletada com o auxílio de uma seringa,

sendo adicionado igual volume de padrão interno. O extraído foi filtrado em filtro seringa e analisado por GC-MS. O procedimento é ilustrado na **Figura 7**.

**Figura 7 – Metodologia para extração de HPAs em peixe: Saponificação- UE-AA-LLME
SAPONIFICAÇÃO**



Fonte: A autora (2022)

As mesmas etapas de extração foram realizadas sem a etapa de banho ultrassônico e para determinar a metodologia mais eficiente em termos de recuperação dos analitos. Para essa avaliação, a amostra de peixe foi fortificada com as concentrações de 50, 100 e 150 ng mL⁻¹ de mistura de HPA. Em todos os casos, 50 μL de *p*-terfenil-d14 (10⁻⁵ mol L⁻¹ ou 2500 ng mL⁻¹) foram adicionados aos peixes como padrão de recuperação.

O extrato foi filtrado utilizando um filtro de seringa antes da análise por GC-MS. O tempo de saponificação (30 min, 1h e 2h de aquecimento) e a influência do banho ultrassônico na transferência de massa dos analitos durante a extração também foram avaliados no estudo.

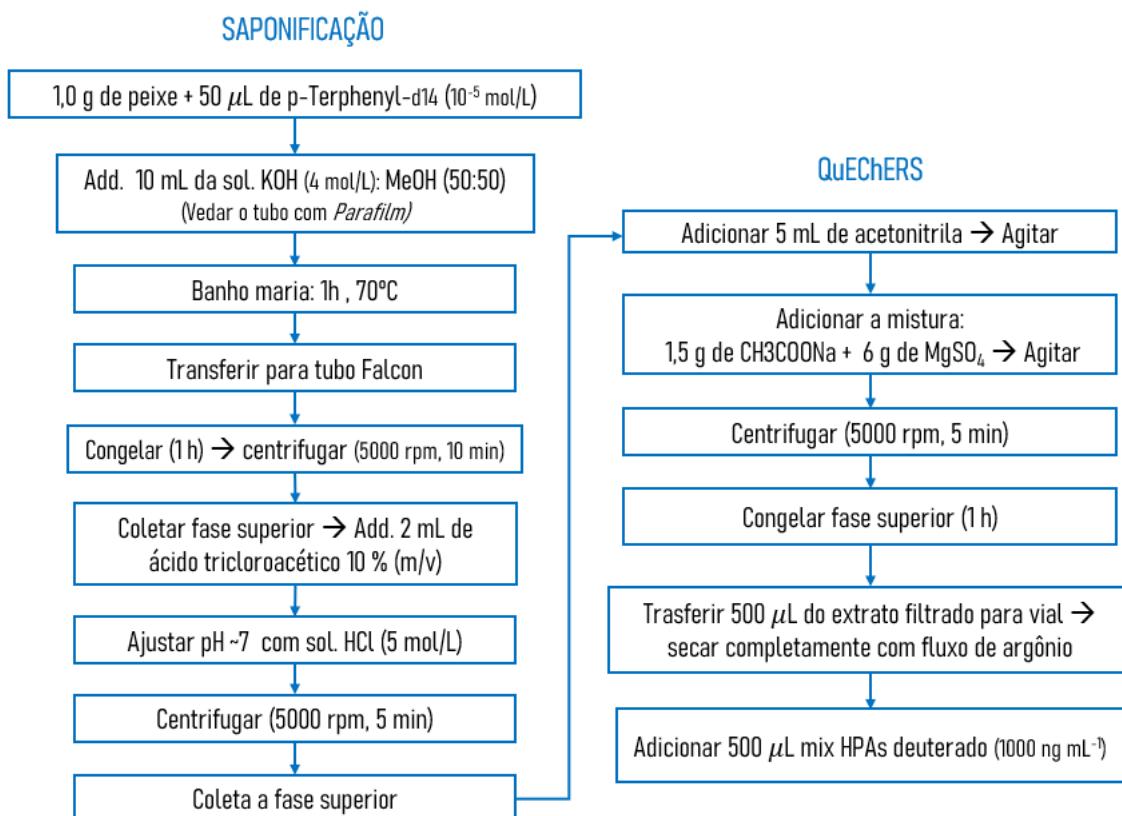
A metodologia UE-AA-LLME foi aplicada a um total de vinte e quatro amostras (n=24) de filés de peixe liofilizadas, coletadas em diferentes pontos do litoral pernambucano entre junho/2021 e dezembro/2020 (vide **APÊNDICE A**). As amostras foram divididas em

seis classes de acordo com as seguintes espécies: cavala (codificada CV, n=8), oparu (codificado O, n=3), pampo (codificado PP, n=3), saramunete (codificado SP, n=3), tainha (codificado TP, n=3) e xaréu (codificado XA, n=3).

3.6.2 Extração de HPAs em peixe: Saponificação-QuEChERS

Partindo-se da etapa de saponificação descrita na **Seção 3.5.2**, foi feita a extração QuEChERS, adaptando a metodologia descrita por SLÁMOVÁ e colaboradores (2020), onde optou-se por utilizar a metade do volume de CH₃CN originalmente proposto. O procedimento é ilustrado na **Figura 8** e descrito a seguir.

Figura 8 - Metodologia para extração de HPAs em peixe: Saponificação-QuEChERS



Fonte: A autora (2024)

Neste sentido, após a etapa de saponificação, foram adicionados 5 mL de CH₃CN (CH₃CN). O tubo foi selado e agitado em vórtex durante 1 minuto. Em seguida, adicionou-se

rapidamente a mistura composta por 1,5 g de CH₃COONa anidro + 6,0 g de MgSO₄, com o auxílio de uma espátula. O tubo foi agitado em vórtex durante 1 minuto, levado à centrífuga a 5000 rpm por 5 minutos e, em sequência refrigerado por 1h. A fase superior (da CH₃CN) foi cuidadosamente coletada com uma seringa, e filtrada com filtro de Nylon acoplado à extremidade da seringa. 500 µL do filtrado foram transferidos para um vial e levado à completa secura com fluxo de argônio. Por fim foram adicionados 500 µL do mix de HPAs deuteroado (1000 ng mL⁻¹). A secura do extrato foi realizada para a contornar a formação de duas fases no vial após a adição do padrão interno, dissolvido em hexano.

Os extraídos foram armazenados em *vials* e mantidos sob refrigeração até o momento da análise por GC-MS. Entre as injeções dos extraídos de peixe, a agulha do injetor foi descontaminada com CH₃CN.

3.6.3 Extração de HPAs em peixe: Dispersão em fase sólida (MSPD)

O método MSPD foi aplicado para melhorar a extração de HPAs de maior massa molar, que não produziram recuperações viáveis com o método UE-AA-LLME. A extração em fase sólida foi adaptada do protocolo desenvolvido por PENSADO *et al.*, (2005) para extração de HPAs em peixes, em parceria com o Grupo de Química Ambiental da Universidade Federal do Paraná (GQA- UFPR). A adaptação, realizada na etapa de limpeza, envolveu a incorporação de etapas de congelamento e filtração para remover a gordura do extrato de forma mais eficaz.

No método MSPD, amostras de peixe foram fortificadas com uma mistura de HPAs em concentrações de 50, 100 ou 150 ng mL⁻¹. Em 0,1 g do filé liofilizado foram adicionados 40 µL de estoque *p*-terfenil-d14 (5 mg L⁻¹), como padrão de recuperação. As amostras foram então dispersas em 0,2 g de Na₂SO₄ e 0,2 g de C18 por maceração no almofariz com um pistilo. Embora o processo de maceração em si seja simples, é importante destacar que o alto teor de fibras presentes nos filés de peixe torna a homogeneização mais trabalhosa. Após a homogeneização, o conteúdo foi transferido para uma coluna previamente preenchida com CH₃CN e auxiliada por fluxo de ar sintético. A coluna foi então preparada com a seguinte composição: 2g de sílica (SiO₂), 1g de óxido de alumínio (Al₂O₃), 1g de Florisil e 0,5g de C18.

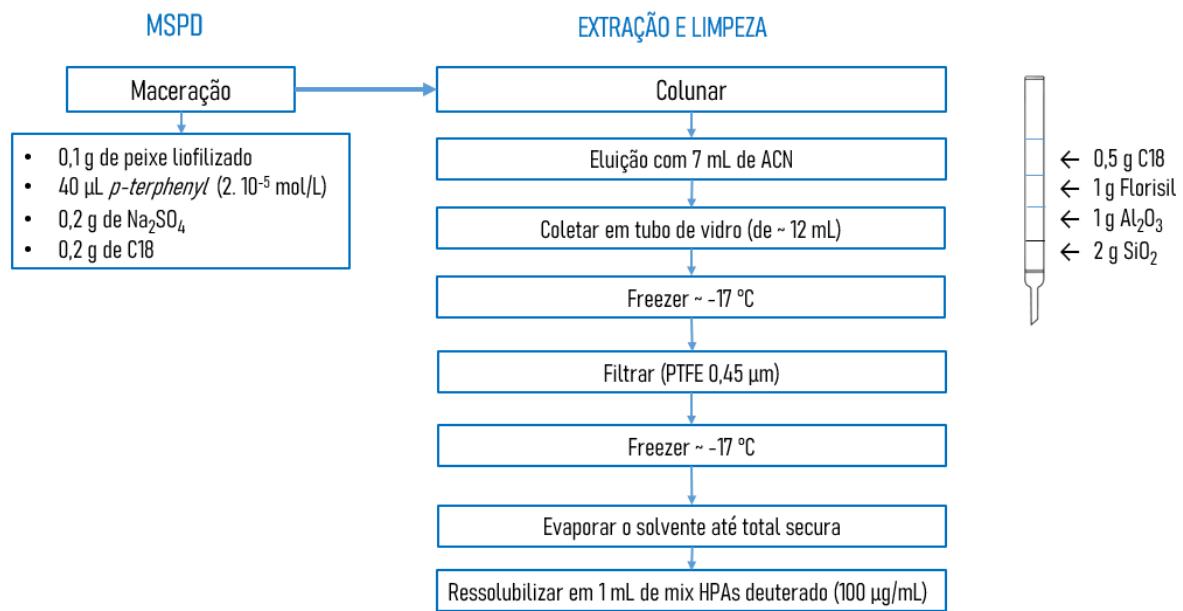
A coluna proporciona a limpeza do material extraído, permitindo a retenção de gorduras e outras macromoléculas através do uso dos reagentes escolhidos. No entanto, é

importante destacar que esses reagentes tornam a etapa de limpeza mais cara, em comparação ao uso de filtros de nylon, por exemplo.

Na coluna, a eluição foi realizada com um volume total de 7 mL de CH₃CN, com o auxílio de fluxo de ar sintético. Sem o fluxo de ar, o processo de eluição poderia levar horas, inviabilizando o experimento em série. Após a eluição, o eluato foi coletado em tubos de vidro de 12 cm com tampa e colocado no freezer por 1 hora. Após esse tempo, caso fosse observada a presença de gordura nas paredes dos tubos de vidro, o eluato era transferido para uma seringa acoplada a um filtro de nylon de 0,15 µm. Para minimizar a transferência de impurezas, o filtrado foi congelado novamente por igual período. É importante destacar que para peixes com maior teor de gordura, como pampo e oparu, o processo de congelamento/filtração foi realizado duas vezes consecutivas o que indica a elevada complexidade dessas amostras para a análise de HPAs.

Após a conclusão da etapa de limpeza, o filtrado foi evaporado até a secura completa em um evaporador rotativo a vácuo (marca Martin Christ, modelo RVC 2-18CD plus) por 40 min e ressuspenso em 1 mL de padrão interno deuterado (mistura de HPA deuterado 100 µg mL⁻¹). O procedimento é ilustrado na **Figura 9**.

Figura 9 – Metodologia para extração de HPAs em peixe: MSPD



Fonte: A autora (2024)

Para análise das amostras, foi utilizado o método cromatográfico desenvolvido pelo Grupo GQA – UFPR, sumarizado na **Tabela 2**. Estes parâmetros foram estabelecidos com base no método previamente aplicado para análise de HPA em pescado (F. BERTOLDI *et al.*, 2024). No entanto, o método foi adequado às necessidades de separação cromatográfica nos peixes com alto teor de gordura. A rampa de aquecimento foi simplificada; evitando-se regiões de platô. Foi adotada a taxa fixa de $7,00\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ ao longo de toda corrida cromatográfica, até alcançar a temperatura final de $300\text{ }^{\circ}\text{C}$. O tempo total da corrida cromatográfica foi de 41,71 minutos, temperatura do forno da coluna a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$, e injeção de 1 μL a temperatura de $270\text{ }^{\circ}\text{C}$ em modo *splitless*.

Tabela 2 - Método cromatográfico utilizado para leitura dos extraídos por MSPD

Taxa ($^{\circ}\text{C min}^{-1}$)	Temperatura final ($^{\circ}\text{C}$)	Tempo de espera (min)
–	50	1,00
7,00	300	5,00

3.7 ANÁLISE EXPLORATÓRIA DOS DADOS

Para visualização de agrupamentos naturais, distâncias ou similaridades entre os perfis das amostras do petróleo e do filé de peixe nos estudos introdutórios, foram feitas duas análises exploratórias nos dados: HCA (do inglês, *Hierarchical cluster analysis*) e PCA (do inglês, *Principal component analysis*) clássica e robusta.

As análises preliminares de HCA e PCA foram aplicadas aos dados analisados por GC-MS em um primeiro momento, sendo referentes às frações do extraído de petróleo (sem fortificação) e o teste de extraído de peixe *Teste 1 para saponificação – QuEChERS*. A análise exploratória foi aplicada à matriz de dados autoescalados (vide **APÊNDICE E**, **Tabela E.1**).

Após definição da melhor metodologia, através de testes de recuperação, e o método microextração líquido-líquido assistida por ar, e ultrassom (UE-AA-LLME) foi aplicado a amostras de peixe da espécie cavala, oparu, pamapo, saramunete, tainha e xaréu, coletadas entre junho de 2021 e dezembro de 2022. Nos teores de HPA determinados nestas amostras, foi realizada a análise por RobPCA.

Os cálculos de HCA foram feitos usando a interface gráfica *PCA_toolbox 1.5* no ambiente Matlab. Os cálculos de CPCA foram feitos pela interface *PCA_toolbox 1.5* (método NIPALS) e por SVD no Matlab. Para o cálculo de RobPCA foi realizado o pacote LIBRA, também em ambiente Matlab e pelo aplicativo Chemometrics Web App de quimiometria desenvolvido no ambiente R (DARZÉ *et al.*, 2023).

3.8 EXTRAÇÃO DE FTALATOS EM ÁGUAS COM USO DE SOLVENTES EUTÉTICOS (DES) E ANÁLISE POR HPLC-UV

3.8.1 Síntese de DES e método de extração

Para a síntese do DES, a mistura de composição mentol + β -citronelol, de proporção molar (1:1), foi transferida para um Erlenmeyer. A mistura foi aquecida em chapa de aquecimento à 80°C, sob agitação, durante 20 minutos (até à formação de um líquido transparente homogêneo). O aquecimento diretamente na chapa foi adotado em substituição ao uso do banho-maria (EL ACHKAR; FOURMENTIN; GREIGE-GERGES, 2019).

Outras quinze composições eutéticas foram avaliadas neste estudo, sendo considerados para a escolha do DES os parâmetros: estabilidade à temperatura ambiente, solubilidade em água e solubilidade em ftalato.

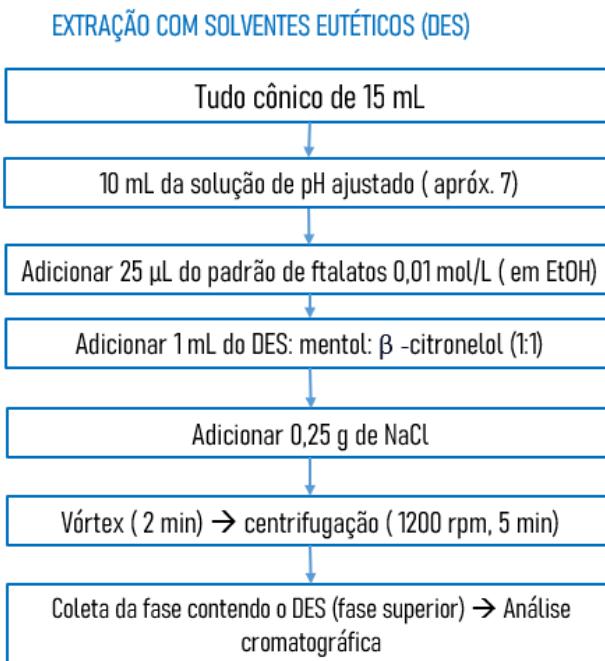
Método de extração

A metodologia adotada baseou-se no protocolo de extração líquido-líquido homogênea (LLH) (FARAJZADEH; SHEYKHIZADEH; KHORRAM, 2013). No entanto, o solvente extrator originalmente utilizado pelos autores (CH_3CN) foi substituído pelos DES; como alternativa para extrair ftalatos em águas.

No presente estudo, antes da extração, o pH da solução aquosa foi ajustado para 7 com uma solução NaOH 3 mol L⁻¹, quando necessário. O volume de 10 mL da solução aquosa foi transferido para um tubo cônico de 15 mL. Em caso de fortificação, foram adicionados 25 μL de padrão de ftalatos 0,01 mol L⁻¹ (em etanol). Em seguida foi adicionado 1 mL de DES de composição mentol: β -citronelol (1:1) e 0,25 g de NaCl. O sistema foi homogeneizado por agitação em vórtex durante 2 minutos, promovendo maior interação entre o DES – de baixa solubilidade em água – e a amostra. Foi centrifugado a 1200 rpm durante 5 minutos, e por

fim, a fase (superior) do DES contendo os analitos foi coletada com o auxílio de uma micropipeta e armazenada em *vial* para análise cromatográfica. As etapas do procedimento de extração com DES são sumarizadas na **Figura 10**.

Figura 10 - Metodologia para extração de ftalatos usando DES



Fonte: A autora (2024)

Para a análise cromatográfica por HPLC-UV, o volume de injeção da amostra foi de 10 µL. Foi adotado o seguinte sistema gradiente de solventes: 2% de CH₃CN (A) e 28% de CH₃CN (B) foi utilizado como segue: 0 min 100% A; 15 minutos 100% (B); 16 min 100% (A); a um fluxo constante de 1 mL min⁻¹.

3.8.2 Método GC-MS/MS para ftalatos

Para comparar com o método desenvolvido para HPLC-UV, foram realizadas análises por GC com espectrometria de massas em tandem (GC-MS/MS).

Para isto, foi replicado o protocolo descrito por PEREIRA e colaboradores (2023), que utilizaram o método de extração por DLLME (com hexano como solvente extrator) e GC para determinação de ftalatos em cervejas.

Para extração, a amostra foi previamente desgaseificada permanecendo 15 min sob sonicação e então foram adicionados 200 µL de n-hexano (solvente extrator) e 100 µL de etanol (solvente dispersor). O tubo foi tampado com uma camada de folha de alumínio, agitado em vórtice por 30 segundos e centrifugado por 5 minutos (1000 g). O extrato orgânico resultante foi transferido para o frasco de injeção tampado com folha de alumínio. Por fim, 1 µL do extraído foi injetado no sistema GC-MS/MS (PEREIRA; CUNHA; FERNANDES, J. O., 2023).

Para separação cromatográfica, a temperatura do forno foi programada para começar a 90 °C sendo mantida por 1 minuto. Em seguida, aumentada para 300 °C a uma taxa de 20 °C min⁻¹ e mantida por 5 minutos. O tempo total de execução foi de 16,5 minutos. Hélio de ultra alta pureza (99,999%) foi usado como gás de arraste a uma taxa de 1,0 mL min⁻¹. O injetor foi mantido a 300°C no modo *splitless* pulsado (0,5 min de purga, 35 psi) (PEREIRA; CUNHA; FERNANDES, J. O., 2023).

3.9 Validação dos métodos para determinação de HPA e ftalatos

Os métodos desenvolvidos para a determinação de HPA e de ftalatos, foram validados a partir da determinação dos LD e LQ, e os parâmetros da curva analítica.

Para os HPAs, as curvas analíticas foram construídas a partir do mix de HPAs, contendo também os padrões internos e o padrão de recuperação. Após definição do método foi feita a injeção das soluções padrão nas concentrações 1 a 300 ng mL⁻¹. Cada ponto da curva foi preparado em triplicata, permitindo os cálculos de média e desvios-padrão para cada concentração.

Para os ftalatos, as curvas analíticas foram construídas a partir das análises das soluções de misturas dos ftalatos BBP, DBP, DEP, DEHA, DEHP, DIBP, DMP, na faixa de concentrações 0,50 a 20 µg L⁻¹. A análise em cada concentração foi realizada em triplicata, calculando-se as médias e os desvios-padrão para cada concentração. A precisão foi avaliada em termos de repetibilidade, realizando determinações repetidas no mesmo dia (n=6), e como precisão intermediária (n=18), após análises em três dias diferentes. A exatidão do método analítico foi avaliada pelo método das adições de padrão e consequente recuperações obtidas. As amostras foram fortificadas com concentrações de ftalatos de 1,0 µg L⁻¹, 5,0 µg L⁻¹ e 10,0 µg L⁻¹, sujeitas ao procedimento de e análise cromatográfica nas condições previamente estabelecidas. O estudo dos valores da recuperação consistiu na comparação dos valores

obtidos dos extratos com DES com os valores obtidos a partir das soluções padrão do analito em solvente orgânico.

A partir da construção de curva de calibração, foi feito o estudo da linearidade e análise do coeficiente de determinação (R^2).

O limite de detecção, definido como o menor teor do analito que pode ser detectado com certeza estatística razoável, foi obtido através da seguinte equação:

$$LD = \frac{3,3 \times \sigma_{y/x}}{b}$$

Onde: $\sigma_{y/x}$ é o desvio padrão residual da curva de calibração, b era o coeficiente angular da reta, para um nível de confiança de 99,74%.

O limite de quantificação, considerado a menor concentração medida a partir da qual a quantificação do analito é possível com uma determinada exatidão e repetibilidade, foi obtido através da seguinte equação:

$$LQ = \frac{10 \times \sigma_{y/x}}{b}$$

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 MÉTODO GC-MS PARA HPAs

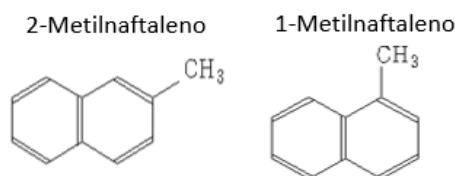
A partir de ajustes no método original da coluna de GC (**Tabela 3**), foram monitorados os seguintes HPAs: acenafteno, acenaftileno, antraceno, benzo[a] antraceno, benzo[b]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno, benzo[a]pireno, benzo[g,h,i]perileno, criseno, dibenz[a,h]antraceno, fenantreno, fluoranteno, fluoreno, indeno[1,2,3-cd]pireno, naftaleno e pireno.

Tabela 3 – Programa de temperatura fornecido pela coluna GC Zebron *SemiVolatiles*

Taxa (°C min ⁻¹)	Temperatura final (°C)	Tempo de espera (min)
–	100	0,50
30	260	0,00
6	295	0,00
25	325	2,00

Além destes, os HPAs metilados: 1-metilnaftaleno, 2-metilnaftaleno, cujas estruturas químicas estão ilustradas na **Figura 11**.

Figura 11 - Estrutura química dos HPAs metilados, e que foram monitorados no presente estudo



Fonte: Spectral Database for Organic Compounds (SDBS) Europe, e Mass Spectral Database (MassBank)

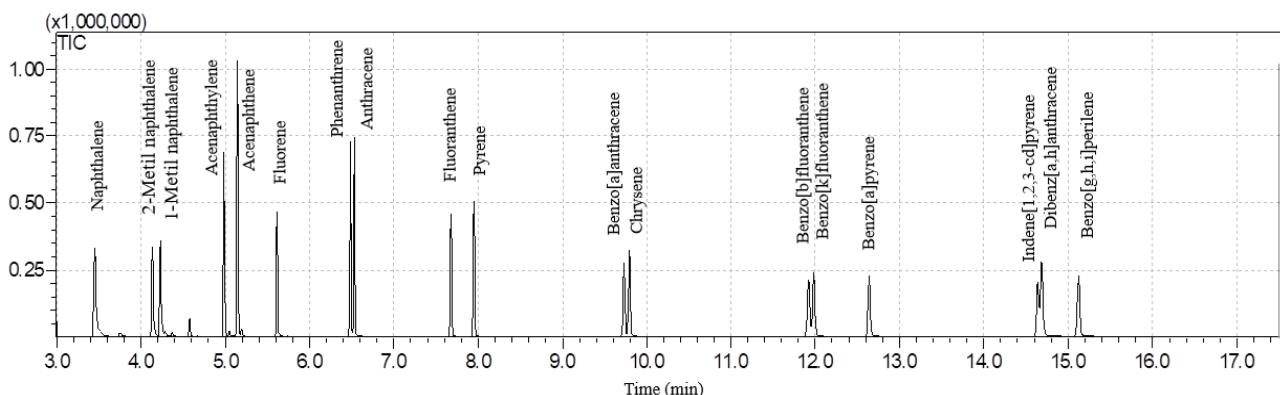
A soma dos picos não resolvidos dos isômeros benzo[b]fluoranteno e benzo[k]fluoranteno é comumente representada como “benzofluorantenos” (HARTMANN, 1996; KANEYASU; TAKADA, 2004). No entanto, esses isômeros podem ser separados com o auxílio do software do cromatógrafo *GCMS Solutions/ LabSolutions*. Devido à sua natureza isotópica, a separação ideal destes compostos ocorre quando se utiliza uma coluna quiral.

Com base no método original (**Tabela 3**), foram feitos 04 (quatro) testes a fim de se obter o melhor perfil de separação cromatográfica, para injeção de um padrão de HPAs na concentração 10 ng mL^{-1} . Em cada teste, foi alterado apenas um parâmetro por vez.

- **Teste 1:** A temperatura inicial da rampa foi reduzida para 90°C , ao invés de 100°C . O intervalo de varredura foi de 0,25 ms, com o tempo de corte do solvente de 2,7 minutos e o modo *split* foi configurado para 10:1.
- **Teste 2:** A fim de promover a maior resolução entre bandas isômeros, o intervalo de varredura foi alterado para 0,50 ms e modo de injeção foi *Splitless*.
- **Teste 3:** Para elevar a resolução entre os picos dos analitos, a temperatura da segunda rampa foi reduzida de 260°C para 240°C , e mantido o modo de injeção *Splitless*.
- **Teste 4:** Para permitir a detecção adequada dos analitos de maior tempo de retenção, a temperatura inicial de rampa passou a ser 80°C , enquanto a segunda temperatura da rampa foi mantida à 260°C . A isoterma final mantida durante 4 minutos, a vazão foi alterada para $1,53 \text{ mL min}^{-1}$ e o corte do solvente alterado para 3 minutos.

Dentre os testes realizados, a melhor resposta experimental foi obtida para as condições do Teste 4 (**Vide seção 3.4, pág. 48**). Portanto, este foi considerado o método mais adequado para traçar a curva analítica e realizar a leitura de todas as amostras. Com base neste método, o perfil obtido na separação dos analitos contidos em um padrão mix de HPA na concentração 1000 ng mL^{-1} é ilustrado na **Figura 12**.

Figura 12 – Cromatograma ilustrando a separação obtida a partir do método escolhido, considerando a injeção de um mix de HPA 1000 ng mL^{-1} .



A partir do cromatograma, foram observados os tempos de retenção (TR). A seleção da razão m/z e o íon de confirmação para cada analito são listados na **Tabela 4** (ALLIATI *et al.*, 2019; FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ *et al.*, 2008).

Tabela 4 - Tempos de retenção (TR) e razão m/z de quantificação e o íon de confirmação selecionados no modo SIM

Analito	TR (min)	m/z	Íon de confirmação
Naftaleno-d8	3,50	136	108
Naftaleno	3,55	128	102
2-Metilnaftaleno	4,13	142	115
1-Metilnaftaleno	4,23	142	115
Bifenila *	4,57	154	—
Acenaftileno	4,98	152	126
Acenafteno- d10	5,10	162	164
Acenafteno	5,14	153	150
Fluoreno	5,62	166	163
Fenantreno-d10	6,44	188	184
Fenantreno	6,48	178	152
Antraceno	6,53	178	152
Fluoranteno	7,68	202	198
Pireno	7,94	202	198
p- Terfenil-d14	8,09	244	243
Benzo[a]antraceno	9,73	228	224
Criseno	9,79	228	224
Benzo[b]fluoranteno	11,93	252	248
Benzo[k]fluoranteno	11,98	252	248
Benzo[a]pireno	12,64	252	248
Indeno[1,2,3-cd] pireno	14,60	276	272
Dibenz[a,h]antraceno	14,69	278	274
Benzo[g,h,i]períleno	15,20	276	272

*O Bifenila foi usada como padrão interno apenas na análise prévia qualitativa, devido a ausência dos compostos deuterados quando foram realizados os testes.

Curva Analítica

Nos cromatogramas, as áreas dos analitos foram corrigidas pela área do padrão interno. Em uma avaliação preliminar utilizou-se uma solução de bifenila (5000 ng mL^{-1}) para a padronização interna, a fim de estudar a faixa linear de 1 a 750 ng mL^{-1} para os analitos.

Posteriormente, a padronização interna foi feita utilizando-se um mix de padrões deuterados: Naftaleno-d8 (para padronização de Naftaleno e 2-Metilnaftaleno), Acenafteno-d10 (para Acenaftileno, 2-Metilnaftaleno, Acenafteno), Fenantreno-d10 (para Fenantreno,

Antraceno, Fluoranteno, Pireno, Benzo[a]antraceno, Criseno, Benzo[b]fluoranteno, Benzo[k]fluoranteno, Benzo[a]pireno, Indeno[1,2,3-cd]pireno, Dibenz[a,h]antraceno, Benzo[g,h,i]perileno. Ao serem consideradas as baixas concentrações de HPAs em amostras ambientais, foi adotado como faixa de trabalho o intervalo de 1 a 300 ng mL⁻¹, e o *p*-Terfenil-d14 foi adicionado como padrão de recuperação.

Para o 2-metilnaftaleno, a ANOVA (**Tabela 5**) mostra que o modelo ajustado (**Eq.1**) explica 98,9 % da variabilidade dos dados obtidos experimentalmente. Por não considerar a variância entre as diferentes concentrações da curva, a medida de erro experimental (refletido no erro puro) foi subestimado, provocando uma significância equivocada para a medida de falta de ajuste. O resíduo foi expresso como o somatório do erro puro e falta de ajuste. Assim, a tabela ANOVA descreve apenas a variância do modelo e resíduo total.

Tabela 5 - ANOVA para o 2-metilnaftaleno

Fonte	SQ	GL	MQ	F (calculado)
Modelo	314,8	1	314,8	3148
Residual	3,6	37	0,1	
Total (Corr.)	318,4	38		

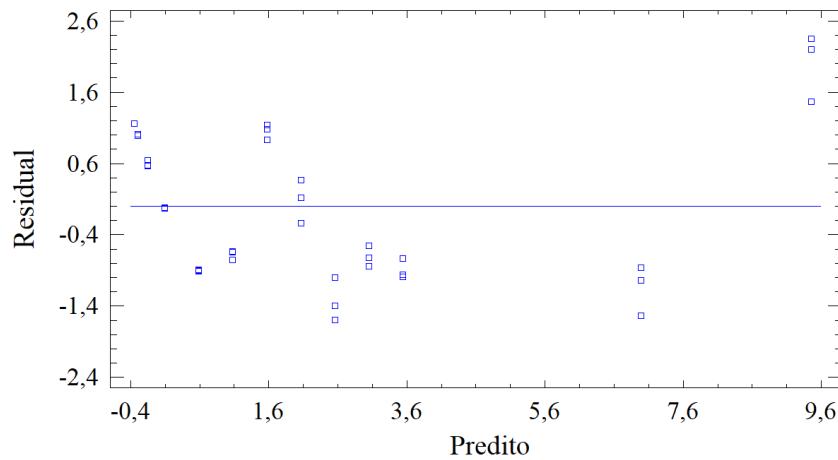
SQ: soma quadrática; GL: Graus de liberdade; MQ: média quadrática

$$\text{Sinal} = -0,398043 + 0,00984888 * \text{Conc}(2\text{-metilnaftaleno}).$$

Eq.1

A homocedasticidade e aleatoriedade na distribuição dos resíduos (**Figura 13**) permite que o teste F seja utilizado para atestar a significância estatística do modelo. A razão ($MQ_{\text{Modelo}} / MQ_{\text{residual}} = 3148$) é bem maior que o valor crítico de $F_{(1,37)} = 4,1$ (no nível de confiança de 95%), indicando que o ajuste linear para o 2-metilnaftaleno é altamente significativo.

De forma análoga, foram construídos os modelos para os demais analitos, que se encontram listados na **Tabela 5**. Todos os coeficientes angulares e lineares foram considerados significativos a partir do Teste-t, a 95% de confiança. As respectivas tabelas de ANOVA e gráficos de resíduos podem ser consultados no **APÊNDICE D**.

Figura 13 - Gráfico de resíduos para o ajuste do modelo para 2-metilnaftaleno.

A **Tabela 6** reúne os parâmetros avaliados para a validação do método cromatográfico e observa-se que os coeficientes de determinação para os HPAs apresentaram valores entre 0,974 – 0,997. Foram obtidos LD na faixa de 1,0 a 4,4 ng mL⁻¹ e LQ na faixa de 3,4 a 13 ng mL⁻¹, demonstrando sensibilidade analítica adequada para a determinação de HPAs em peixes.

Tabela 6 - Parâmetros de validação do método cromatográfico para determinação de HPA

HPA	LD (S/N=3, ng mL ⁻¹)	LQ (S/N=10, ng mL ⁻¹)	Coeficiente de determinação (R ²)
Naftaleno	3,2	9,7	0,997
2-metil naftaleno	2,6	7,8	0,994
Acenaftileno	2,1	5,0	0,992
1-metil naftaleno	2,1	6,4	0,992
Acenafteno	2,6	8,0	0,993
Fluoreno	2,1	6,6	0,993
Fenantreno	1,8	5,3	0,992
Antraceno	1,7	5,2	0,993
Fluoranteno	1,7	5,0	0,991
Pireno	3,0	9,2	0,991
p-Terfenil-d14	3,0	9,2	0,990
Benz[a]antraceno	4,4	13	0,990
Crisene	3,3	10	0,987
Benzo[b]fluoranteno	1,7	5,2	0,974
Benzo[k]fluoranteno	1,7	5,2	0,974
Benzo[a]pireno	1,0	3,4	0,981
Indeno[1,2,3-cd]pireno	3,2	9,7	0,972
Dibenz[a,h]antraceno	2,3	6,7	0,986
Benzo[ghi]perileno	2,3	6,7	0,982

Os níveis obtidos de LD e LQ são compatíveis com critérios internacionalmente aceitos para métodos analíticos de contaminantes, como os adotados pela União Européia através do Regulamento N° 2023/915 (EU, 2023), que estabelece limites máximos para HPAs em alimentos — limites de benzo[a]pireno $\leq 2 \text{ }\mu\text{g kg}^{-1}$ e somatório de quatro HPAs $\leq 12 \text{ }\mu\text{g kg}^{-1}$ em produtos derivados de pescado e defumados —, exigindo que os métodos tenham sensibilidade suficiente para detectar e quantificar abaixo desses patamares. No âmbito da legislação brasileira, a ANVISA a través da Resolução RDC ANVISA nº 722/2022 (ANVISA, 2022) incorpora os princípios de desempenho analítico reconhecidos internacionalmente, incluindo os critérios do *Codex Alimentarius*, e requer que os métodos utilizados para verificação de conformidade regulatória atendam a esses critérios.

Portanto, os LDs e LQs observados neste estudo atendem a esses requisitos de desempenho, tornando o método adequado em programas de monitoramento e controle de HPAs em alimentos, conforme as regulamentações vigentes no Brasil e Europa.

4.2 EXTRAÇÃO DE HPA EM PETRÓLEO

Em adaptação ao protocolo proposto pelos autores HASHEMI-NASAB e PARASTAR (2020), neste trabalho foi dispensado o uso de uma coluna cromatográfica aberta recheada com sílica gel ativada. No entanto, a proporção entre os solventes e a massa de amostra, assim como os solventes utilizados, foram mantidos. Dessa forma, após preparo da amostra não fortificada, as frações extraídas foram analisadas por GC-MS (**Tabela 7**).

Tabela 7 - Concentrações de HPAs (ng mL^{-1}) nas frações extraídas de petróleo sem fortificação na amostra coletada em Itapuama

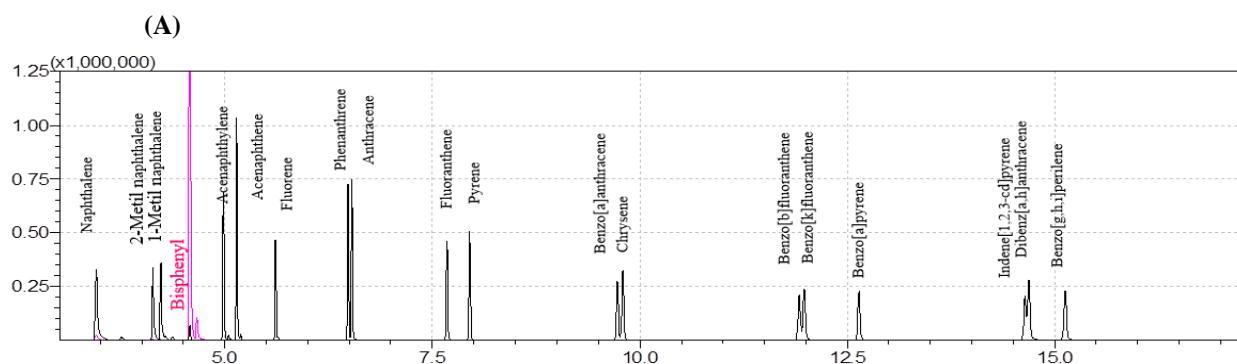
Analitos	Frac_1	Frac_1	Frac_2	Frac_2	Frac_3	Frac_3	Mix	Mix
Naftaleno	3176	2912	2016	2010	1945	1956	2559	2546
2-metilnaftaleno	4834	4735	4062	4058	-	-	4161	4142
1-metilnaftaleno	4390	4353	3967	3971	-	-	3985	3981
Acenaftileno	-	-	-	-	-	-	-	-
Acenafteno	-	-	-	-	-	-	-	-
Fluoreno	3199	3181	-	-	-	-	2646	2653
Fenanreno	7450	7489	3872	3892	3737	3734	5608	5522
Antraceno	-	-	-	-	-	-	-	-
Fluoranteno	3332	3305	-	-	-	-	2993	2993
Pireno	4670	3517	3117	3112	-	-	3473	3443

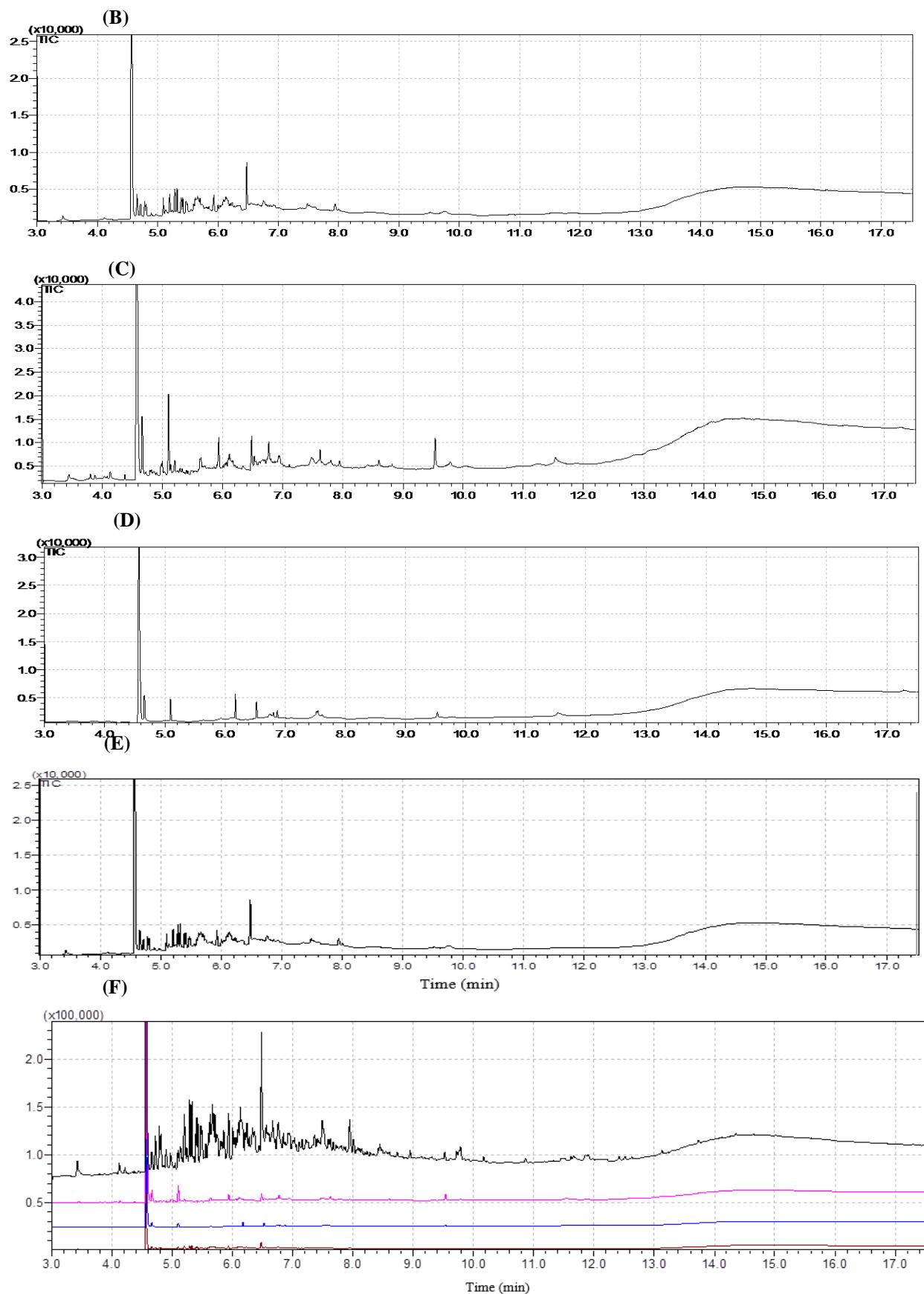
Benzo[a]antraceno	6447	6431	-	-	-	-	6031	6029
Criseno	5690	5640	-	-	-	-	5243	5490
Benzo Fluorantenos	-	-	-	-	-	-	-	-
Benzo[a]pireno	3762	3666	-	-	-	-	3581	3593
Indeno[1,2,3-cd]pireno	-	-	-	-	-	-	-	-
Dibenz[a,h]antraceno	-	-	-	-	-	-	-	-
Benzo[g,h,i]perileno	-	-	-	-	-	-	-	-

Os resultados mostram que na alíquota de petróleo coletada em Itapuama não foi detectadaa presença natural de acenaftileno, acenafteno, antraceno, benzofluorantenos, indeno[1,2,3-cd] perileno, dibenz[a,h]antraceno e benzo[g,h,i]perileno, nos níveis de concentração estudados. Isto significa que, dos 16 HPAs monitorados, foram encontrados dez na amostra de petróleo.

A **Tabela 7** também mostra que as maiores concentrações e a maior quantidade de HPAs foram extraídos na primeira fração do petróleo (Frac_1), em n-hexano. O uso deste solvente é direcionado à extração de compostos apolares, com preferência para os hidrocarbonetos alifáticos. Em seguida, concentrações ainda consideráveis podem ser observadas nas segunda e terceira frações (Frac_2 e Frac_3), respectivamente. Além disto, a quarta fração (Mix) é basicamente o resultado da mistura das três frações, sendo mais influenciada pela primeira fração de extraído, como esperado. O perfil cromatográfico é observado na **Figura 14**.

Figura 14 - Perfil cromatográfico (TIC) do (A) do padrão de HPAs 1000 ng mL⁻¹ contendo bifenila (5000 ng mL⁻¹); e frações de petróleo, extraídas por fracionamento, sendo Fração 1(B), Fração 2 (C), Fração 3 (D) e Mistura das frações (E). Em (F) encontram-se as mesmas frações sobrepostas, sendo: Fração 1(em preto), Fração2 (em rosa), Fração 3 (em azul) e mistura das frações (em marrom)





4.3 EXTRAÇÃO DE HPA EM PEIXE

4.3.1 Extração em fase líquida: Saponificação- UE-AA-LLME

Considerando a alta complexidade e teor de gordura em amostras de peixe (MITTENDORF *et al.*, 2010), foram feitos 03 (três) testes a fim de estabelecer um protocolo de saponificação previamente à extração.

Saponificação

- Teste 1 para saponificação

A etapa de saponificação foi realizada em adaptação às metodologias descritas por GHASEMZADEH-MOHAMMADI (2012) , ROSTAMPOUR (2017) e seus colaboradores. O aquecimento assistido por radiação micro-ondas foi substituído pelo aquecimento em banho maria (**Figura 15**), mantendo-se a temperatura e tempo de aquecimento propostos pelos autores.

Figura 15 - Montagem para os testes de saponificação em banho maria, com tubos de ensaio macro vedados com Parafim, e termômetro digital



Fonte: A autora (2022)

A **Figura 14**, mostra tubos de ensaio macro, nos quais foram adicionados 1,0 g de filé de peixe liofilizado e 10 mL da mistura KOH (2 mol L⁻¹): CH₃OH (50:50), como solução hidrolisante para a saponificação. O sistema foi aquecido a 70°C durante 10 minutos. No entanto, o aquecimento durante 10 minutos se mostrou insuficiente para provocar quaisquer indícios visuais da ocorrência da saponificação das amostras. Desta forma foram feitos ajustes subsequentes, descritos nos Testes 2 e 3.

- *Teste 2 para saponificação*

Com base nos resultados observados no Teste 1, realizou-se este segundo teste, aumentando o tempo de aquecimento em banho maria para 30 min, a 70 °C. Posteriormente, o tempo de aquecimento foi aumentado para 1h.

- *Teste 3 para saponificação*

Visando aumentar a eficiência do processo e reduzir a interferência de macromoléculas, foi realizado o último teste. Este apresentou o melhor resultado.

A concentração da solução de KOH foi aumentada para 4 mol L⁻¹ na mistura hidrolisante e o tempo de aquecimento em banho maria foi mantido em 1h. Após o aquecimento, foram incluídas novas etapas: o sistema foi refrigerado por 1h e em seguida submetido a centrifugação a 5000 rpm por 5 min. A fase superior foi transferida para outro tubo e, a fim de precipitar proteínas e outras macromoléculas, foram adicionados 2 mL de ácido tricloroacético 10% (m v⁻¹) (FIC *et al.*, 2010; REICHELT *et al.*, 2016). O pH foi ajustado para aproximadamente 7 (sete) com a solução HCl 5,0 mol L⁻¹. O sistema foi novamente submetido à centrifugação. A fase superior foi transferida para outro tubo tipo Falcon, para posterior extração.

UE-AA-LLME

Os primeiros testes para extração iniciaram a partir do procedimento de DLLME descrito nos estudos de GHASEMZADEH-MOHAMMADI (2012), ROSTAMPOUR (2017) e seus respectivos colaboradores. A partir destes, foram realizados outros dois testes, na ausência do solvente dispersor.

- DLLME

Ao tubo Falcon contendo o resultado da etapa de saponificação, adicionou-se 1,5 g de NaCl, a fim de favorecer a migração dos analitos para a fase orgânica, e o sistema foi submetido à agitação em vórtex por 1 min. Em seguida, 475 µL da mistura extratora, contendo 100 µL de C₂Cl₄ (como solvente extrator) e 375 µL de CH₃(CO)CH₃ (como agente dispersor) foi rapidamente injetada com o auxílio de uma seringa com agulha, e o conjunto foi novamente agitado. Posteriormente, o conjunto foi submetido à centrifugação a 4000 rpm por 5 min. A fase orgânica foi coletada e filtrada em filtro seringa, sendo direcionada para o vial (*insert*) onde também foram adicionados 5 µL da solução de bifenila (5000 ng mL⁻¹). A proporção adotada entre os solventes extrator e dispersor foi baseada no melhor resultado obtido por ROSTAMPOUR e colaboradores (2017), a partir do design de experimentos. Por fim, o mesmo teste foi repetido, desta vez adicionando-se 0,5 g de NaCl, após a etapa de saponificação. A redução do sal no último experimento visou facilitar a coleta da fase orgânica, como detalha o tópico “*Teste 2 para o UE-AA-LLME*”.

- Teste 1 com o UE-AA-LLME

Com base nos resultados observados no teste anterior e, a fim de melhorar a qualidade da separação entre as fases, foi realizado este último teste dispensando o uso de NaCl. Além disto, foi dispensado o uso da CH₃(CO)CH₃ na mistura extratora

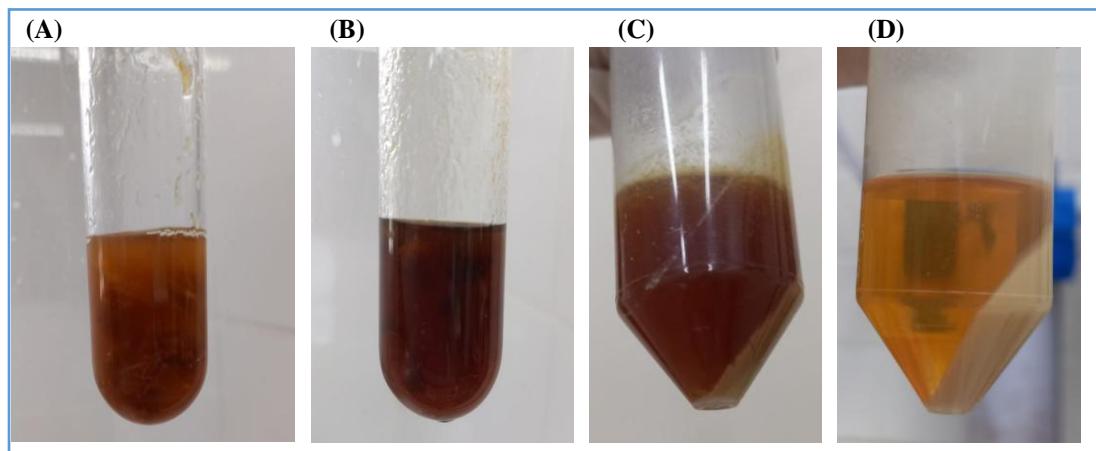
Partindo-se do tubo contendo a amostra saponificada, uma alíquota da mesma foi aspirada para o interior da seringa descartável a ser usada no processo de extração. Em seguida, com o auxílio de uma micropipeta, foram transferidos 250 µL de C₂Cl₄ para o interior da mesma seringa. A seringa foi gentilmente agitada a fim de promover a homogeneização da mistura. A agulha foi acoplada à seringa e a mistura foi injetada rapidamente ao tubo Falcon de origem. O tubo foi submetido à agitação em vórtex por 1 minuto e em seguida ao banho ultrassônico durante 10 min. O sistema foi centrifugado a 5000 rpm, durante 10 min. A fase sedimentada foi transferida para um *eppendorf*, adicionou-se 10 µL da solução de bifenila 2500 ng mL⁻¹ e então foi feita a filtração do extraído, com o auxílio de um filtro seringa. O extraído filtrado foi armazenado em um vial (*insert*) e reservado para análise por GC-MS.

Partindo-se da melhor condição para a saponificação (1h de aquecimento), a não utilização do solvente dispersor gerou um melhor resultado visual de extração. Pois, quando a presença residual de KOH, proveniente da saponificação, foi somada à $\text{CH}_3(\text{CO})\text{CH}_3$ não foi possível observar a separação visual entre as fases orgânica e aquosa.

Nos dois primeiros Testes para a saponificação, onde se utilizou aquecimento durante 10 e 30 min e menor concentração da solução KOH, observou-se que grande parte da massa de peixe permaneceu inalterada após aquecimento (**Figura 16-A e B**), indicando que mais tempo de aquecimento seria necessário. Ao realizar a etapa de extração descrita no Teste para o DLLME, observou-se que, o processo havia sido ineficiente por não permitir a separação do solvente extrator ao fim do DLLME (**Figura 16-C**).

Em seguida, ao ser aumentado o tempo de saponificação para 1h e aplicadas as condições do Teste 3 para saponificação, toda a massa de peixe foi visivelmente dissolvida. Entretanto, sendo realizada a extração por DLLME, percebeu-se que a fase do C_2Cl_4 ainda não pôde ser separada adequadamente, e resquícios deste solvente foram adsorvidos pelo sal acumulado ao fim do processo **Figura 16-D**. Desta forma, a extração foi considerada insatisfatória.

Figura 16- Resultado dos testes iniciais para saponificação-DLLME. (A) Massa de peixe e mistura KOH (2 mol L^{-1}): CH_3OH antes do aquecimento; (B) O mesmo sistema após 30 minutos de aquecimento; (C) Resultado após saponificação (Teste 2) e DLLME; (D) Resultado após Saponificação (Teste 3) e DLLME, com adição de 0,5g de NaCl.



Fonte: A autora (2022)

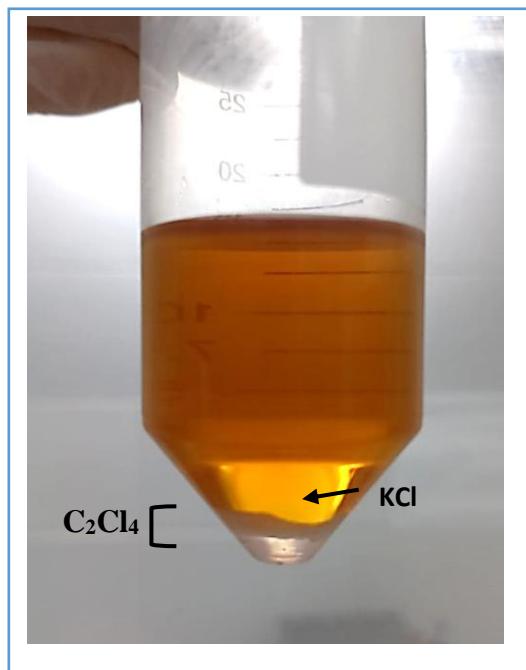
Foi feito o último teste, partindo-se da saponificação do Teste 3 para Saponificação, seguido do Teste 2 para o UE-AA-LLME. Nesta atualização da etapa de extração, o objetivo

foi reduzir a solubilidade do C_2Cl_4 no meio e reduzir o acúmulo de sal ao final do processo, evitando a adsorção de resquícios do C_2Cl_4 . Para isto, foram descartadas a adição de NaCl após a saponificação e a adição do solvente dispersor ($CH_3(CO)CH_3$) na mistura extratora.

O uso do NaCl foi descartado porque a presença de KOH e HCl em elevada concentração já seria suficiente para formação de sal (cloreto de potássio, KCl) que, de acordo com os Testes, foi o suficiente para promover o efeito de *salting out*, aumentando a afinidade dos HPAs com o solvente extrator. Além disto, neste último teste para otimizar a etapa do UE-AA-LLME foi acrescentado ácido tricloroacético para remover a interferência de proteínas e macromoléculas do extraído, além de acrescentadas etapas de centrifugação e coleta de sobrenadantes para continuar com as etapas subsequentes.

Como resultado, foi possível separar a fase do solvente extrator ao final do processo, como mostra a **Figura 17**. É importante destacar que, mesmo sendo injetados 250 μL de C_2Cl_4 para extração, foi possível recuperar aproximadamente 120 μL do mesmo ao final do processo.

Figura 17 - Resultado da melhor condição de extração de HPAs em peixe por Saponificação-UE-AA-LLME, com base na inspeção visual, após 1h de saponificação e banho ultrassônico durante a extração.



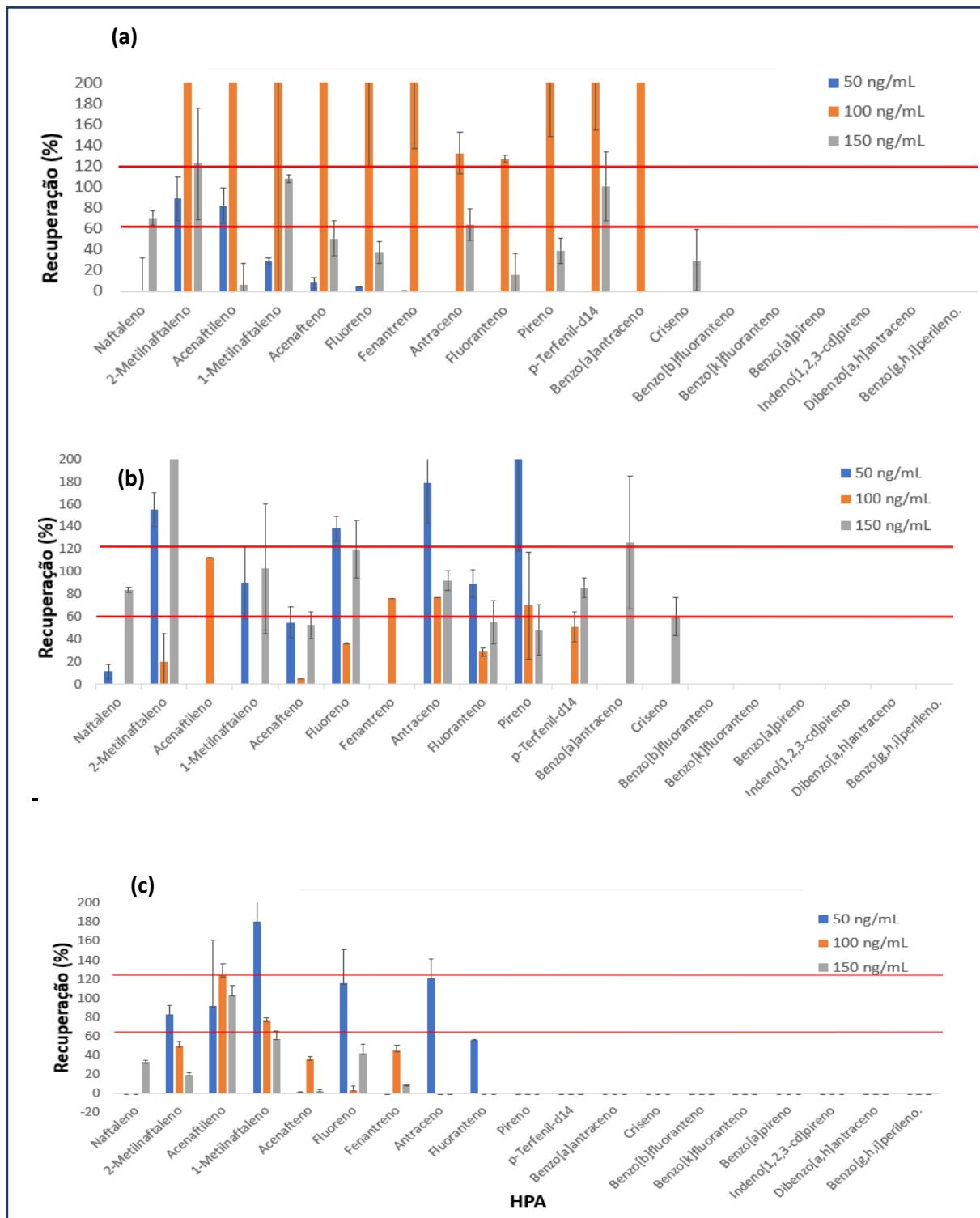
Fonte: A autora (2022)

Após realização dos testes baseados na inspeção visual, foram realizados testes quantitativos por meio de ensaios de recuperação, onde foram avaliados o efeito do tempo de saponificação e o efeito do banho ultrassônico para a extração.

Para isto, foram feitas fortificações da amostra de peixe, com o mix de HPAs, para 50, 100 e 150 ng mL⁻¹. Em todos os casos, 50 µL de *p*-terfenil-d14 (2500 ng mL⁻¹) foram adicionados ao peixe, como padrão de recuperação. Na etapa de saponificação, foram preparadas amostras com 30 min, 1h e 2h de aquecimento. Na etapa de extração foi também avaliada a influência do banho ultrassônico (durante 10 min).

A **Figura 18** reúne os ensaios de recuperação em percentagem com seus respectivos desvios-padrão amostral, realizados com a inclusão do banho ultrassônico durante a extração.

Figura 18 - Ensaios de recuperação (%) para UE-AA-LLME com (a) 30 min, (b) 1h ou (b) 2h de saponificação e etapa de banho ultrassônico

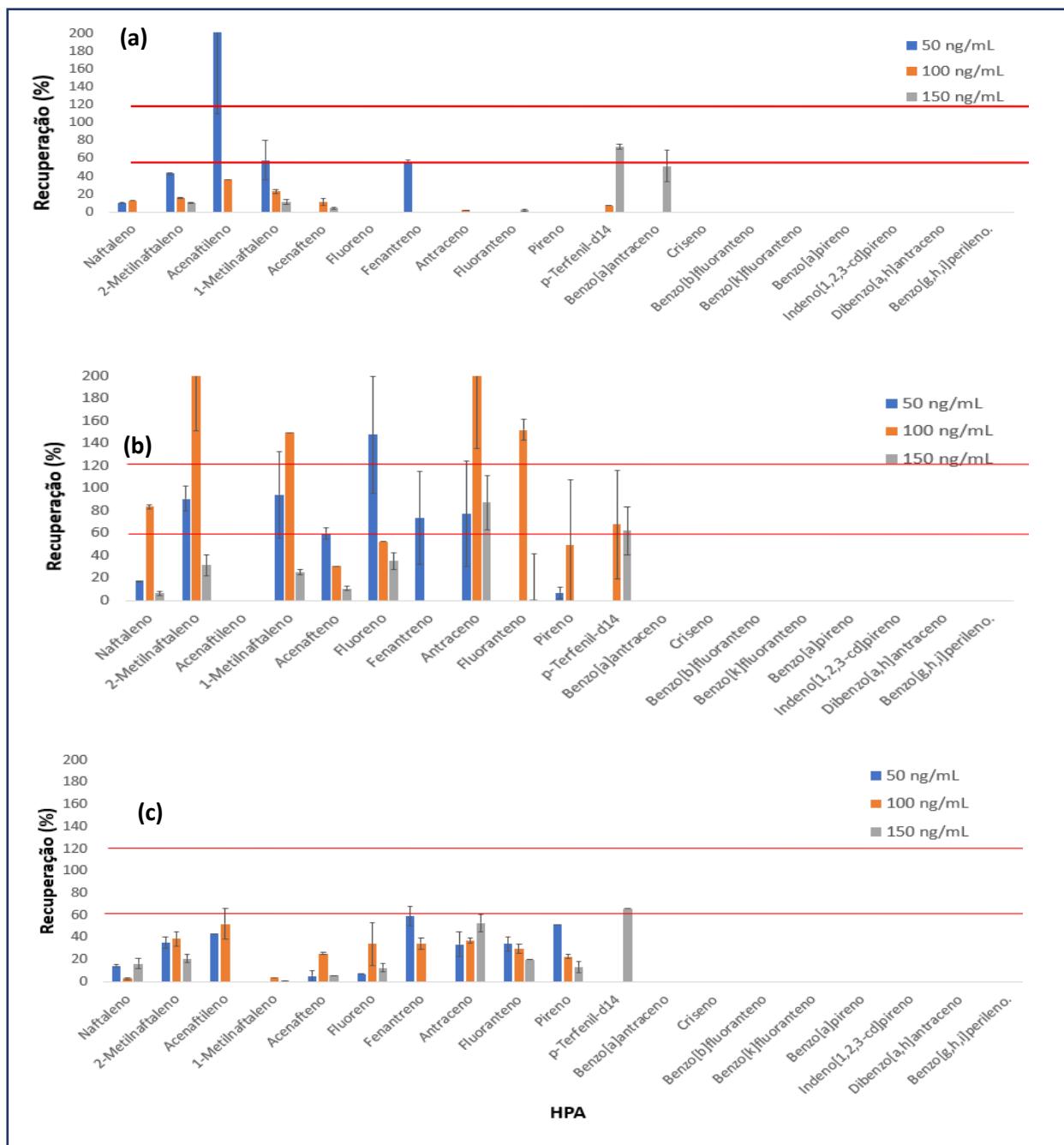


A **Figura 19** sumariza os ensaios realizados sem esta etapa. Em ambos os casos, observa-se que os métodos propostos permitem a recuperação relativa aos HPAs de massa

molar menor a intermediária (do naftaleno ao *p*-terfenil-d14), enquanto que, para os compostos de maior massa molar, a recuperação é praticamente nula.

Neste ponto, serão considerados satisfatórias as condições que permitem níveis de recuperação entre 60% e 120%, em acordo com os critérios mínimos de qualidade do método para análise de HPAs do Regulamento (EC) N° 627/2006 da Comissão Européia (EU, 2006b).

Figura 19- Ensaios de recuperação para UE-AA-LLME com (a) 30 min, (b) 1h ou (b) 2h de saponificação, sem banho ultrassônico



Comparando as **Figuras 18 e 19**, observa-se que a percentagem de recuperação nos três níveis de concentração apresenta distribuição mais uniforme e significativo nos ensaios em que o banho ultrassônico foi incluído (**Figura 18**). Com ou sem a etapa de ultrassom, é possível comprovar algo previamente indicado pela inspeção visual; que a saponificação durante 30 min se mostra insuficiente, permitindo recuperações inferiores a 60% para fortificações a 50 e 150 ng mL⁻¹, e desvios padrão consideráveis para fortificações a 100 ng mL⁻¹. Estes teores podem ser associados a alta lipofilicidade dos HPAs de maior massa molar (HARRIS *et al.*, 2013; SVERDRUP; NIELSEN; KROGH, 2002) à gordura da matriz que não foi suficientemente hidrolisada.

Por outro lado, as baixas recuperações observadas durante a saponificação de 2h podem ser associadas à perda de analitos de menor massa molar por volatilidade (GONZÁLEZ-GAYA *et al.*, 2016). Embora a temperatura tenha sido controlada a 70 °C durante a saponificação, o *Parafilm* utilizado não garantiu a vedação perfeita dos tubos o que pode ter permitido a evaporação de analitos.

Desta forma, a melhor recuperação média foi observada para a condição de saponificação durante 1h e utilização de banho ultrassônico por 10 min, durante a extração por UE-AA-LLME (vide **Figura 18**, pág. 74). Nesta condição foi possível recuperar o naftaleno, 2-metilnaftaleno, acenaftíleno, 1-metilnaftaleno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, p-terfenil-d14, benz[a]antraceno, com teor de recuperação entre 60% e 120% para os analitos.

Amostras reais

A **Tabela 8** apresenta o teor de analitos em µg kg⁻¹ no filé seco. Os níveis de HPA encontrados nas amostras de peixes foram baixos, exceto para indeno[1,2,3-cd]pireno (0,5 - 109 µg kg⁻¹) e dibenz[a,h]antraceno (0,2 - 48,3 µg kg⁻¹). Embora as amostras não tenham sido defumadas, observamos que os teores de benzo[a]pireno (< 2,0 µg kg⁻¹) e a soma de benzo[a]pireno, benz[a]antraceno, benzo[b]fluoranteno e criseno (< 12 µg kg⁻¹) mostram que estes peixes adquiridos localmente não representariam um risco para a saúde, de acordo com o Regulamento da Comissão Européia n.º 835/2011 (UE, 2011).

Antraceno Fluoranteno	Pireno	<i>p</i> -Terfenil-d14	Benz[al]antra ceno	Criseno	Benz[b]fluorante no	Benzo[k]fluor anteno	Benzo[a]pireno	Indeno[1,2,3-cd] pireno	Dibenz[a,h] antraceno	Benz[g,h,i] perileno
< 0,5	< 0,5	< 0,9	< 1	0,03 ± 0,00	< 1,0	< 1,2	0,0	0,2	< 1,0	< 1,0
< 0,5	< 0,5	< 0,9	< 1	< 1,2	< 1,0	< 1,2	< 1,2	0,8 ± 0,2	< 1,0	< 1,0
< 0,5	< 0,5	< 0,9	< 1	< 1,2	< 1,0	< 1,2	< 1,2	0,6 ± 0,3	35,7 ± 1,5	< 0,7
< 0,5	< 0,5	< 0,9	< 1	< 1,2	< 1,0	< 1,2	< 1,2	0,4	1,0 ± 0,1	< 0,7
< 0,5	< 0,5	< 0,9	< 1	< 1,2	< 1,0	< 1,2	< 1,2	0	< 1,00	< 0,7
< 0,5	< 0,5	< 0,9	< 1	< 1,2	< 1,0	< 1,2	< 1,2	0,2	0,2	< 0,7
< 0,5	< 0,5	< 0,9	< 1	< 1,2	< 1,0	< 1,2	< 1,2	0,3	57,3 ± 4,2	1,0 ± 0,1
< 0,5	< 0,5	< 0,9	< 1	< 1,2	< 1,0	< 1,2	< 1,2	0,6	< 1,0	0,4 ± 0,1
< 0,5	< 0,5	< 0,9	< 1	< 1,2	< 1,0	< 1,2	< 1,2	0,2	< 1,0	0,4 ± 0,1
< 0,5	< 0,5	< 0,9	< 1	< 1,2	< 1,0	< 1,2	< 1,2	0,6 ± 0,1	8,7 ± 0,8	8,2 ± 1,5
< 0,5	< 0,5	< 0,9	< 1	< 1,2	< 1,0	< 1,2	< 1,2	0,2	2,0 ± 0,3	2,8 ± 0,7
< 0,5	< 0,5	< 0,9	< 1	< 1,2	< 1,0	< 1,2	< 1,2	0,4 ± 0,1	0,9 ± 0,1	1,0 ± 0,1
< 0,5	0,1	0,2	< 1	0,1	0,0	0,0	0,0	0,6 ± 0,1	101,2	40,6 ± 25,4
< 0,5	< 0,5	< 0,9	< 1	< 1,2	< 1,0	< 1,2	< 1,2	0,1	109,7 ± 3,5	48,3 ± 2,4
< 0,5	0,0	0,0	< 1	0,0	< 1,0	< 1,2	< 1,2	0,2	109,7 ± 3,5	48,3 ± 2,4
< 0,5	0,3 ± 0,1	0,2 ± 0,1	< 1	0,3	0,5	0,1	0,1	0,2	101,2	40,6 ± 25,4
< 0,5	0,0	0,1	< 1	< 1,2	< 1,0	0,3	0,2	0,2	109,7 ± 3,5	48,3 ± 2,4
< 0,5	< 0,5	0,2	< 1	< 1,2	< 1,0	0,1	0,4	1,4 ± 0,1	6,3 ± 1,6	22,9 ± 5,4
< 0,5	< 0,5	< 0,9	< 1	< 1,2	< 1,0	< 1,2	< 1,2	0,1	18,8 ± 1,0	0,7 ± 0,1
< 0,5	0,0	0,0	< 1	< 1,2	< 1,0	< 1,2	< 1,2	0,2 ± 0,1	99,0 ± 3,5	1,1 ± 0,3
< 0,5	< 0,5	< 0,9	< 1	< 1,2	< 1,0	0,1	< 1,2	0,2 ± 0,1	65,3 ± 0,9	1,1 ± 0,5
< 0,5	< 0,5	< 0,9	< 1	< 1,2	< 1,0	0,1	0,0	0,5 ± 0,1	0,1	0,6 ± 0,1
< 0,5	0,0	< 0,9	< 1	< 1,2	< 1,0	0,1	0,0	0,4	4,3 ± 0,2	1,2 ± 0,3
< 0,5	< 0,5	< 0,9	< 1	< 1,2	< 1,0	0,1	0,1	0,3 ± 0,1	16,3 ± 1,3	0,6
< 0,5	< 0,5	< 0,9	< 1	< 1,2	< 1,0	< 1,2	< 1,2	0,2	< 1,0	0,4 ± 0,2
< 0,5	< 0,5	< 0,9	< 1	< 1,2	< 1,0	< 1,2	< 1,2	0,1	0,4	0,6
< 0,5	0,1	< 0,9	< 1	< 1,2	< 1,0	< 1,2	< 1,2	0,0	0,4	0,5
< 0,5	< 0,5	< 0,9	< 1	< 1,2	< 1,0	< 1,2	< 1,2	0,0	105,4 ± 0,9	0,5

Tabela 8 - Teor de HPA, em $\mu\text{g kg}^{-1}$, em filé após UE-AA-LLME

Amostra	Naftaleno	2-Metilnaftaleno	Azenaftileno	Acenafilenos	1-Metilnaftaleno	Acenafeno	Fluoreno	Fenantreno
CV2	0,7 ± 0,2	< 0,8	1,1	< 0,6	< 0,8	0,0	0,0	0,1
CV4A	0,7 ± 0,0	< 0,8	< 0,6	< 0,6	< 0,8	0,1	0,0	0,0
CV7A	< 0,6	< 0,8	0,4	< 0,6	< 0,8	0,0	0,0	0,1
CV8A	0,7 ± 0,0	< 0,8	< 0,6	< 0,6	0,1	0	0,0	0,0
CV11A	< 0,6	< 0,8	< 0,6	< 0,6	< 0,8	0,0	0,0	0
CV12A	1,2 ± 0,3	< 0,8	< 0,6	< 0,6	< 0,8	0,0	0,0	0
CV48	1,0 ± 0,0	< 0,8	< 0,6	< 0,6	< 0,8	0,0	0,0	0
CV61	0,1 ± 0,0	< 0,8	0,2 ± 0,0	< 0,6	< 0,8	0,0	0,0	0
O3	< 0,6	< 0,8	< 0,6	< 0,6	0,0	0,1	0,3	
O6	< 0,6	< 0,8	< 0,6	< 0,6	< 0,8	0,2	0,0	
O9	< 0,6	< 0,8	< 0,6	< 0,6	< 0,8	0,0	0,1	
PP1	2,7 ± 0,0	< 0,8	< 0,6	< 0,6	0,1	0,7 ± 0,3	0,1	
PP2	8,3 ± 2,1	< 0,8	3,6 ± 0,1	< 0,6	0,3	0,3	0,3	
PP3	7,8 ± 0,3	2,3 ± 0,2	< 0,6	2,1 ± 1,3	4,9	0,4 ± 0,1	0,1	
SP1	< 0,6	< 0,8	0,5	< 0,6	< 0,8	0,1	0	
SP2	1,4 ± 0,1	< 0,8	< 0,6	< 0,6	< 0,8	0,1	0,1	
SP3	< 0,6	< 0,8	0,2	< 0,6	< 0,8	0,1	0,0	
SP4	2,6 ± 0,2	< 0,8	1,7	< 0,6	0,1	0,1	0,1	
TP1	< 0,6	< 0,8	0,6	< 0,6	0,1	0,1	0,3	
TP2	< 0,6	< 0,8	0,6 ± 0,1	< 0,6	< 0,8	0,1	0,1	
TP3	0,2 ± 0,0	< 0,8	< 0,6	< 0,6	< 0,8	0,0	0,0	
XA2	< 0,6	< 0,8	0,2	< 0,6	< 0,8	0	0,0	
XA7	< 0,6	< 0,8	0,1	< 0,6	< 0,8	0	0	
XA11	< 0,6	< 0,8	0,8	< 0,6	< 0,8	0,1	0,0	

A **Seção 4.4.2 “Análise Exploratória nos peixes analisados”** mostra representações gráficas em termos da composição de HPAs. As concentrações determinadas abaixo do limite de quantificação, foram tratadas como dados faltantes, previamente à análise exploratória.

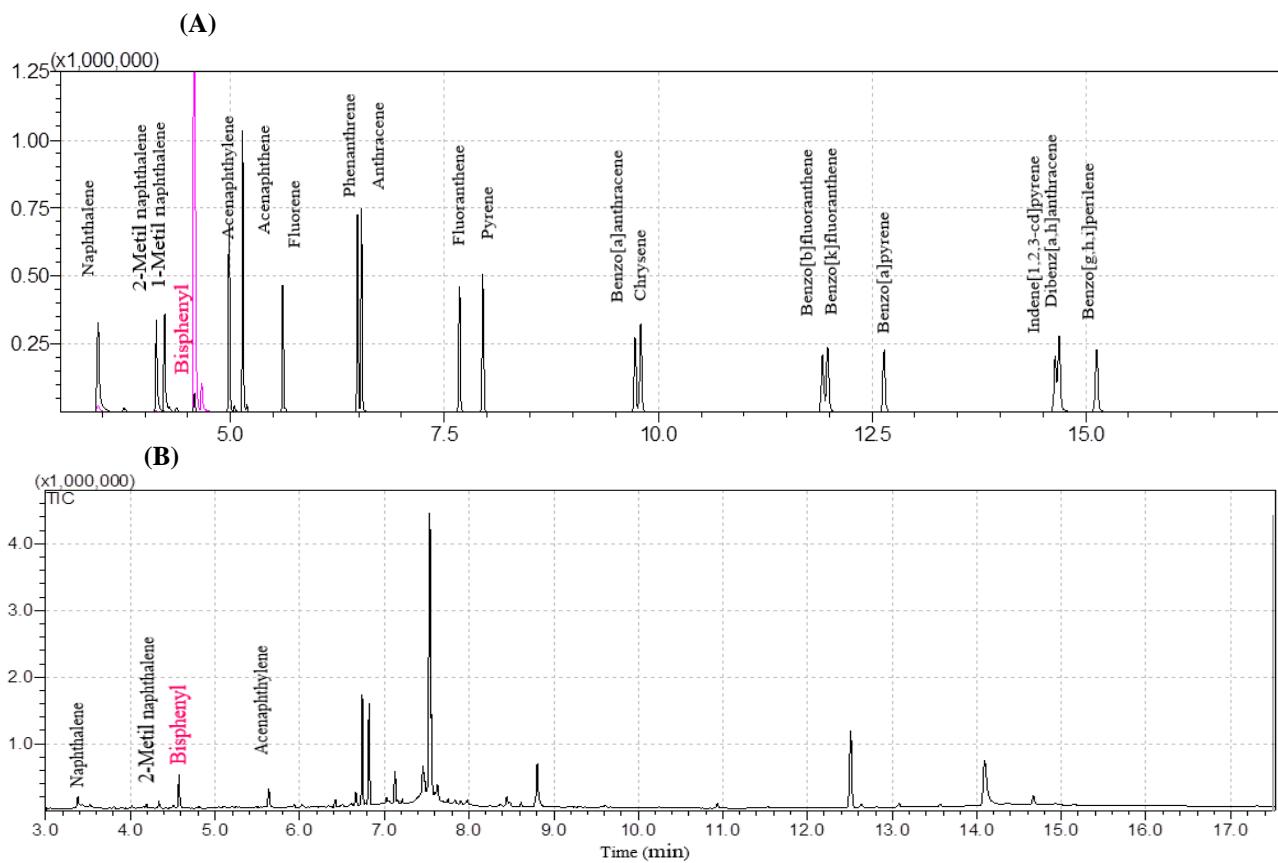
4.3.2 Extração em fase líquida: Saponificação-QuEChERS

Com base nos testes para saponificação descritos na **Seção 4.2.2**, foi feito um preparo de amostra preliminar que consiste nas condições do teste 1 para Saponificação, seguido da extração por QuEChERS. No entanto, como já observado anteriormente, nestas condições, a saponificação foi considerada insuficiente por não conseguir dissolver grande parte da

amostra de peixe durante o processo. Desta forma, poderia haver uma perda significativa dos analitos retidos na matriz gordurosa.

Mesmo se tratando de um teste preliminar voltado para a melhoria da saponificação, as amostras de peixe cavala, foram submetidas à extração de HPAs pela metodologia de teste e foram analisadas por GC-MS. Os resultados são mostrados no cromatograma da **Figura 20**.

Figura 20 - Perfil cromatográfico (TIC) do (A) mix de padrão de HPAs 1000 ng mL⁻¹ e (B) perfil médio de HPAs extraídos usando o método de saponificação-QuEChERS em peixe cavala



Conforme pode ser observado, somente alguns analitos foram identificados após extração através do método de saponificação-QuEChERS em amostra de peixe cavala.

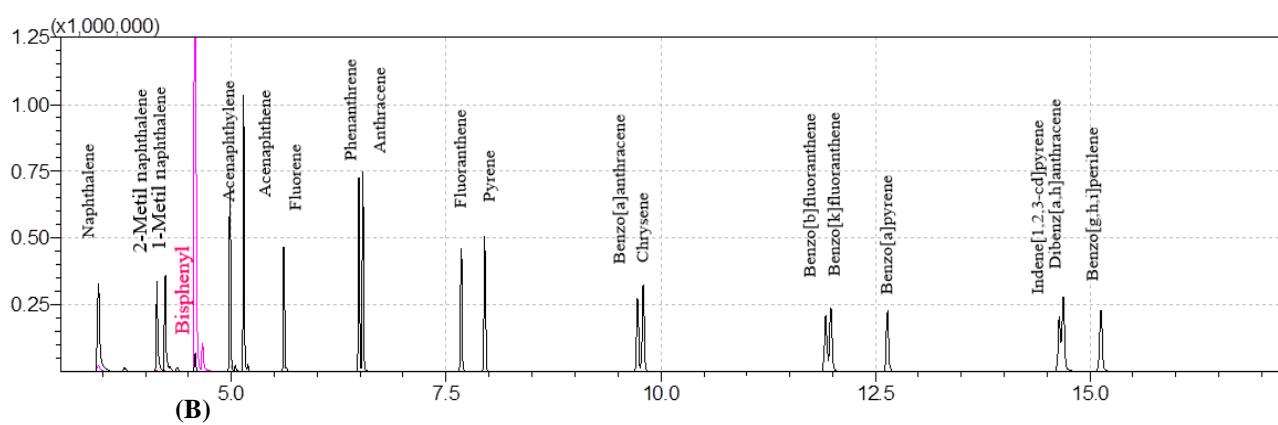
Na **Tabela 9** observamos que a metodologia permitiu a extração de apenas três analitos: naftaleno, 2- metilnaftaleno e acenaftileno, os demais estavam abaixo do limite de detecção (LD). Este é um indicativo preliminar de que o peixe em estudo pode não ter sido contaminado pela composição de petróleo considerada. As amostras de peixe cavala foram preparadas em duplicata, sem fortificação. O teor dos analitos no peixe é, em ordem de grandeza, aproximadamente 100 vezes menor em comparação ao teor dos analitos no petróleo analisado (**Tabela 7**).

Tabela 9- Concentrações de HPAs (ng mL^{-1}) em peixe sem fortificação. Análise de teste preliminar para Saponificação- QuEChERS

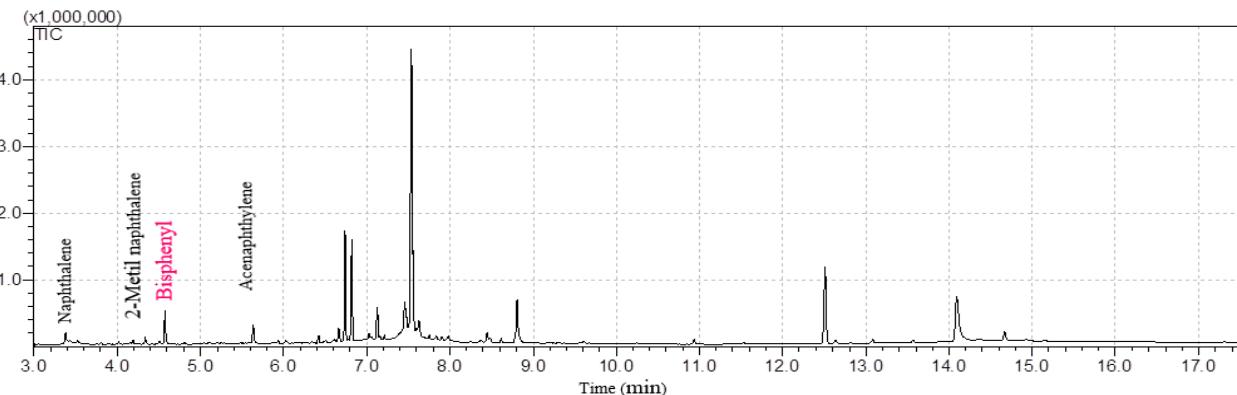
Analitos	Cavala	Cavala
Naftaleno	25,96	27,41
2-metilnaftaleno	42,49	42,53
1-metilnaftaleno	< LD	< LD
Acenaftileno	29,76	30,98
Acenafteno	< LD	< LD
Fluoreno	< LD	< LD
Fenanreno	< LD	< LD
Antraceno	< LD	< LD
Fluoranteno	< LD	< LD
Pireno	< LD	< LD
Benzo[a]antraceno	< LD	< LD
Criseno	< LD	< LD
Benzo Fluorantenos	< LD	< LD
Benzo[a]pireno	< LD	< LD
Indeno[1,2,3-cd]pireno	< LD	< LD
Dibenz[a,h]antraceno	< LD	< LD
Benzo[g,h,i]perileno	< LD	< LD

Figura 21 - Perfil cromatográfico (TIC) do (A) mix de padrão de HPAs 1000 ng mL^{-1} e (B) perfil médio de extraído preliminar de saponificação-QuEChERS em peixe cavala

(A)



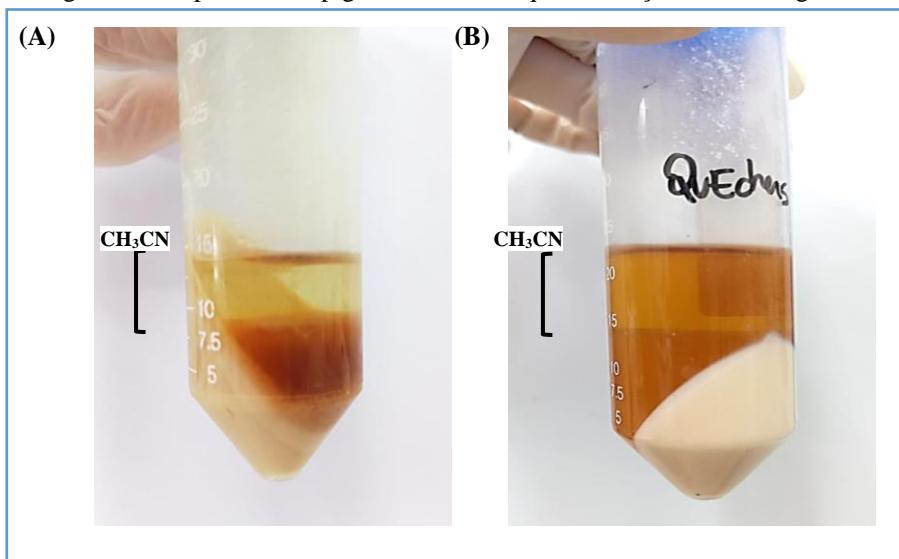
(B)



A **Figura 21** mostra que fração da gordura e/ou sujidade ainda foram carreados até o equipamento, pela presença de picos intensos, ruído e efeito aditivo na linha de base do cromatograma. Isto corrobora com a análise visual, de que o procedimento necessita de correções na saponificação, posteriormente descritas no tópico “Teste 3 para saponificação”, na **Seção 4.3.1**).

A **Figura 22** ilustra a diferença visual entre o teste preliminar (cujos resultados encontram-se na **Tabela 7**) e após o ajuste da saponificação. O resultado da saponificação ineficiente, e posterior extração, é mostrado na **Figura 22-A**. Percebe-se ainda bastante gordura não hidrolisada no tubo, o que favorece a retenção de analitos e interferentes lipofílicos na fase de gordura o que dificulta a migração destes para a fase da CH₃CN (fase superior). Por outro lado, com a melhoria da saponificação, a fase da CH₃CN aparece mais pigmentada (**Figura 22-B**), indicando que mais compostos (incluindo os aromáticos) encontram-se dissolvidos.

Figura 22 – (A) Resultado do teste inicial e (B) da melhor metodologia para Saponificação-QuEChERS. Na melhor metodologia a fase superior mais pigmentada indica que a extração foi mais significativa.



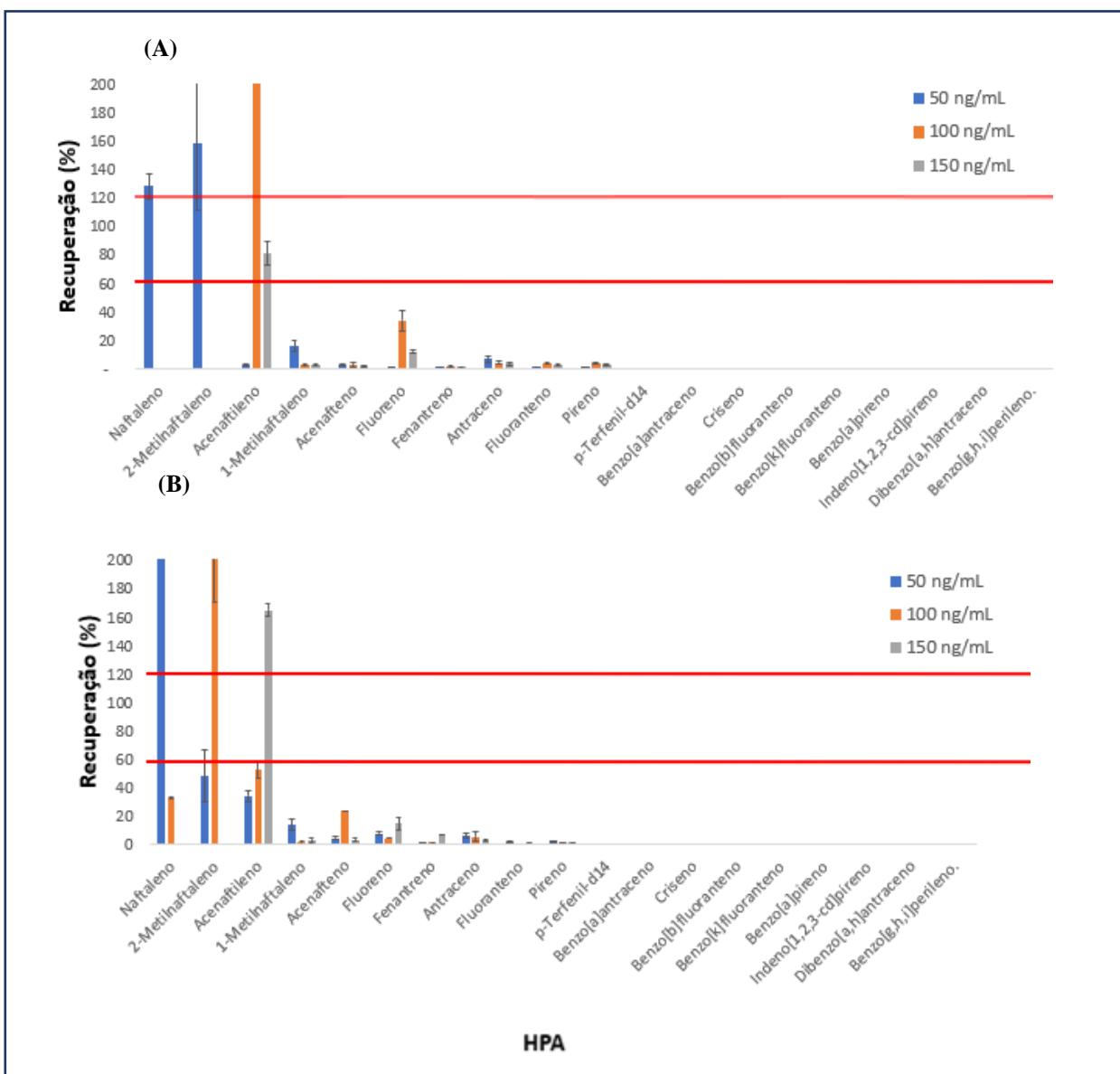
Fonte: A autora (2022)

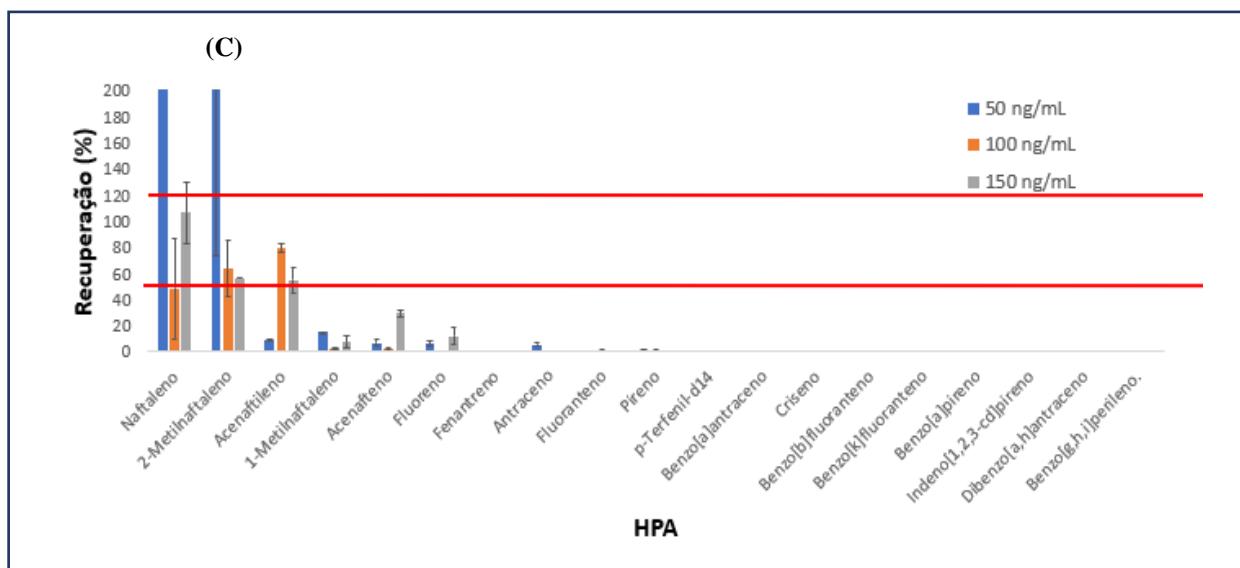
Portanto, foi selecionada a metodologia para extração por saponificação – QuEChERS, cujo procedimento é sumarizado na **Figura 8** (Seção 3.6.2, pág. 53).

Com base neste protocolo, foram feitas fortificações da amostra de peixe, com o mix de HPAs, para 50, 100 e 150 ng mL⁻¹. Foi adicionado 50 µL de *p*-terfenil-d14 (2500 ng mL⁻¹) como padrão de recuperação. Nestes ensaios também se avaliou a saponificação, com 30 min, 1h e 2h de aquecimento, sendo os resultados de recuperação ilustrados na **Figura 23**.

Observa-se na **Figura 23** que, independentemente do tempo aplicado para saponificação há indicativo de recuperação de apenas três analitos de menor massa molar (Naftaleno, 2-Metilnaftaleno e Acenaftileno), porém com teores acima do percentual de recuperação aceito (120%). Com base nesses resultados, a metodologia de extração QuEChERS não foi considerada satisfatória.

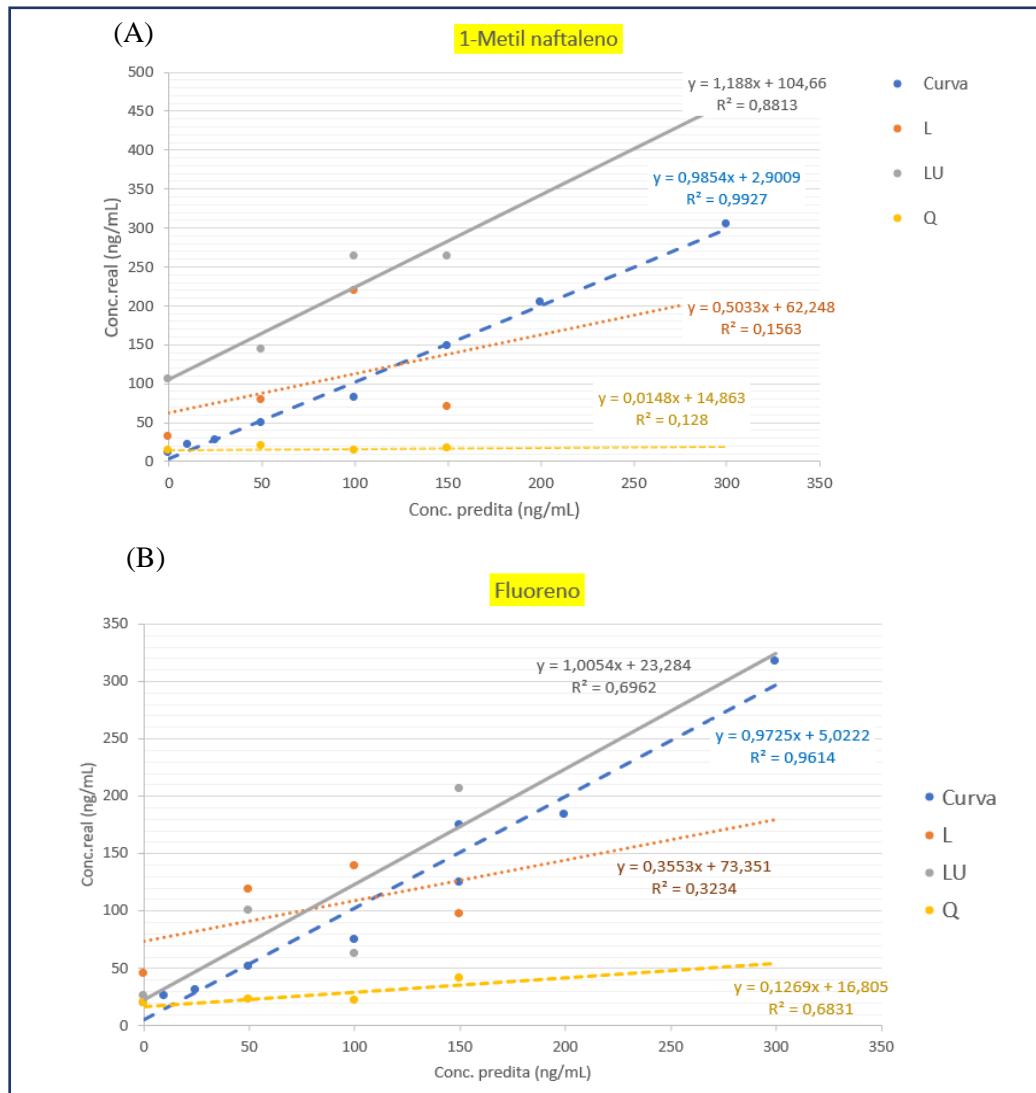
Figura 23 - Ensaios de recuperação (%) para QuEChERS com (A) 30 min, (B) 1h ou (C) 2h de saponificação, sem banho ultrassônico





Com o objetivo de comparar a metodologia QuEChERS com as metodologias de UE-AA-LLME na melhor condição de saponificação (aquecimento durante 1h), foi avaliado o efeito de matriz, conforme mostra a **Figura 24**. A curva analítica foi comparada com os resultados de adição de padrão nas concentrações de 50, 100 e 150 ng mL^{-1} em cada preparo de amostra, para 1-metilnaftaleno (**Figura 24-A**) e fluoreno (**Figura 24-B**). Os gráficos gerados para os demais analitos encontram-se no **APÊNDICE C**.

Figura 24 – Estudo do efeito de matriz para (A) 1-Metilnaftaleno e (B) Fluoreno. Considerando a curva analítica (Curva), e as metodologias UE-AA-LLME (L), UE-AA-LLME com etapa de ultrassom (LU) e QuEChERS (Q), com saponificação durante 1h.



O efeito de matriz, causado pelo aumento ou supressão do sinal dos analitos devido aos interferentes presentes na amostra (GNIAZDOWSKA; GIEBUŁTOWICZ; RUDZKI, 2023) é mais pronunciado no método QuEChERS (representado pela letra Q). Isso ocorre porque, para o QuEChERS, o perfil da linha de tendência obtida é o que mais se distancia do perfil da referência, que corresponde à curva analítica. Por outro lado, o menor efeito de matriz é observado para a metodologia UE-AA-LLME com ultrassom (representado pelas letras LU), que apresenta um perfil mais semelhante à referência.

Estes resultados corroboram com as análises realizadas em gráficos de barras, que comparam a percentagem de recuperação dos analitos. Assim, dentre as opções estudadas em fase líquida, a melhor estratégia para extração de HPAs em peixe é o UE-AA-LLME com

etapa de ultrassom. As principais vantagens desta metodologia incluem um menor efeito de matriz e um consumo reduzido de solvente orgânico, especialmente quando comparado ao método QuEChERS.

4.3.3 Extração em fase sólida: Dispersão em fase sólida (MSPD)

A fim de comparar os desafios encontrados na conversão do peixe em uma solução, como possível perda de analitos durante a saponificação, foi realizado o método MSPD. Vale destacar que a metodologia foi aplicada à mesma amostra de peixe da espécie cavala usada nos experimentos de extração em fase líquida.

Para o MSPD, foi feita a fortificação com mix de HPA para 50, 100 e 150 ng mL⁻¹ no pescado, que em seguida foi disperso em 0,2 g de Na₂SO₄ e 0,2 g de C18 por maceração. Embora o processo de maceração seja simples, é importante destacar que o alto teor de fibra presente no filé de peixe torna a homogeneização mais laboriosa.

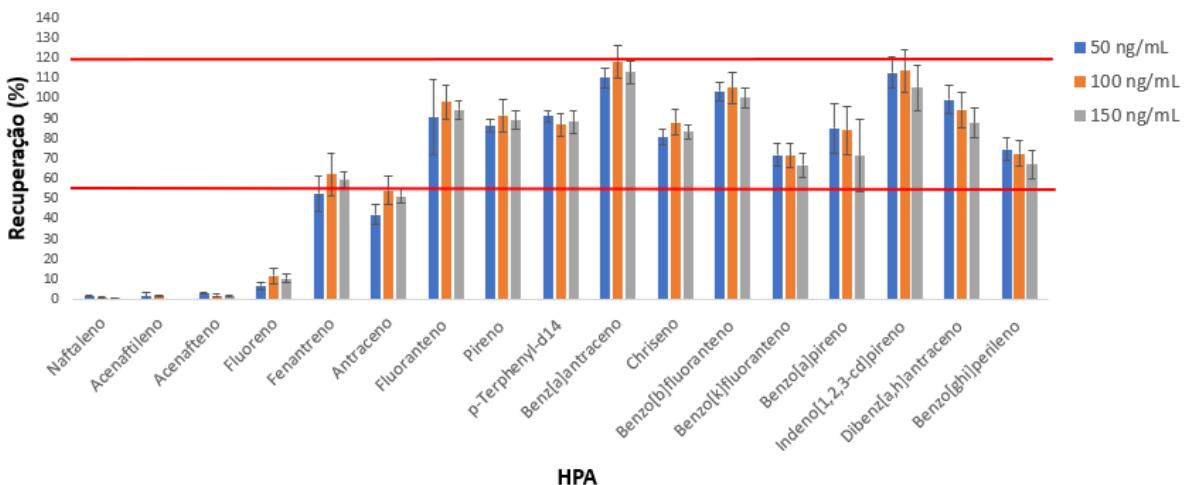
A coluna utilizada promove a limpeza do extrato, permitindo a retenção de gorduras e outras macromoléculas por meio dos reagentes escolhidos. No entanto, é importante destacar que estes reagentes tornam a etapa de limpeza mais dispendiosa, especialmente se comparados ao uso de filtros de nylon, por exemplo.

Na coluna, a eluição foi realizada utilizando um volume total de 7 mL de CH₃CN, sendo necessário o uso de fluxo de ar sintético. Sem o fluxo, o processo de eluição poderia se prolongar por horas, inviabilizando o experimento em série. Após passagem pela coluna, o eluato apresentou aspecto incolor e ausência de resíduos visíveis. Com base nos benefícios observados pela inclusão de etapas de congelamento/filtração nos métodos de extração em fase líquida estudados, decidiu-se incluir esse processo também ao MSPD, visando melhorar ainda mais a eficiência de extração.

O eluato passou por etapas de congelamento e filtração, após ser observada a presença de gotículas de gordura aderidas às paredes do tubo, com o objetivo de garantir que o mínimo possível de sujidade seria transferido à coluna do GC. No caso de peixes com maior teor natural de gordura, como pampo e oparu, o processo de congelamento/filtração foi realizado por duas vezes consecutivas.

A **Figura 25** mostra os resultados percentuais dos testes de recuperação em três níveis de concentração para os analitos, com seus respectivos desvios-padrão.

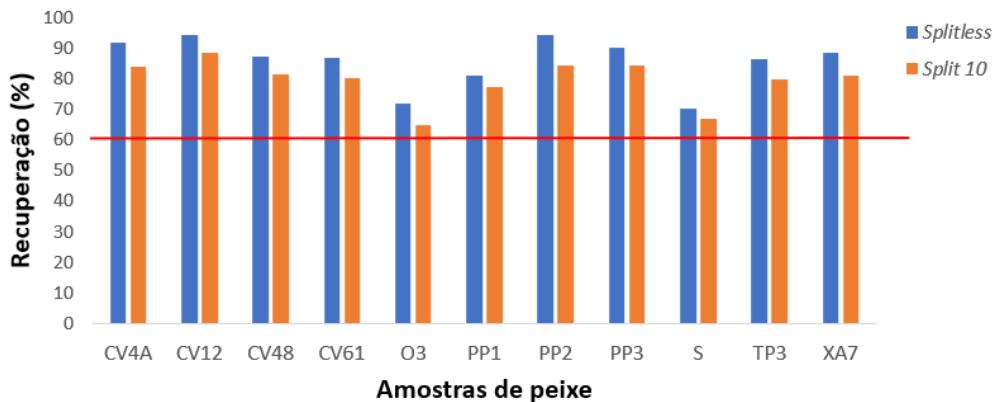
Figura 25- Ensaios de recuperação (%) de HPAs em peixe após extração por MSPD



Percebe-se que, diferente do observado para os casos de extração em fase líquida, a metodologia MSPD se mostra mais atrativa para a recuperação de HPAs de maior massa molar. São observados teores de recuperação satisfatórios (60% - 120%) para doze HPAs, dentre os dezesseis avaliados. Os analitos recuperados foram fenantreno, fluoranteno, pireno, benzo[a] antraceno, criseno, benzo[b]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno, benzo[a]pireno, indeno [1,2,3 -cd]pireno, dibenz[a,h]antraceno e benzo[g,h,i]períleno. Além destes, foi possível recuperar também o *p*-terfenil-d14, adicionado diretamente ao peixe como padrão de recuperação.

A **Figura 26** resume ensaios de recuperação (%) de *p*-terfenil-d14 em filés liofilizados de quatro peixes da espécie cavala (CV), um filé de peixe oparu (O), três filés de peixe pampo (PP), um filé de saramunete (S), um filé de tainha (TP) e um filé de xaréu (XA). Para todas as amostras, o teor de recuperação foi superior a 60%, o que é considerado um resultado bastante satisfatório. Durante as análises, foram avaliados os modos de injeção na coluna cromatográfica, utilizando as configurações *Split* 10 e *Splitless*.

Figura 26- Recuperação de *p*-terfenil após extração por MSPD, em peixes da espécie cavala (CV4A,12 e 48), oparu (O3), pampo (PP1,2 e 3), saramunete (S), tainha (TP3) e xaréu (XA7).



O modo *Split 10* foi a primeira escolha de injeção avaliado, a fim de verificar se haveria a presença de sujidade que poderia prejudicar a coluna cromatográfica. Constatando-se que o processo de limpeza foi realmente eficiente, foi feita a injeção do extraído também no modo *splitless*.

Embora o procedimento para extração em fase sólida envolva menos etapas, se comparado às metodologias descritas em meio líquido, acaba por ser mais dependente de equipamentos e reagentes mais dispendiosos ou mais específicos, o que pode tornar a execução do procedimento menos aplicável à rotina de laboratórios mais simples.

Amostras reais

A metodologia MSPD foi aplicada a onze amostras de peixes ($n=11$), que também já foram analisadas pelo método UE-AA-LLME. As amostras foram divididas em seis classes de acordo com as seguintes espécies: cavala (CV, $n=4$), oparu (O, $n=1$), pampo (PP, $n=3$), saramunete (SP, $n=1$), tainha (TP, $n=1$) e xaréu (XA, $n=1$). A **Tabela 10** mostra o teor de analitos, em $\mu\text{g kg}^{-1}$, no filé seco.

Nestas amostras foi feita a adição de $60 \mu\text{g kg}^{-1}$ de solução padrão de *p*-terfenil-d14 para avaliar a recuperação do analito. Isto explica os valores elevados de concentração na faixa $42,18 - 56,69 \mu\text{g kg}^{-1}$ para este reagente, o que representa recuperação na faixa de 70,3 – 94,5 %. Na sequência, são observados maiores teores para o naftaleno ($0,26 - 18,18 \mu\text{g kg}^{-1}$) e fanantreno ($0,90 - 11,29 \mu\text{g kg}^{-1}$).

Tabela 10 - Teor de HPA, em µg kg⁻¹, em filé seco após procedimento MSPD

Amostra	Naftaleno no	Azenafileno	Azenafeno	Fluoreno	Fenantreno	Antraceno 0	Fluoranten	Pireno	p-Terfenil- dl4	Benz[a] antraceno	Crisene	Benzo[b] fluoranteno	Benzo[k] fluoranteno	Indeno[1,2, 3-cd]pírenio	Benzo[a,h]Benz[ghi] pireno	3-cd]pírenio antraceno	períleno
CV4A	38,7	0,0	0,0	10,2	37,6	0,0	10,1	5,0	183,9	1,1	<11	2,1	1,5	4,3	3,6	0,0	3,2
CV12	60,6	0,0	0,0	8,5	34,0	5,9	9,3	3,0	188,9	1,0	<11	2,2	1,5	4,3	3,7	9,3	3,3
CV48	1,1	0,0	1,2	3,4	12,6	0,0	6,2	0,7	174,8	0,0	0,8	2,2	1,4	4,2	3,6	9,2	3,2
CV61	0,9	0,0	0,0	2,1	6,3	4,4	5,1	0,6	173,9	0,9	<11	2,1	1,4	0,0	3,6	9,1	3,1
O3	3,5	0,0	2,4	3,7	11,1	0,0	5,6	3,9	144,2	1,3	<11	2,3	0,0	4,3	4,0	9,3	3,3
PP1	1,4	0,0	1,4	4,3	16,8	4,7	7,4	4,0	162,1	1,0	<11	2,2	1,4	4,3	0,0	0,0	2,9
PP2	8,9	0,0	0,0	6,3	24,6	0,0	8,3	3,0	189,0	0,0	<11	2,2	1,4	4,2	3,6	9,3	3,1
PP3	27,7	3,1	2,8	9,4	29,8	5,7	9,9	8,1	180,6	1,4	<11	2,1	0,0	4,3	3,7	9,2	3,2
S	0,9	1,0	0,0	1,8	3,0	4,4	4,4	0,7	140,6	0,7	<11	2,1	1,4	4,2	3,4	9,3	3,1
TP3	2,3	0,0	0,0	5,3	20,2	0,0	7,3	2,0	172,9	0,8	<11	2,0	0,0	0,0	0,0	9,2	3,3
XA7	1,0	0,0	1,2	2,2	6,6	0,0	5,2	0,8	177,1	0,9	<11	2,2	1,4	4,2	0,0	9,3	3,2

Ainda de acordo com esta metodologia de preparação, observa-se que os peixes analisados estariam em conformidade com a Regulação da Comissão Européia N° 835/2011(EU, 2011).

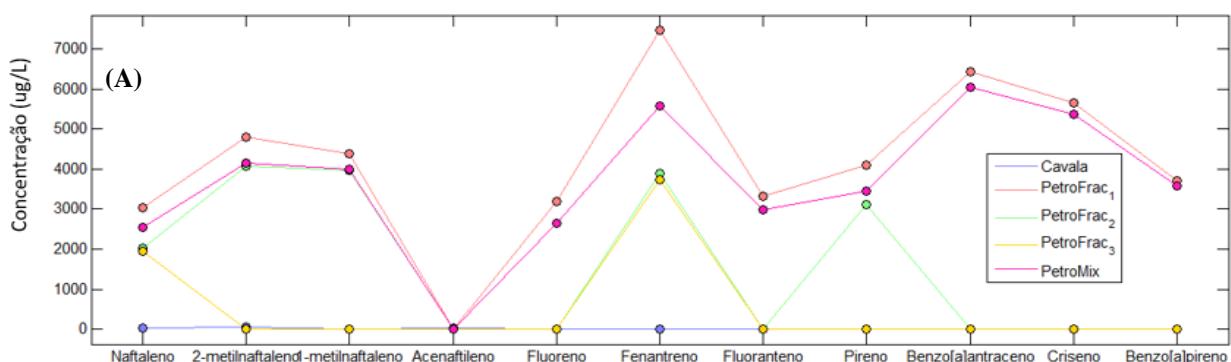
4.4 ANÁLISE EXPLORATÓRIA DOS DADOS

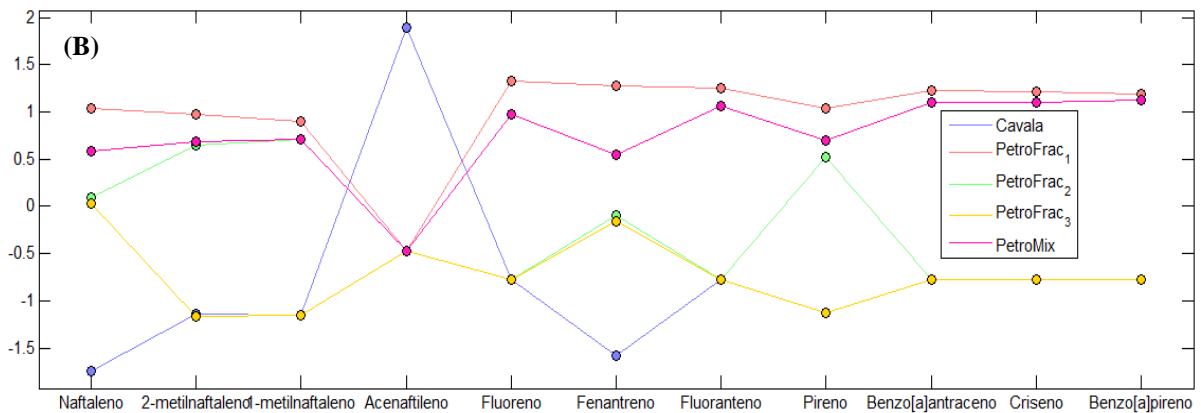
Devido à quantidade ainda diminuta de dados obtidos nas análises dos ftalatos, esta seção apresenta análises exploratórias apenas referentes à análise de HPA em óleo bruto e peixe.

4.4.1 Análises preliminares

Para análise exploratória, os dados foram organizados em uma matriz $X_{[10 \times 11]}$, onde as amostras foram dispostas em linhas e as variáveis (concentração dos HPAs) dispostas em colunas. Para normalizar a diferença na ordem de grandeza dos teores de HPAs encontrados no peixe e no petróleo, os dados originais (**Figura 27-A**) foram pré-processados pelo auto escalonamento (**Figura 27-B**). A matriz $X_{[10 \times 11]}$, com os dados escalonados, é apresentada no **APÊNDICE E**. As concentrações determinadas abaixo do limite de quantificação, foram tratados como dados faltantes, previamente à análise exploratória.

Figura 27 - (A) Visualização dos dados brutos e (B) dos dados autoescalados de peixe (Cavala), primeira fração de petróleo (PetroFrac_1), segunda fração de petróleo (PetroFrac_2), terceira fração de petróleo (PetroFrac_3) e mistura das três frações (PetroMix).





No autoescalonamento (**Eq. 2**), os dados são centrados na média e divididos por um fator de escala (desvio padrão das medidas). Assim, cada HPA passa a ser avaliado com o mesmo nível de importância, preservando a informação estatística dos dados (FERREIRA., 2016; MOITA NETO; MOITA, 1998).

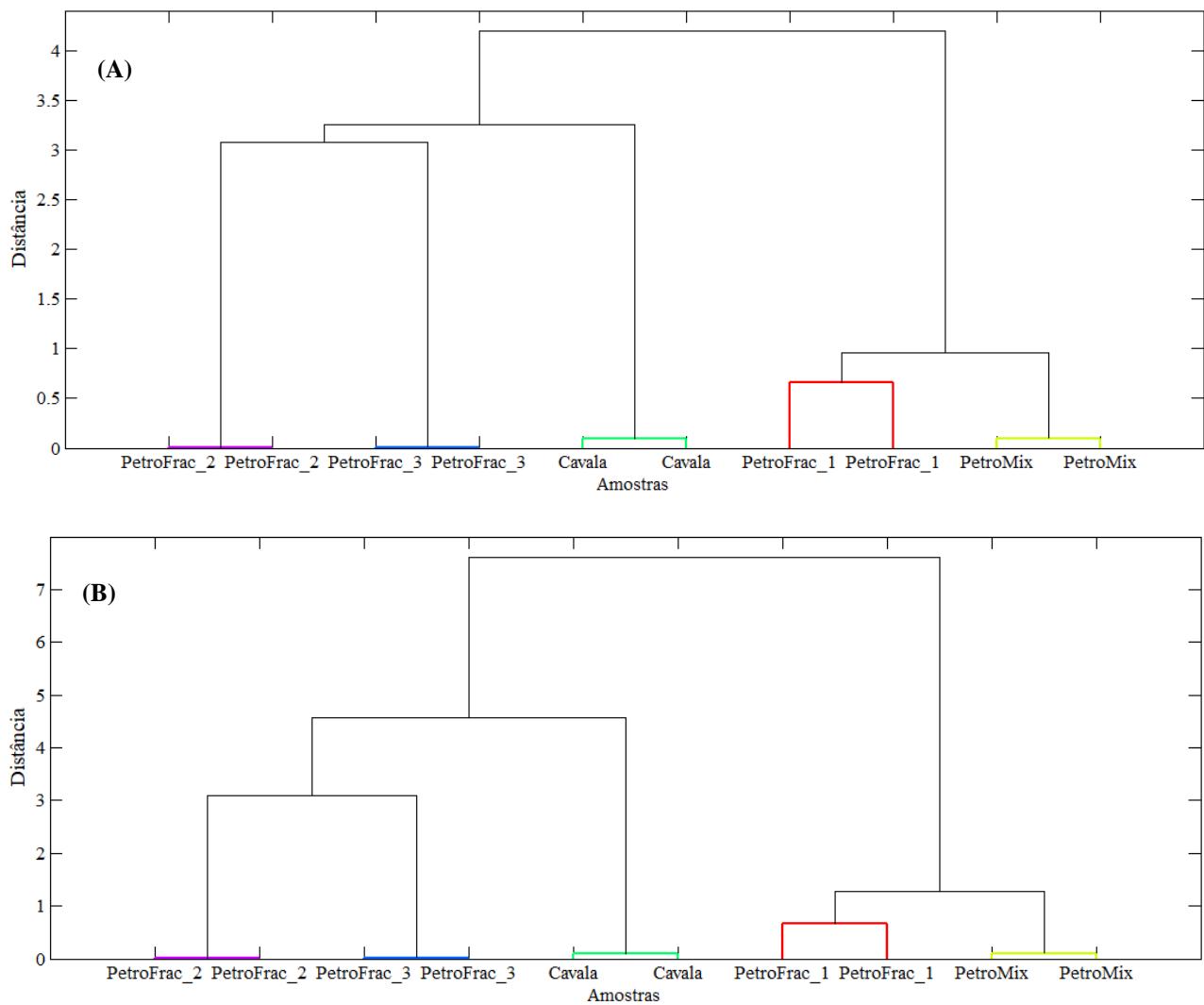
$$X_{ij} (v) = \frac{(x_{ij} - \bar{X}_j)}{S_j} \quad \text{Eq. 2}$$

Onde: x_{ij} é a resposta individual, \bar{X}_j é a resposta média e S_j desvio padrão para variável.

Análise exploratória: HCA

Nesta análise, a formação de agrupamentos hierárquicos é baseada no cálculo de distâncias ou similaridades (correlação). A matriz de dados é composta por 10 amostras (cada amostra em duplicata), 11 variáveis, e apresenta correlação média moderada (0,6098). Apesar da correlação entre as variáveis existir, o fato de que a matriz dos dados possuir n^o amostras < n^o variáveis impede a realização do cálculo usando a distância de Mahalanobis (pois a matriz de covariância não seria inversível). Na **Figura 28** são mostrados os agrupamentos formados pelo cálculo da distância Euclidiana, considerando o método do vizinho mais próximo (**Figura 28-A**) e método do vizinho mais distante (**Figura 28-B**).

Figura 28 - HCA com cálculo de distância Euclidiana (A) pelo método dos vizinhos mais próximos e (B) método dos vizinhos mais distantes de peixe (Cavala), primeira fração de petróleo (PetroFrac_1), segunda fração de petróleo (PetroFrac_2), terceira fração de petróleo (PetroFrac_3) e mistura das três frações (PetroMix).



Fonte: A autora (2022). Feito no Matlab (2010)

O fato de serem consideradas poucas amostras e as replicatas serem reprodutíveis, levou à formação de agrupamento iguais quando considerados os dois métodos de distância, indicando que não há sobreposição entre as amostras dos grupos. Considerando o método dos vizinhos mais distantes, a divisão espacial dos clusters ficou um pouco menos alongado comparado ao método dos vizinhos mais próximos, como esperado. O cálculo foi repetido usando a distância *city-block*, e os gráficos foram iguais aos obtidos usando a distância Euclidiana; por esta razão estes últimos não são mostrados.

A HCA mostra que a composição da mistura das frações (PetroMix) tem maior influência/ similaridade com a composição da primeira fração extraída do óleo (PetroFrac_1), sendo esta composta pela fração mais apolar de HPAs. Por sua vez, a composição da segunda

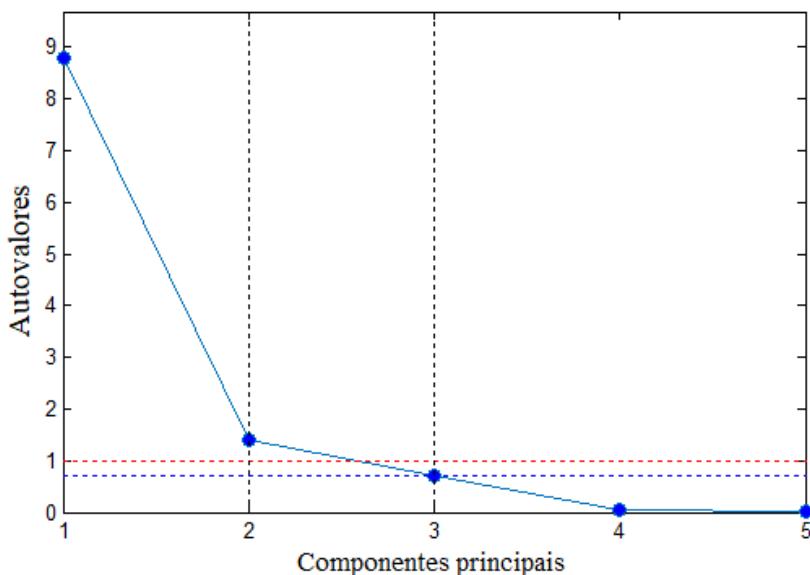
e terceira frações de petróleo são mais semelhantes entre si por constituírem as composições de HPAs mais polares. A este último agrupamento, o peixe cavala apresenta maior semelhança.

Os testes preliminares foram realizados em peixes da espécie cavala, porque estas foram as primeiras amostras, referentes ao incidente com petróleo, encaminhadas ao laboratório (DQF-UFPE) onde pesquisa foi conduzida.

Análise exploratória: PCA clássica e robusta

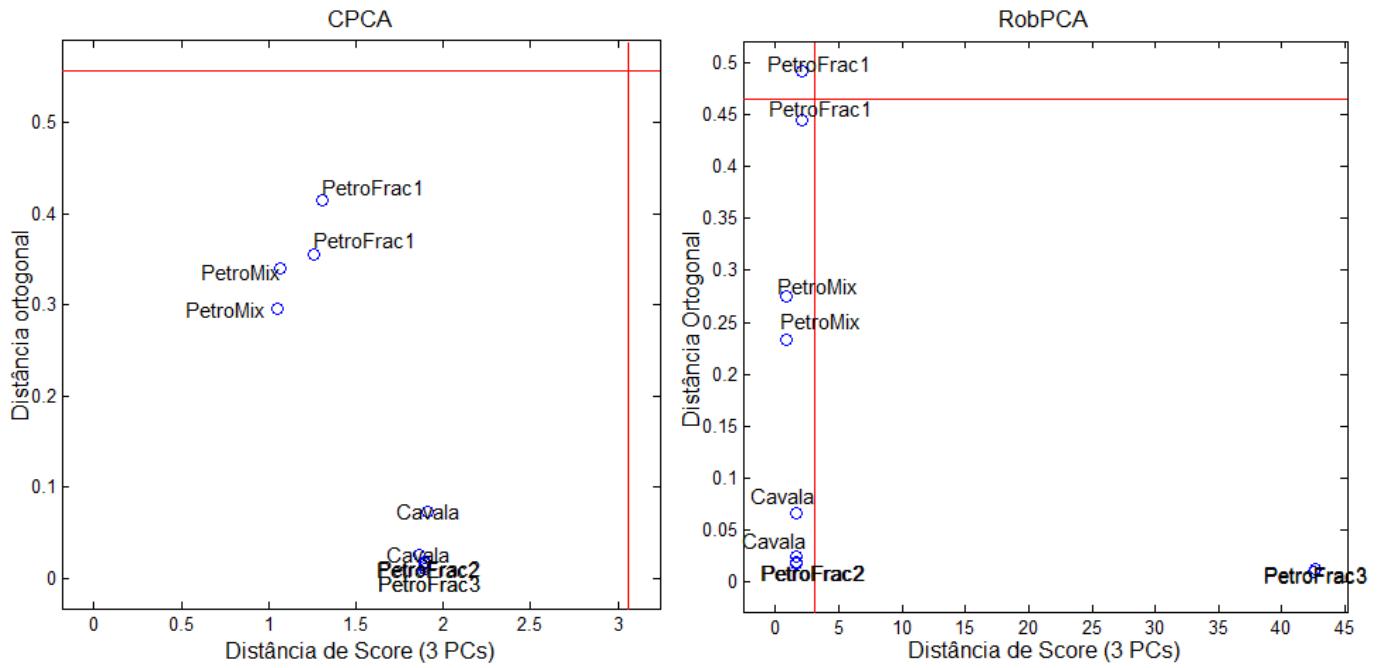
Para os cálculos de PCA os dados foram autoescalados. Na **Figura 29**, o gráfico de autovalores indica, tanto para a PCA clássica (CPCA) quanto para a PCA robusta (RobPCA), que a variabilidade dos dados pode ser explicada por até três componentes principais. Nos cálculos da CPCA, 3 PCs explicam 99,5% da variância dos dados, enquanto que na RobPCA, 3 PCs explicam 99,6% da variância. O cálculo clássico foi feito pelos métodos NIPALS e SVD. No entanto, a baixa variabilidade dos dados produziu resultados idênticos pelas duas metodologias.

Figura 29 - Gráfico de autovalores para os cálculos de PCA robusta (ROBPCA)



Na **Figura 30**, considerando 3 PCs, a métrica de distância ortogonal versus a distância de score indica que nenhuma amostra ocupa o primeiro quadrante e, portanto, nenhuma delas é considerada anômala.

Figura 30 - Distância de score versus distância ortogonal, para identificação de amostras anômalas



Tanto na abordagem clássica quanto na abordagem robusta, a terceira componente principal explica apenas 6,6% e 7,6% dos dados, respectivamente. As **Figuras 31** e **32** representam a distribuição espacial das amostras (*scores*, em preto) em função da influência de cada analito (*loadings*, em azul) no mesmo gráfico, denominado *biplot*. Percebe-se que duas PCs são suficientes para visualizar o agrupamento natural de cinco tipos de amostras, como esperado. A diferença entre o biplot de CPCA e RobPCA consiste, unicamente, no deslocamento das linhas que limitam a região média de PC1 e PC2. Por isto, a interpretação para estes gráficos é a mesma.

Figura 31 - Gráfico biplot representando scores (□) e loadings (●) em CPCA

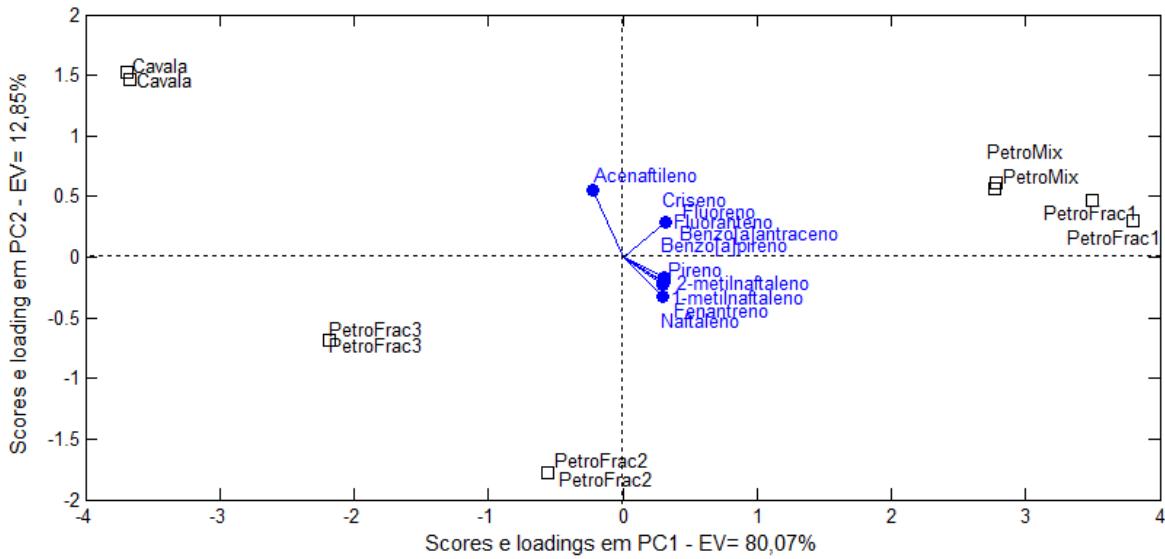
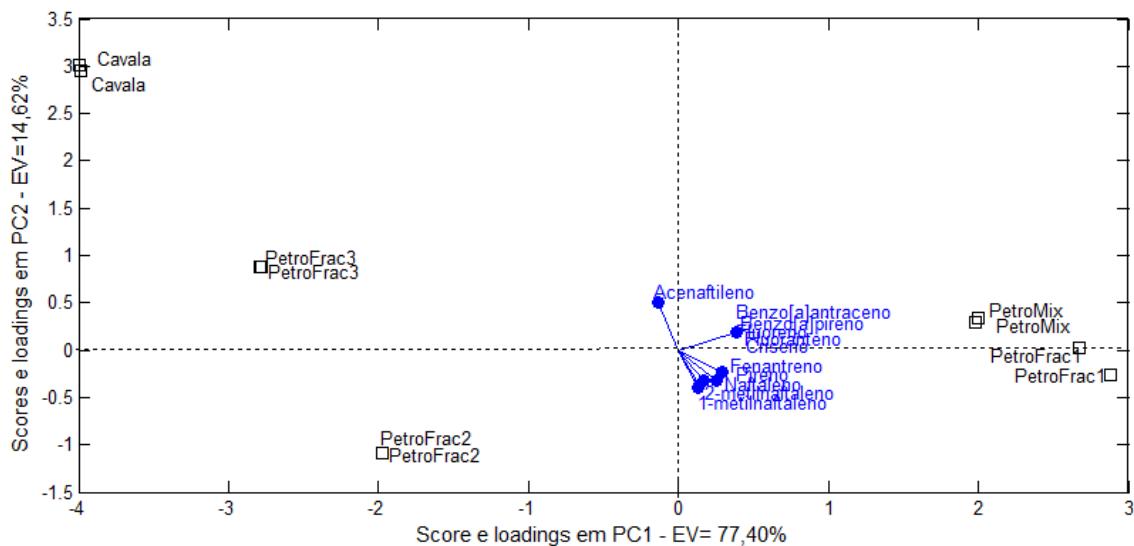


Figura 32 - Gráfico biplot representando scores (□) e loadings (●) em ROBPCA



Em PC1 é evidenciada a correlação entre a primeira fração do petróleo (PetroFrac1) e a mistura (PetroMix), sendo estas as amostras que têm influência de todos os HPAs, exceto do acenaftileno. Por outro lado, as amostras de Cavala aparecem em direção oposta em PC1, indicando que sua composição é bastante distinta, possuindo maior influência do acenaftileno em comparação com quaisquer outras amostras.

A PC2 mostra que a terceira fração do petróleo pode apresentar composição intermediária às frações PetroFrac1 e PetroFrac2. Em PC2 PetroFrac3 e PetroFrac2 têm maior influência de naftaleno, fenantreno, 1 e 2-metilnaftaleno e pireno em suas composições,

enquanto que PetroFrac1 e PetroMix apresentam maior influência de benzo[a]pireno, benzo[a]antraceno, fluoranteno, flueoreno em suas composições. Tanto PC1 quanto PC2 evidenciam que a composição da amostra de peixe difere das frações do petróleo. Este resultado é esperado, uma vez que o peixe utilizado no estudo foi coletado de uma região onde, segundo informações dos locais, não foram vistas manchas de óleo.

A partir das análises preliminares foram feitos ajustes na metodologia de extração do peixe, e então o preparo aplicado a peixes de diferentes espécies coletados.

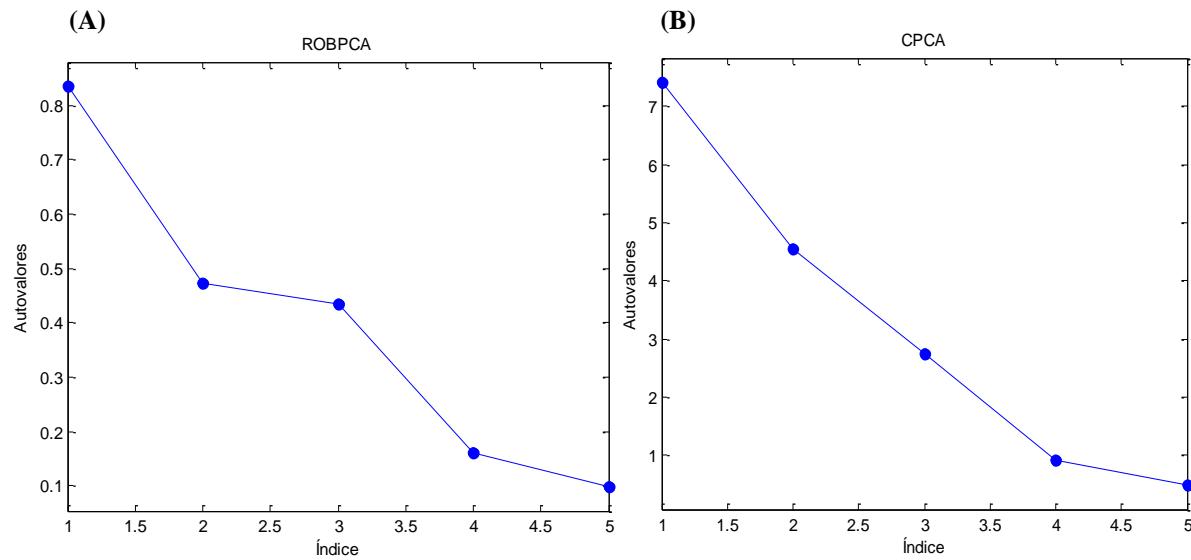
4.4.2 Análise exploratória nos peixes analisados

Os dados foram dispostos em uma matriz $X_{[24 \times 19]}$, contendo as concentrações médias calculadas, em ng mL^{-1} , para cada amostra em triplicata. A metodologia de UE-AA-LLME com saponificação durante 1h, e banho ultrassônico foi aplicada a um total de vinte e quatro amostras de peixe ($n=24$), divididas em seis classes de acordo com as seguintes espécies: cavala (códigos CV, $n=8$), oparu (códigos O, $n=3$), pampo (códigos PP, $n=3$), saramunete (códigos SP, $n=3$), tainha (códigos TP, $n=3$) e xaréu (códigos XA, $n=3$). O pré-processamento aplicado foi o auto escalonamento. Para o cálculo de RobPCA foi realizado o pacote LIBRA, em ambiente Matlab.

Nas dezenove ($n=19$) colunas na Matriz X estão presentes os seguintes analitos: naftleno*, 2-metilnaftaleno*, acenaftileno*, 1-metilnaftaleno*, acenafteno*, fluoreno*, fenantreno*, antraceno*, fluoranteno*, pireno*, *p*-terfenil-d14, benzo[a]antraceno, criseno, benzo[b]fluoranteno, benzo[k] fluoranteno, benzo [a]pireno, indeno[1,2,3-cd]pireno, dibenz[a,h]antraceno e benzo[g,h,i] perileno. Embora a metodologia aplicada tenha apresentados bons resultados de recuperação apenas para os HPAs marcados com (*), todos os HPA estudados foram incluídos nos cálculos.

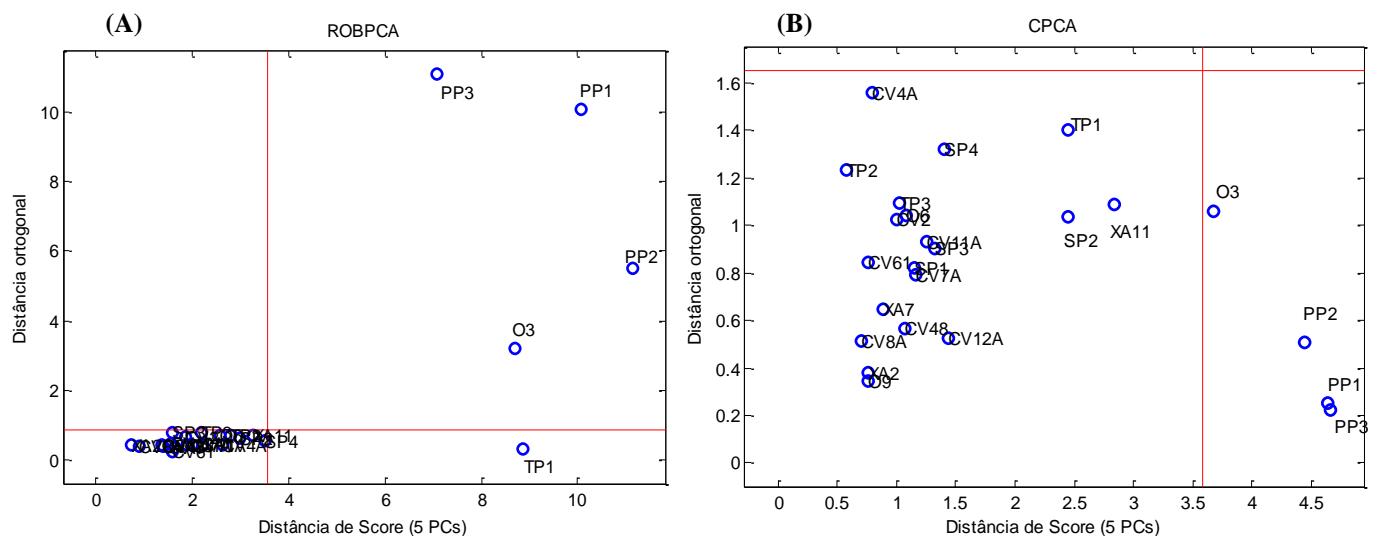
A **Figura 33-A** indica o cálculo de autovalores para o cálculo de RobPCA considerando os dezenove analitos. Neste caso, o uso de 5 PCs explicam 86 % da variância dos dados experimentais. Por outro lado, nos cálculos de CPCA, 5 PCs são capazes de explicar 95% dos dados (**Figura 33-B**).

Figura 33- Gráfico de autovalores para os cálculos de (A) ROBPCA e (B) CPCCA para o perfil de HPAs em 24 amostras de peixe.



Na **Figura 34** são mostradas as amostras de cavala (CV), oparu (O), pampo (PP), saramunete (S), tainha (TP) e xaréu (XA), pela métrica de distância de *score* versus a distância ortogonal para ROBPCA (**Figura 34-A**) e CPCCA (**Figura 34-B**), considerando 5 PCs.

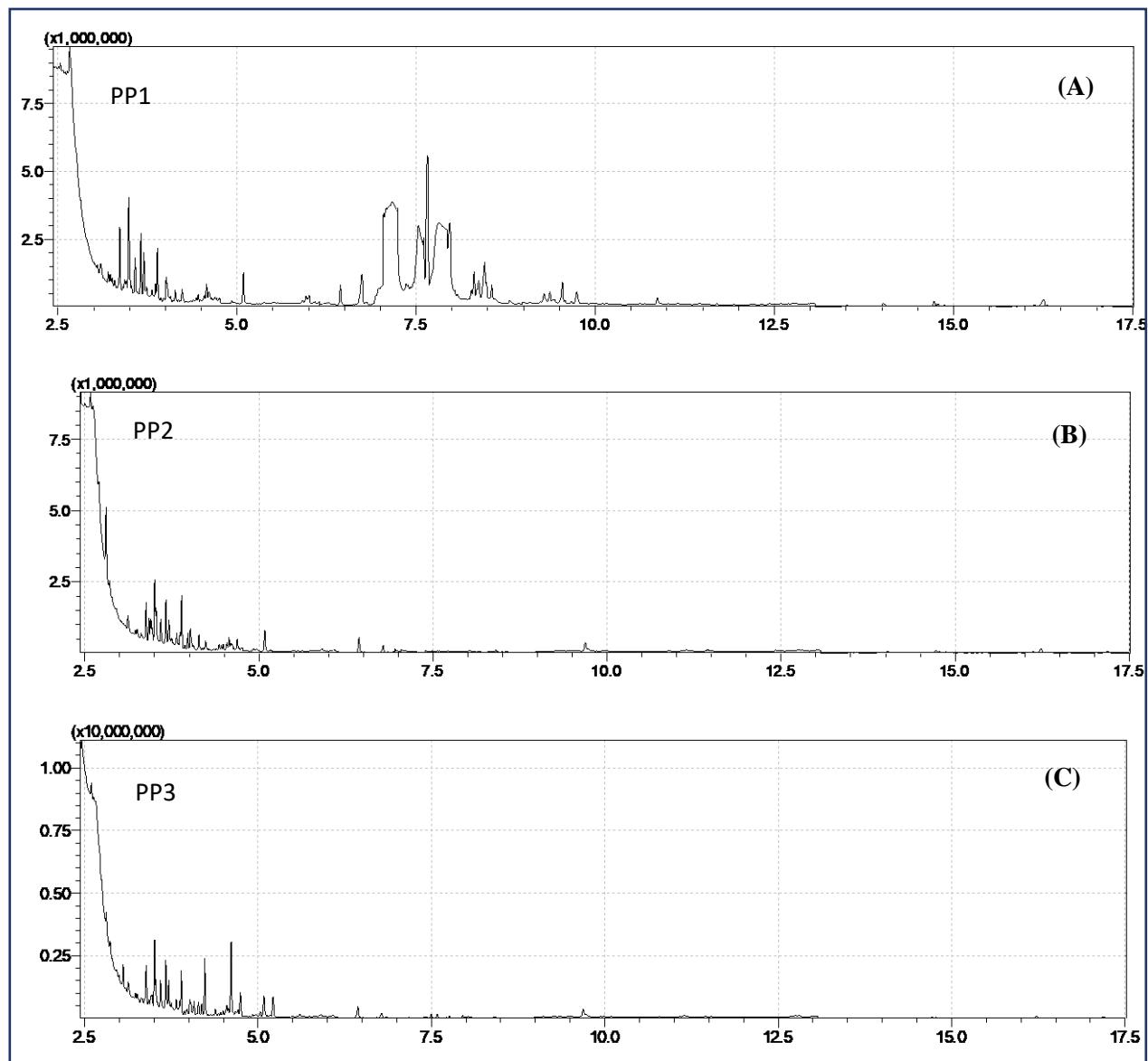
Figura 34 - Identificação de amostras anômalas, considerando os analitos recuperados pelo método UE-AA-LLME com ultrassom. Para 24 amostras de peixe



Enquanto que no gráfico de CPCCA nenhuma amostra foi considerada atípica, o gráfico de ROBPCA apresenta a amostra de pampo (PP1) com alto valor de distância ortogonal e de

score. Assim, esta deve ser observada com mais cuidado. Próximo à amostra em questão, outras duas amostras da mesma espécie destacam-se no gráfico (PP2 e 3), porém com distância ortogonal ou de score menos pronunciada. Todas estas são amostras de pampo coletadas em Itamaracá em abril/2022. Os cromatogramas individuais da amostra suspeita (PP1) e demais amostras de pampo são mostrados na **Figura 35**.

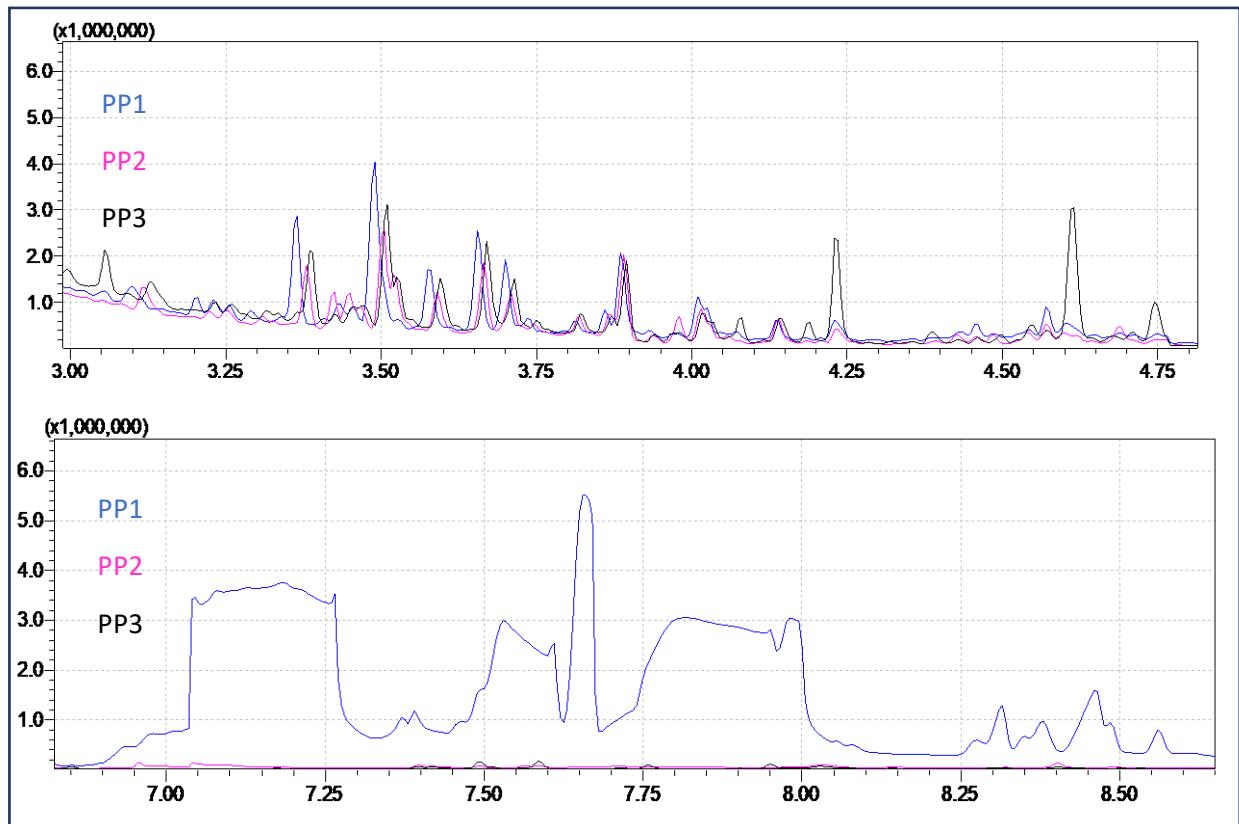
Figura 35 - Cromatogramas individuais das amostras da pampo (A) PP1(B) PP2 e (C) PP3



E a **Figura 36** mostra os mesmos cromatogramas sobrepostos, em recortes ampliados, comprovando que o perfil da amostra PP1 é realmente distinto das demais amostras de mesma

espécie. No entanto, esta amostra será considerada nas análises por considerar a variabilidade de amostras reais de peixe pampo.

Figura 36 - Cromatogramas de pampo sobrepostos, em recorte



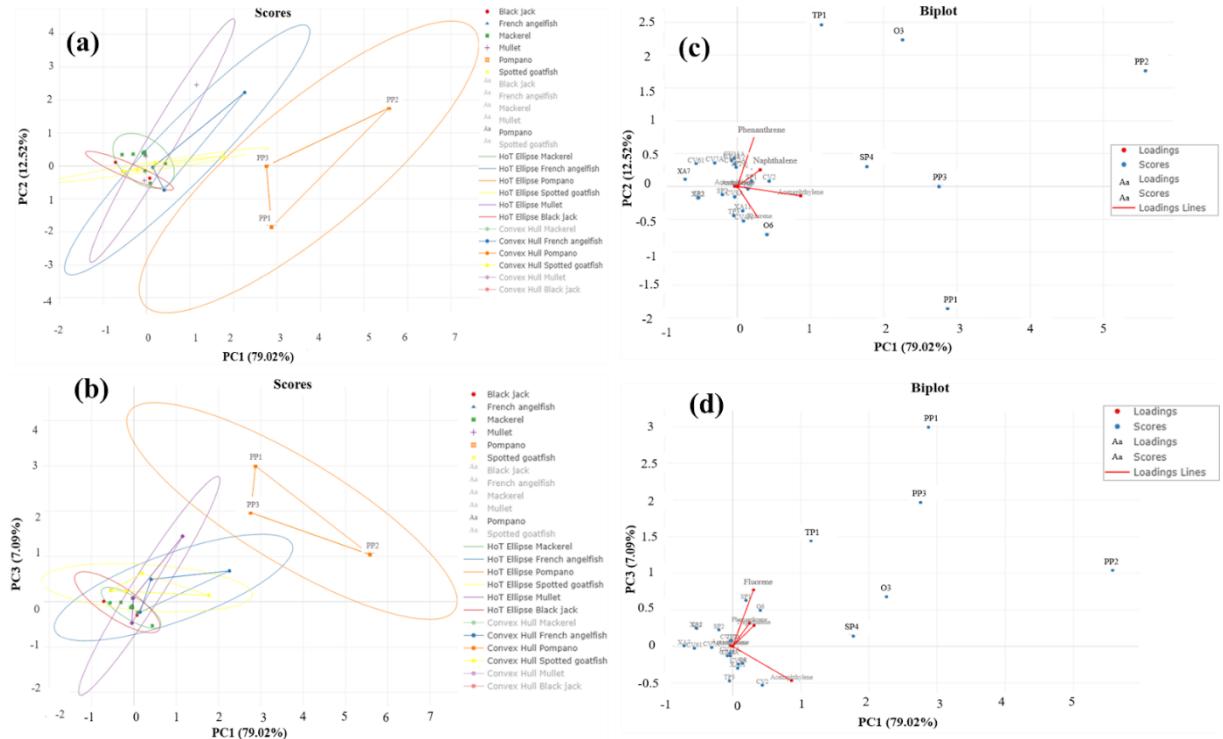
Antes da análise exploratória, optou-se pelo pré-processamento das amostras por meio da imputação de valores faltantes, utilizando $KNN = 3$ e escalonamento automático. Esta metodologia foi aplicada às amostras com concentrações de analito abaixo do LQ. Os valores imputados são apresentados no **APÊNDICE E**. Cada valor imputado foi avaliado para garantir que não excedeu o LQ e que a distribuição normal geral das concentrações do analito permaneceu normal, a fim de fornecer um conjunto de dados completo para análise. Ao manter a distribuição normal das concentrações do analito e garantir que os valores imputados permaneceram dentro dos limites aceitáveis, a integridade dos dados foi preservada.

Para o cálculo do RobPCA foi utilizado o aplicativo web de quimiometria desenvolvido no ambiente R (DARZÉ *et al.*, 2023). A análise exploratória foi realizada separadamente para o MSPD e UE-AA-LLME para avaliar a variação do teor de HPA com baixas e altas massas molares nas amostras de peixes analisadas.

Assim, uma matriz foi montada contendo as concentrações de naftaleno, 2-metilftaleno, acenaftileno, 1-metilftaleno, acenafteno, fenantreno, antraceno, fluoranteno e pireno, obtidas pelo método UE-AA-LLME. Enquanto que as concentrações de benzo[a]fluoranteno, benzo [a]pireno, indeno[1,2,3-cd]pireno, dibenz[a,h] antraceno e benzo[g,h,i]perileno foram obtidas pelo método MSPD, e dispostas em outra matriz.

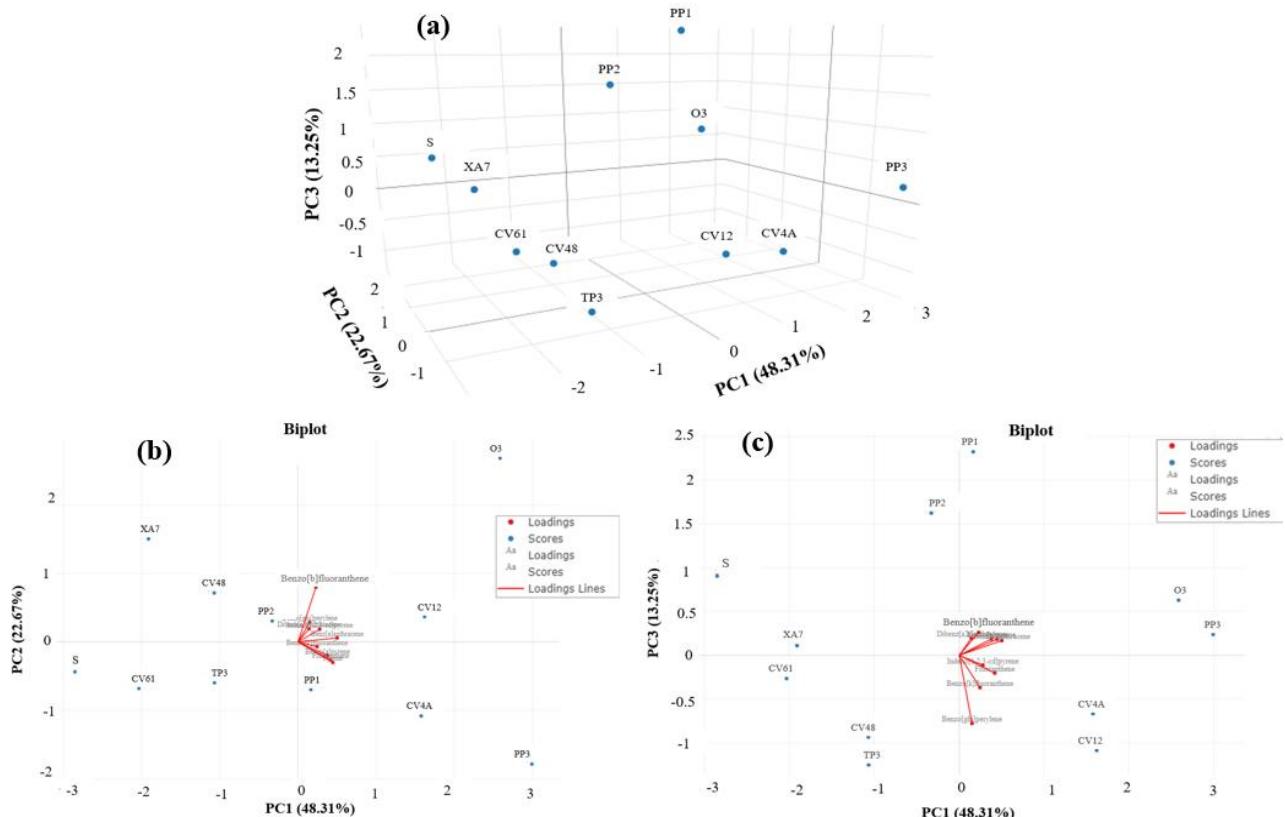
Na **Figura 37-a e b**, os gráficos de PC1 versus PC2 e PC1 versus PC3 mostram que a composição de HPAs nas amostras de pampo (PP1, PP2 e PP3) e de saramunete (SP4) é a mais distinta entre as demais. Esta diferença é atribuída principalmente aos níveis mais elevados de naftaleno, acenaftileno, fluoreno e fenantreno nesta espécie (ver **Figura 37-c e d**). As amostras de tainha (TP1) e oparo (O3) apresentam perfil químico mais semelhante entre si devido à semelhança nas concentrações de naftaleno e fenantreno. A alta concentração de HPAs no peixe pampo pode estar relacionada ao seu alto teor de gordura (HE *et al.*, 2019), que é superior a 7% no seu músculo. As amostras de pompons e de peixes oparu foram semelhantes entre si, como pode ser visto na **Figura 37-a**. Nessas espécies, foi observado maior teor de gordura durante o preparo da amostra (ESPITIA-MANRIQUE *et al.*, 2017; HE *et al.*, 2019). Esta análise RobPCA indica que HPAs de baixa massa molar tendem a bioacumular em tecidos com maior teor de gordura (JIN *et al.*, 2021), como ocorre com os poixes pampo e oparu.

Figura 37- Gráficos de *score* para (a) PC1 vs. PC2, (c) PC1 vs. PC3 e gráficos Biplot para (c) PC1 vs. PC2 e (d) PC1 vs. PC3 para os HPAs de baixa massa molar extraídos de amostras de peixes com método EU-AA-LLME.



A Figura 38 mostra os resultados do RobPCA para os HPAs de alta massa molar extraídos com o método MSPD para as amostras de peixes. Os valores imputados são apresentados no APÊNDICE E. Pode-se observar que as mesmas amostras de pampo (PP1, PP2 e PP3) e a amostra de oparu (O3) apresentam maiores teores de HPAs, principalmente fluoranteno e pireno. Para os HPAs de alta massa molar, as amostras de cavala (CV4A e CV12) também apresentam maior concentração de fluoranteno e pireno. No entanto, a concentração de HPAs de alta massa molar não diferiu daquela de baixa massa molar. Este resultado sugere que a bioacumulação de HPAs de alta massa molar ocorre independente do teor de gordura do peixe (LOURENÇO *et al.*, 2023), provavelmente devido ao maior número de anéis aromáticos que podem apresentar maior afinidade mesmo com menor quantidade de gordura presente no filé de peixe. Assim, a análise de PCA sugere que as espécies gordurosas apresentam maior bioacumulação de HPAs, principalmente para aquelas com baixas massas molares.

Figura 38- Gráfico de scores (a) PC1 vs. PC2 vs. PC3 e Gráficos biplot (b) PC1 vs. PC2 e (c) PC1 vs. PC3 para os HPAs de alta massa molar extraídos de amostras de peixes com o método de MSPD.



4.5 EXTRAÇÃO DE FTALATOS EM ÁGUAS COM USO DE SOLVENTES EUTÉTICOS (DES) E ANÁLISE POR HPLC-UV

4.5.1 Síntese de DES e método de extração

As quinze composições eutéticas avaliadas, foram baseadas nos trabalhos indicados no **Quadro 3**, tendo sido aplicadas à extração de ftalatos em águas, suco, chás ou leite.

Quadro 3- Misturas eutéticas avaliadas para extração de ftalatos em bebidas e águas residuais

Composição para síntese do DES	Referência
Propilenoglicol: cloreto de colina: água (1:1:1) Glucose: cloreto de colina: água (2:5:5) Ácido láctico: glucose: água (5:1:3)	EL ACHKAR; FOURMENTIN; GREIGE-GERGES, 2019
Mentol: ácido láurico (1:1)	WANG, <i>et al.</i> , 2020

Mentol: timol (2:1)	SANTANA-MAYOR <i>et al.</i> , 2021
Mentol: β-citronelol (1:1) Mentol: ácido láctico (1:1) Mentol: ácido acético (1:1) Cánfora: ácido fórmico (1:1) Timol: β -citronelol (1:1)	FAN <i>et al.</i> , 2021
Cloreto de colina: etilenoglicol (1:2) Cloreto de colina: ácido acético (1:2) Cloreto de colina: glicerol (1:2) Cloreto de colina: ureia (1:2)	SANTANA-MAYOR <i>et al.</i> , 2020
Mentol: ácido esteárico (1:1)	KAUL; QADAH; DIETZ, 2019

As misturas foram preparadas adicionando-se as proporções molares calculadas para cada reagente, dentro de um Erlenmeyer sob agitação magnética. As composições eutéticas foram aquecidas à 80°C sob agitação, até à formação de um líquido transparente homogêneo. Nestes casos o aquecimento foi realizado diretamente na chapa de aquecimento sob agitação, como adaptação ao procedimento original de aquecimento em sistema banho-maria (EL ACHKAR; FOURMENTIN; GREIGE-GERGES, 2019). As misturas de composição ternária com a água foram levadas a aquecimento até 50 °C. A **Figura 39** mostra a montagem do experimento realizado.

Figura 39 - Montagem do sistema para preparo das misturas eutéticas, consistindo de chapa de aquecimento e sistema de agitação magnética.

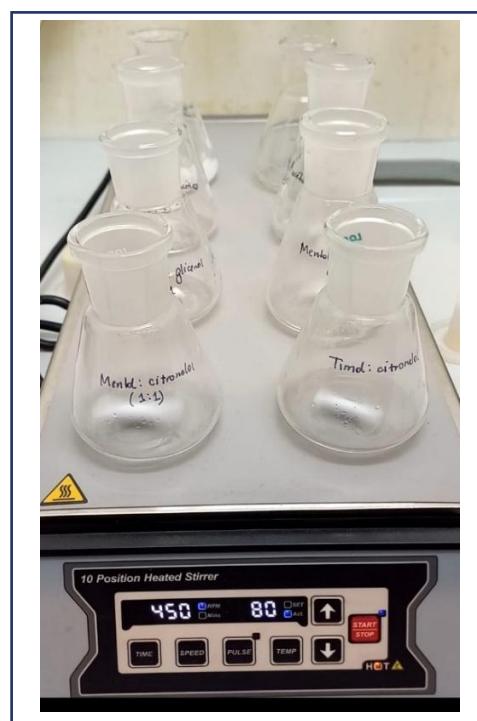
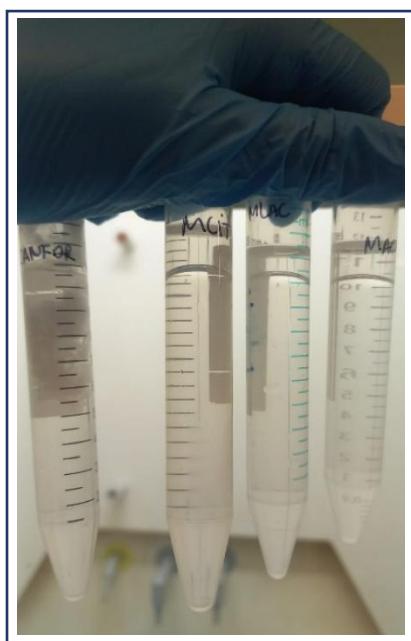


Foto: A autora (2024)

Após síntese, foi realizado o teste visual de estabilidade térmica à temperatura ambiente, onde os Erlenmeyers contendo os DES foram vedados com tampa e deixados em repouso na bancada durante o fim de semana. Foram consideradas estáveis as misturas que permaneceram em estado líquido. Para avaliar a solubilidade em meio aquoso, foram transferidos para um tubo côncico, 1 mL do DES e 10 mL de água destilada. Nos casos de insolubilidade foram formadas duas fases, com o solvente eutético na fase superior, como ilustra a **Figura 40**.

Figura 40 - Teste para avaliar a solubilidade do solvente eutético em água. Sendo estes DES menos densos que a água, eles se depositam na fase superior do tubo



O **Quadro 4** reúne o resultado das observações para os testes de estabilidade à temperatura ambiente e de solubilidade em água. Dentre as opções avaliadas, as misturas que apresentaram os melhores resultados e foram reservadas para as etapas seguintes do experimento foram: mentol: β -citronelol (1:1) (abreviada como MENCIT), timol: β -citronelol (1:1) (abreviada como TIMCIT) e mentol:timol (2:1) (abreviada como MENTIM).

Quadro 4 - Testes de estabilidade realizado nas misturas eutéticas, baseados na inspeção visual

Mistura	Estabilidade à temperatura ambiente	Solubilidade em água
Ácido láctico: glucose: água (5:1:3)	X	✓ *
Cánfora: ácido fórmico (1:1)	✓	X **
Cloreto de colina: polietilenoglicol (1:2)	X	✓ *
Cloreto de colina: ácido acético (1:2)	✓	✓
Cloreto de colina: glicerol (1:2)	✓	✓
Cloreto de colina: ureia (1:2)	X	✓
Glucose: cloreto de colina: água (2:5:5)	✓	✓
Mentol: ácido acético (1:1)	X	X
Mentol: ácido esteárico (1:1)	X	X
Mentol: ácido láctico (1:1)	✓	✓
Mentol: ácido lúbrico (1:1)	X	X
Mentol: β-citronelol (1:1)	✓	X
Mentol: timol (2:1)	✓	X
Propilenoglicol: cloreto de colina: água (1:1:1)	✓	✓
Timol: β-citronelol (1:1)	✓	X

*Após repouso durante o fim de semana, na bancada.

** Houve a gelificação da mistura eutética quando em contato com a água.

A escolha de DES de baixa solubilidade em água dispensa uso de agente emulsificante como THF (ÖZGÜR *et al.*, 2023; SANTANA-MAYOR *et al.*, 2020) tornando a síntese ainda mais “sustentável”. Isto motivou a busca de uma metodologia de referência, a título de comparação, em que o solvente extrator também fosse coletado na fase superior do tubo cônico.

Método de extração

- **Extração com DES**

Com base neste procedimento para extração LLH, foram estabelecidas as etapas para extração com os DES: MENCIT, TIMCIT e MENTIM. Inicialmente foi preciso realizar um estudo para definir a quantidade adequada de sal na etapa de *salting-out*. Os testes foram conduzidos em água destilada.

Para isto, foram feitos testes em tubos cônicos de 15 mL, adicionando-se 10 mL de água destilada, 25 uL de solução do padrão de ftalatos 0,01 mol L⁻¹ (em etanol), 1 mL do solvente eutético (MENCIT, TIMCIT ou MENTIM). Em seguida, foram adicionadas 0,1, 0,25 ou 0,5g de NaCl – correspondendo a 1,0, 2,5 e 5,0 % (m v⁻¹) de NaCl, respectivamente. Também foi feito um teste na ausência do sal. Os tubos foram submetidos a agitação por vórtex (2 min), seguido de centrifugação durante 5 min. Por fim, as respectivas fases orgânicas foram coletadas, armazenadas em *vials* e mantidas sob refrigeração até o momento da análise por HPLC.

Os resultados das análises por HPLC são apresentados na **Tabela 11**. Nos testes de recuperação de DBP, DEP e DMP em alíquotas de água e extraídos por solventes eutéticos, observa-se que a presença de sal nas amostras realmente favorece a migração dos analitos para a fase eutética, permitindo maiores percentagens de recuperação na presença de NaCl.

Dentre as condições estudadas, o melhor desempenho de extração foi observado para o uso da mistura mentol: β-citronelol (1:1) (MENCIT) e posterior adição de 2,5% (m v⁻¹) de NaCl para promover a migração dos analitos para a fase do DES, alcançando percentuais de recuperação elevados, entre 95 – 98%, para os ftalatos investigados. A melhor condição foi posteriormente aplicada para extração de ftalatos em amostras de águas residuais e bebidas, ampliando-se também o número de ftalatos avaliados.

Tabela 11 – Avaliação da etapa de salting-out, para extração com solventes eutéticos

Composição	DBP	DEP	DMP
MENCIT 0% NaCl	92%	93%	94%
MENCIT 1% NaCl	94%	92%	95%
MENCIT 2,5% NaCl	98%	95%	97%
MENCIT 5% NaCl	98%	93%	94%
TIMCIT 0% NaCl	93%	91%	96%
TIMCIT 1% NaCl	90%	93%	94%

TIMCIT 2,5% NaCl	94%	95%	95%
TIMCIT 5% NaCl	95%	97%	95%
MEMTIM 0% NaCl	87%	83%	86%
MEMTIM 1% NaCl	89%	88%	84%
MEMTIM 2,5% NaCl	90%	93%	92%
MEMTIM 5% NaCl	94%	94%	95%

4.5.2 Validação dos métodos cromatográficos

A **Tabela 12** reúne os parâmetros avaliados para a validação do método de HPLC-UV para extração de ftalatos por DES. Nesta Tabela observa-se que o ajuste linear avaliado foi bastante elevado para todos os ftalatos, com valores de $R^2 > 0,99$. Considerando-se BBP, DBP, DEP, DEHA, DEHP, DiBP e DMP foram obtidos LD na faixa $0,6 - 2,1 \mu\text{g L}^{-1}$ e LQ na faixa $2 - 7 \mu\text{g L}^{-1}$. Avaliando-se a precisão da técnica, o RSD variou na faixa de $2,45 - 14,21\%$, enquanto que para a precisão intermediária, a percentagem variou na faixa $2,36 - 16,98\%$. Para realizar os testes de repetibilidade e precisão intermediária, foram usadas soluções padrão $10 \mu\text{g L}^{-1}$.

Tabela 12 - Parâmetros de validação do método HPLC-UV, para determinação de ftalatos

Composto	LD (S/N=3,3, $\mu\text{g L}^{-1}$)	LQ (S/N=10, $\mu\text{g L}^{-1}$)	Repetibilidade (n=6, RSD %)	Precisão Intermediária (n=18, RSD %)	Coeficiente Determinação (R^2)
BBP	0,6	2	11,32	13,11	0,995
DBP	0,6	2	14,21	15,67	0,992
DEP	0,6	2	4,89	8,28	0,991
DEHA	1,5	5	3,21	2,36	0,996
DEHP	1,5	5	2,45	3,21	0,987
DiBP	0,6	2	5,89	16,98	0,991
DMP	2,1	7	7,21	8,21	0,995

Em paralelo, a **Tabela 13** mostra os parâmetros de linearidade avaliados para o método GC-MS/MS aplicado a análise de ftalatos, com base no protocolo já descrito na literatura (PEREIRA; CUNHA; FERNANDES, 2023), onde foram utilizados solventes

orgânicos convencionais (n-hexano + etanol) para extração por DLLME. Foi utilizada uma curva de calibração na faixa de concentração 1 – 500 µg L⁻¹ de ftalatos. Esta metodologia foi adotada para fins de comparação com o método desenvolvido com o uso de DES e HPLC-UV.

Tabela 13- Parâmetros de linearidade para método GC-MS/MS, para determinação de ftalatos

Composto	LD (S/N=3,3, µg L ⁻¹)	LQ (S/N=10, µgL ⁻¹)	Coeficiente Determinação (R ²)
BBP	0,5	0,6	0,998
DBP	0,5	0,6	0,999
DEP	0,5	1,5	0,994
DEHA	0,5	0,6	0,998
DEHP	0,5	0,6	0,998
DiBP	0,5	1,5	0,998
DMP	0,5	1,5	0,998

Embora tenham sido alcançados LD mais baixos para os analitos, vale destacar que o método de extração por DLLME envolveu o uso de reagentes tóxicos, e que equipamentos de GC-MS/MS são mais caros e mais dificilmente encontrados em laboratórios de rotina; tornando esta alternativa mais dispendiosa. Por outro lado, o uso dos DES na extração de ftalatos é uma alternativa verde, sustentável e prática, porém a alta viscosidade e alto ponto de fusão tornam a separação e determinação possível apenas por técnicas de cromatografia líquida, o que também exige maior consumo de solventes orgânicos como fase móvel.

4.5.3 Análise de amostras reais, por HPLC-UV e GC- MS/MS

Águas residuais

Foram coletadas quatro amostras na ETAR do Freixo, no Porto (**Figura 41**), antes e após o tratamento na unidade, a fim de monitorar o efeito das etapas de limpeza na remoção de BBP, DBP, DEP, DEHA, DEHP, DiBP e DMP.

Figura 41- Estação de Estação de Tratamento de Águas Residuais (ETAR) do Freixo, situada na margem norte do Rio Tinto, no Porto, Portugal.



Fonte: A autora (2024)

Na ETAR foram realizadas coleta antes e após a Estação de Tratamento, permitindo monitorar o efeito das etapas de limpeza na remoção de BBP, DBP, DEP, DEHA, DEHP, DiBP e DMP. Os resultados obtidos para a primeira coleta, por HPLC, são summarizados na **Tabela 14**.

Tabela 14- Análise do teor de ftalatos, após extração por DES e análise por HPLC, em amostras coletadas na Estação de Tratamento de Águas Residuais do Freixo (ETAR)

Período	Ponto de Amostragem	DEP ($\mu\text{g L}^{-1}$)	DBP ($\mu\text{g L}^{-1}$)	DEHP ($\mu\text{g L}^{-1}$)	BBP ($\mu\text{g L}^{-1}$)	DiBP ($\mu\text{g L}^{-1}$)	DEHA ($\mu\text{g L}^{-1}$)	DMP ($\mu\text{g L}^{-1}$)
NOV/2023	Entrada da ETAR	3,55	<0,6	< 1,5	< 0,6	2,67	< 1,5	< 2,1
	Saída da ETAR	< 0,6	< 0,6	< 1,5	< 0,6	< 0,6	< 1,5	< 2,1

Na **Tabela 15** encontram-se os resultados obtidos para as leituras por GC-MS/MS, após extração por DLLME.

Tabela 15- Análise do teor de ftalatos, após extração por DLLME e análise por GC-MS/MS, em amostras coletadas na Estação de Tratamento de Águas Residuais do Freixo (ETAR)

Período	Ponto de Amostragem	DEP ($\mu\text{g L}^{-1}$)	DBP ($\mu\text{g L}^{-1}$)	DEHP ($\mu\text{g L}^{-1}$)	BBP ($\mu\text{g L}^{-1}$)	DiBP ($\mu\text{g L}^{-1}$)	DEHA ($\mu\text{g L}^{-1}$)	DMP ($\mu\text{g L}^{-1}$)
NOV/2023	Entrada da ETAR	3,55	0,67	2,63	<0,05	2,67	<0,05	0,08
	Saída da ETAR	<0,05	<0,05	0,15	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05
MAI/2024	Entrada da ETAR	3,35	0,68	2,51	<0,05	2,35	<0,05	0,07
	Saída da ETAR	<0,05	<0,05	0,07	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05

Dentre os ftalatos analisados nas águas residuais empregando HPLC (**Tabela 14**), foi determinada a presença de apenas DEP ($3,55 \mu\text{g L}^{-1}$) e DiBP ($2,67 \mu\text{g L}^{-1}$) no ponto de entrada na ETAR. Na saída na Unidade, todos os ftalatos estudados tornam-se indetectáveis pelo método proposto. As análises realizadas por GC (**Tabela 15**) indicam a presença de DEP e DiBP em teores concordantes aos obtidos por HPLC (**Tabela 14**) para o mesmo período. Além disto, também identificaram a presença de DMP ($0,08 \mu\text{g L}^{-1}$) e DBP ($0,67 \mu\text{g L}^{-1}$) na entrada da ETAR. Comparando-se os resultados listados na **Tabela 15**, não houve diferença significativa entre os teores de ftalatos quantificados em novembro/2023 e maio/2024.

Dentre os compostos, o adipato de di-(2-etil-hexila), DEHA, também foi investigado por ser um substituto dos ftalatos bastante reconhecido, amplamente utilizado como plastificante em filmes de PVC para confecção de materiais que acondicionam alimentos (ESTEVES; BORGES; ABRANTES; *et al.*, 2007).

A **Tabela 16** reúne teores de ftalatos encontradas por outros autores, antes e após o tratamento realizado nas respectivas estações de tratamento. Vários trabalhos na literatura mostram que o DEHP é o ftalato mais abundante em águas residuais e que os métodos de extração de ftalatos propostos alcançam percentagens de recuperação superiores a 85%, empregando os métodos de extração em fase sólida ou extração líquida com solventes convencionais.

Tabela 16 - Teores de ftalatos em águas residuais, antes e após tratamento na ETAR, conforme determinado por outros autores.

Ponto de Amostragem	DEP ($\mu\text{g L}^{-1}$)	DBP ($\mu\text{g L}^{-1}$)	DEHP ($\mu\text{g L}^{-1}$)	BBP ($\mu\text{g L}^{-1}$)	DiBP ($\mu\text{g L}^{-1}$)	DMP ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Métodologia e Referência
Entrada da ETAR	<0,004 - 4,05	<0,009 – 65,6	<0,0008 – 143,3		< 0,0009– 93,1	< 0,007 – 4,93	*HS-SPME → GC-MS. Fonte: (KOTOWSKA; KAPELEWSKA; SAWCZUK, 2020)
Saída da ETAR	<0,004 - 3,26	<0,002 – 365,8	<0,002 – 27,1		< 0,001– 76,2	< 0,108 – 6,50	
Entrada da ETAR	0,20	0,14	1,2		0,05	<0,05	SPE → GC-MS Fonte: (ANNE; PAULAUSKIENE, 2021)
Saída da ETAR	<0,05	<0,05	0,07		<0,05	<0,05	
Entrada da ETAR	7,71	1,10	22,46	1,12		0,82	LE (hexano: 85% + diclorometano: 15%) e purificação com cartucho de Florisil® → GC-ECD**. Fonte: (DARGNAT <i>et al.</i> , 2009)
Saída da ETAR	0,78	0,15	5,02	0,30		nd*	
Entrada da ETAR	15,50	10,58	28,38	7,33			LE (hexano: 80% e diclorometano: 20%) e purificação com cartucho de alumina → GC-MS Fonte: (GANI; RAJPAL; KAZMI, 2016)
Saída da ETAR	2,48	2,93	4,86	1,56			

Extração à líquido (LE); * Microextração em Fase Sólida do Espaço Livre (HS-SPME); ** ECD: detector de captura de elétrons. ETAR: Estação de tratamento de água. nd*: não determinado.

Na **Tabela 16**, observa-se que os teores de ftalatos determinados após tratamento é expressivamente menor quando comparados aos teores antes do tratamento. Em situações em que a concentração dos ftalatos é significativamente maior na saída da Estação (por exemplo, o teor de DBP ser $365,8 \mu\text{g L}^{-1}$), KOTOWSKA e colaboradores (2020) atribuem este fato, a fatores como: a amostragem inadequada, uso de produtos químicos como coagulantes que podem conter ftalatos, ou mesmo devido a adsorção do DBP pelo lodo ativado durante o tratamento e posteriormente dessorção na água residual tratada de um lote diferente de esgoto (KOTOWSKA; KAPELEWSKA; SAWCZUK, 2020).

Em comparação com os teores de ftalatos determinados no presente estudo (vide **Tabelas 14 e 15**), observa-se que apenas a concentração de DEP determinado na entrada da ETAR do Freixo ($3,55 \mu\text{g L}^{-1}$) se aproxima dos valores determinados por KOTOWSKA e colaboradores (2020), para amostras coletadas na entrada de ETARs na Polônia ($4,05 \mu\text{g L}^{-1}$).

Os resultados destes estudos indicam que a quantificação e remoção eficiente dos ftalatos, permanece como um desafio significativo no âmbito ambiental devido à sua elevada persistência e toxicidade. Esses contaminantes persistem mesmo diante de avanços na implementação de estratégias para aprimorar seu monitoramento e remoção em sistemas aquáticos e águas residuais.

Bebidas do comércio local

Os métodos para análise de ftalatos por HPLC-UV e GC-MS/MS foram aplicados a dezessete amostras de bebidas comercializadas em mercados locais do Porto, acondicionadas em diferentes embalagens, como mostra a **Figura 42**.

Figura 42 - Bebidas adquiridas no comércio local do Porto, utilizadas para análise dos ftalatos. Foram avaliados sucos, chás gelados, cafés e refrigerantes, acondicionados em recipientes de metal, plástico e/ou papel



Fonte: Autora (2024)

As concentrações obtidas de DEP, DBP, DEHP, DMP, BBP, DiBP, e DEHA quantificadas pelo método de extração por DES e análise por HPLC são listadas na **Tabela 17**.

Tabela 17 – Concentrações de ftalatos ($\mu\text{g L}^{-1}$) em bebidas comercializadas no Porto, após extração com DES e detecção por HPLC-UV

Tipo de embalagem	Temperatura	Amostras	DEP	DBP	DEHP	DMP	BBP	DiBP	DEHA
HDPE (Polietileno de alta densidade)	Ambiente	Suco de laranja	< 0,6	< 0,6	3,89	< 2,1	< 0,6	< 0,6	3,44
		Suco de Limão	< 0,6	5,21	< 1,5	< 2,1	< 0,6	< 0,6	12,23
		Suco maça	< 0,6	< 0,6	< 1,5	< 2,1	< 0,6	< 0,6	13,21
		Chá gelado pêssego	< 0,6	< 0,6	4,12	< 2,1	< 0,6	4,45	7,11
		Chá gelado limão	< 0,6	< 0,6	3,91	< 2,1	< 0,6	5,43	5,29
PET (polietileno tereftalato)	Ambiente	Água consumo	< 0,6	< 0,6	< 1,5	< 2,1	< 0,6	< 0,6	< 1,5
Vidro	Ambiente	Água consumo	< 0,6	< 0,6	< 1,5	< 2,1	< 0,6	< 0,6	< 1,5
		Suco de laranja	< 0,6	< 0,6	8,11	< 2,1	< 0,6	2,28	3,11
		Suco de maça	< 0,6	< 0,6	< 1,5	< 2,1	< 0,6	< 0,6	< 1,5
		Suco de ananás	< 0,6	< 0,6	< 1,5	< 2,1	< 0,6	< 0,6	< 1,5
		Suco de laranja	< 0,6	3,11	3,25	< 2,1	< 0,6	< 0,6	12,78
Cartão (interior alumínio)	Ambiente	Suco de maça	< 0,6	2,34	< 1,5	< 2,1	< 0,6	< 0,6	< 1,5
		Suco de ananás	< 0,6	< 0,6	12,43	< 2,1	< 0,6	< 0,6	12,83
PET (polietileno tereftalato)	80° C	Café	< 0,6	8,29	28,11	< 2,1	6,11	< 0,6	31,82
PET (polietileno tereftalato)	80° C	Chá	< 0,6	7,21	29,15	< 2,1	7,89	< 0,6	25,67
Papel	80° C	Café	< 0,6	< 0,6	< 1,5	< 2,1	< 0,6	< 0,6	< 1,5
Papel	80° C	Chá	< 0,6	< 0,6	< 1,5	< 2,1	< 0,6	< 0,6	< 1,5

A **Tabela 18** reúne os resultados obtidos para a análise de algumas das mesmas amostras, mas submetidas à extração por DLLME e leitura por cromatografia gasosa.

Tabela 18 – Concentrações de ftalatos ($\mu\text{g L}^{-1}$) em bebidas comercializadas no Porto, após extração com DLLME e detecção por GC-MS/MS

Tipo de embalagem	Temperatura	Amostras	DEP	DBP	DEHP	DMP	BBP	DiBP	DEHA
HDPE (Polietileno de alta densidade)	Ambiente	Suco de laranja							
		Suco de Limão	27,29	8,74	5,17	< 0,05		6,31	3,98
		Suco maça			0,74			1,19	
		Chá gelado pêssego							
PET (polietileno tereftalato)	Ambiente	Chá gelado limão			< 0,05	< 0,05	0,61		
		Água consumo							
Vidro	Ambiente	Água consumo	18,84	3,13	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	1,01
		Suco de laranja			< 0,05		1,54		1,12
		Suco de maça							
		Suco de ananás							
Cartão (interior alumínio)	Ambiente	Suco de laranja							
		Suco de maça							
		Suco de ananás	10,38	3,88	2,61	< 0,05	4,36	2,14	2,32
PET (polietileno tereftalato)	80° C	Café	100,81	10,02	7,12	< 0,05		5,26	5,95
PET (polietileno tereftalato)	80° C	Chá							
Papel	80° C	Café							
Papel	80° C	Chá							

Comparando-se os resultados dispostos nas **Tabelas 17 e 18**, observamos que, em geral, os maiores teores de ftalatos foram detectados após extração por DLLME e detecção por GC-MS/MS. A extração por DLLME, de fato, promove maior pré-concentração dos analitos, porém faz uso de solventes orgânicos tóxicos (hexano+ etanol), sendo necessário maior cuidado à saúde do operador e do descarte dos rejeitos gerados (NIU *et al.*, 2023). Em comparação à técnica de detecção, o detector de GC-MS/MS permite alcançar limites de detecção mais baixos e fornece informação estrutural dos compostos (ANKARBERG-LINDGREN; DAHLGREN; ANDERSSON, 2018), o que também explica maiores concentrações de ftalatos em algumas bebidas e a detecção de DEP e DMP, que não foram identificados por HPLC.

Em relação aos limites considerados aceitáveis para ftalatos em alimentos pela Diretiva da Comissão Européia N° 10/2011 (EU, 2011), observamos que o método proposto

com o uso dos DES (**Tabela 17**) identificou concentrações de DBP superiores ao aceitável ($0,3 \mu\text{g L}^{-1}$) para: café acondicionado em embalagem de PET ($8,29 \mu\text{g L}^{-1}$), chá gelado em embalagem de PET ($7,21 \mu\text{g L}^{-1}$) e sumo de limão em embalagem de HPDE ($5,21 \mu\text{g L}^{-1}$). As maiores concentrações de DEHP superiores ao aceitável ($1,5 \mu\text{g L}^{-1}$) foram observadas para: chá gelado em embalagem de PET ($29,15 \mu\text{g L}^{-1}$), café acondicionado em embalagem de PET ($28,11 \mu\text{g L}^{-1}$) e sumo de ananás em embalagem de cartão ($12,43 \mu\text{g L}^{-1}$). Nenhuma das amostras apresentou teores acima do permitido para BBP ($30 \mu\text{g L}^{-1}$). Isto corrobora com o esperado; em que as maiores concentrações de ftalatos tenderiam a serem encontradas em bebidas acondicionadas em embalagens plásticas.

Uma análise análoga com os dados da **Tabela 18** mostra que as maiores concentrações de DBP superiores ao aceitável ($0,3 \mu\text{g L}^{-1}$) foram observadas para: café acondicionado em embalagem de PET ($10,02 \mu\text{g L}^{-1}$), sumo de limão em embalagem de HPDE ($8,74 \mu\text{g L}^{-1}$) e sumo de ananás em embalagem de cartão ($3,88 \mu\text{g L}^{-1}$). As maiores concentrações de DEHP superiores ao aceitável ($1,5 \mu\text{g L}^{-1}$) foram observadas para: café acondicionado em embalagem de PET ($7,12 \mu\text{g L}^{-1}$), suco de limão em embalagem de HPDE ($5,17 \mu\text{g L}^{-1}$) e suco de ananás em embalagem de cartão ($2,61 \mu\text{g L}^{-1}$). Nenhuma das amostras apresentou teores acima do permitido para BBP ($30 \mu\text{g L}^{-1}$). Estas observações confirmam que as maiores concentrações de ftalatos se encontram em bebidas acondicionadas em embalagens plásticas, e também acende o alerta para embalagens de cartão interiormente revestidas com alumínio.

5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Este estudo desenvolveu duas metodologias de extração para quantificar HPAs prioritários, com baixo e alto peso molecular, em amostras complexas de peixes coletadas das praias de Pernambuco entre 2021 e 2022; após derramamento de óleo. As 24 amostras de peixes, que variaram em composição e teor de gordura, demonstraram que as técnicas combinadas de UE-AA-LLME e MSPD recuperaram eficazmente HPAs, alcançando taxas médias de recuperação entre 60% e 120%, baseado no Regulamento (EC) N° 627/2006 da Comissão Européia (EU, 2006b).

Notavelmente, o método MSPD se destacou na extração de HPAs de alta massa molar, incluindo fluoranteno, pireno e benzo[a]pireno, enquanto UE-AA-LLME foi mais eficiente para HPAs de baixa massa molar, como naftaleno e fenantreno. É importante ressaltar que a análise revelou que os níveis de benzo[a]pireno estavam abaixo de $2,0 \mu\text{g kg}^{-1}$, e o total de benzo[a]pireno, benz[a]antraceno, benzo[b]fluoranteno e criseno permaneceu abaixo de $12 \mu\text{g kg}^{-1}$. Estes resultados indicam que os peixes adquiridos localmente não representam riscos para a saúde de acordo com o Regulamento da Comissão Europeia n.º 835/2011, e demonstra uma redução significativa nos riscos relacionados com a contaminação por petróleo na região.

Na segunda parte do trabalho foi apresentada uma estratégia para extração de ftalatos em águas, com teores de recuperação entre 95 – 98% para DBP, DEP e DMP, utilizando o DES de composição mentol: citronelol (1:1) como solvente extrator e detecção por HPLC-UV. A abordagem de extração com DES foi comparada com o uso de solventes convencionais (n-hexano + etanol) e detecção por GC-MS/MS; e as diferentes estratégias mostraram que as maiores concentrações de ftalatos se encontram em bebidas acondicionadas em embalagens plásticas, acendendo também o alerta para embalagens de cartão interiormente revestidas com alumínio. Além disto, a análise de amostras de águas residuais indicou que o sistema de tratamento da ETAR avaliada é eficiente na remoção de ftalatos.

Como perspectiva, propõe-se o preparo e análise de um maior número de amostras pelo método de DLLME – GC-MS/MS a fim de se comparar com os resultados obtidos pelo método proposto de DES – HPLC, e avaliar mais detalhadamente o processo de extração de ftalatos por DES, visto que ainda é pouco explorado na literatura. A proposta do grupo de pesquisa local é seguir com o monitoramento dos teores de ftalatos na ETAR do Freixo e, para isto novas coletas serão realizadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBASI, F. *et al.* A review of endocrine disrupting chemicals migration from food contact materials into beverages. **Chemosphere**. Elsevier Ltd, 2024. v.155, p. 1–13.
- ABRAHA, B. *et al.* Effect of processing methods on nutritional and physico-chemical composition of fish: a review. **MOJ Food Processing & Technology**, 2018. v. 6, n. 4, p. 376–382.
- AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY (ATSDR). **Toxicological Profile for Di (2-Ethylhexyl) Phthalate**. [S.l.]: [s.n.], 2022. Disponível em: <<https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp9.pdf>>. Acesso em 13 ago 2024.
- AIGNASSE, M. F. *et al.* A new simple and rapid HPLC method for determination of DEHP in PVC packaging and releasing studies. **International Journal of Pharmaceutics**, 1995. v. 113, n. 2, p. 241–246.
- ALLIATI, M. *et al.* Ionic Species in a Naphthalene Plasma: Understanding Fragmentation Patterns and Growth of PAHs. **Journal of Physical Chemistry A**, 2019. v. 123, n. 10, p. 2107–2113.
- AL-NATSHEH, M. *et al.* Simultaneous GC-MS determination of eight phthalates in total and migrated portions of plasticized polymeric toys and childcare articles. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, 2015. v. 985, p. 103–109.
- AMBIENTEBRASIL. Principais Acidentes com Petróleo e Derivados no Brasil. [s.d.]. Disponível em: <https://ambientes.ambientebrasil.com.br/energia/acidentes_ambientais/principais_acidentes_com_petroleo_e_derivados_no_brasil.html>. Acesso em: 5 set. 2022.
- ANKARBERG-LINDGREN, C.; DAHLGREN, J.; ANDERSSON, M. X. High-sensitivity quantification of serum androstenedione, testosterone, dihydrotestosterone, estrone and estradiol by gas chromatography–tandem mass spectrometry with sex- and puberty-specific reference intervals. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, 2018. v. 183, p. 116–124.
- ANNE, O.; PAULAUSKIENE, T. The assessment of the sewage and sludge contamination by phthalate acid esters (PAEs) in eastern europe countries. **Sustainability (Switzerland)**, 2021. v. 13, n. 2, p. 1–14.
- ANVISA. Resolução - RDC No 722, de 1º de julho de 2022. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, 2022. p. 1–2. Disponível em:

<https://anvisalegis.datalegis.net/action/ActionDatalegis.php?acao=abrirTextoAto&link=S&tipo=RDC&numeroAto=00000722&seqAto=002&valorAno=2022&orgao=RDC/DC/ANVISA/MS&codTipo=&desItem=&desItemFim=&cod_modulo=134&cod_menu=1696>. Acesso em: 28 dez. 2025.

BABU-RAJENDRAN, R. *et al.* GC-MS determination of phthalate esters in human urine: A potential biomarker for phthalate bio-monitoring. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, 2018. v. 1079, n., p. 15–24.

BARCELLOS HOFF, R. *et al.* Cassava-based materials for matrix solid phase dispersion: An alternative for sample preparation in food analysis. **Journal of Chromatography B**, 30 maio. 2022. v. 1201–1202, n. 123263, p. 1–9.

BARFI, B. *et al.* Comparison of ultrasound-enhanced air-assisted liquid-liquid microextraction and low-density solvent-based dispersive liquid-liquid microextraction methods for determination of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in human urine samples. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 2015. v. 111, p. 297–305.

BARROS NETO, B. De; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. 25 anos de quimiometria no Brasil. **Química Nova**, 2006. v. 29, n. 6, p. 1401–1406.

BERETTA, L.; SANTANELLO, A. Nearest neighbor imputation algorithms: A critical evaluation. **BMC Medical Informatics and Decision Making**, 2016. v. 16. n. 74, p.197–208.

BEYER, J. *et al.* Analytical methods for determining metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) pollutants in fish bile: A review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, 2010. v. 30, n. 3, p. 224–244. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.etap.2010.08.004>>.

BRO, R.; SMILDE, A. K. Principal component analysis. **Analytical Methods**, 2014. v. 6, n. 9, p. 2812–2831.

BYRD, K. A.; THILSTED, S. H.; FIORELLA, K. J. Fish nutrient composition: A review of global data from poorly assessed inland and marine species. **Public Health Nutrition. Cambridge University Press**. 2020. v. 24, n. 3, p. 476–486.

CHACÓN-PATIÑO, M. L. *et al.* Vanadium and nickel distributions in Pentane, In-between C5-C7 Asphaltenes, and heptane asphaltenes of heavy crude oils. **Fuel**, 2021. v. 292, n. 120259, p. 1–11.

CHEN, G. *et al.* Characteristics of a crude oil composition and its in situ waxing inhibition behavior. **Fuel**, 2018. v. 218, n., p. 213–217. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.fuel.2017.12.116>>.

CHEN, B.-H.; INBARAJ, B. S.; HSU, K.-C. Recent advances in the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in food and water. **Journal of Food and Drug Analysis**, 2022. v. 30, n. 4, p. 494–522. Disponível em: <<https://www.jfda-online.com/journal/vol30/iss4/2>>.

CNN BRASIL. 64 praias do litoral cearense registram manchas de óleo. 2022. Disponível em: <<https://www.cnnbrasil.com.br/nacional/64-praias-do-litoral-cearense-registram-manchas-de-oleo/>>. Acesso em: 6 set. 2022.

COKER, A. K. Characterization of Petroleum and Petroleum Fractions. *Petroleum Refining Design and Applications Handbook*. [S.l.]: John Wiley & Sons, 2018, v. 1, p. 31–62.

CONDE-DÍAZ, A. *et al.* Assessment of endocrine disruptor pollutants and their metabolites in environmental water samples using a sustainable natural deep eutectic solvent-based analytical methodology. **Chemosphere**, 2023. v. 338, n. 139480, p. 1–12.

DARGNAT, C. *et al.* Phthalate removal throughout wastewater treatment plant. Case study of Marne Aval station (France). **Science of the Total Environment**, 2009. v. 407, n., p.1235–1244.

DARZÉ, B. C. *et al.* Chemometrics web app's part 2: Dimensionality reduction and exploratory analysis. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, 2023. v. 237, p. 1–10.

DHAKA, A.; CHATTOPADHYAY, P. A review on physical remediation techniques for treatment of marine oil spills. **Journal of Environmental Management**, 2021. v. 288, n. 112428, p. 1–17. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.112428>>.

DISNER, G. R.; TORRES, M. The environmental impacts of 2019 oil spill on the Brazilian coast: Overview. **Revista Brasileira de Gestão Ambiental e Sustentabilidade**, 2020. v. 7, n. 15, p. 241–255.

EFSA JORNAL. Opinion of the Scientific Panel on food additives, flavourings, processing aids and materials in contact with food (AFC) on a request from the Commission related to tertiary-Butylhydroquinone (TBHQ). **European Food Safety Authority**, [S.l.], 2005. v. 2, n. 10, p. 1–14.

EL ACHKAR, T.; FOURMENTIN, S.; GREIGE-GERGES, H. Deep eutectic solvents: An overview on their interactions with water and biochemical compounds. **Journal of Molecular Liquids**, 2019. v. 288, p. 1–17. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.molliq.2019.111028>>.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY - US EPA. Locating and estimating air emissions from sources of polycyclic organic matter. **EPA**, 1998. v. EPA-454, n. R-98/014. Disponível em: <<http://www.epa.gov/ttn/chief>>.

ESPITIA-MANRIQUE, C. H. *et al.* Description of growth and body composition of freshwater angelfish (*Pterophyllum scalare*) by Gompertz model. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 2017. v. 46, n. 8, p. 631–637.

ESTEVES, A. A.; BORGES, S. V.; ABRANTES, S.; *et al.* Validação em laboratório de método analítico para determinação do teor de adipato e ftalato de di-(2-etil-hexila) utilizados como plastificantes em filmes flexíveis de PVC. **Quim. Nova**, 2007. v.30, n. 1, p. 219–223.

EU. Commission Regulation (EC) N° 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. **Official Journal of the European Union**, 2006a. p. 5–24.

_____. Commission Regulation (EC) N° 627/2006 of 21 April 2006 implementing Regulation (EC) No 2065/2003 of the European Parliament and of the Council as regards quality criteria for validated analytical methods for sampling, identification and characterisation of primary smoke products. **Official Journal of the European Union**, 2006b. p. 3–6.

_____. Commission Directive 2007/19/EC of 30 March 2007 amending Directive 2002/72/EC relating to plastic materials and articles intended to come into contact with food and Council Directive 85/572/EEC laying down the list of simulants to be used for testing migration of constituents of plastic materials and articles intended to come into contact with foodstuffs. **Official Journal of the European Union**, 2007. p. 17–36.

_____. Commission Regulation (EU) N° 10/2011 of 14 January 2011 on plastic materials and articles intended to come into contact with food. **Official Journal of the European Union**, 2011. p. 4–8. Acesso em: 17 nov. 2024.

_____. Commission Regulation (EU) N° 2023/915 of 25 April 2023 on maximum levels for certain contaminants in food and repealing Regulation (EC) N° 1881/2006. **Official Journal of the European Union**, 2023. p. 103–157.

F. BERTOLDI, C. *et al.* Vestígios do derrame de petróleo de 2019: avaliação da presença de HPA e BTEX em produtos de pesca. **Química Nova**, 2024. v. 47, n. 10, p. 1–7. Disponível em: <https://quimicanova.sbj.org.br/audiencia_pdf.asp?aid2=9786&nomeArquivo=AR2024-0131_SustQuimAmb.pdf>.

FAN, C. *et al.* A Theoretical Study on Terpene-Based Natural Deep Eutectic Solvent: Relationship between Viscosity and Hydrogen-Bonding Interactions. **Global Challenges**, 2021. v. 5, n. 2000103, p. 1–8.

FARAJZADEH, M. A.; SHEYKHIZADEH, S.; KHORRAM, P. Salting-out homogeneous liquid-liquid extraction in narrow-bore tube: Extraction and preconcentration of phthalate esters from water. **Journal of Separation Science**, 2013. v. 36, n. 5, p. 939–946.

FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, V. *et al.* Development of a programmed temperature vaporization-gas chromatography-tandem mass spectrometry method for polycyclic aromatic hydrocarbons analysis in biota samples at ultratrace levels. **Journal of Chromatography A**, 2008. v. 1207, n., p. 136–145.

FERREIRA, M. M. C. **Quimiometria - Conceitos, métodos e aplicações**. Campinas, SP: Editora Unicamp, 2016.

FIC, E. *et al.* Comparison of protein precipitation methods for various rat brain structures prior to proteomic analysis. **Electrophoresis**, 2010. v. 31, n. 21, p. 3573–3579.

FURTADO, M. Biota: Desconhecimento sobre biota aumenta os riscos do pré-sal. 2011. **Revista Química e Derivados**. Disponível em: <<https://www.quimica.com.br/ambiente-desconhecimento-sobre-biota-aumenta-os-riscos-do-pre-sal/>>. Acesso em: 22 jan. 2025.

G1 PERNAMBUCO. Vestígios de óleo são encontrados em praias de nove municípios e chegam ao litoral da Paraíba, diz governo de PE. 28 ago. 2022. Disponível em: <<https://g1.globo.com/pe/pernambuco/noticia/2022/08/28/vestigios-de-oleo-sao-encontrados-em-praias-de-nove-municipios-e-chegam-ao-litoral-da-paraiba-diz-governo-de-pe.ghtml>>. Acesso em: 18 mar. 2024.

GANI, K. M.; RAJPAL, A.; KAZMI, A. A. Contamination level of four priority phthalates in North Indian wastewater treatment plants and their fate in sequencing batch reactor systems. **Environmental Science: Processes and Impacts**, 2016. v. 18, n. 3, p. 406–416.

GENAY, S. *et al.* Identification and quantification by ^1H nuclear magnetic resonance spectroscopy of seven plasticizers in PVC medical devices. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 2017. v. 409, n. 5, p. 1271–1280.

GHASEMZADEH-MOHAMMADI, V. *et al.* Microwave-assisted extraction and dispersive liquid-liquid microextraction followed by gas chromatography-mass spectrometry for isolation and determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked fish. **Journal of Chromatography A**, 2012. v. 1237, n., p. 30–36. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2012.02.078>>.

GNIAZDOWSKA, E.; GIEBUŁTOWICZ, J.; RUDZKI, P. J. How does the order of sample analysis influence the matrix effect during LC-MS bioanalysis? **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, 2023. v. 1227, n. 123800, p. 1–11.

- GONZÁLEZ-GAYA, B. *et al.* High atmosphere-ocean exchange of semivolatile aromatic hydrocarbons. **Nature Geoscience**, 2016. v. 9, n. 6, p. 438–442.
- GONZÁLEZ-SÁLAMO, J. *et al.* Determination of phthalates in beverages using multiwalled carbon nanotubes dispersive solid-phase extraction before HPLC–MS. **Journal of Separation Science**, 2018. v. 41, n. 12, p. 2613–2622.
- GRANATO, D. *et al.* Use of principal component analysis (PCA) and hierarchical cluster analysis (HCA) for multivariate association between bioactive compounds and functional properties in foods: A critical perspective. **Trends in Food Science and Technology**, 2018. v. 72, n., p. 83–90. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.12.006>>.
- GRUVAEUS, G.; WAINER, H. Two additions to hierarchical cluster analysis. **Br. J. math. statist. Psychol.**, 1972. v. 25, p. 200–206.
- HARRIS, K. L. *et al.* Bioaccessibility of polycyclic aromatic hydrocarbons: Relevance to toxicity and carcinogenesis. **Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology**, 2013. v. 9, n. 11, p. 1465–1480.
- HARTMANN, R. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in forest soils: Critical evaluation of a new analytical procedure. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, 1996. v. 62, n. 2, p. 161–173.
- HASHEMI-NASAB, F. S.; PARASTAR, H. Pattern recognition analysis of gas chromatographic and infrared spectroscopic fingerprints of crude oil for source identification. **Microchemical Journal**, 2020. v. 153, n.104326, p. 1–8. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.104326>>.
- HE, C. *et al.* Fatty Acid Profiles of Triacylglycerols and Phospholipids of Sea-Cage Cultured *Trachinotus blochii*: A Comparative Study of Head, Viscera, Skin, Bone, and Muscle. **Journal of Food Science**, 2019. v. 84, n. 3, p. 650–658.
- HEYMANS, M. W.; TWISK, J. W. R. Handling missing data in clinical research. **Journal of Clinical Epidemiology**, 2022. v. 151, p. 185–188.
- HETTITHANTHRI, O. *et al.* A review of oil spill dynamics: Statistics, impacts, countermeasures, and weathering behaviors. **Asia-Pacific Journal of Chemical Engineering**, 2024. v. 19, p. 1–21.
- HU, C. *et al.* Deep eutectic solvents in sample preparation and determination methods of pesticides: Recent advances and future prospects. **Talanta**, 2024. v. 266, n. 125092, p. 1–23. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2023.125092>>.

HUBERT, M.; ENGELEN, S. Robust PCA and classification in biosciences. **Bioinformatics**, 2004. v. 20, n. 11, p. 1728–1736.

_____; ROUSSEEUW, P. J.; BRANDEN, K. VANDEN. ROBPCA: A new approach to robust principal component analysis. **Technometrics**, 2005. v. 47, n. 1, p. 64–79.

IAVINDRASANA, J. *et al.* Clinical Data Mining: a Review. **IMIA Yearbook of Medical Informatics**, 2009. p.121–133. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov.ez16.periodicos.capes.gov.br/19855885/>>.

IBAMA. Localidades Oleadas No Litoral Brasileiro Identificadas a Partir De 30/ agosto/2019. **Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis**, 2020. Disponível em: <https://www.ibama.gov.br/phocadownload/emergenciasambientais/2020/manchasdeoleo/2020-03-19_LOCALIDADES_AFETADAS.pdf>.

IKO AFÉ, O. H. *et al.* Contamination of smoked fish and smoked-dried fish with polycyclic aromatic hydrocarbons and biogenic amines and risk assessment for the Beninese consumers. **Food Control**, 2021. v. 126, n. 108089, p. 1–10.

JIN, X. *et al.* Organ and tissue-specific distribution of selected polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in ApoE-KO mouse. **Environmental Pollution**, 2021. v. 286, n. 117219, p. 1–10.

KANEYASU, N.; TAKADA, H. Seasonal variations of sulfate, carbonaceous species (black carbon and polycyclic aromatic hydrocarbons), and trace elements in fine atmospheric aerosols collected at subtropical islands in the East China Sea. **Journal of Geophysical Research: Atmospheres**, 2004. v. 109, n. 6, p. 1–12.

KAUL, M. J.; QADAH, D.; DIETZ, M. L. Systematic evaluation of hydrophobic deep-melting eutectics as alternative solvents for the extraction of organic solutes from aqueous solution. **Royal Society of Chemistry**, 2019. v. 9, n. 15798, p. 15798–15804.

KAVALIAUSKAS, V.; OLŠAUSKAITĖ, V.; PADARAUSKAS, A. Hydrophobic Eutectic Solvents Based on Perfluorinated Hydrogen Bond Donors as Extractants for Dispersive Liquid–Liquid Microextraction. **Chromatographia**, 2022. v. 85, n. 3, p. 255–262. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10337-022-04129-z>>.

KOTOWSKA, U.; KAPELEWSKA, J.; SAWCZUK, R. Occurrence, removal, and environmental risk of phthalates in wastewaters, landfill leachates, and groundwater in Poland. **Environmental Pollution**, 2020. v. 267, n. 115643, p. 1–13.

LERDA, D. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) Factsheet. **JRC Technical Notes - European Commission**. 2011, 4th Edition, p. 1–34.

LOURENÇO, R. A. *et al.* Mysterious oil spill along Brazil's northeast and southeast seaboard (2019–2020): Trying to find answers and filling data gaps. **Marine Pollution Bulletin**, 2020. v. 156, n. 111219, p. 16. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2020.111219>>.

_____ *et al.* Navigating the PAH maze: Bioaccumulation, risks, and review of the quality guidelines in marine ecosystems with a spotlight on the Brazilian coastline. **Marine Pollution Bulletin**, 2023. v. 197, n. 115764, p. 1–11. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2023.115764>.

MAFAT, I. H. *et al.* Exploring machine learning applications in chemical production through valorization of biomass, plastics, and petroleum resources: A comprehensive review. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, 2024. v. 180, n. 106512, p.1–33.

MAHUGIJA, J. A. M.; NJALE, E. Effects of washing on the polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) contents in smoked fish. **Food Control**, 2018. v. 93, n., p. 139–143. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.05.050>>.

MAN, Y. B. *et al.* Health risk assessments based on polycyclic aromatic hydrocarbons in freshwater fish cultured using food waste-based diets. **Environmental Pollution**, 2020. v. 256, n. 113380, p. 1–9. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113380>>.

MANO, E. B.; MENDES, L. C. **Introdução a polímeros**. 2. ed. São Paulo: Edgard Blücher LTDA, 2004.

MAPA. Consumo e tipos de peixes no Brasil. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**, 2020. Disponível em: <[https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/aquicultura-e-pesca/rede-do-pescado/consumo-e-tipos-de-peixes-no-brasil#:~:text=No%20Brasil%2C%20o%20consumo%20de,Oliveira%20Ramos%202016\).>](https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/aquicultura-e-pesca/rede-do-pescado/consumo-e-tipos-de-peixes-no-brasil#:~:text=No%20Brasil%2C%20o%20consumo%20de,Oliveira%20Ramos%202016).>) Acesso em: 7 set. 2022.

MARINHA DO BRASIL. Um derramamento de óleo e os desafios para a proteção da Amazônia Azul. (Por: Inojosa, Fernanda C. Pirillo), 2021. Disponível em: <<https://www.marinha.mil.br/economia-azul/noticias/um-derramamento-de-oleo-e-os-desafios-para-protecao-da-amazonia-azul#:~:text=Em%202019%2C%20o%20Brasil%20foi,de%20Janeiro%20e%20o%20Maranhao.>>. Acesso em: 7 set. 2022.

MCNAIR, H. M.; MILLER, J. M. **Basic Gas Chromatography**, 2009. Wiley, 3rd Edition, Chap.11, p. 177–193.

MCTI. Nota técnica à Imprensa: Resíduos de óleo encontrados em agosto no litoral do Nordeste. **Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovações**, 12 set. 2022. Disponível em:

<<https://www.gov.br/mcti/pt-br/acompanhe-o-mcti/noticias/2022/09/nota-tecnica-a-imprensa-residuos-de-oleo-encontrados-em-agosto-no-litoral-do-nordeste>>. Acesso em: 18 mar. 2024.

MITTENDORF, K. *et al.* Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) and Aliphatic Hydrocarbons in Fish by GC-MS/MS. Method: 51991. **Thermo scientific**, 2010. Disponível em: < <https://assets.thermofisher.com/TFS-Artigos/CMD/Methods-&-Protocols/TG-51991-Determination-PAH-Aliphatic-Hydrocarbons-Fish-TG51991-E.pdf> > Acesso em: 22 out. 2024.

MJSP (Ministério da Justiça e Segurança Pública). PF conclui investigações sobre a origem das manchas de óleo que atingiram o litoral brasileiro entre 2019 e 2020. **Ministério da Justiça e Segurança Pública**, 30 nov. 2021. Disponível em: < [https://www.gov.br/pf/pt-br/assuntos/noticias/2021/12/pf-conclui-investigacoes-sobre-a-origem-das-manchas-de-oleo-que-atingiram-o-litoral-brasileiro-entre-2019-e-2020#:~:text=Nota%20%C3%A0%20Imprensa-%20PF%20conclui%20investiga%C3%A7%C3%A3o%20sobre%20a%20origem%20das%20manchas%20de%20C3%B3leo,respons%C3%A1vel%20pelo%20lan%C3%A7amento%20da%20subst%C3%A2ncia](https://www.gov.br/pf/pt-br/assuntos/noticias/2021/12/pf-conclui-investigacoes-sobre-a-origem-das-manchas-de-oleo-que-atingiram-o-litoral-brasileiro-entre-2019-e-2020#:~:text=Nota%20%C3%A0%20Imprensa-%20PF%20conclui%20investiga%C3%A7%C3%A3o%20sobre%20a%20origem%20das%20manchas%20de%20C3%B3leo,respons%C3%A1vel%20pelo%20lan%C3%A7amento%20da%20subst%C3%A2ncia.)>. Acesso em: 22 fev. 2022.

MOITA NETO, J. M.; MOITA, G. C. Uma introdução à análise exploratória de dados multivariados. **Química Nova**, 1998. v. 21, n. 4, p. 467–469.

NDHLALA, A. R.; NCUBE, B.; STADEN, J. VAN. Ensuring quality in herbal medicines: Toxic phthalates in plastic-packaged commercial herbal products. **South African Journal of Botany**, 2012. v. 82, p. 60–66. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.sajb.2012.07.004>>.

NIU, R. *et al.* In situ formation of deep eutectic solvents based dispersive liquid–liquid microextraction for the enrichment of trace phthalate esters in aqueous samples. **Microchemical Journal**, 2023, v. 189, n. 108537, p. 1–9.

OLIVEIRA, O. M. C. DE *et al.* Environmental disaster in the northeast coast of Brazil: Forensic geochemistry in the identification of the source of the oily material. **Marine Pollution Bulletin**, 2020. v. 160, n. 111597, p. 1–7. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2020.111597>>.

OLSON, G. M.; MEYER, B. M.; PORTIER, R. J. Adaptation of sonication-assisted matrix solid phase dispersion of tissues for the subsequent extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from Gulf menhaden (*Brevoortia patronus*). **Biochemistry Research International**, 2014. v. 2014. n.1, p 1–7.

OSSANI, P. C. Proposição de um novo índice para Projection Pursuit na análise de múltiplos fatores. [Tese de doutorado]: Universidade Federal de Lavras, 2019. Disponível em: <<http://repositorio.ufla.br/jspui/handle/1/33233>>. Acesso em: 5 dez. 2024.

ÖZGÜR, A. *et al.* Deep Eutectic Solvent-based green extraction and gas chromatography determination of phthalates released from food contact materials. **Journal of Food Composition and Analysis**, 2023. v. 118, n. 105208, p. 1–9.

PATEL, A. B. *et al.* Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Sources, Toxicity, and Remediation Approaches. **Frontiers in Microbiology**, 2020. v. 11, p. 1–23. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2020.562813/full>>

PAZ, A. P. S. Da *et al.* Presença de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em produtos alimentícios e a sua relação com o método de cocção e a natureza do alimento. **Brazilian Journal of Food Technology**, 2017. v. 20, n. e2016102, p. 1–13. Disponível em <<https://doi.org/10.1590/1981-6723.10216>>. Acesso em: 22 jan. 2022.

PENSADO, L. *et al.* Application of matrix solid-phase dispersion in the analysis of priority polycyclic aromatic hydrocarbons in fish samples. **Journal of Chromatography A**, 2005. v. 1077, n. 2, p. 103–109.

PEREIRA, C.; CUNHA, S. C.; FERNANDES, J. O. Commercial beers: A source of phthalates and di-ethylhexyl adipate. **Food Chemistry: X**, 2023. v. 19, n. 100768, p. 1–9.

PETROBRÁS. Refino: tecnologia que cria várias soluções com uma única matéria-prima. 2022. Disponível em: <<https://petrobras.com.br/pt/nossas-atividades/areas-de-atuacao/refino/#:~:text=Nosso%20parque%20de%20refino%20produz,prima%20para%20diversos%20outros%20produtos.>>. Acesso em: 4 set. 2022.

PITOMBEIRA, M. Da S.; GOMES, F. V. B.; MARTINS, J. M. Dados hematológicos da cavala *Scomberomorus cavalla* (Cuvier), do nordeste brasileiro. **Bol. Zool. e Biol. Mar.**, 1973. v. 30, p. 843–852. Disponível em: <<https://www.revistas.usp.br/bzbm/article/view/121483/118369>>. Acesso em: 18 mar. 2024.

PORDET-KOLTALO, F. *et al.* Determination of multi-class polycyclic aromatic compounds in sediments by a simple modified matrix solid phase dispersive extraction. **Talanta**, 2021. v. 221, n. 121601, p. 1–9.

RAHMANI, M. *et al.* Comparison of Air-Assisted, Vortex-Assisted and Ultrasound-Assisted Dispersive Liquid–Liquid Microextraction for the Determination of BTEX Compounds in Water Samples Prior to GC-FID Analysis. **Chromatographia**, 2017. v. 80, n. 1, p. 109–117.

REACH. Regulation (EC) N° 1907/2006 of the European Parliament and of the Council of 18 December 2006 concerning the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH), establishing a European Chemicals Agency, amending Directive 1999/45/EC and repealing Council Regulation (EEC) No 793/93 and Commission Regulation

(EC) No 1488/94 as well as Council Directive 76/769/EEC and Commission Directives 91/155/EEC, 93/67/EEC, 93/105/EC and 2000/21/EC. **Official Journal of the European Union**, 2006. p. 1–847. Disponível em: <<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32006R1907>>. Acesso em: 17 nov. 2024.

_____. Substances restricted under REACH. Diisobutyl phthalate (DIBP); Dibutyl phthalate (DBP); Benzyl butyl phthalate (BBP); Bis(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP). **Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (EU)**, [s.d.]. Disponível em: <<https://echa.europa.eu/substance-information/-/substanceinfo/100.251.384>>. Acesso em: 9 fev. 2023.

REICHELT, W. N. *et al.* Bioprocess monitoring: minimizing sample matrix effects for total protein quantification with bicinchoninic acid assay. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, 2016. v. 43, n. 9, p. 1271–1280.

ROMÃO, W.; SPINACÉ, M. A. S.; PAOLI, M. A. DE. Poli(tereftalato de etileno), PET:Uma revisão sobre os processos de síntese, mecanismos de degradação e sua reciclagem. **Polímeros**, 2009. v. 19, n. 2, p. 121–132.

ROSTAMI, S.; ABESSI, O.; AMINI-RAD, H. Assessment of the toxicity, origin, biodegradation and weathering extent of petroleum hydrocarbons in surface sediments of Pars Special Economic Energy Zone, Persian Gulf. **Marine Pollution Bulletin**, 2019. v. 138, p. 302–311. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.11.034>>.

ROSTAMPOUR, R. *et al.* An efficient, sensitive and fast microextraction method followed by gas chromatography-mass spectrometry for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in bread samples. **Analytical Methods**, 2017. v. 9, n. 44, p. 6246–6253.

RUBIN, D. B. Inference and Missing Data. **Biometrika**, 1976. v. 63, n. 3, p. 581–592. Disponível em: <<https://about.jstor.org/terms>>.

SANTANA-MAYOR, Á. *et al.* A green and simple procedure based on deep eutectic solvents for the extraction of phthalates from beverages. **Food Chemistry**, 2020. v. 312, n. 125798, p. 1–10. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125798>>.

_____*et al.* Quality assessment of environmental water by a simple and fast non-ionic hydrophobic natural deep eutectic solvent-based extraction procedure combined with liquid chromatography tandem mass spectrometry for the determination of plastic migrants. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 2021. v. 413, n. 7, p. 1967–1981.

SEMAS. Balanço da quarta-feira 31/08/2022 – Vestígios de óleo no litoral pernambucano. **Secretaria de Meio Ambiente e Sustentabilidade de Pernambuco**, 2022. Disponível em:

<<https://semas.pe.gov.br/balanco-da-quarta-feira-31-08-2022-vestigios-de-oleo-no-litoral-pernambucano/>>. Acesso em: 7 set. 2022.

SETTE, C. B. *et al.* Formation and identification of PAHs metabolites in marine organisms. **Marine Environmental Research**, 2013. v. 91, n. 2, p. 1–13.

SILVA, B. R. L. DA; RODRIGUES, G. G. Impactos Socioambientais do derramamento de petróleo nas comunidades pesqueiras em Pernambuco. **Mares: Revista de Geografia e etnociências**, 2020. v. 2, n. 2, p. 73–84.

SLÁMOVÁ, T. *et al.* Application of QuEChERS-EMR-Lipid-DLLME method for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked food of animal origin. **Journal of Food Composition and Analysis**, 2020. v. 87, n. 103420, p. 1–8.

SOARES, M. De O. *et al.* Oil spill in South Atlantic (Brazil): Environmental and governmental disaster. **Marine Policy**, 2020. v. 115, n. 103879, p. 1–7.

SOUZA, A. M. DE; POPPI, R. J. Experimento didático de quimiometria para análise exploratória de óleos vegetais comestíveis por espectroscopia no infravermelho médio e análise de componentes principais: UM tutorial, parte I. **Química Nova**, 2012. v. 35, n. 1, p. 223–229.

SUNDARAVADIVELU, D. *et al.* Determination of Cyanotoxins and Prymnesins in Water, Fish Tissue, and Other Matrices: A Review. **Toxins. MDPI**. v. 14, n. 213, p. 1–33.

SVERDRUP, L. E.; NIELSEN, T.; KROGH, P. H. Soil ecotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons in relation to soil sorption, lipophilicity, and water solubility. **Environmental Science and Technology**, 2002. v. 36, n. 11, p. 2429–2435.

THE GUARDIAN. Chemicals used in packaging may play role in 100,000 US deaths a year – study. 2021. Disponível em: <<https://www.theguardian.com/us-news/2021/oct/14/phthalates-deaths-older-americans-study-chemicals>>. Acesso em: 8 fev. 2023.

TRASANDE, L.; LIU, B.; BAO, W. Phthalates and attributable mortality: A population-based longitudinal cohort study and cost analysis. **Environmental Pollution**, 2022. v. 292, n. 118021, p. 1–8.

UNITED NATIONS ENVIRONMENT PROGRAMME (UNEP). Comprehensive assessment on marine litter and plastic pollution confirms need for urgent global action. 2021. Disponível em: <<https://www.unep.org/news-and-stories/press-release/comprehensive-assessment-marine-litter-and-plastic-pollution>>. Acesso em: 5 fev. 2023.

VENTRICE, P. *et al.* Phthalates: European regulation, chemistry, pharmacokinetic and related toxicity. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, 2013. v. 36, n. 1, p. 88–96.

WANG, Cong *et al.* The fate of phthalate acid esters in wastewater treatment plants and their impact on receiving waters. **Science of the Total Environment**, 2023. v. 873, n. 162201, p. 1–10.

WANG, X. L. *et al.* Novel low viscous hydrophobic deep eutectic solvents liquid-liquid microextraction combined with acid base induction for the determination of phthalate esters in the packed milk samples. **Microchemical Journal**, 2020. v. 159, n. 105332, p. 1–7. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.105332>>.

WANG, Xiaoyu *et al.* Occurrence, distribution and risk assessment of phthalate esters in 51 urban wastewater treatment plants in Shaanxi Province, China. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, 2023. v. 11, n. 110075, p. 1–10.

WILLSCH, H. *et al.* Liquid chromatographic separation of sediment, rock, and coal extracts and crude oil into compound classes. **Analytical Chemistry**, 1997. v. 69, n. 20, p. 4203–4209.

WOLD, S.; ESBENSEN, K.; GELADI, P. Principal Component Analysis. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, 1987. v. 2, n. 2, p. 37–52. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/b98835>>.

WU, Q. *et al.* Combination of magnetic solid-phase extraction and HPLC-UV for simultaneous determination of four phthalate esters in plastic bottled juice. **Food Chemistry**, 2021. v. 339, n. 127855, p. 1–9.

ZHOU, Q. *et al.* Ultrasound-enhanced air-assisted liquid-liquid microextraction for the UPLC determination of organophosphorus pesticides in river water. **Microchemical Journal**, 2022. v. 183, n. 108046, p. 1–6.

APÊNDICE A

Tabela A.1 - Amostras de peixe avaliadas no estudo

Espécie	Código	Local de coleta	Data
Cavala	CV2	Maracaípe	13/Jun/2021
Cavala	CV4A	Serinhaém	13/Jun/2021
Cavala	CV7A	Serinhaém	13/Jun/2021
Cavala	CV8A	Serinhaém	13/Jun/2021
Cavala	CV11A	Serinhaém	13/Jun/2021
Cavala	CV12	Pina	15/Dez/2022
Cavala	CV48	Serinhaém	13/Jun/2021
Cavala	CV61	Maracaípe	13/Jun/2021
Oparu	O3	Serinhaém	13/Jun/2021
Oparu	O6	Serinhaém	13/Jun/2021
Oparu	O9	Serinhaém	13/Jun/2021
Pampo	PP1	Itamaracá	15/ Abr/2022
Pampo	PP2	Itamaracá	15/ Abr/2022
Pampo	PP3	Itamaracá	15/ Abr/2022
Saramunete	SP1	Itamaracá	15/ Abr/2022
Saramunete	SP2	Itamaracá	15/ Abr/2022
Saramunete	SP3	Itamaracá	15/ Abr/2022
Saramunete	SP4	Itamaracá	15/ Abr/2022
Tainha	TP1	Maria Farinha	15/ Abr/2022
Tainha	TP2	Maria Farinha	15/ Abr/2022
Tainha	TP3	Maria Farinha	15/ Abr/2022
Xaréu	XA2	Maracaípe	13/Jun/2021
Xaréu	XA7	Maracaípe	13/Jun/2021
Xaréu	XA11	Maracaípe	13/Jun/2021

APÊNDICE B

Tabela B.1 - Praias pernambucanas afetadas pelo derramamento de óleo bruto em 2019

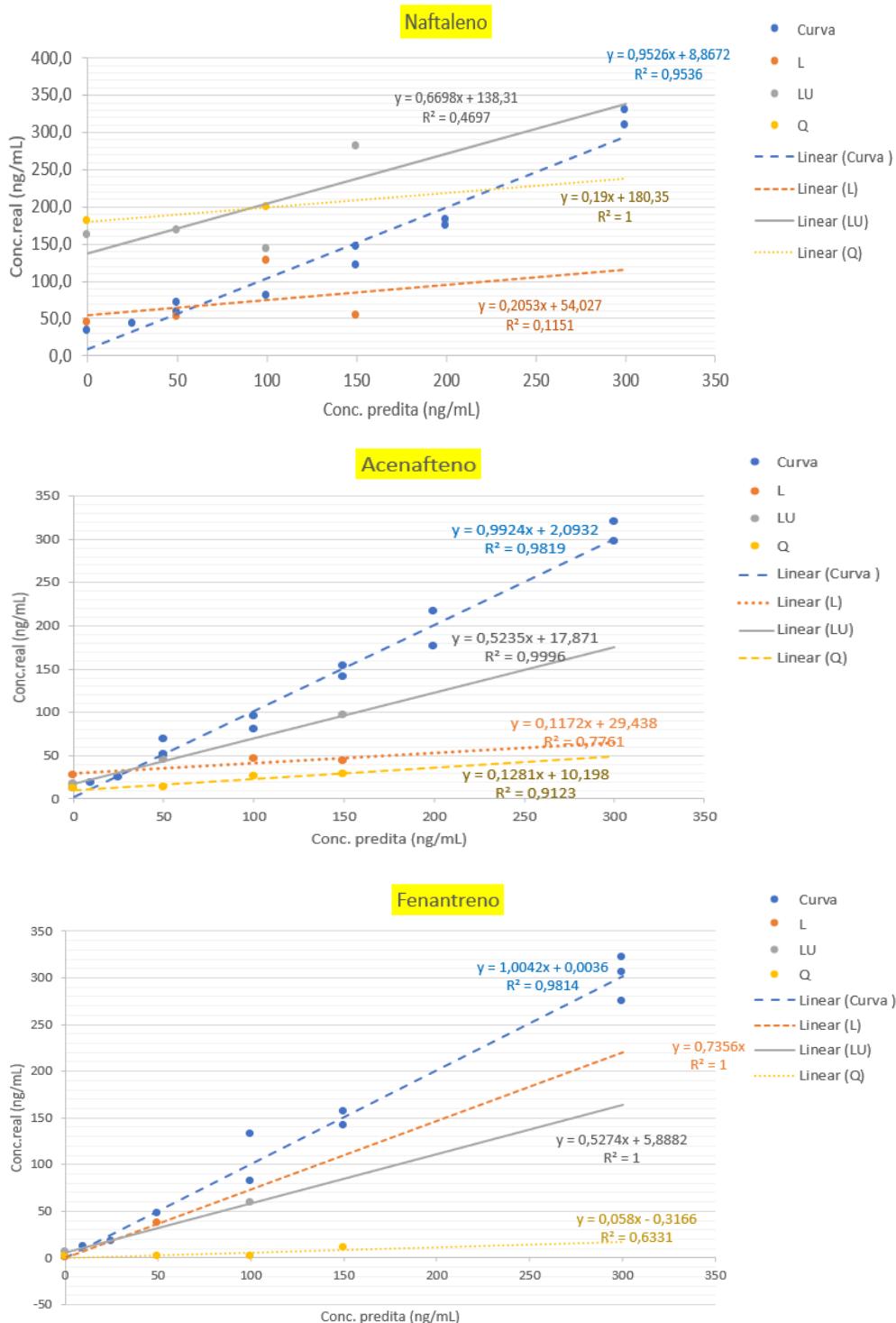
Localidade	Município	Avistamento
Praia de Dell Chifre	Olinda	02/set
Praia do Janga	Paulista	02/set
Suape	Ipojuca	02/set
Pau Amarelo	Paulista	02/set
Conceição	Paulista	02/set
Maria Farinha	Paulista	02/set
Praia do Forte Orange	Ilha de Itamaracá	02/set
Praia de Nossa Senhora do Ó	Ipojuca	02/set
Praia de Gamboa	Ipojuca	02/set
Porto de Galinhas	Ipojuca	02/set
Piedade	Jaboatão dos Guararapes	03/set
Candeias	Jaboatão dos Guararapes	03/set
Boa Viagem	Recife	03/set
Carneiros	Tamandaré	03/set
Praia do Paiva	Cabo de Santo Agostinho	04/set
Praia Ponta de Pedras	Goiana	07/set
Tamandaré	Tamandaré	07/set
Catuama	Goiana	07/set
São José da Coroa Grande	São José da Coroa Grande	25/set
Praia do Reduto	Tamandaré	15/out
Ponta da Gameleira	Sirinhaém	18/out
Ponta das Ilhotas	Barreiros	18/out
Ilha de Santo Aleixo	Sirinhaém	19/out
Praia da Enseada dos Corais	Cabo de Santo Agostinho	24/out
Praia de Jaguaripe	Ilha de Itamaracá	24/out
Barra da Jangada	Jaboatão dos Guararapes	24/out
Praia de Gaibu	Cabo de Santo Agostinho	24/out
Praia de Itapuama	Cabo de Santo Agostinho	24/out
Pontal do Jaguaripe	Ilha de Itamaracá	25/out
Praia de Quatro Cantos	Ilha de Itamaracá	25/out
Praia de Muro Alto	Ipojuca	25/out
Praia da Barra de Sirinhaém	Sirinhaém	25/out
Nossa Senhora do Ó	Paulista	27/out
Várzea do Una	Barreiros	28/out
Praia do Sossego	Ilha de Itamaracá	28/out
Praia do Pontal de Maracaípe	Ipojuca	28/out
Praia do Cupe	Ipojuca	29/out
Praia do Porto	Barreiros	29/out
Ilha do Francês/Suape	Ipojuca	31/out
Praia da Boca da Barra	Tamandaré	01/nov
Praia de Cambôa	Ipojuca	04/nov
Praia de Porto de Galinhas	Ipojuca	04/nov
Praia de Muro Alto	Ipojuca	04/nov
Praia da Barra da Jangada	Jaboatão dos Guararapes	04/nov

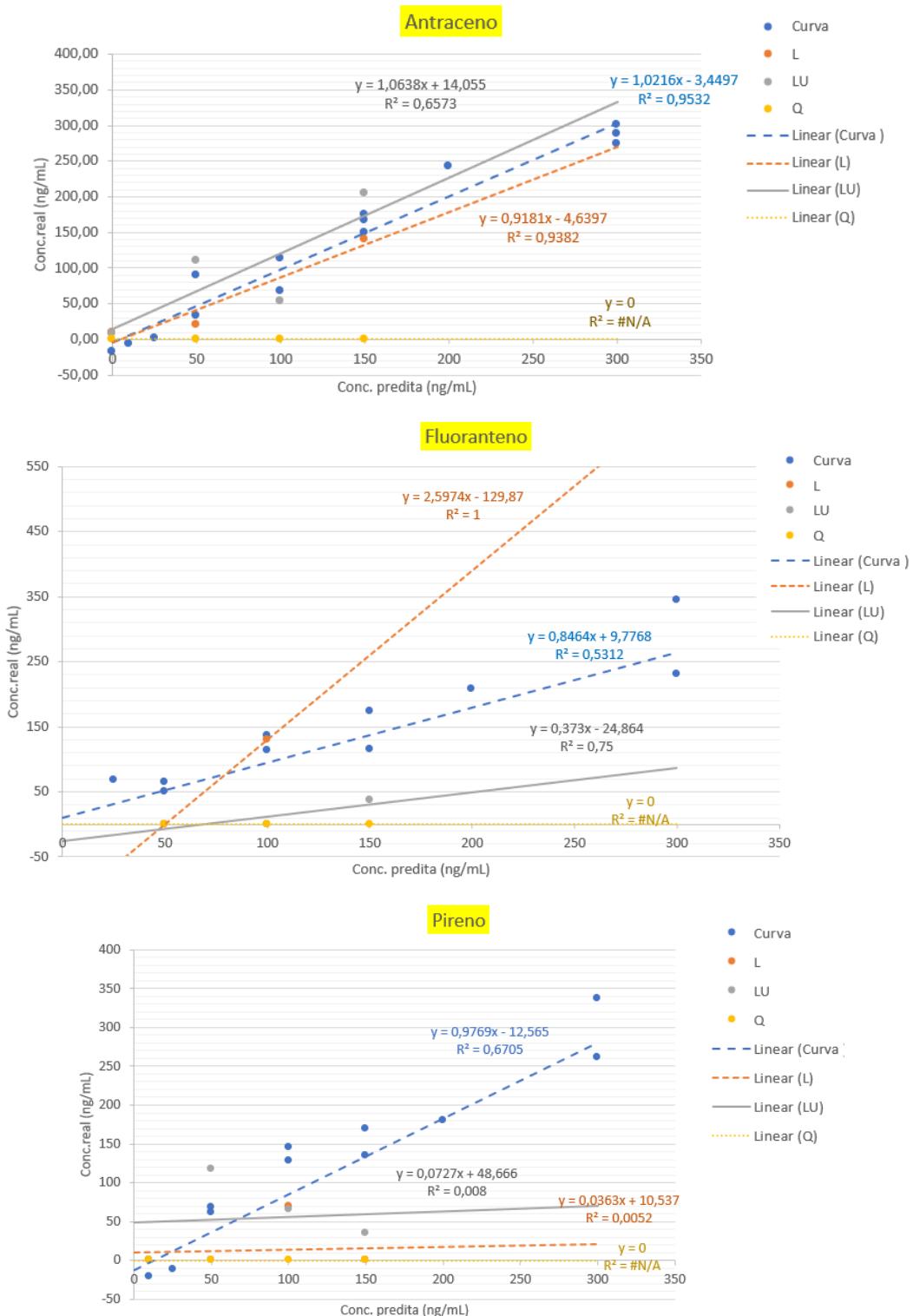
Praia da Barra de Sirinhaém	Sirinhaém	06/nov
Praia de Guaiamum	Sirinhaém	06/nov
Praia da Pedra	Sirinhaém	07/nov
Praia do Paiva	Cabo de Santo Agostinho	10/nov
Praia de Muro Alto	Ipojuca	11/nov
Praia de Gaibu	Cabo de Santo Agostinho	11/nov
Praia do Paiva	Cabo de Santo Agostinho	11/nov
Praia da Boca da Barra	Tamandaré	15/nov
Praia de Junga	Paulista	23/nov
Abreu do Una	São José da Coroa Grande	28/nov

Fonte: IBAMA. (Acesso em Agosto/2022)

APÊNDICE C

Efeito de matriz avaliado para os HPA, nos métodos DLLME, DLLME com ultrassom e QuEChERS.





APÊNDICE D

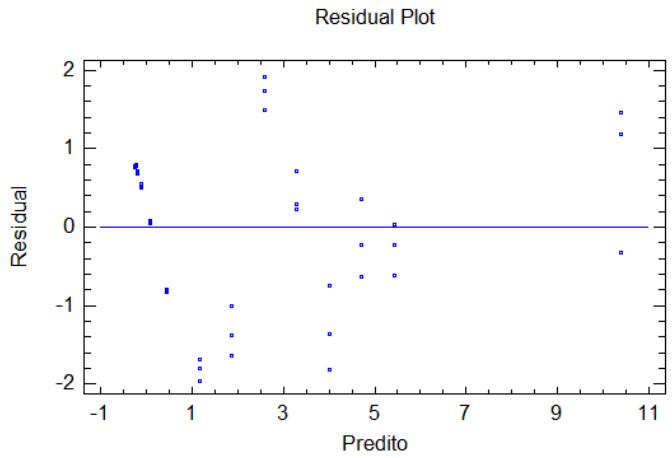
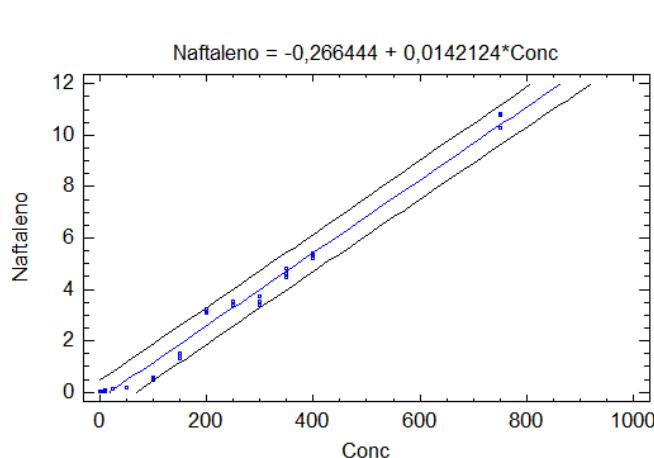
Tabelas de análise de variância e gráficos de resíduos

Naftaleno

Análise de variância

Fonte	Soma dos quadrados	G.L.	Média quadrática	F-Calculado	P-Valor
Modelo	359,3	1	359,3	2914,9	0,00
Residual	4,9	40	0,1		
Total (Corr.)	364,3	41			

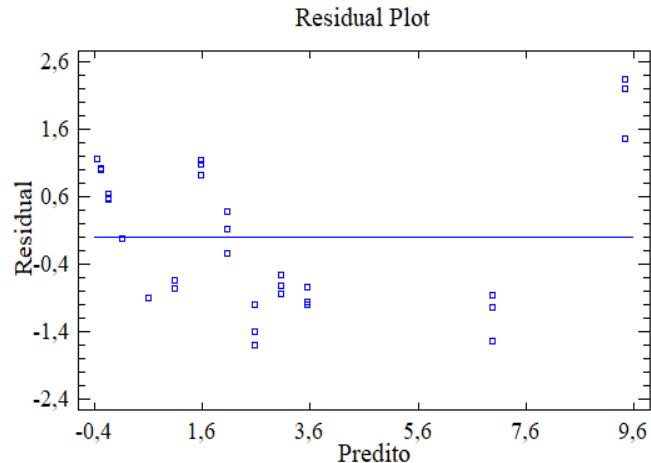
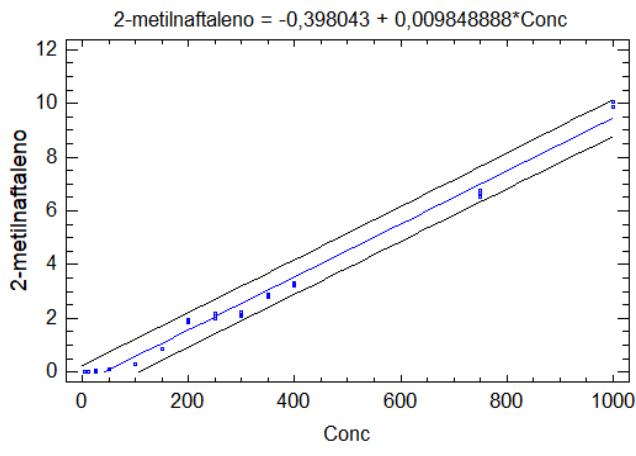
* G.L. = grau de liberdade



2-metilnaftaleno

Análise de variância

Fonte	Soma dos quadrados	G.L.	Média quadrática	F-Calculado	P-Valor
Modelo	314,8	1	314,8	3229,9	0,00
Residual	3,6	37	0,1		
Total (Corr.)	318,4	38			

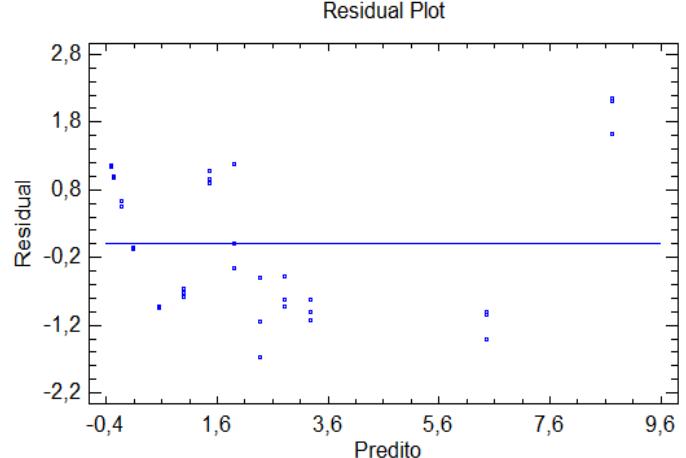
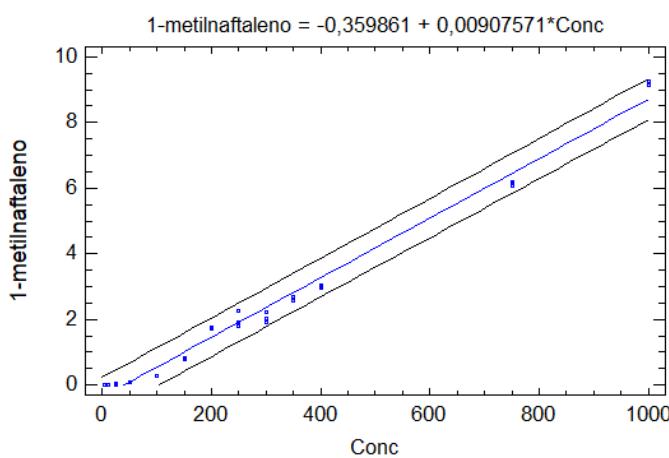


1-metilnaftaleno

Análise de variância

Fonte	Soma dos quadrados	G.L.	Média quadrática	F-Calculado	P-Valor
Modelo	267,3	1	267,3	3267,5	0,00
Residual	3,0	37	0,1		
Total (Corr.)	270,4	38			

*G.L.= grau de liberdade

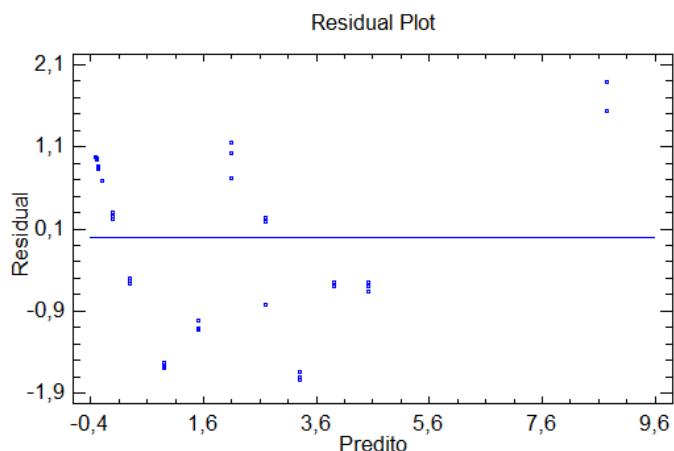
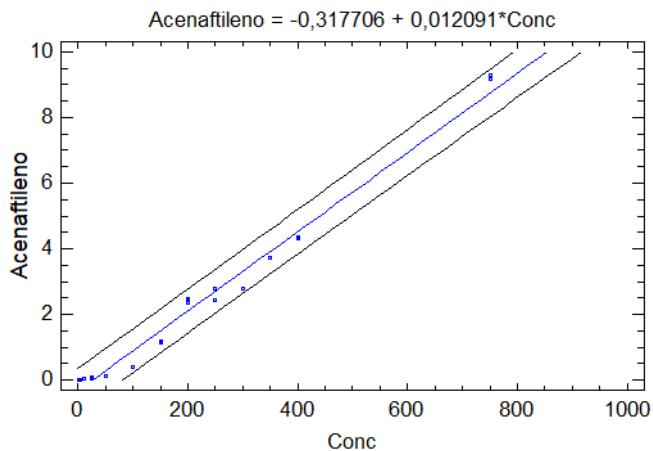


Acenaftileno

Análise de variância

Fonte	Soma dos quadrados	G.L.	Média quadrática	F-Calculado	P-Valor
Modelo	260,1	1	260,1	2437,2	0,00
Residual	4,3	40	0,1		
Total (Corr.)	264,3	41			

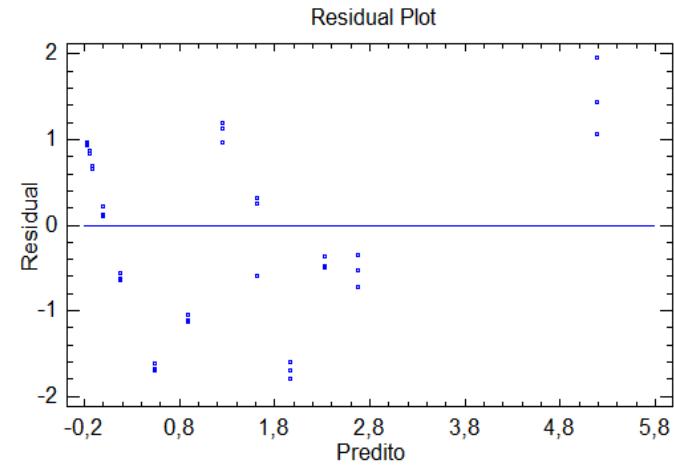
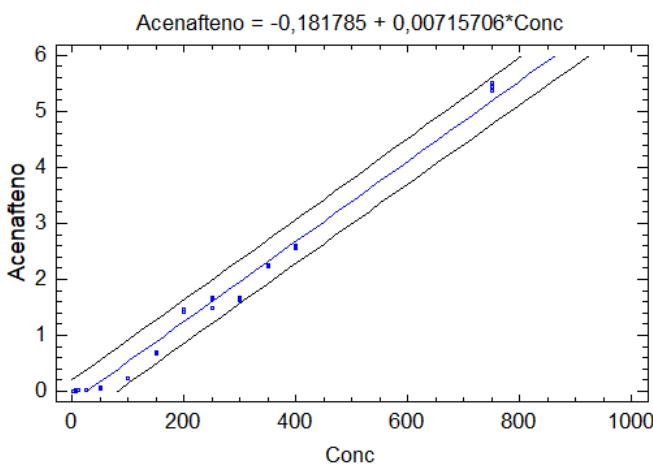
*G.L.= grau de liberdade



Acenafteno

Análise de variância

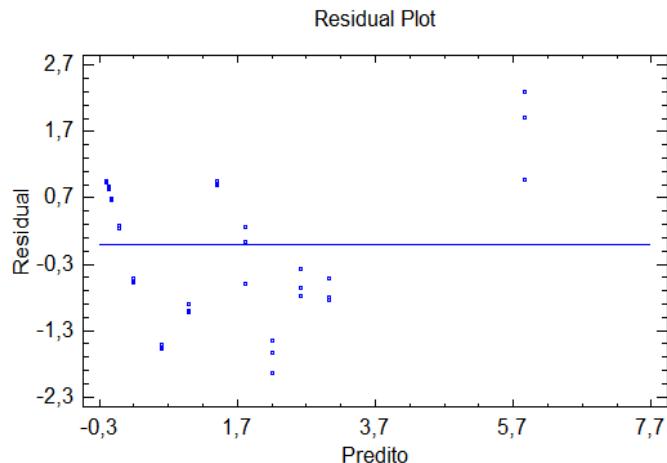
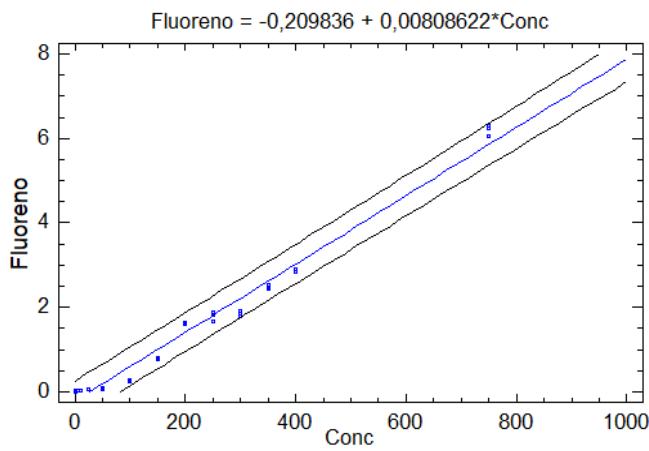
Fonte	Soma dos quadrados	G.L.	Média quadrática	F-Calculado	P-Valor
Modelo	91,1	1	91,1	2533,6	0,00
Residual	1,4	40	0,0		
Total (Corr.)	92,6	41			



Fluoreno

Análise de variância

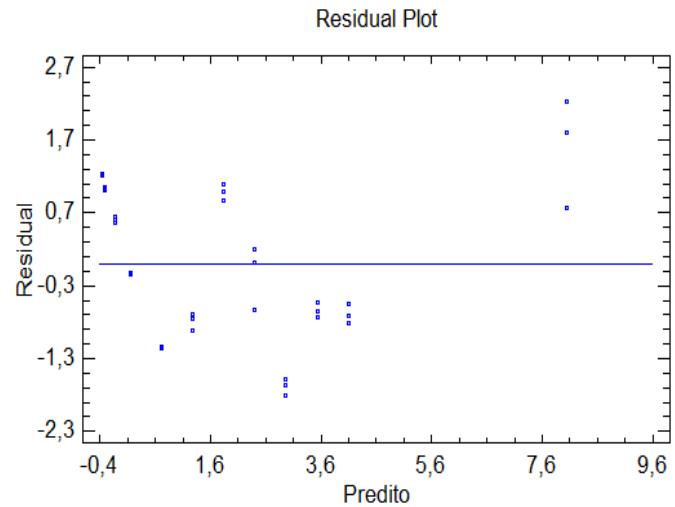
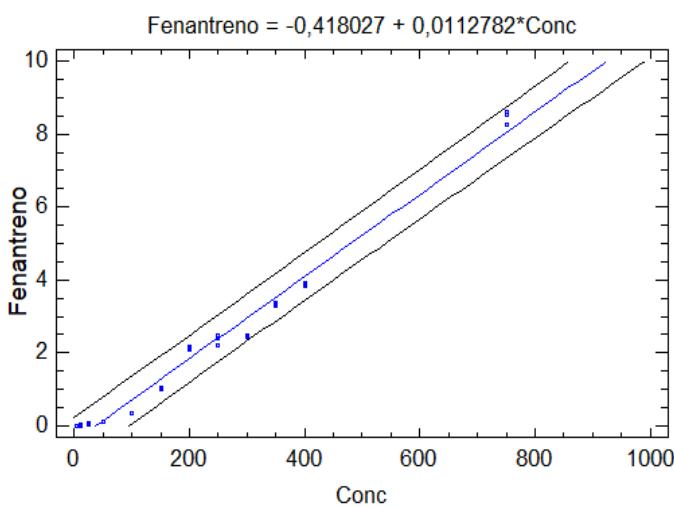
Fonte	Soma dos quadrados	G.L.	Média quadrática	F-Calculado	P-Valor
Modelo	116,3	1	116,3	2323,5	0,00
Residual	2,0	40	0,1		
Total (Corr.)	118,3	41			



Fenantreno

Análise de variância

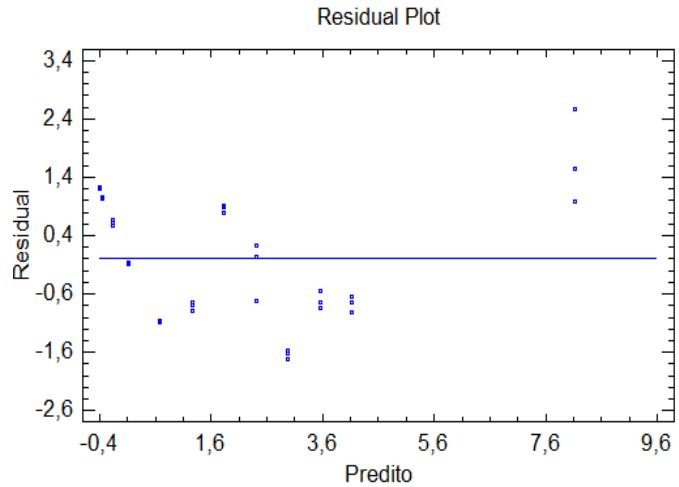
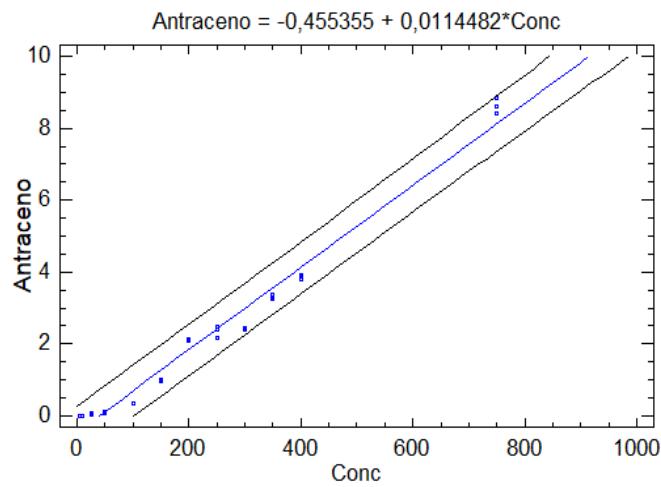
Fonte	Soma dos quadrados	G.L.	Média quadrática	F-Calculado	P-Valor
Modelo	196,2	1	196,2	1988,9	0,00
Residual	3,4	34	0,1		
Total (Corr.)	199,6	35			



Antraceno

Análise de variância

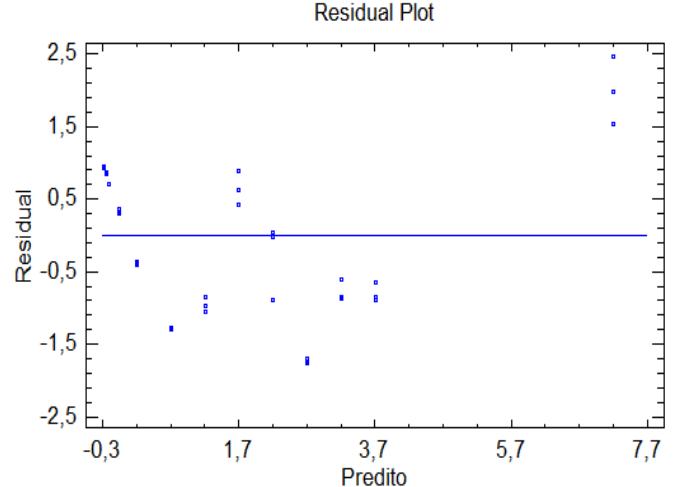
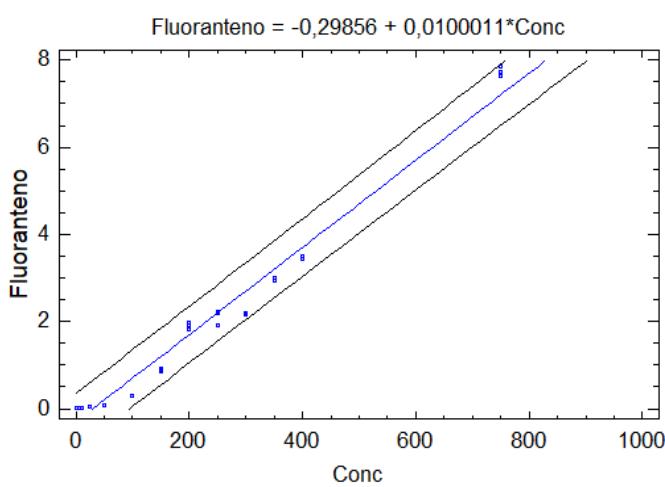
Fonte	Soma dos quadrados	G.L.	Média quadrática	F-Calculado	P-Valor
Modelo	202,2	1	202,2	1717,7	0,00
Residual	4,0	34	0,1		
Total (Corr.)	206,2	35			



Fluoranteno

Análise de variância

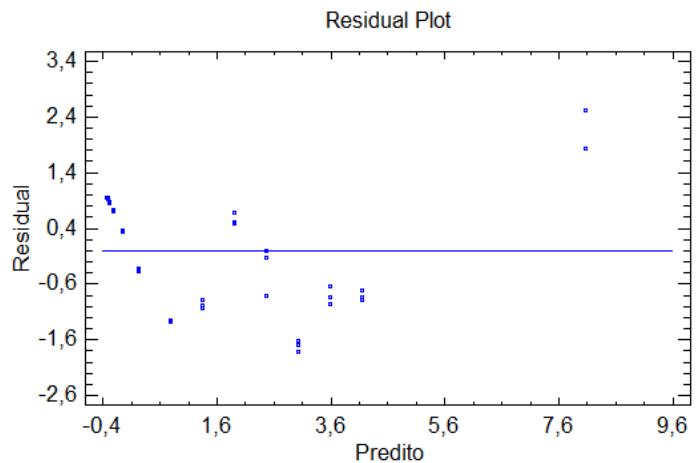
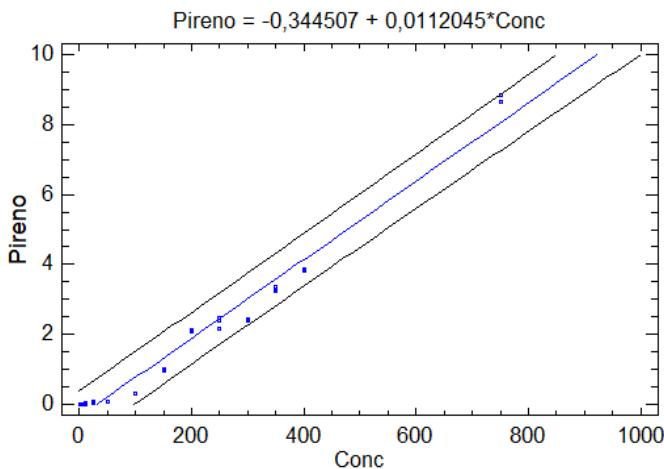
Fonte	Soma dos quadrados	G.L.	Média quadrática	F-Calculado	P-Valor
Modelo	177,9	1	177,9	1770,1	0,00
Residual	4,0	40	0,1		
Total (Corr.)	182,0	41			



Pireno

Fonte	Soma dos quadrados	G.L.	Média quadrática	F-Calculado	P-Valor
Modelo	223,3	1	223,3	1694,4	0,00
Residual	5,3	40	0,1		

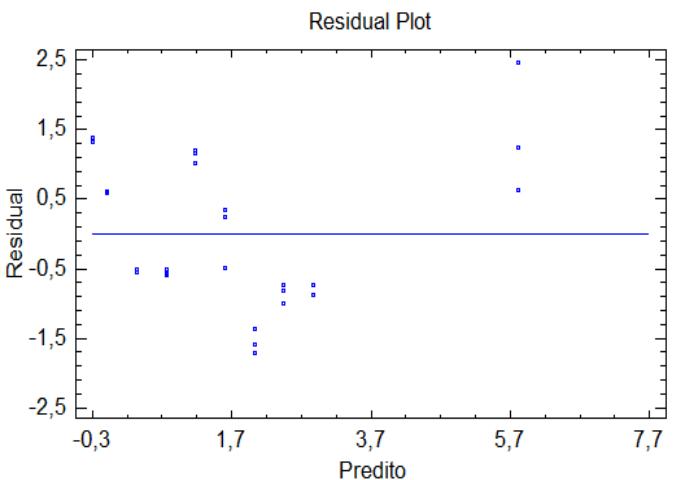
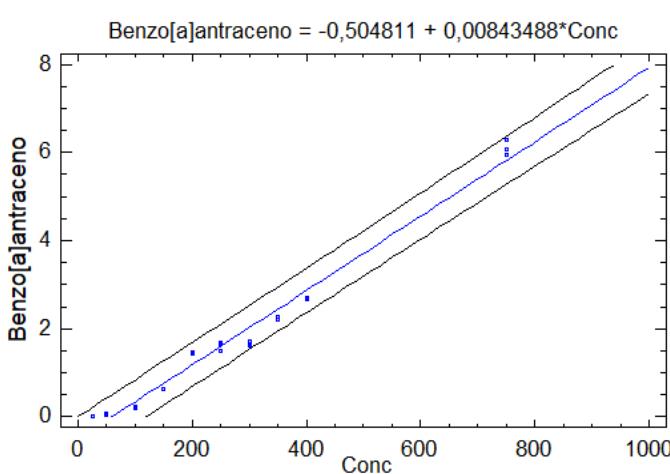
Total (Corr.)	228,6	41			
---------------	-------	----	--	--	--



Benzo[a]antraceno

Análise de variância

Fonte	Soma dos quadrados	G.L.	Média quadrática	F-Calculado	P-Valor
Modelo	87,5	1	87,5	1512,2	0,00
Residual	1,6	28	0,1		
Total (Corr.)	89,1	29			

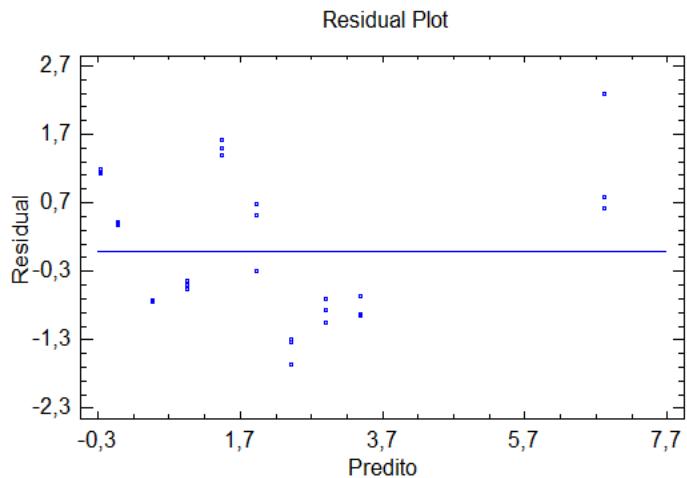
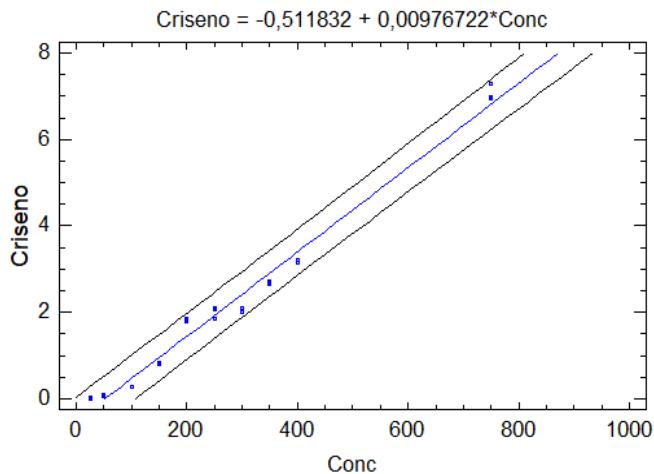


Criseno

Análise de variância

Fonte	Soma dos quadrados	G.L.	Média quadrática	F-Calculado	P-Valor

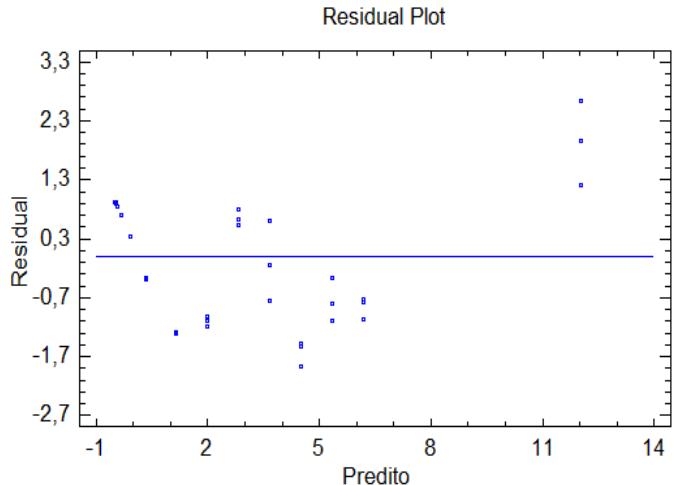
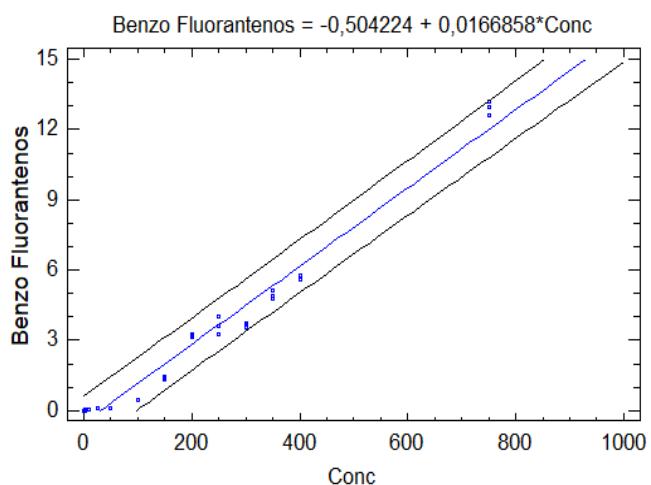
Modelo	117,4	1	117,4	1796,3	0,00
Residual	1,8	28	0,1		
Total (Corr.)	119,2	29			



Benzo Fluorantenos

Análise de variância

Fonte	Soma dos quadrados	G.L.	Média quadrática	F-Calculado	P-Valor
Modelo	495,3	1	495,3	1653,3	0,00
Residual	12,0	40	0,3		
Total (Corr.)	507,3	41			

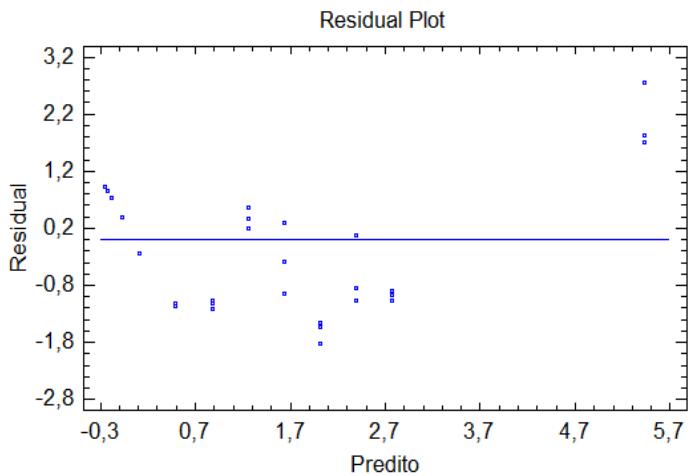
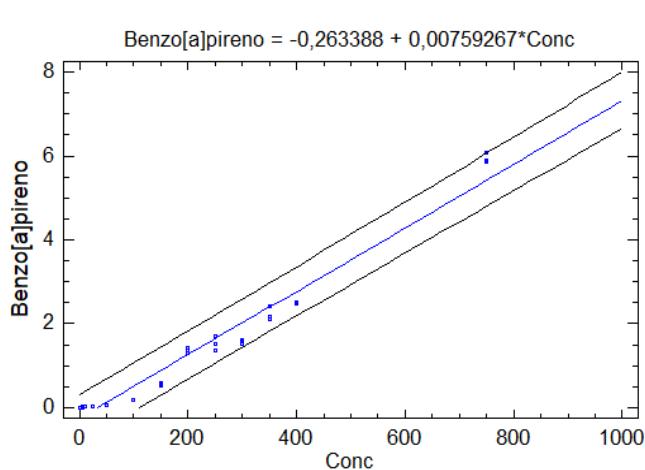


Benzo[a]pireno

Análise de variância

Fonte	Soma dos quadrados	G.L.	Média quadrática	F-Calculado	P-Valor
Modelo	102,6	1	102,6	1275,8	0,00
Residual	3,2	40	0,1		

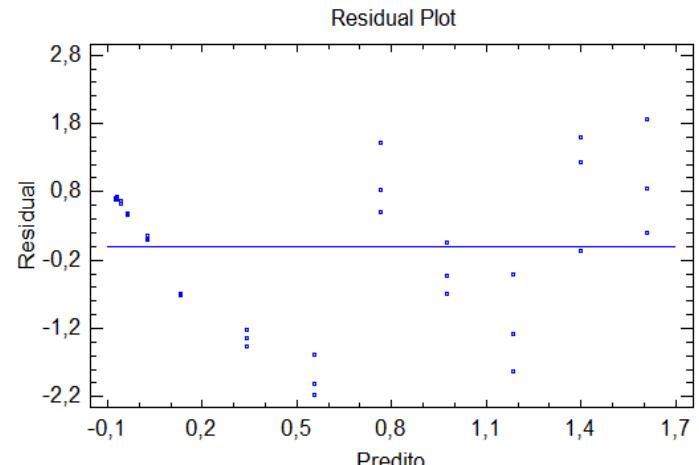
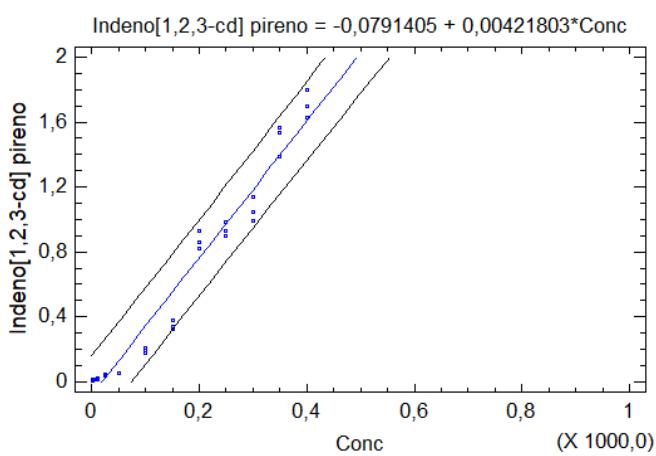
Total (Corr.)	105,8	41			
---------------	-------	----	--	--	--



Indeno[1,2,3-cd]pireno

Analysis of Variance

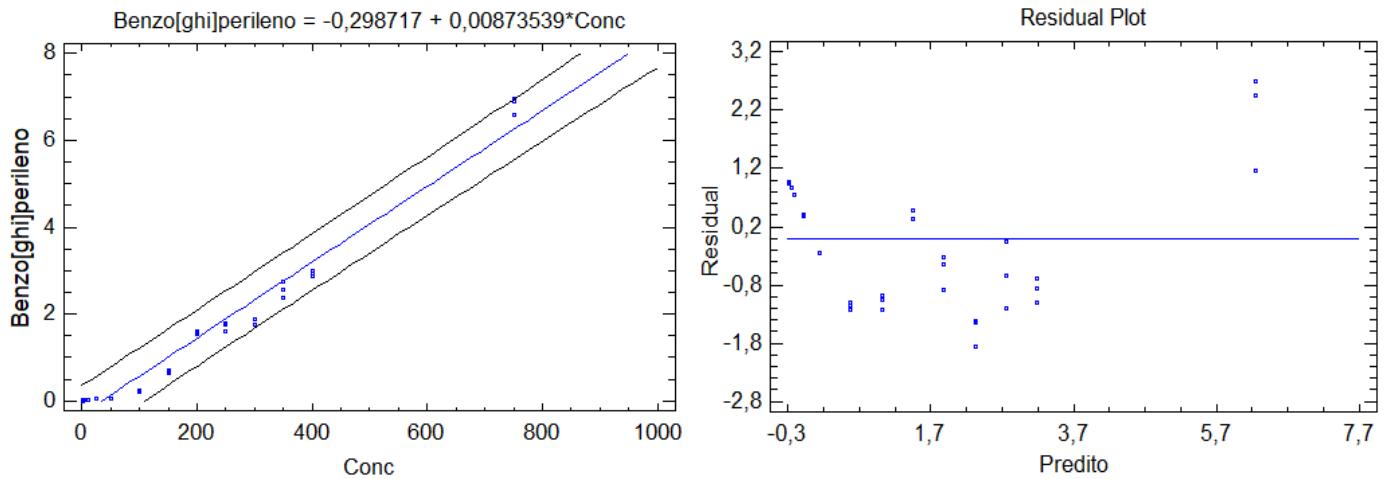
Fonte	Soma dos quadrados	G.L.	Média quadrática	F-Calculado	P-Valor
Modelo	13,3	1	13,3	1023,9	0,00
Residual	0,5	37	0,0		
Total (Corr.)	13,8	38			



Benzo[g,h,i]perileno

Analysis of Variance

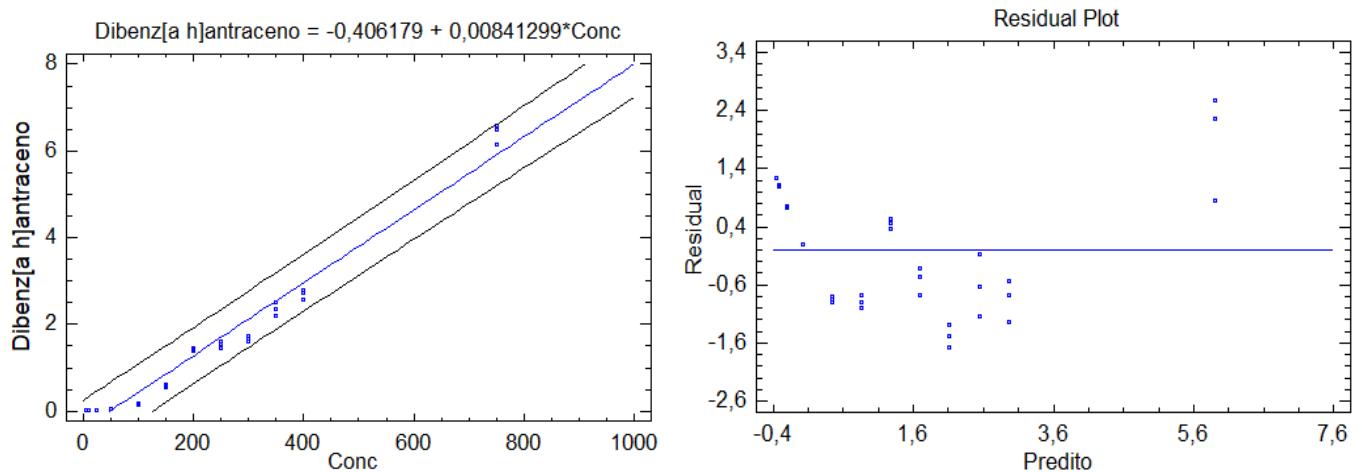
Fonte	Soma dos quadrados	G.L.	Média quadrática	F-Calculado	P-Valor
Modelo	135,7	1	135,7	1360,4	0,00
Residual	4,1	40	0,1		
Total (Corr.)	139,7	41			



Dibenz[a,h]antraceno

Analysis of Variance

Fonte	Soma dos quadrados	G.L.	Média quadrática	F-Calculado	P-Valor
Modelo	109,2	1	109,2	1096,7	0,00
Residual	3,4	34	0,1		
Total (Corr.)	112,6	35			



APÊNDICE E

Tabela E.1 -Matriz X de dados autoescalados, usada para análise preliminar de amostras de peixe (submetidas à extração por QuEChERS) e de petróleo (submetidas à extração por fracionamento).

Amostra	Naftaleno	2-Metilnaftaleno	1-Metilnaftaleno	Acenaftileno	Fluoreno	Fenanreno	Fluoranteno	Pireno	Benz[a]antraceno	Criseno	Benz[a]pireno
Cavala	-1,75	-1,14	-1,16	1,85	-0,77	-1,59	-0,77	-1,13	-0,77	-0,77	-0,77
Cavala	-1,75	-1,14	-1,16	1,94	-0,77	-1,59	-0,77	-1,13	-0,77	-0,77	-0,77
PetroFrac_1	1,16	0,99	0,91	-0,47	1,34	1,28	1,27	1,35	1,23	1,22	1,22
PetroFrac_1	0,92	0,95	0,89	-0,47	1,33	1,29	1,25	0,73	1,22	1,20	1,17
PetroFrac_2	0,09	0,65	0,71	-0,47	-0,77	-0,10	-0,77	0,52	-0,77	-0,77	-0,77
PetroFrac_2	0,09	0,65	0,71	-0,47	-0,77	-0,09	-0,77	0,52	-0,77	-0,77	-0,77
PetroFrac_3	0,03	-1,16	-1,16	-0,47	-0,77	-0,15	-0,77	-1,13	-0,77	-0,77	-0,77
PetroFrac_3	0,04	-1,16	-1,16	-0,47	-0,77	-0,15	-0,77	-1,13	-0,77	-0,77	-0,77
PetroMix	0,59	0,69	0,71	-0,47	0,97	0,57	1,06	0,71	1,10	1,07	1,12
PetroMix	0,58	0,68	0,71	-0,47	0,98	0,53	1,06	0,69	1,10	1,15	1,13

Tabela E.2 -Valores imputados (ng mL⁻¹) para análise exploratória após preparação *por* MSPD

Amostra	Espécie	Fluoranteno	Pireno	Benz[a]antraceno	Benz[b]fluoranteno	Benz[k]fluoranteno	Benz[a]pireno	Indeno[1,2,3-cd]pireno	Dibenz[a,h]antraceno	Benz[ghi]perileno
CV4A	Cavala	3,03	1,49	0,33	0,63	0,44	1,28	1,08	2,78	0,96
CV12	Cavala	2,78	0,92	0,31	0,66	0,44	1,28	1,10	2,78	0,98
CV48	Cavala	1,86	0,21	0,27	0,65	0,43	1,26	1,09	2,76	0,97
CV61	Cavala	1,53	0,18	0,27	0,62	0,43	1,27	1,07	2,74	0,94
O3	Oparu	1,68	1,16	0,38	0,70	0,43	1,29	1,19	2,80	0,98
PP1	Pampo	2,22	1,21	0,31	0,65	0,43	1,28	1,08	2,78	0,88
PP2	Pampo	2,49	0,90	0,31	0,65	0,41	1,27	1,07	2,80	0,93
PP3	Pampo	2,98	2,43	0,41	0,62	0,43	1,29	1,11	2,77	0,96
S	Saramunete	1,31	0,22	0,21	0,62	0,42	1,27	1,01	2,78	0,93
TP3	Tainha	2,20	0,59	0,25	0,61	0,43	1,26	1,07	2,77	0,98
XA7	Xaréu	1,55	0,25	0,27	0,66	0,42	1,25	1,07	2,78	0,95

Tabela E.3 - Valores imputados (ng mL⁻¹) para análise exploratória após preparação *por* EU-AA-LLME

Amostra	Espécie	Naftaleno	Acenaftileno	Acenafiteno	Fluoreno	Fenanreno	Antraceno
CV4A	Cavala	0,68	0,79	0,07	0,07	0,01	1,32
CV12A	Cavala	1,24	0,50	0,07	0,03	0,07	1,76
CV48	Cavala	0,98	0,55	0,07	0,01	0,07	1,32
CV61	Cavala	0,13	0,23	0,13	0,01	0,07	1,32
O3	Oparu	2,59	1,67	0,04	0,09	0,28	1,32
PP1	Pampo	2,74	1,67	0,13	0,70	0,08	1,42
PP2	Pampo	8,34	3,61	0,32	0,26	0,26	1,42
PP3	Pampo	7,83	1,67	4,86	0,35	0,08	1,70
SP1	Saramunete	1,24	0,50	0,13	0,14	0,08	1,31
TP3	Tainha	0,21	0,79	0,07	0,03	0,01	1,32
XA7	Xaréu	0,98	0,09	0,05	0,01	0,03	1,32
CV2	Cavala	0,65	1,07	0,07	0,01	0,06	1,32
CV7A	Cavala	0,65	0,37	0,07	0,02	0,07	1,32
CV8A	Cavala	0,70	0,64	0,05	0,05	0,04	1,32
CV11A	Cavala	1,24	0,55	0,07	0,01	0,07	1,32
O6	Oparu	0,65	0,79	0,07	0,20	0,03	1,32
O9	Oparu	0,65	0,79	0,07	0,04	0,05	1,32
SP2	Saramunete	1,36	0,37	0,07	0,07	0,03	1,32
SP3	Saramunete	0,65	0,18	0,07	0,07	0,03	1,32
SP4	Saramunete	2,59	1,67	0,07	0,13	0,10	1,42
TP1	Tainha	2,59	0,64	0,14	0,11	0,29	1,32
TP2	Tainha	0,65	0,55	0,07	0,05	0,08	1,32
XA2	Xaréu	0,68	0,17	0,07	0,07	0,03	1,32
XA11	Xaréu	0,65	0,79	0,07	0,05	0,02	1,32

NOTA DE IMPRENSA

A tese de doutorado da pesquisadora Abinoan da Silva Rodrigues, do Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), apresenta soluções inovadoras e de baixa toxicidade para a extração e pré-concentração de contaminantes orgânicos em matrizes ambientais. O trabalho tem foco em hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) presentes em peixes e ftalatos em águas, oferecendo avanços na análise de impacto ambiental e segurança alimentar.

Sob orientação dos professores Dra. Ana Paula Silveira Paim (UFPE) e Dr. José Licarion Pinto Segundo Neto (UERJ), e com bolsa financiada pelo CNPq (Processo nº 140640/2020-7) e Bolsa de Finalização de Doutorado da FACEPE (Processo BFD-0022-1.06/24) a pesquisa destaca-se pela aplicação de métodos eficientes para a detecção de HPAs em peixes coletados em Pernambuco após o derramamento de óleo ocorrido na costa brasileira em 2019. A técnica utilizada, cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS), permitiu identificar HPAs em uma ampla faixa de massa molar com alta precisão.

Os métodos de extração desenvolvidos revelaram resultados significativos: **Extração em fase sólida (MSPD)** - Efetiva para HPAs de alta massa molecular, como benzo[a]pireno e criseno, e **Extração em fase líquida (UE-AA-LLME)** - Melhor desempenho para HPAs de baixa massa molecular, como naftaleno e fenantreno.

As taxas de recuperação variaram de 60% a 120%, e os resultados indicaram que os peixes analisados estavam em conformidade com as normas da Comissão Europeia nº 2023/915. O estudo gerou a publicação de um artigo em revista científica de relevância internacional ([Marine Pollution Bulletin](#), 212 (2025) 117483).

A segunda etapa da pesquisa foi realizada em Portugal, sob a supervisão da professora Dra. Maria Conceição Branco, da Universidade do Porto. Financiada pelo programa CAPES-PrInt (Processo nº 88887.837619/2023-00), essa fase fortaleceu a cooperação científica entre os dois países.

Nesta etapa, foi desenvolvida uma metodologia inovadora para a extração de ftalatos – compostos tóxicos amplamente utilizados como plastificantes – em águas residuais e bebidas. Utilizando solventes eutéticos profundos (DES) à base de mentol e citronelol, os métodos alcançaram taxas de recuperação de 95% a 98%.

A análise de amostras da Estação de Tratamento de Águas Residuais (ETAR) do Freixo, no Porto, revelou a presença de ftalatos antes do tratamento, mas com completa eliminação após o processo de purificação. No entanto, foi constatada a presença de ftalatos em bebidas cítricas acondicionadas em recipientes plásticos, com concentrações acima dos limites permitidos pela regulamentação europeia (EU nº 10/2011).

Os avanços apresentados na tese de Abinoan Rodrigues aprimoraram significativamente as técnicas de monitoramento ambiental, contribuindo para a análise de riscos à saúde pública e ao meio ambiente. A pesquisa evidencia o papel essencial da ciência no enfrentamento de desafios globais, promovendo maior segurança alimentar e ambiental por meio de métodos sustentáveis e eficazes.