

Extração e *clean up* para determinação de HPAs em biota

Para a análise dos HPAs parentais e alquilados, foi utilizada a metodologia QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe*) com adaptações feitas pelo próprio laboratório, na qual passou por processos avaliativos da comunidade europeia (QUASIMEME). O QUASIMEME (*Quality Assurance of Information in Marine Environmental Monitoring*) é um organizador credenciado para testes de proficiência laboratorial no ambiente marinho, como em água do mar, sedimento marinho, biota e toxinas de moluscos. O teste de proficiência determina o desempenho de laboratórios para testes ou medições específicas, na qual fornecem a base da garantia de qualidade externa para institutos que fazem medições químicas regulares no ambiente marinho. A maioria dos estudos de teste de proficiência que o QuEChERS oferece tem duas rodadas por ano, com um mínimo de dois materiais de teste contendo os analitos em diferentes concentrações. O resultado desses estudos é revisado anualmente pelo Conselho Consultivo Científico do QuEChERS, que é composto por especialistas em cada uma das principais áreas dos estudos de desempenho laboratorial. O método adaptado do QuEChERS proposto obteve resultados bastante satisfatórios, sendo assim, seguro para as análises realizadas.

Em relação ao QuEChERS, Anastassiades et al. (2003), desenvolveu o método baseado nas seguintes etapas: extração com acetonitrila seguida da partição, e uma posterior limpeza em Extração em Fase Sólida Dispersiva (*Dispersive Solid Phase Extraction, D-SPE*), sendo estas descritas a seguir.

Lavagem de vidrarias

Primeiramente, todas as vidrarias foram lavadas com detergente Dinamicatec em concentração de 3%. Após o enxague em água corrente, os utensílios foram lavados com uma solução básica de hidróxido de potássio a 10% e enxaguados novamente até a remoção total da solução. Posteriormente, as vidrarias foram banhadas em solução de ácido acético a 10%, sendo retirado com água corrente. Após a remoção do ácido, é realizado um último enxágue das vidrarias com água destilada e colocados na estufa a 150°C para a secagem.

Pesagem de amostra e fortificação

Pesou-se com o auxílio de uma balança analítica, 5 gramas de cada amostra em um tubo Falcon de vidro de 50 ml. Para o controle de qualidade, foram feitos também 2 brancos para cada dia de análise. Após a pesagem, as amostras foram fortificadas com padrão *surrogate*, sendo este responsável por indicar a eficiência do método de extração através do estudo de recuperação dele. Cada amostra foi dopada com 50uL de padrão

surrogate a uma concentração de 10 ppm, a fim de se obter uma concentração de $50\mu\text{g.L}^{-1}$ em 10 mL de solvente da extração.

Em seguida, cada tubo contendo a amostra e o padrão foi agitado no Vórtex por 2 minutos, e logo após deixado em repouso por 30 minutos, no intuito de aumentar a interação entre eles.

Extração

Após o tempo de repouso, foi adicionado 10 mL de Acetonitrila ao tubo contendo a amostra e agita-se novamente no Vórtex por 2 minutos. A utilização de acetonitrila como solvente possibilita a extração de uma menor quantidade de co-extrativos lipofílicos provenientes da amostra, como gorduras e pigmentos, que podem interferir posteriormente nos resultados (Anastassiades et al. 2003; Lehotay et al., 2005).

Partição e centrifugação

A partir disso, foi adicionado ao tubo de análise 4 gramas de Sulfato de Magnésio (MgSO_4) e 1 grama de Acetato de Sódio (CH_3COONa). O MgSO_4 possui grande capacidade de remover água quando comparado a outros sais, ademais, sua hidratação é uma reação exotérmica que irá favorecer a extração, especialmente dos compostos apolares (PANG et al., 2006). Já em relação ao CH_3COONa , algumas aplicações do método registraram problemas de estabilidade e recuperação de certos compostos de acordo com o pH da matriz (Lehotay et al., 2005). Desta forma, a utilização de tampões (pH 5) promove recuperações satisfatórias para compostos dependentes do pH independente da matriz utilizada, sendo o efeito tamponante promovido pelo acetato de sódio (Lehotay et al., 2005). Na extração com acetonitrila, a adição de sais possui grande vantagem, uma vez que promove o efeito *salting out*, isto é, a adição de sais que irá diminuir a solubilidade dos compostos na fase aquosa bem como a quantidade de água na fase orgânica, além de não diluir o extrato da amostra (Anastassiades et al. 2003).

Após a adição desses dois sais, os tubos foram levados para agitação em vórtex por 2 minutos e posteriormente centrifugados por 8 minutos à 2000 rpm. Depois da centrifugação, uma alíquota de 1 mL do sobrenadante de cada extrato (fase orgânica) foi coletada e transferida para um tubo de vidro de 10 ml, onde será realizada a etapa de limpeza. A utilização de um extrato pré-concentrado se dá pelo fato de que, por serem matrizes biológicas, a quantidade de gordura nas amostras são altas. Dessa forma, a pré-concentração evita a contaminação do *line* do equipamento cromatográfico.

Limpeza (clean up)

A limpeza foi realizada em um tubo de vidro de 10 ml, contendo 150 mg de $MgSO_4$ e 150 mg de PSA. O $MgSO_4$, como já citado anteriormente, irá promover a redução de água residual. Em relação ao PSA, este irá reter as interferências da matriz, através do efeito quelante da sua estrutura bidentada, devido à presença da amina primária e secundária (Anastassiades et al. 2003). Após a adição da alíquota de 1mL do extrato, o tubo foi agitado no vórtex por 2 minutos e posteriormente, a mistura contendo o extrato foi levada a centrífuga por 10 minutos à 2000 rpm. O volume total de extrato limpo foi coletado com o auxílio de uma pipeta analítica e transferido para um vial, que posteriormente foi fechado, lacrado com parafilm e acondicionado na geladeira para posterior injeção no cromatógrafo.

Controle de qualidade

Todos os dados foram submetidos a procedimentos rigorosos de controle de qualidade. A análise dos brancos de reagente demonstrou que o sistema analítico (vidrarias, solventes e materiais) estava livre de contaminação por HPAs. A identidade e a quantidade foram confirmadas por validação cromatográfica utilizando o Guia de Validação de Métodos e Tópicos Relacionados do Laboratório (www.eurachem.org). O método analítico de HPAs foi submetido a um processo contínuo de controle de qualidade externo, participando da Garantia da Qualidade da Informação para o Monitoramento Ambiental Marinho na Europa. Todos os *Testes Round Robin* realizados durante o estudo apresentaram resultados satisfatórios ($|z| < 2$) (QUASIMEME, 2020). Além disso, nos Estudos de Desempenho de Laboratório do QUASIMEME, a eficiência com que os HPAs foram extraídos das amostras foi avaliada em estudos de recuperação usando a adição de padrões deuterados *surrogate* (HPAs-D) no início do processo de extração da amostra, e a recuperação varia de 70 a 105 %.

Anastassiades, Michelangelo; Lehotay, Steven J; Htajnbaher, Darinka; Schenck, Frank J. Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and “Dispersive Solid-Phase Extraction” for the Determination of Pesticide Residues in Produce. *Journal Of Aoac International*, [S.L.], v. 86, n. 2, p. 412-431, 1 mar. 2003. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/jaoac/86.2.412>

Lehotay, Steven J; Kok, André de; Hiemstra, Maurice; Van Bodegraven, Peter. Validation of a Fast and Easy Method for the Determination of Residues from 229 Pesticides in Fruits and Vegetables Using Gas and Liquid Chromatography and Mass Spectrometric Detection. *Journal Of Aoac International*, [S.L.], v. 88, n. 2, p. 595-614, 1 mar. 2005. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/jaoac/88.2.595>