

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

ENGENHARIA DE ALIMENTOS

**DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO SIMPLES E EFICIENTE PARA O
MONITORAMENTO DE SETE HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS ARO-
MÁTICOS EM FUMAÇA LÍQUIDA**

LUCÉLIO MARQUES ALVES COSTA



Lucélio Marques Alves Costa

DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO SIMPLES E EFICIENTE PARA O MONITORAMENTO DE SETE HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS EM FUMAÇA LÍQUIDA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial, para a obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Alimentos.

Orientadora: Profa. Dra. Gevany Paulino de Pinho

Montes Claros

2024

Este trabalho é dedicado aos meus avós, Alíria e Melquíades, vocês que com amor e sabedoria me guiaram ao longo da minha vida. Agradeço por cada palavra de incentivo, por cada gesto de carinho e por cada lição compartilhada. Vocês são a base da minha formação e os pilares do meu caráter. Este trabalho é um reflexo do amor e do apoio que vocês sempre me deram.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus, que fez com que meus objetivos fossem alcançados durante todos os meus anos de estudos. Agradeço por ter saúde e determinação para não desanimar durante a realização deste trabalho.

Aos amigos/familiares Fábio, Lucas, Lin, Leonardo, Ana Clara Rocha, Ana Clara Gusmão, Gustavo, Enthony, Rogério, Marcos, Caroline Batista e Ane Caroline, por todo o apoio e amizade durante o curso. Aos meus pais e minha avó, que me incentivaram nos momentos difíceis e compreenderam a minha ausência enquanto eu me dedicava à realização deste trabalho.

Também sou grato aos professores que desempenharam um papel fundamental em minha jornada acadêmica. A professora Dra. Gevany que me orientou e desempenhou um papel fundamental no trabalho e por minha evolução como pesquisador e como pessoa, que dedicou tempo e esforço para me guiar neste processo. Ao professor Dr. Flaviano, pelas correções e ensinamentos que me permitiram apresentar um melhor desempenho no meu processo de formação profissional.

Agradeço a todos aqueles que contribuíram, de alguma forma, para a realização deste trabalho. Agradeço a todos os colegas e amigos do Laboratório de Pesquisas em Agroquímica, em especial a Maria Eduarda, Gleison, Ane, Luís e Erica e Karine, pela ajuda, ensinamentos e a amizade. Agradeço ao Instituto de Ciências Agrárias da UFMG pela estrutura disponibilizada.

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), à Pró-Reitoria de Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (PRPq-UFMG), ao Laboratório de Química Instrumental (LQI), ao Laboratório de Pesquisa em Agroquímica (LPA) e à Fundação Universitária Mendes Pimentel (FUMP).

“Uma mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original” - Albert Einstein

Resumo

A fumaça líquida é um produto derivado da pirólise da madeira sob condições controladas. No entanto, essa pirólise pode levar a formação de compostos tóxicos aos animais e humanos, tais como os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), os quais são classificados como possíveis carcinogênicos. Neste trabalho, foi otimizada e validada a extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura (ELL-PBT) seguida por cromatografia em fase gasosa acoplada ao espectrometria de massas para análise de benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, indeno[1,2,3-Cd]pireno e o dibenzo(a,h)antraceno em fumaça líquida. Os resultados mostraram recuperação dos HPAs entre 95 e 114% e desvio-padrão relativo inferior a 10. Os limites de detecção e quantificação para os analitos-alvo foram de $2 \mu\text{g L}^{-1}$ e $5 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. As curvas analíticas preparadas no extrato da matriz apresentaram coeficiente de determinação superior a 0,98. O método foi aplicado em quatro amostras de fumaça líquida comerciais e o criseno foi quantificado em uma delas ($9,81 \pm 0,22 \mu\text{g kg}^{-1}$) e detectado em outras duas. O método se mostrou uma alternativa para quantificar HPAs em fumaça líquida de forma exata, precisa, simples e de baixo custo.

Palavras chaves: HPAs; Defumado; ELL-PBT; Aroma de fumaça.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** - Cromatogramas das amostras das cinco amostras de fumaça líquida no modo scan usando a técnica ELL-PBT seguida por análise no CG-EM17
- Figura 2** - ELL-PBT de sete HPAs a $500 \mu\text{g L}^{-1}$ em amostras de fumaça líquida utilizando as fases extratoras acetonitrila (ACN; 8,0 mL) e acetonitrila:acetato de etila (ACN:ACT; 6,5 mL : 1,5 mL) com partição a $-35 \text{ }^\circ\text{C}$ 18
- Figura 3** - Extração de HPAs em fumaça líquida pela técnica de ELL-PBT a $-18 \text{ }^\circ\text{C}$ e $-35 \text{ }^\circ\text{C}$ 19
- Figura 4** - Porcentagem de recuperação dos HPAs pela d-SPE usando a sílica.....21
- Figura 5** - Comparação da técnica de extração sem o uso de PSA (B1) e com clean up utilizando o PSA como sorvente (B2).21
- Figura 6** - Cromatogramas da extração sem PSA (A1) e com o clean up com d-SPE (A2) ..22
- Figura 7** - Espectros de absorção na região do visível de extratos orgânicos de fumaça líquida obtidos a partir da ELL-PBT e d-SPE com sílica e PSA em diferentes proporções de massa de sorvente / mL de extrato22
- Figura 8** - Comparação entre os cromatogramas de extratos de amostra de fumaça líquida fortificada com os HPAs a $5 \mu\text{g L}^{-1}$ (A) e amostra não fortificada branco (B)24
- Figura 9** - Efeito de matriz nas análises por CG-EM-MIS de sete HPAs nas concentrações de 5 e $10 \mu\text{g L}^{-1}$ em extratos de fumaça líquida27
- Figura 10** - Resíduos de regressão linear para o benzo(a)antraceno antes da exclusão de valores extremos (teste Jackknife)28

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Propriedades dos sete HPAs, bem como sua estrutura química e a toxicidade.....	12
Tabela 2 - Porcentagem de recuperação de sete HPAs empregando a ELL-PBT seguida pela d-SPE com os sorventes florisil, sílica, PSA e alumina.	20
Tabela 3 - Dados para limites de detecção (LD) e quantificação (LQ), linearidade, exatidão e precisão para sete HPAs extraídos a partir da fumaça líquida empregando a técnica de ELL-PBT e análises por CG-EM-MIS.	25
Tabela 4 - Comparação da ELL-PBT com outras técnicas de extração para HPAs em amostras aquosas.	30

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN – Acetonitrila

ACT – acetato de etila

ELL – PBT – Extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura

HPAs – Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos

LD – Limite de detecção

LQ – Limite de quantificação

LMP – Limite máximo permitido

DPR – Desvio padrão relativo

CG-EM-MIS – Cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas com monitoramento de íons selecionados

d-SPE – Extração em fase sólida dispersiva

MMQO – Método dos mínimos quadrados ordinários

SPE – Extração em fase sólida

EPA – Agência de proteção ambiental

Kow – Coeficiente de partição octanol/água

IARC – Agência internacional de pesquisa contra o câncer

BAA – Benzo antraceno

BAP – Benzo(a)pireno

BBF – Benzo(b)fluoranteno

BKF – Benzo(k)fluoranteno

CRHY – Criseno

DBA – Dibenzo(a,h)antraceno

IND – Indeno(1,2,3-Cd)pireno

S/R – Relação sinal/ruído

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	9
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	10
2.1 Fumaça líquida	10
2.2 Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos.....	11
2.3. Extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura.....	13
3. OBJETIVOS	13
3.1 Objetivo geral	13
3.2 Objetivos específicos	13
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	13
4.1. Padrões analíticos e solventes.....	13
4.2. Soluções padrões	14
4.3. Amostras.....	14
4.4. Procedimento de extração.....	14
4.5. Cromatografia gasosa acoplada ao espectrofotômetro de massas	14
4.6. Validação	15
4.7. Amostras reais	16
5. RESULTADOS E DISCURSÃO	16
5.1. Seleção da amostra para otimização do método.....	16
5.1. Otimização da técnica de extração	16
5.1.2. Temperatura de congelamento	18
5.1.3. Clean up com d-SPE.....	19
5.2. Validação	23
5.2.1. Seletividade	23
5.2.2. Limite de detecção e quantificação	24
5.2.3. Efeito de matriz	26
5.3.4. Linearidade	27
5.3.5. Exatidão e precisão.....	29
5.5. Amostras reais	31
6. CONCLUSÕES	31
REFERÊNCIAS	31

1. INTRODUÇÃO

A fumaça líquida é um aromatizante de alimentos, composto por combinações de substâncias que possuem propriedades odoríferas e/ou sápidas (Anvisa, 2022), produzida pela condensação da fumaça de madeira gerada pela pirólise controlada e mínima presença de oxigênio (Budaraga *et al.*, 2016).

Segundo dados de análises de mercado (Pustaka, 2020), nos últimos anos houve um aumento nos investimentos das indústrias de alimentos processados na utilização de fumaça líquida como aditivo, o qual tem sido incorporado em uma variedade de produtos, incluindo carnes, aves, frutos do mar, molhos, temperos, biscoitos e pães, em 2018, o valor do mercado global de fumaça líquida foi estimado em US\$ 56,5 milhões.

A aplicação de fumaça líquida em alimentos, especialmente aqueles ricos em proteínas, não só melhora o sabor, mas também contribui para a segurança dos alimentos, pois a fumaça líquida tem propriedades bactericidas (Lingbeck *et al.*, 2014). Contudo no processo de fabricação da fumaça líquida pode ocorrer a formação de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs), especialmente em elevadas temperaturas (500 – 700 °C) (Camargo *et al.*, 2006). Segundo a Agência Internacional de Pesquisas sobre o Câncer (IARC, 2008), alguns HPAs foram classificados como possíveis carcinogênicos (grupo 2B) devido a sua alta toxicidade tanto humanos quanto em animais. Entre esses HPAs estão o criseno, benzo[a]antraceno, benzo[b]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno e indeno[1,2,3-Cd]pireno. Já o dibenzo[a,h]antraceno é classificado como causador de câncer em animais e possivelmente nos seres humanos (grupo 2A). O benzo[a]pireno é o contaminante de maior preocupação mundial, pois existem evidências claras que o classifica como carcinogênico para humanos (grupo 1). Além do câncer, a exposição aos HPAs, de uma forma geral, pode aumentar os riscos de doenças, tais como, doenças pulmonares, doenças cardiovasculares, hipertensão, trombose e infarto do miocárdio (Holme *et al.*, 2019).

A legislação da União Europeia, por meio do Regulamento nº 2023/915 (UE, 2023), estabeleceu limites máximos para a presença de HPAs em alimentos defumados, sendo 2 µg kg⁻¹ para o benzo(a)pireno e 12 µg kg⁻¹ para a soma das concentrações de benzo(a)pireno, criseno, benzo(b)fluoranteno, benzo(a)antraceno, porém não especifica limites para a fumaça líquida. Por outro lado, a legislação brasileira por meio da Resolução RDC nº 725/2022 (Anvisa, 2022) estabeleceu que a fumaça líquida pode transferir no máximo 0,03 µg kg⁻¹ de benzo(a)pireno para o produto final, não tendo limites máximos para os demais HPAs.

Diante deste cenário, o monitoramento de HPAs em amostras de fumaça líquida é uma das etapas fundamentais para assegurar a qualidade desse aditivo alimentar. Entretanto, sob a luz do nosso conhecimento, não há na literatura nenhum método otimizado e validado para HPAs em fumaça líquida. As pesquisas são limitadas à aplicação de técnicas de preparo de amostras baseadas em prévio tratamento alcalino, seguida pela extração líquido-líquido convencional e limpeza dos extratos com extração em fase sólida (SPE) (Solid phase extraction) (Guillen; Sopelana; Partearroyo, 2000a; Guillén; Sopelana; Partearroyo, 2000b; Simon *et al.*, 2005) ou somente SPE (García Falcón *et al.*, 1996). Os procedimentos descritos para essas técnicas de preparação de amostra são laboriosos e foram propostos há cerca de 20 anos atrás. A técnica de extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura (ELL-PBT) é uma técnica simples, versátil, possui custo acessível aos laboratórios e tem apresentado elevadas taxas de extração de resíduos e contaminantes, em matrizes complexas (Goulart *et al.*, 2008; Rübensam *et al.*, 2011). A ELL-PBT consiste na adição da amostra aquosa em um frasco, seguida pela adição de um solvente orgânico miscível na água, à uma temperatura ambiente. A extração do analito-alvo ocorre em meio homogêneo, e o rompimento do equilíbrio ocorre pelo abaixamento da temperatura (- 18 °C). Nessas condições, os componentes polares da matriz são aprisionados na estrutura do gelo e o solvente orgânico contendo o analito-alvo permanece líquido (Kerkich *et al.*, 2024). Dependendo da complexidade da matriz, uma etapa de limpeza adicional do extrato tem sido adicionada, geralmente, baseada na extração em fase sólida dispersiva (d-SPE).

A identificação e quantificação de HPAs em amostras essencialmente aquosas tem sido realizada a partir da cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fluorescência (CLAE-DF) (Girelli; Sperati; Tarola, 2014; Kafouris *et al.*, 2020; Hamidi *et al.*, 2022) e a cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) (Mohammadi, Valizadeh-kakhki, 2018; Ciemniak *et al.*, 2019; Moradi *et al.*, 2020; Ostadgholami *et al.*, 2024). A análise por CG-EM tem como principal vantagem a obtenção de informações estruturais dos compostos de interesse (Cristale; Silva; Marchi, 2008). Sendo assim, o presente estudo visa otimizar e validar a ELL-PBT para os sete HPAs mencionados anteriormente em amostra de fumaça líquida. As análises foram realizadas por CG-EM e os níveis de benzo(a)pireno, criseno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, indeno[1,2,3-cd]pireno e dibenzo(a,h)antraceno foram monitorados quatro amostras comerciais.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Fumaça líquida

A fumaça é obtida através da pirólise de determinadas madeiras para sob ausência de oxigênio (Rozum, 2014). A fumaça líquida é considerada um aditivo natural, sendo considerada mais segura ao comparar com a tradicional, pois possuem uma maior praticidade de aplicação (Holley; Patel, 2005). Ela é aplicada em alimentos à base de proteínas como carnes, frutos do mar e queijos, bacon, peixes e presuntos (Soares *et al.*, 2016; Racioppo *et al.*, 2023; Shao *et al.*, 2023). Além disso a composição desse aditivo favorece ação eficaz contra deteriorantes e microorganismos que possuem patogenicidade (Milly *et al.*, 2005).

O uso de fumaça líquida vem aumentando nos últimos 30 anos devido as vantagens em comparação com as técnicas de defumação tradicionais, fornecendo sabor e aroma de defumado aos produtos (Simon *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2023), sendo os maiores consumidores os Estados Unidos e a Europa (Alçiçek; Balaban, 2015).

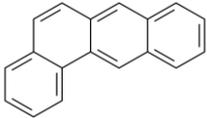
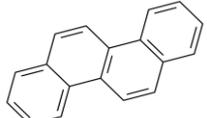
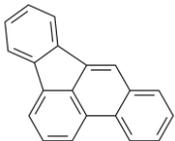
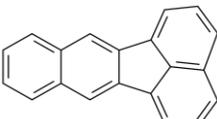
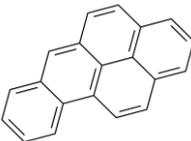
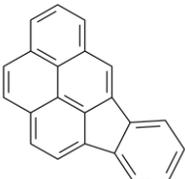
2.2 Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), são compostos orgânicos contendo dois ou mais anéis aromáticos, que podem ser formados por processos biológicos ou por pirólise incompleta de matéria orgânica influenciada principalmente pela temperatura, pressão e níveis reduzidos de oxigênio durante sua formação (Page *et al.*, 1999; Abdel-Shafy; Mansour, 2016; Sampaio *et al.*, 2021). Alguns HPAs têm sido associados ao aumento do risco de câncer em várias partes do corpo em estudos com animais de laboratório (Rengarajan *et al.*, 2015).

Além disso, alguns HPAs podem afetar os sistemas hematopoiético e imunológico, bem como causar danos no sistema reprodutivo, neurológicos e de desenvolvimento (Zhao; Quan; Tian, 1990; Stephanou *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 2013; Mallah *et al.*, 2022). Dentre os HPAs existentes, sete são considerados com maior potencial carcinogênicos pela Agência de Proteção Ambiental (Environmental Protection Agency - EPA), dentre eles o benzo[a]antraceno, benzo[a]pireno, benzo[b]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno, criseno e o dibenzo[a,h]antraceno como representado na Tabela 1.

Devido a sua toxicidade, os HPAs são comumente estudados em diferentes matrizes, com diferentes técnicas de extração (Lau; Gan; Ng, 2010; Sibiya *et al.*, 2012; Erawaty Silalahi; Anita; Teruna, 2021; Eyring *et al.*, 2021; Trouvé *et al.*, 2022). A extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura se mostrou uma técnica viável para a detecção do benzo(a)pireno em amostras complexas (Soares *et al.*, 2024)

Tabela 1 – Propriedades dos sete HPAs, bem como sua estrutura química e a toxicidade

Composto	Abreviação	estrutura	Massa molar (g/mol)	Log Kow	Ponto de ebulição (°C)	Toxicidade (IARC)
Benzo(a)antraceno	BAA		228,3	5,61	437,6	2B
Criseno	CRHY		228,3	5,9	448	2B
Benzo(b)fluoranteno	BBF		252,3	5,78	481	2B
Benzo(k)fluoranteno	BKF		252,3	6,11	480	2B
Benzo(a)pireno	BAP		252,3	6,04	496	1
Indeno[1,2,3-Cd]pireno	IND		276,3	6,58	536	2B
Dibenzo(a,h)antraceno	DBA		278,3	6,5	524	2A

Fonte: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>

Nota: Kow – Coeficiente de partição octanol/água

IARC – Agência internacional de pesquisa em câncer

- 2A – possível causador de câncer em animais e humanos
- 2B – Causador de câncer em animais e possível em humanos
- 1 – Causador de câncer em animais e humanos

2.3. Extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura

A extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura (ELL-PBT) foi desenvolvida como uma técnica eficiente e versátil para a extração de contaminantes orgânicos, principalmente para matrizes complexas tais como alimentos, águas residuais e sangue (da Silva Rodrigues *et al.*, 2020; Freitas *et al.*, 2020; Gama; Rocha, 2020; Paranhos *et al.*, 2021).

Essa técnica permite extrair os compostos além de purificar o extrato em uma única etapa, sendo ela o congelamento, no qual as impurezas alvo ficam retidas na fase aquosa congelada, essa extração dos compostos alvo ocorre devido a separação dos analitos entre a fase orgânica e aquosa com a diminuição da temperatura (Gomes *et al.*, 2017; Chang, 2007). A ELL-PBT é uma técnica simples, seletiva, precisa e de baixo custo (Magalhães *et al.*, 2012).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O presente trabalho tem como objetivo desenvolver um método simples, rápido e de custo acessível para o monitoramento de sete hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em amostras de fumaça líquida.

3.2 Objetivos específicos

- Otimizar as condições de extração da ELL-PBT em termos de Solvente, Temperatura e clean up com *d-SPE*;
- Validar a metodologia de extração otimizada;
- Aplicar a técnica em amostras reais de fumaça líquida.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Padrões analíticos e solventes

Os padrões analíticos individuais de benzo[a]antraceno (BAA), benzo[a]pireno (BAP), benzo[b]fluoranteno (BBF), benzo[k]fluoranteno (BKF), criseno (CRHY), dibenzo[a,h]antraceno (DBA), indeno[1,2,3-Cd]pireno (IND) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, USA), com grau de pureza de 99,9 % (m/m).

Os solventes orgânicos utilizados no preparo das soluções padrão foram todos grau HPLC, sendo a acetonitrila e hexano obtidos da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil) e o diclorometano da Dinâmica (São Paulo, Brasil). Os solventes orgânicos grau analítico, acetonitrila da Neon (São Paulo, Brasil) e acetato de etila da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil), foram utilizados durante a etapa de extração. Sulfato de sódio anidro com pureza de 99,8% (m/m), adquirido da Sigma-Aldrich (St. Louis, USA), foi submetido ao aquecimento na mufla por 3 h à 350 °C, para a

remoção de interferentes. Os sorventes foram utilizados durante a limpeza dos extratos, sendo a sílica obtida da Macherey-Nagel (Duren, Alemanha), florisil da Mallinckrodt Chemicals (New Jersey, USA), alumina da Micro Abrasives Corporation (Massachusetts, USA) e PSA (primary secondary amine) da Supelco (St. Louis, USA).

4.2. Soluções padrão

Soluções padrão estoque foram preparadas individualmente nas seguintes concentrações: BAA, BAP, CHRY e DBA a 480 mg L^{-1} em diclorometano, BBF a 560 mg L^{-1} em diclorometano, BKF a 560 mg L^{-1} em hexano e diclorometano (20:5, v:v) e IND a 200 mg L^{-1} em hexano. A partir das soluções padrão estoque foi preparada uma solução mista contendo simultaneamente os sete HPAs na concentração de 20 mg L^{-1} em acetonitrila. Finalmente, essa solução foi diluída para preparar a solução de trabalho a 4 mg L^{-1} em acetonitrila. Todas as soluções foram armazenadas em frascos de vidro âmbar e armazenadas a $-18 \text{ }^\circ\text{C}$.

4.3. Amostras

Quatro amostras de fumaça líquida de diferentes origens, com volumes variando de 180 mL a 1000 mL, foram obtidas no *e-commerce*. Essas amostras foram produzidas industrialmente a partir das madeiras de eucalipto (A1 e A2), mesquite (A3) e noqueira (A4). A amostra de fumaça líquida A5 foi adquirida em feira livre, a qual tinha sido produzida artesanalmente a partir das madeiras de pessegueiro e macieira. Todas as amostras foram mantidas a $-4 \text{ }^\circ\text{C}$ durante os experimentos.

4.4. Procedimento de extração

Em um *vial* de vidro transparente de 22 mL foi adicionado 4,00 mL de fumaça líquida, 6,50 mL de acetonitrila e 1,50 mL de acetato de etila. O *vial* foi homogeneizado em vórtex por 30 s e em seguida refrigerado por 2 h à $-18 \text{ }^\circ\text{C}$. Cerca de 2 mL da fase orgânica líquida foi transferido para um tubo falcon de 15 mL contendo 350 mg de sulfato de sódio anidro, 200 mg de sílica e 200 mg de PSA. O tubo foi homogeneizado em vórtex por 30 s e posteriormente centrifugado a 4000 rpm por 10 min. Cerca de 1,5 mL do sobrenadante foi transferido para o *vial* de injeção de 2 mL e analisado por CG-EM.

4.5. Cromatografia gasosa acoplada ao espectrofotômetro de massas

Os extratos foram analisados em um cromatógrafo a gás da Agilent Technologies (CG 7890A) acoplado a um espectrômetro de massas (5975C). O injetor split/splitless foi mantido a $300 \text{ }^\circ\text{C}$ e o auto injetor CombiPAL introduziu $1 \text{ } \mu\text{L}$ da amostra, sem divisão de fluxo, em um liner reto empacotado com lã. Hélio (99,999 %) foi utilizado como gás de arraste a uma taxa de 2 mL min^{-1} . Uma coluna capilar de sílica fundida SLB[®] - 5ms da Merck (Darmstadt, Germany)

com 30 m de comprimento x 0,25 mm de diâmetro interno x 0,25 µm espessura do filme interno foi usada para separação dos compostos. A programação de temperatura do forno iniciou-se em 100 °C (10 min), seguida por uma taxa de aquecimento de 7 °C min⁻¹ até 250 °C. Novamente o forno foi aquecido a uma taxa de 20 °C min⁻¹ até 300 °C. O tempo de análise foi de 33,93 min. O espectrômetro de massas foi operado no modo de ionização por impacto de elétrons a 70 eV e analisador de massas tipo quadrupolo. A interface foi mantida a 300 °C e a fonte de íons a 230 °C.

O controle e obtenção de dados foram feitos com o software ChemStation (E.02.02.1431 copyright[©] 1989-1811) da Agilent Technology. As análises foram realizadas por meio do monitoramento de íons seletivo (MIS) para identificação e quantificação de BAP, BKF e BBF (*m/z* 250, 252 e 253), BAA e CHRY (*m/z* 226, 228 e 229), DBA (*m/z* 276, 278 e 279) e IND (*m/z* 274, 276 e 277).

4.6. Validação

O método proposto foi validado de acordo com os principais parâmetros apresentados no Documento No SANTE/12682/2019 (Analytical Quality Control and Method Validation Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Fedd).

A seletividade do método foi avaliada comparando o cromatograma do extrato de fumaça líquida fortificada com os sete HPAs a 5 µg L⁻¹ e o cromatograma do extrato de fumaça líquida não fortificada (extrato branco).

O limite de detecção (LD) do método foi determinado fortificando amostras de fumaça (extrato branco) em baixas concentrações. As amostras foram submetidas à ELL-PBT, e analisadas por CG-EM. O LD foi definido como a menor concentração que apresentou uma relação sinal/ruído superior a 3. Por outro lado, o limite de quantificação (LQ) foi definido como a menor concentração dos HPAs que apresentou exatidão, precisão e a relação sinal/ruído superior a 10. O ruído foi avaliado a partir de análises de extratos da matriz livres de HPAs (extrato branco).

A variação da resposta cromatográfica induzida pelos componentes da matriz (efeito de matriz) foi avaliada após as análises cromatográficas de soluções padrão dos sete HPAs a 5 e 10 µg L⁻¹ preparadas em acetonitrila e soluções padrão nas mesmas concentrações preparadas em extrato da matriz (calibração na matriz). O efeito de matriz (EM) foi calculado a partir da equação: %EM = (A_s-A_m)*100/A_s, onde A_s é a área cromatográfica da solução padrão em solvente enquanto que A_m é em extrato da matriz.

A linearidade do método foi avaliada a partir de soluções padrão preparadas em extratos da matriz livres de HPAs (calibração na matriz) nas concentrações de 5, 10, 20, 30, 40

e $50 \mu\text{g L}^{-1}$. As soluções padrões foram preparadas em triplicatas. Após as análises cromatográficas, os dados experimentais foram submetidos ao Método dos Mínimos Quadrados Ordinários (MMQO) e o modelo linear obtido foi avaliado pelo teste de resíduos de Jackknife com a exclusão máxima de 22,2% de *outliers*.

A exatidão do método foi avaliada a partir de experimentos de fortificação/recuperação nas concentrações de 1xLQ, 2xLQ e 5xLQ. Os experimentos foram realizados em triplicatas e o método foi considerado exato com recuperações entre 70 e 120%. Por outro lado, a precisão foi avaliada sob condições de repetitividade na concentração de 2xLQ com sete repetições. Para isso, amostras de fumaça líquida foram fortificadas, submetidas à ELL-PBT e os extratos analisados por CG-EM. O método foi considerado preciso a partir de DPR inferior a 20%.

4.7. Amostras reais

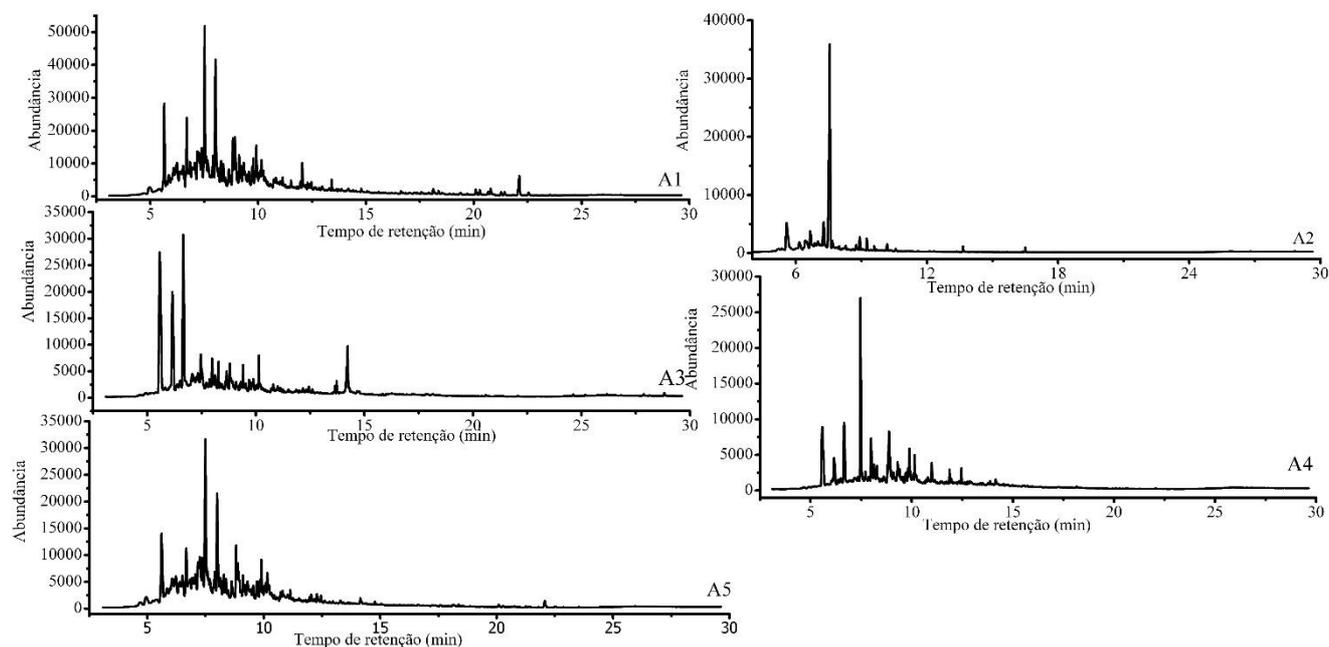
Cinco amostras de fumaça líquida de diferentes origens foram submetidas à ELL-PBT e os extratos foram analisados por CG-EM. Os HPAs presentes nas amostras foram quantificados a partir da curva de calibração do método (calibração na matriz).

5. RESULTADOS E DISCURSÃO

5.1. Seleção de amostra para otimização do método

Cinco amostras de fumaça líquida distintas foram submetidas a uma avaliação prévia pela ELL-PBT e análises por CG-EM para a determinação da concentração dos HPAs alvo neste estudo. Os cromatogramas de íons totais mostraram que a amostra A1 apresentava maior complexidade devido à elevada extração dos componentes da matriz como mostrado na figura 1 abaixo. Assim, essa amostra foi selecionada para o desenvolvimento do método proposto.

Figura 1 - Cromatogramas das amostras das cinco amostras de fumaça líquida no modo scan usando a técnica ELL-PBT seguida por análise no CG-EM

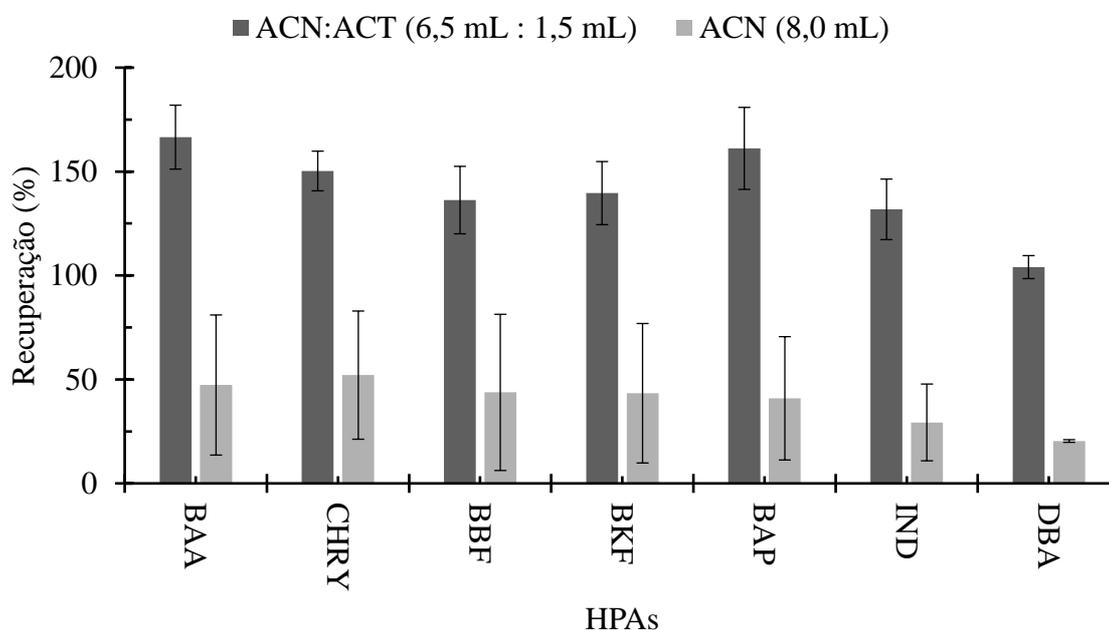


Fonte: Do autor, 2024

5.2. Otimização da técnica de extração

O primeiro parâmetro otimizado foi a fase extratora devido às propriedades hidrofóbicas dos HPAS, os quais apresentam coeficiente de partição octanol/água ($\log K_{ow}$) entre 5,67 e 6,82 (Pubchem, 2024). Embora a acetonitrila ($\log K_{ow}$ -0,34) seja um solvente orgânico tradicionalmente usado na ELL-PBT, a polaridade dessa fase extratora pode ser reduzida pela adição de acetato de etila ($\log K_{ow}$ 0,73), sendo permitida a adição de um volume máximo de 18,75% (v/v) na mistura (Costa *et al.*, 2015). Nessas condições, a fumaça líquida (4 mL), acetonitrila (6,5 mL) e acetato de etila (1,5 mL) formam fase única nas condições ambiente e a partição ocorre apenas com o abaixamento da temperatura. Na Figura 1 é apresentado o resultado da extração dos sete HPAs com duas fases extradoras.

Figura 2- Taxa de recuperação dos sete HPAs usando a acetonitrila (ACN) e acetonitrila : acetato de etila (ACN:ACT), empregando a ELL-PBT



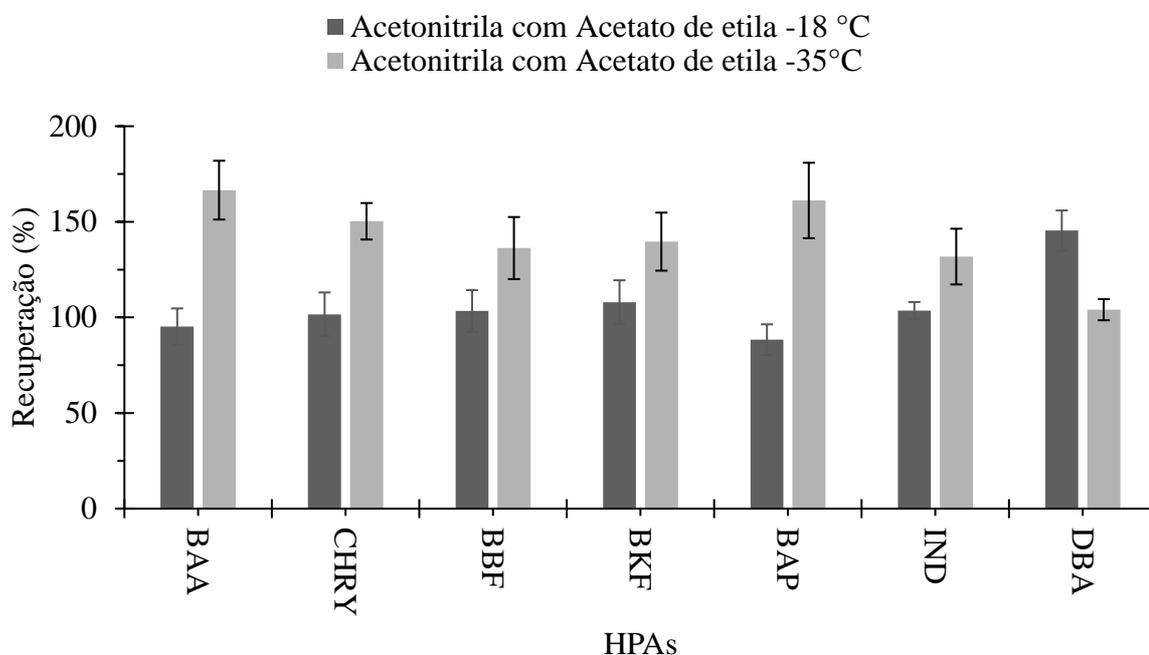
Fonte: Do autor, 2024

Como pode ser observado na Figura 2, a extração dos HPAs com acetonitrila variou entre 20 e 41 % enquanto que a extração com a mistura acetonitrila:acetato de etila variou de 104 % a 167 %. Outro dado relevante foi o elevado DPR obtido a partir da extração com acetonitrila, o qual variou de 1 a 51 % nos experimentos, realizados em triplicatas. Já a mistura extratora acetonitrila: acetato de etila proporcionou um DPR dentro da faixa aceitável (< 20%). Dessa forma, os resultados experimentais apontaram nitidamente que a mistura acetonitrila:acetato de etila foi a melhor opção para a extração dos HPAs empregando a ELL-PBT em amostras de fumaça. Isso está de acordo com outros estudos, onde demonstraram que o acetato de etila altera a polaridade do solvente de extração e melhora a recuperação de analitos-alvo apolares (Costa *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2024).

5.1.2. Temperatura de congelamento

A temperatura de fusão da acetonitrila e acetato de etila é $-44\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $-83,6\text{ }^{\circ}\text{C}$, respectivamente (Pubchem, 2024). Baseado nesses dados, a partição em baixa temperatura foi avaliada em freezer a $-35\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$. Na Figura 2, são apresentados os resultados experimentais referentes a essas duas temperaturas.

Figura 3 - Porcentagem de recuperação dos sete HPAs empregando a técnica de ELL-PBT a -18 °C e -35 °C.



Fonte: Do autor, 2024

As diferenças nas porcentagens de recuperação dos HPAs podem ser explicadas pela relação temperatura e tempo de congelamento. Nos experimentos realizados a -35 °C a amostra de fumaça líquida congelou em cerca de 30 min enquanto que a -18 °C o tempo de congelamento foi no mínimo 2 h. A -18 °C a separação da fase aquosa e fase orgânica ocorre mais lentamente, nessas condições os HPAs são transferidos para a fase orgânica e os componentes da matriz são aprisionados durante o congelamento da fase aquosa de forma mais eficiente, diminuindo o efeito de matriz. Com partição à -18 °C, a recuperação foi de 88 a 108 % para a maioria dos HPAs, com exceção do DBA (> 140%). Dessa forma, foi selecionada a temperatura de -18 °C, o que está de acordo com os princípios da técnica (Vieira; Neves; Queiroz, 2007; Goulart *et al.*, 2010; Do Rego *et al.*, 2015; Rodrigues *et al.*, 2021;).

5.1.3. Clean up com *d*-SPE

Embora o particionamento em baixa temperatura proporcione extração e *clean up* dos extratos simultaneamente, foi possível observar visualmente a presença de pigmentos da matriz na fase orgânica. Sendo assim, quatro sorventes polares (florisil, sílica, PSA e alumina) foram avaliados empregando a *d*-SPE logo após a etapa de particionamento em baixa temperatura. Na Tabela 2 são apresentadas as recuperações e DPR dos sete HPAs nos quatro sorventes.

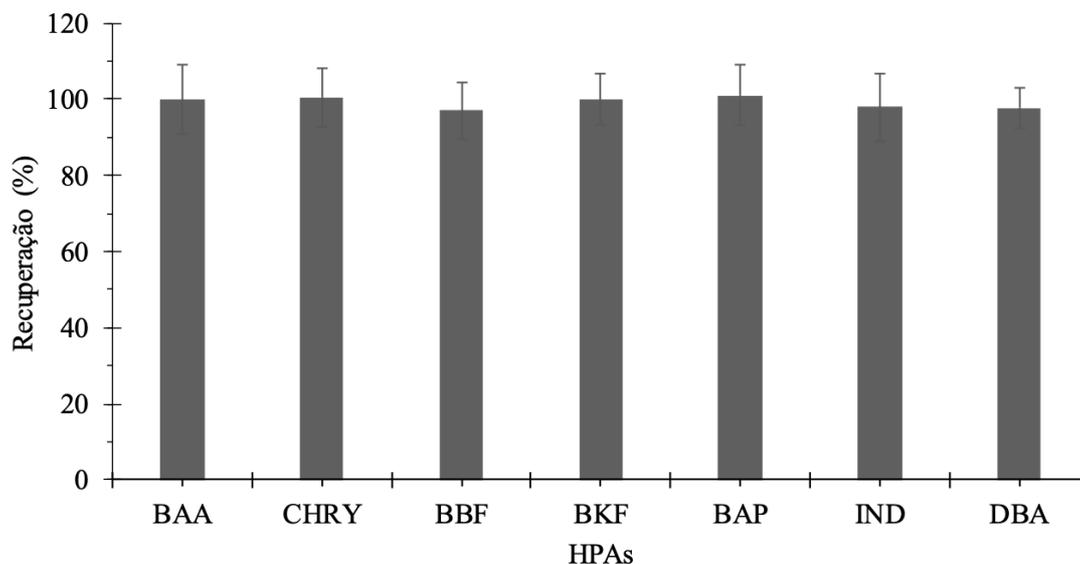
Tabela 2 - Porcentagem de recuperação de sete HPAs empregando a ELL-PBT seguida pela d-SPE com os sorventes florisil, sílica, PSA e alumina

Compostos	Recuperação (%) \pm DPR			
	Florisil	Sílica	PSA	Alumina
BAA	105 \pm 14	100 \pm 9	143 \pm 9	190 \pm 9
CHRY	105 \pm 13	100 \pm 8	142 \pm 8	177 \pm 9
BBF	99 \pm 11	97 \pm 9	145 \pm 9	190 \pm 10
BKF	100 \pm 8	100 \pm 7	142 \pm 8	185 \pm 15
BAP	98 \pm 7	101 \pm 8	149 \pm 10	189 \pm 14
IND	93 \pm 10	98 \pm 9	149 \pm 18	185 \pm 10
DBA	101 \pm 8	98 \pm 5	147 \pm 9	157 \pm 21

Fonte: Do autor, 2024

As análises estatísticas pelo teste *t* com 95 % de probabilidade mostraram que sílica e florisil proporcionaram recuperações semelhantes para cada HPA avaliado. Entretanto, a sílica apresentou menor DPR nas repetições, diminuiu a presença de interferentes nos cromatogramas na região de eluição dos HPAs ($t_R > 18$ min) e também apresentou menor custo do sorvente. Além disso, dados experimentais mostraram que a sílica não retém os HPAs na sua superfície conforme é possível observar na Figura 3. Esses resultados são consistentes uma vez que os HPAs são compostos muito hidrofóbicos com *Kow* (coeficiente octanol/água) variando entre 5,67 e 6,82 como mencionado anteriormente.

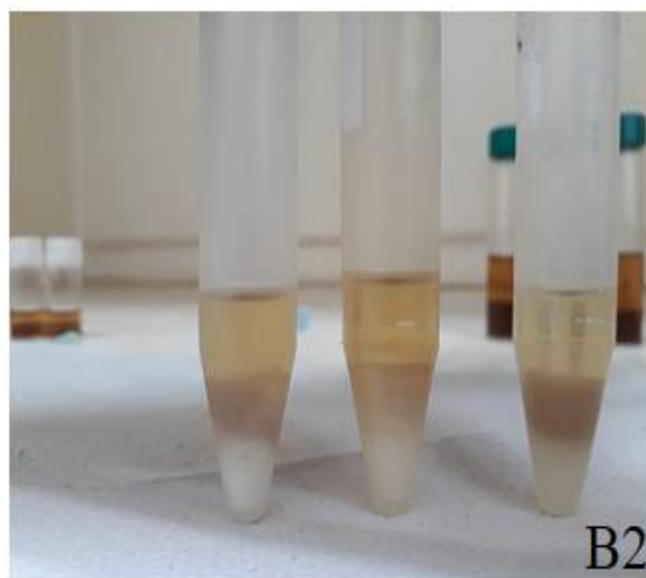
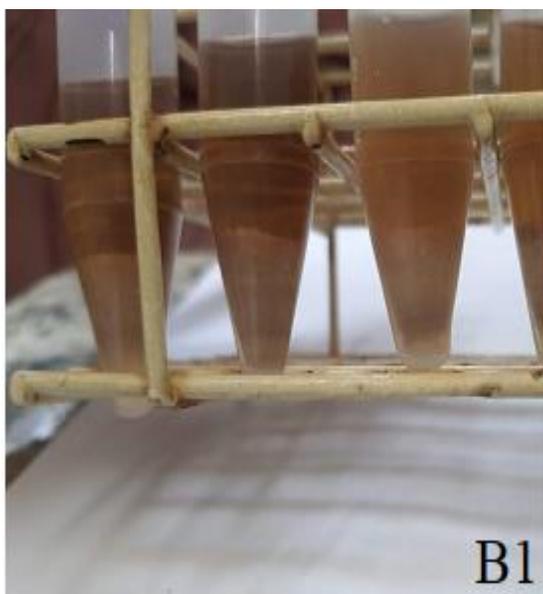
Figura 4 - Porcentagem de recuperação dos HPAs pela *d-SPE* usando a sílica



Fonte: Do autor, 2024

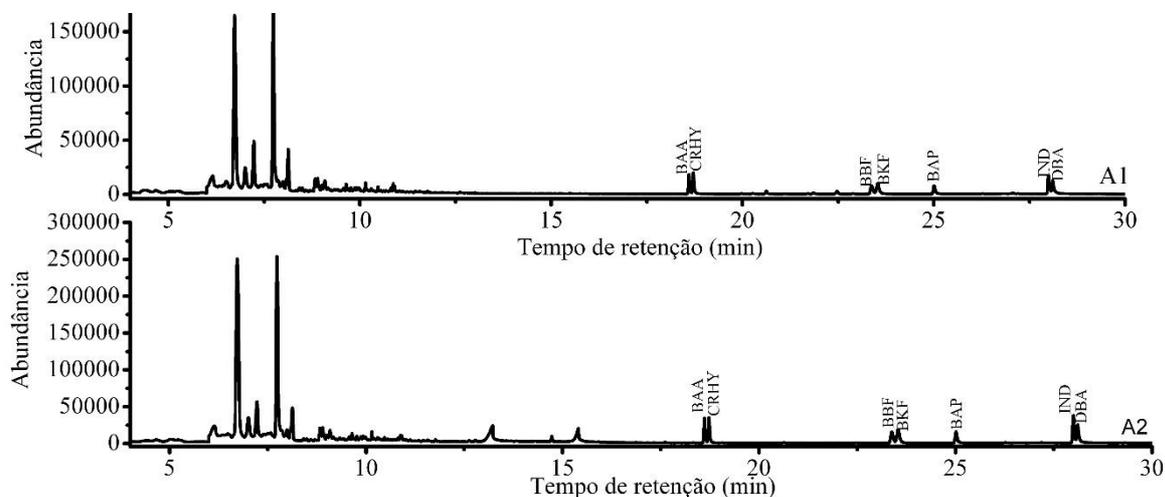
Por outro lado, as elevadas porcentagens de recuperação dos HPAs com PSA e alumina podem ser atribuídas ao efeito de matriz durante as análises por CG-EM. É importante enfatizar que visualmente o PSA apresentou uma elevada eficiência na remoção de pigmentos nos extratos como observado na figura 5, embora esse efeito não tenha sido observado nitidamente nos cromatogramas obtidos a partir das análises por CG-EM-MIS na figura 6. Dessa forma, uma mistura de sílica e PSA foi avaliada para a limpeza dos extratos em duas proporções distintas.

Figura 5 - Comparação da técnica de extração sem o uso de PSA (B1) e com clean up utilizando o PSA como sorvente (B2).



Fonte: Do autor, 2024

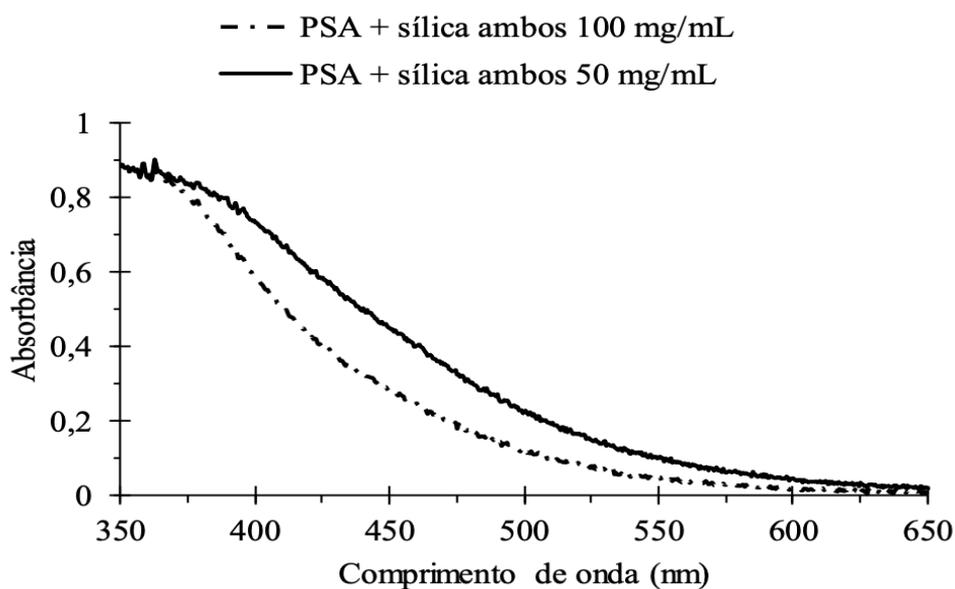
Figura 6 - Cromatogramas da extração sem PSA (A1) e com o clean up com d-SPE (A2)



Fonte: Do autor, 2024

Os extratos foram analisados primeiramente em um espectrofotômetro UV/Vis e os espectros de absorção são apresentados na Figura 7.

Figura 7 - Espectros de absorção na região do visível de extratos orgânicos de fumaça líquida obtidos a partir da ELL-PBT e d-SPE com sílica e PSA em diferentes proporções de massa de sorvente / mL de extrato



Fonte: Do autor, 2024

Comparando os dois espectros de absorção no intervalo de 350 a 650 nm é possível afirmar que o aumento da quantidade de sorventes de 50 para 100 mg/mL de extrato reduziu significativamente a presença dos componentes da matriz. Além disso, foi observado

visualmente a remoção dos pigmentos quando combinado os dois sorventes a 100 mg. O PSA apresenta elevada capacidade de remover ácidos orgânicos e pigmentos polares (Sobhanzadeh; Nemati, 2013), os quais normalmente estão presentes na composição da fumaça líquida (Montazeri *et al.*, 2013; Sokamte tegang *et al.*, 2020). Segundo (Hajšlová; Zrostlíková, 2003) a remoção de pigmentos no extrato reduz problemas associados ao efeito de matriz.

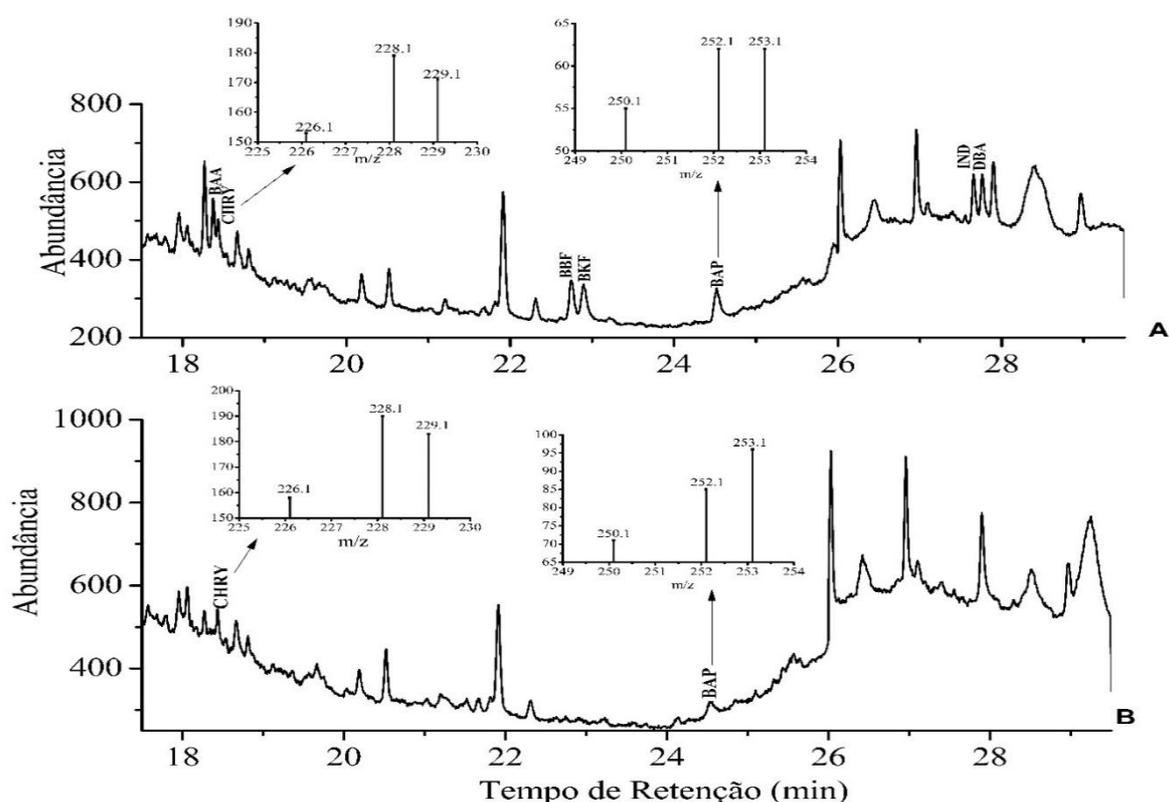
Dessa forma, a limpeza ótima dos extratos foi atingida com sílica e PSA ambos a 100 mg de sorvente / mL de extrato, pois nessas condições a extração dos HPAs foi de 103 a 118% com o DPR inferior a 8%.

5.2. Validação

5.2.1. Seletividade

Como pode ser observado na Figura 5, o método foi seletivo para os HPAs BAA, BBF, BKF, IND, DBA uma vez que não foi observado sinal de interferências no mesmo tempo de retenção. Por outro lado, observamos a presença do BAP e CHRY no cromatograma do extrato da amostra não fortificada (branco). O perfil de fragmentação no espectro de massas no modo SIM confirma a presença do HPA. Vale a pena destacar que não encontramos amostras de fumaça líquida totalmente livre de HPAs.

Figura 8 - Comparação entre os cromatogramas de extratos de amostra de fumaça líquida fortificada com os HPAs a $5 \mu\text{g L}^{-1}$ (A) e amostra não fortificada branco (B)



Fonte: Do autor, 2024

5.2.2. Limite de detecção e quantificação

O LD foi definido como $2 \mu\text{g L}^{-1}$, pois nessas condições a relação sinal/ruído (S/R) foi superior a 4. Já o LQ foi definido como $5 \mu\text{g L}^{-1}$ ($S/R \geq 10$) e como pode ser observado na Tabela 2, o método apresentou exatidão e precisão nessa concentração. Vale destacar que a Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Nº 725, de 1º de julho de 2022, estabelece os aromatizantes de fumaça não podem transferir mais do que $0,03 \mu\text{g}$ de BAP por kg de alimento (Anvisa, 2022).

Os fabricantes de fumaça líquida recomendam usar 2,5 mL do aditivo em cada kg de alimento para um sabor suave de defumado. A partir da razão entre a quantidade de BAP permitido e o volume de fumaça utilizado ($0,03 \mu\text{g/kg} / 2,5 \times 10^{-3} \text{ L kg}^{-1}$), podemos inferir que o limite máximo permitido (LMP) de BAP na fumaça líquida é $12 \mu\text{g L}^{-1}$. Portanto, o método proposto é adequado para a quantificação de HPAs em fumaça líquida uma vez que o LQ é inferior ao LMP.

Tabela3- Dados para limites de detecção (LD) e quantificação (LQ), linearidade, exatidão e precisão para sete HPAs extraídos a partir da fumaça líquida empregando a técnica de ELL-PBT e análises por CG-EM-MIS

Compostos	LD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Linearidade			$5 \mu\text{g L}^{-1}$	$10 \mu\text{g L}^{-1}$	$25 \mu\text{g L}^{-1}$
			Equação	R^2	Faixa linear	(n = 3) % \pm DPR	(n = 7) % \pm DPR	(n = 3) % \pm DPR
BAA	2	5	$Y = 917,59x + 1862,1$	0,995	$5 - 50 \mu\text{g L}^{-1}$	114 ± 1	101 ± 6	100 ± 4
CRHY	2	5	$Y = 836,17x - 653,48$	0,996	$5 - 50 \mu\text{g L}^{-1}$	112 ± 3	101 ± 7	101 ± 2
BBF	2	5	$Y = 454,08x + 1880,3$	0,993	$5 - 50 \mu\text{g L}^{-1}$	113 ± 5	97 ± 10	105 ± 2
BKF	2	5	$Y = 425,92x + 2037,5$	0,993	$5 - 50 \mu\text{g L}^{-1}$	112 ± 5	100 ± 9	101 ± 1
BAP	2	5	$Y = 415,65x + 1563,5$	0,995	$5 - 50 \mu\text{g L}^{-1}$	99 ± 10	103 ± 3	104 ± 3
IND	2	5	$Y = 211,28x + 1624,0$	0,975	$5 - 40 \mu\text{g L}^{-1}$	102 ± 2	95 ± 10	101 ± 4
DBA	2	5	$Y = 451,96x + 1107,8$	0,990	$5 - 50 \mu\text{g L}^{-1}$	102 ± 3	105 ± 5	103 ± 4

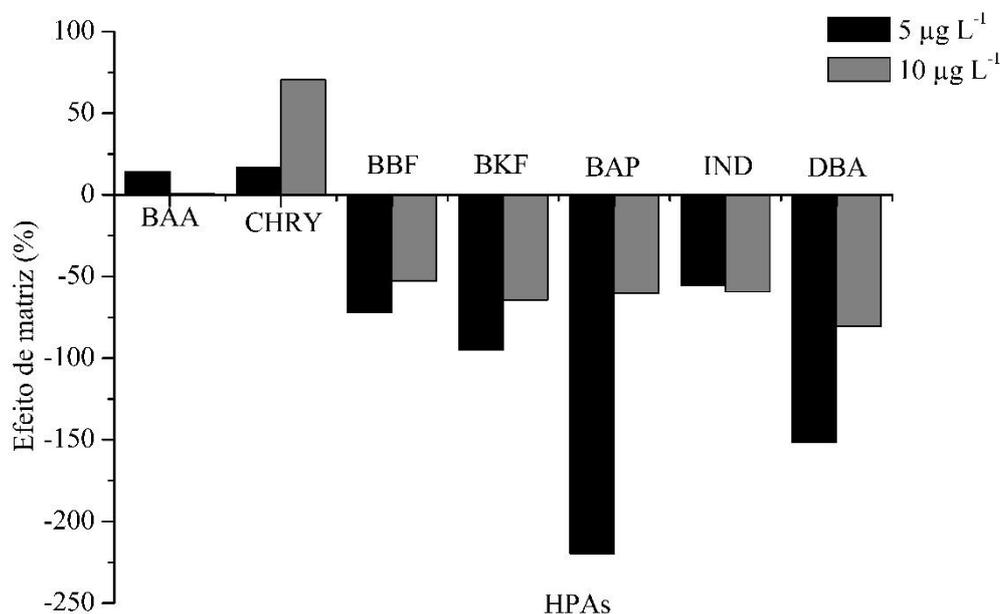
DPR: Desvio padrão

5.2.3. Efeito de matriz

Os componentes de matrizes complexas remanescentes no extrato orgânico podem afetar as análises por cromatografia gasosa em diferentes estágios: injetor, coluna e detector. Os componentes da matriz podem depositar nesses compartimentos do sistema cromatográfico e influenciar na dinâmica de transferência do analito-alvo durante a análise. Essa interferência é mais perceptível quando se compara o sinal cromatográfico gerado pelo composto preparado em solvente puro e o sinal no extrato da matriz, estando na mesma concentração e condições cromatográficas (Williams *et al.*, 2023). Esse fenômeno é denominado de efeito de matriz (Erney *et al.*, 1993).

Os HPAs são severamente afetados pelo efeito de matriz (Chung; Lau, 2015; Petrarca; Godoy, 2018; Prata *et al.*, 2024), pois é influenciado pelo número de anéis fundidos bem como a disposição desses anéis no espaço. Os HPAs de três e quatro anéis são classificados como HPAs leves (BAA, CHRY e BBF) enquanto que os HPAs de cinco e seis anéis são classificados como HPAs pesados (BKF, BAP, IND, DBA)(Lawal, 2017). Na Figura 6 é apresentado o efeito de matriz para os sete HPAs nas concentrações do LQ e 2xLQ. Como pode ser observado os HPAs com menores tempo de retenção (BAA e CHRY) apresentaram efeito de matriz positivo, ou seja, a resposta cromatográfica é maior quando a solução é preparada em extrato da matriz. Por outro lado, os HPAs menos voláteis apresentaram efeito de matriz negativo. Nessas condições, os componentes da matriz adsorvem no sistema cromatográfico criando novos sítios ativos e uma menor quantidade dos HPAs chegam ao detector (Mastovska; Wylie, 2012). Outro ponto a ser considerado é a influência da concentração na intensidade do efeito de matriz, onde concentrações baixas da maioria dos HPAs tendem a sofrer maior influência da matriz, o que também foi possível observar nas análises de alguns resíduos pesticidas (Hercegová; Dömötöróvá; Matisová, 2007; Kirchner *et al.*, 2008).

Figura 9 - Efeito de matriz nas análises por CG-EM-MIS de sete HPAs nas concentrações de 5 e 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ em extratos de fumaça líquida

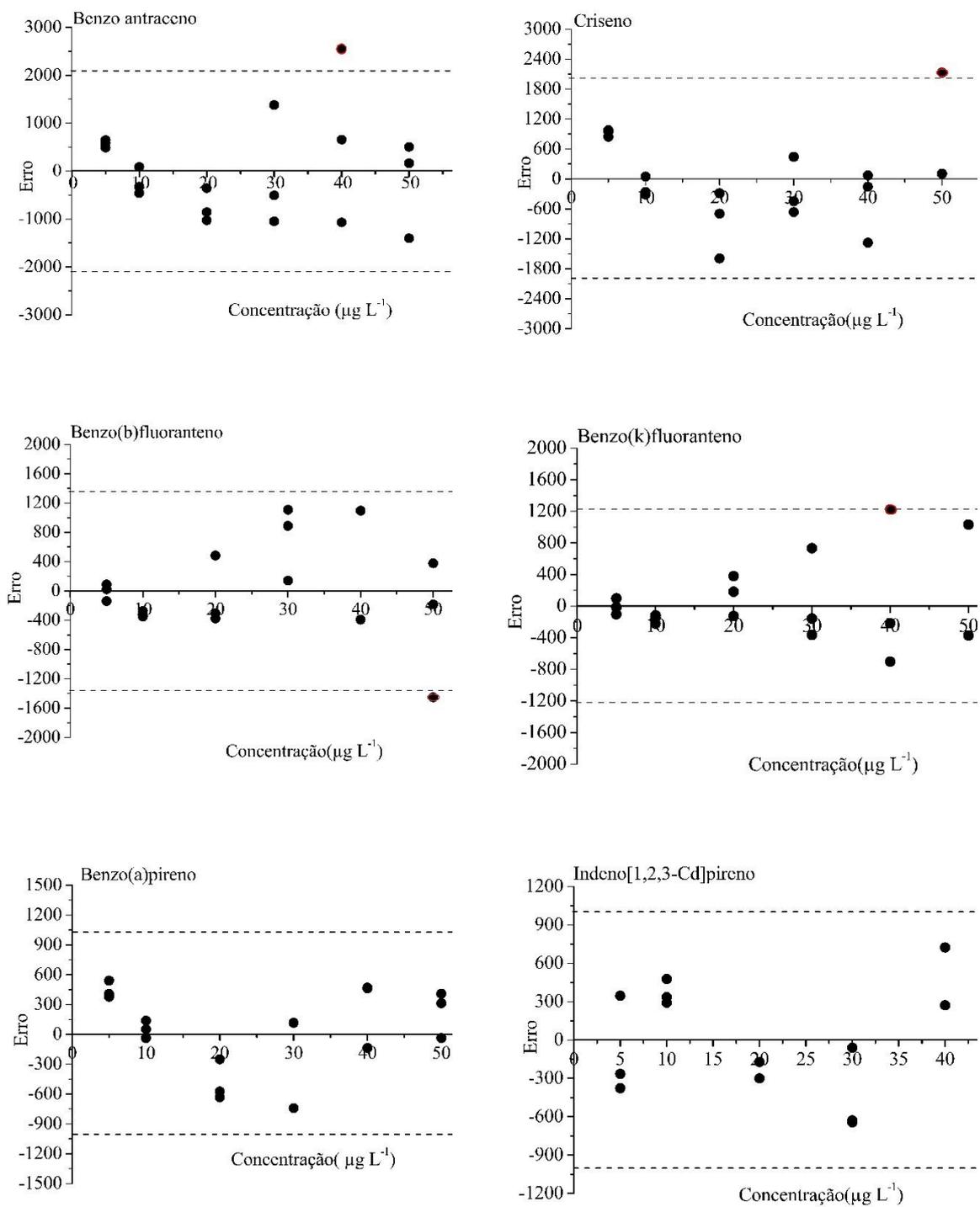


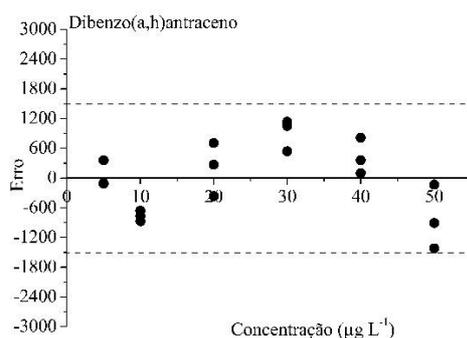
Fonte: Do autor,2024

5.3.4. Linearidade

O método foi linear na faixa de concentração de 5 a 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ para os HPAs com coeficiente de determinação (R^2) superior a 0,99, com exceção do IND como pode ser observado na Tabela 3. Esse HPA foi linear na faixa de 5 a 40 $\mu\text{g L}^{-1}$ com R^2 superior a 0,97. O teste Jackknife foi aplicado aos resíduos de regressão de todos os sete HPAs, e os outliers encontrados foram excluídos sem ultrapassar 22,2% dos pontos da curva e sem a exclusão total de um nível de concentração (De Souza; Junqueira, 2005), como demonstrado na Figura 7 abaixo.

Figura 10 - Resíduos de regressão linear para o benzo(a)antraceno antes da exclusão de valores extremos (teste Jacknife)





5.3.5. Exatidão e precisão

O método apresentou exatidão para as concentrações de 5, 10 e 25 $\mu\text{g L}^{-1}$, pois a recuperação dos HPAs variou de 95 a 114% como pode ser observado na Figura 3. Além disso, o método proposto apresentou precisão na concentração de 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ sob condições de repetitividade, pois o DPR foi inferior a 10%.

5.4. Comparação entre métodos

Os resultados alcançados pela ELL-PBT foram comparados com técnicas de extração de HPAs em amostras aquosas de origens ambientais seguidas por análises por CG-EM (Tabela 4). Isso foi necessário porque, sob a luz do nosso conhecimento, não existe na literatura científica metodologias otimizadas e validadas, para HPAs, em amostras de fumaça líquida até o presente momento.

Tabela 4 - Comparação da ELL-PBT com outras técnicas de extração para HPAs em amostras aquosas

Técnica de extração	Recuperação (%)	DPR (%)	LD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Referência
Extração magnética em fase sólida	20-100	2,0-10	0,8-36	-	Liu et al, 2009
Extração em fase sólida	70-127	1,2-2,1	0,002-0,008	-	Ma et al, 2010
Extração em fase sólida	72-134	0,8-9,5	0,009-0,036	0,029-0,119	Fu et al, 2012
Extração em fase sólida	77-108	2,0-17	0,001-0,003	0,001-0,005	Valera-Tarifa et al, 2018
Microextração em fase sólida por imersão direta	60-120	0,6-24,9	0,170-0,320	-	Bianchin et al, 2012
Microextração em fase sólida por imersão direta	70-125	3,1-12,5	0,0001-0,0007	-	Chen et al, 2012
Microextração em fase sólida por imersão direta	76-99	4,38-16,21	0,007-0,005	0,023-0,193	Menezes et al, 2013
Extração líquido-líquido microporosa com membrana de fibra oca	61-114	1,2-18	1,5	5	Pereira-Coelho et al, 2021
ELL-PBT	95-114	3,0-10	2	5	Presente estudo

DPR - desvio padrão relativo, LD - limite de detecção, LQ - Limite de Quantificação e ELL-PBT - extração líquido-líquido com purificação em baixa temperatura

Como pode ser observado na Tabela 4, a maioria das metodologias apresentou recuperações acima de 100% para os HPAs, mostrando que esses compostos são severamente afetados pelo efeito de matriz. Dentre as técnicas comparadas, a ELL-PBT avaliada neste estudo apresentou a melhor faixa de recuperação para os HPAs ficando entre 95 à 114%, indicando que a metodologia proposta é mais exata. Além disso, o DPR está compatível com a maioria das metodologias avaliadas. A principal desvantagem da ELL-PBT está no maior valor de LQ assim como a extração líquido-líquido microporosa com membrana oca. Esse resultado pode

ser explicado porque durante a ELL-PBT ocorre diluição na concentração dos HPAs e, para a maioria das técnicas comparadas na Tabela 4, a extração dos HPAs ocorre com um elevado fator de concentração. Entretanto, a ELL-PBT é uma técnica de fácil execução, com custo acessível aos laboratórios, que permite a realização, simultânea de várias extrações e, principalmente, atingiu um valor de LQ que atende a legislação vigente para HPAs em fumaça líquida.

5.5. Amostras reais

Quatro amostras de fumaça líquida comerciais foram avaliadas e o criseno foi quantificado em uma das amostras com a concentração de $9,81 \pm 0,22 \mu\text{g L}^{-1}$ e detectado em outras duas amostras. Os demais HPAs não foram detectados nas amostras analisadas. Estudos anteriores (Węgrzyn *et al.*, 2006; Ciecierska; Obiedziński, 2007) têm encontrado elevada concentração de criseno e benzo(a)antraceno em espadilhas defumadas enlatadas ao óleo. Em outro estudo feito por Zachara e colaboradores (2017), as concentrações de criseno em carnes e peixes defumados variaram de $0,68 - 8,59 \mu\text{g kg}^{-1}$. O processo de defumação pode promover a formação dos HPAs em quantidades variadas (Surma; Sadowska-Rociak; Cieślik, 2014).

6. CONCLUSÕES

A ELL-PBT aplicada para sete HPAs em amostras de fumaça líquida seguida pela análise por CG-EM-MIS mostrou ser um método simples, prático, eficiente e de custo acessível aos laboratórios especializados. A combinação dos sorventes sílica e PSA foram altamente eficientes na remoção de pigmentos e redução do efeito de matriz em uma etapa de limpeza dos extratos pela d-SPE. O LQ alcançado ($5 \mu\text{g L}^{-1}$) foi inferior ao limite máximo estimado ($12 \mu\text{g L}^{-1}$) para o BAP em fumaça líquida de acordo com as normas brasileiras da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, sendo o CHRY quantificado em uma das amostras analisadas e detectado em outras duas amostras.

REFERÊNCIAS

ABDEL-SHAFY, Hussein I.; MANSOUR, Mona S.M. A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: Source, environmental impact, effect on human health and remediation. **Egyptian Journal of Petroleum**, v. 25, n. 1, p. 107–123, 2016. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpe.2015.03.011>.

ALÇIÇEK, Zayde; BALABAN, Murat Ömer. Characterization of green lipped mussel meat. Part II: Changes in physical characteristics as a result of brining and liquid smoke application. **Journal of Aquatic Food Product Technology**, v. 24, n. 1, p. 15–30, 2015.

ANVISA. RDC Resolution No. 725, of July 1, 2022. Provides for flavoring food additives. Official Gazette of the Union: section 1, Brasília, DF, n. 126, 6 Jul. 2022. Available at: <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/resolucao-rdc-n-725-de-1-de-julho-de-1822-413249198>. Accessed on: 22 Dec. 2023.

BIANCHIN, Joyce Nunes *et al.* Simultaneous determination of polycyclic aromatic hydrocarbons and benzene, toluene, ethylbenzene and xylene in water samples using a new sampling strategy combining different extraction modes and temperatures in a single extraction solid-phase microextra. *Journal of Chromatography A*, v. 1233, p. 22–29, 2012. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2012.02.022>.

BUDARAGA, Ketut *et al.* Liquid smoke production quality from raw materials variation and different pyrolysis temperature. **International Journal on Advanced Science, Engineering and Information Technology**, v. 6, n. 3, p. 306–315, 2016.

CAMARGO, Mônica Cristiane Rojo *et al.* Determinação de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs). **Food Science and Technology**, v. 26, n. 1, p. 230-234, 2006.

CEC – The Commission of the European Communities. Commission Regulation (EC) N° 915/2023 of 25 April 2023. Official Journal of European Union, 2023. Available at: <https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2023/915/oj>. Accessed on: 22 Dec. 2023.

CHANG, Min S. *et al.* Historical review of sample preparation for chromatographic bioanalysis: pros and cons. **Drug Development Research**, v. 68, n. 3, p. 107-133, 2007.

CHUNG, Stephen W.C.; LAU, Jason S.Y. Single laboratory validation of an environmentally friendly single extraction and cleanup method for quantitative determination of four priority polycyclic aromatic hydrocarbons in edible oils and fats. **Analytical Methods**, v. 7, n. 18, p. 7631–7638, 2015.

CIECIERSKA, Marta; OBIEDZIŃSKI, Mieczysław. Corresponding author-Adres do korespondencji: Mgr in CANNED FISH PRODUCTS CONTAMINATION BY POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS *. **ACTA Acta Sci. Pol., Technol. Aliment**, v. 6, n. 2, p. 19–28, 2007.

CIEMNIAK, Artur *et al.* Assessing the contamination levels of dried teas and their infusions by polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). **Journal fur Verbraucherschutz und**

Lebensmittelsicherheit, v. 14, n. 3, p. 263–274, 2019.

COSTA, Anna I.G. *et al.* Determination of pesticides in lettuce using solid-liquid extraction with low temperature partitioning. **Food Chemistry**, v. 181, p. 64–71, 2015. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.02.070>.

CRISTALE, J.; SILVA, F. S.; MARCHI, M. R.R. Desenvolvimento e aplicação de método GC-MS/MS para análise simultânea de 17 HPAs em material particulado atmosférico. **Eclética Química**, v. 33, n. 4, p. 69–78, 2008.

DA SILVA RODRIGUES, Daniel Aparecido *et al.* Biodegradation of sulfamethoxazole by microalgae-bacteria consortium in wastewater treatment plant effluents. **Science of the Total Environment**, v. 749, p. 141441, 2020. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141441>.

DE SOUZA, Scheilla V.C.; JUNQUEIRA, Roberto G. A procedure to assess linearity by ordinary least squares method. **Analytica Chimica Acta**, v. 552, n. 1–2, p. 25–35, 2005.

DO REGO, Eliane Cristina Pires *et al.* The validation of a new high throughput method for determination of chloramphenicol in milk using liquid-liquid extraction with low temperature partitioning (LLE-LTP) and isotope-dilution liquid chromatography tandem mass spectrometry (ID-LC-MS/MS). **Analytical Methods**, v. 7, n. 11, p. 4699–4707, 2015.

ERAWATY SILALAH, Ester Tio Minar; ANITA, Sofia; TERUNA, Hilwan Y. Comparison of Extraction Techniques for the Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Soil. **Journal of Physics: Conference Series**, v. 1819, n. 1, 2021.

ERNEY, D. R. *et al.* Explanation of the matrix-induced chromatographic response enhancement of organophosphorus pesticides during open tubular column gas chromatography with splitless or hot on-column injection and flame photometric detection. **Journal of Chromatography A**, v. 638, n. 1, p. 57–63, 1993.

EPA - Environmental Protection Agency. **Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs)**. US, Washington, DC, 1996. Available at: <http://www.epa.gov/epaoswer/hazwaste/test/pdfs/3630c.pdf>. Accessed on: 12 Dec. 2023.

EYRING, Philipp *et al.* Development of a new generic extraction method for the analysis of pesticides, mycotoxins, and polycyclic aromatic hydrocarbons in representative animal feed

and food samples. **Food Chemistry**, v. 356, n. July 2020, p. 129653, 2021. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129653>.

FREITAS, Lucas V.P. *et al.* Optimization and Validation of LLE-LTP and QuEChERS Methodologies for Determining 2,4-D in Water Samples. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 31, n. 9, p. 1898–1907, 2020.

FU, Shuai *et al.* Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in water samples using online microextraction by packed sorbent coupled with gas chromatography-mass spectrometry. **Talanta**, v. 94, p. 152–157, 2012. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2012.03.010>.

GAMA, Mariana R.; ROCHA, Fábio R.P. Solventless separation of underivatized biogenic amines by sequential injection chromatography. **Microchemical Journal**, v. 156, n. March, p. 104839, 2020. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.104839>.

GARCÍA FALCÓN, S. *et al.* Determination of benzo[a]pyrene in smoking-flavour agents (water-soluble liquid smoke) by second derivative constant-wavelength synchronous spectrofluorimetry. **Talanta**, v. 43, n. 4, p. 659–664, 1996.

GIRELLI, A. M.; SPERATI, D.; TAROLA, A. M. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in Italian milk by HPLC with fluorescence detection. **Food Additives and Contaminants - Part A**, v. 31, n. 4, p. 703–710, 2014. Available at: <http://dx.doi.org/10.1080/19440049.2013.878959>.

GOMES, Rafaela de Paiva *et al.* Validation of a new high-throughput method to determine urinary S-phenylmercapturic acid using low-temperature partitioning extraction and ultra high performance liquid chromatography–mass spectrometry. **Journal of Separation Science**, v. 40, n. 2, p. 550–557, 2017.

GOULART, Simone Machado *et al.* Low-temperature clean-up method for the determination of pyrethroids in milk using gas chromatography with electron capture detection. **Talanta**, v. 75, n. 5, p. 1320–1323, 2008.

GOULART, Simone Machado *et al.* Optimization and validation of liquid-liquid extraction with low temperature partitioning for determination of carbamates in water. **Analytica Chimica Acta**, v. 671, n. 1–2, p. 41–47, 2010.

GUILLEN, M. D.; SOPELANA, P.; PARTEARROYO, M. A. Polycyclic aromatic hydrocarbons in liquid smoke flavorings obtained from different types of wood. Effect of storage in polyethylene flasks on their concentrations. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 10, p. 5083–5087, 2000a.

GUILLÉN, M. Dolores; SOPELANA, Patricia; PARTEARROYO, M. Aranzazu. Study of several aspects of a general method for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in liquid smoke flavourings by gas chromatography-mass spectrometry. **Food Additives and Contaminants**, v. 17, n. 1, p. 27–44, 2000b.

HAJŠLOVÁ, Jana; ZROSTLÍKOVÁ, Jitka. Matrix effects in (ultra)trace analysis of pesticide residues in food and biotic matrices. **Journal of Chromatography A**, v. 1000, n. 1–2, p. 181–197, 2003.

HAMIDI, Elliyana Nadia *et al.* Bioaccessibility of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Grilled Meat: The Effects of Meat Doneness and Fat Content. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 19, n. 2, 2022.

HERCEGOVÁ, Andrea; DÖMÖTÖROVÁ, Milena; MATISOVÁ, Eva. Sample preparation methods in the analysis of pesticide residues in baby food with subsequent chromatographic determination. **Journal of Chromatography A**, v. 1153, n. 1–2, p. 54–73, 2007.

HOLLEY, Richard A.; PATEL, Dhaval. Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. **Food Microbiology**, v. 22, n. 4, p. 273–292, 2005.

HOLME, J. A.; BRINCHMANN, B. C.; REFSNES, M.; LÅG, M.; ØVREVIK, J. Potential role of polycyclic aromatic hydrocarbons as mediators of cardiovascular effects from combustion particles. *Environ Health*, v. 18, n. 1, p. 74, 22 ago. 2019. DOI: 10.1186/s12940-019-0514-2.

HUANG, Yanpei *et al.* Effects of tea branch liquid smoke on oxidation and structure of myofibrillar protein derived from pork tenderloin during curing. **Food Chemistry: X**, v. 17, n. December 2022, 2023.

INTERNATIONAL Agency for Research on Cancer. GLOBOCAN 2008: Cancer Incidence and Mortality Worldwide. Lyon: IARC, 2008. Available at: <https://www.iarc.who.int/news-events/globocan-1808-cancer-incidence-and-mortality-worldwide/>. Accessed on: 22 Dec.

2023.

KAFOURIS, Demetris *et al.* Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in traditionally smoked meat products and charcoal grilled meat in Cyprus. **Meat Science**, v. 164, n. November 2019, p. 108088, 2020. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2020.108088>.

KERKICH, Kamal *et al.* Recent advances in the extraction, purification and analysis of emerging pesticides in honey products: A review. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 127, n. August 2023, p. 105947, 2024. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2023.105947>.

KIM, Ki Hyun *et al.* A review of airborne polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and their human health effects. **Environment International**, v. 60, p. 71–80, 2013. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2013.07.019>.

KIRCHNER, Michal *et al.* Fast gas chromatography for pesticide residues analysis using analyte protectants. **Journal of Chromatography A**, v. 1186, n. 1–2, p. 271–280, 2008.

LAU, E. V.; GAN, S.; NG, H. K. Extraction Techniques for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Soils. **International Journal of Analytical Chemistry**, v. 2010, p. 1–9, 2010.

LAWAL, Abdulazeez T. Polycyclic aromatic hydrocarbons. A review. **Cogent Environmental Science**, v. 3, n. 1, 2017. Available at: <https://doi.org/10.1080/23311843.2017.1339841>.

LI, Yan *et al.* Compensation for matrix effects in the gas chromatography-mass spectrometry analysis of 186 pesticides in tea matrices using analyte protectants. **Journal of Chromatography A**, v. 1266, p. 131–142, 2012. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2012.10.008>.

LINGBECK, Jody M. *et al.* Functionality of liquid smoke as an all-natural antimicrobial in food preservation. **Meat Science**, v. 97, n. 2, p. 197–206, 2014. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2014.02.003>.

LIU, Wen *et al.* Investigation of low-temperature partitioning with dispersive solid-phase extraction for quantification of pesticides in apples followed by electrospray-ionization mobility spectrometry: Comparison with conventional procedure. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 1234, n. January, p. 124014, 2024. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2024.124014>.

LIU, Yan; LI, Haifang; LIN, Jin Ming. Magnetic solid-phase extraction based on octadecyl functionalization of monodisperse magnetic ferrite microspheres for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in aqueous samples coupled with gas chromatography-mass spectrometry. *Talanta*, v. 77, n. 3, p. 1037–1042, 2009.

MA, Jiping et al. Determination of 16 polycyclic aromatic hydrocarbons in environmental water samples by solid-phase extraction using multi-walled carbon nanotubes as adsorbent coupled with gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v. 1217, n. 34, p. 5462–5469, 2010. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2010.06.060>.

MAGALHÃES, Elisângela Jaqueline *et al.* Fast Determination of Benzodiazepines in Human Urine via Liquid-Liquid Extraction with Low Temperature Partitioning and LC-HRMS. **American Journal of Analytical Chemistry**, v. 03, n. 02, p. 118–124, 2012.

MALLAH, Manthar Ali *et al.* Polycyclic aromatic hydrocarbon and its effects on human health: An overview. **Chemosphere**, v. 296, n. February, 2022.

MASTOVSKA, Katerina; WYLIE, Philip L. Evaluation of a new column backflushing set-up in the gas chromatographic-tandem mass spectrometric analysis of pesticide residues in dietary supplements. **Journal of Chromatography A**, v. 1265, p. 155–164, 2012. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2012.09.094>.

MENEZES, Helvécio C. et al. A sensitive GC/MS method using cold fiber SPME to determine polycyclic aromatic hydrocarbons in spring water. *Microchemical Journal*, v. 110, p. 209–214, 2013. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.microc.2013.03.010>.

MILLY, P.J.; TOLEDO, R.T.; RAMAKRISHNAN, S. Determination of Minimum Inhibitory Concentrations of Liquid Smoke Fractions. *Journal of Food Science*, v. 70, n. M12-M17, 2005. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2005.tb09040.x>.

MOHAMMADI, M.; VALIZADEH-KAKHKI, F. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Determination in Grilled Beef and Chicken. **Polycyclic Aromatic Compounds**, v. 38, n. 5, p. 434–444, 2018. Available at: <http://dx.doi.org/10.1080/10406638.2016.1236824>.

MONTAZERI, Naim *et al.* Chemical characterization of commercial liquid smoke products. **Food Science & Nutrition**, v. 1, n. 1, p. 102–115, 2013.

MORADI, Vahideh *et al.* Development of a GC-MS method for determination of various polycyclic aromatic hydrocarbons in Iranian traditional and semi-industrial taftoon bread. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 19, n. 3, p. 183–194, 2020.

OSTADGHOLAMI, Mahsa *et al.* Multivariate Optimization and Validation of a Modified QuEChERS Method for Determination of PAHs and PCBs in Grilled Meat by GC-MS. **Foods**, v. 13, n. 1, 2024.

PAGE, D. S. *et al.* Pyrogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments record past human activity: A case study in Prince William Sound, Alaska. **Marine Pollution Bulletin**, v. 38, n. 4, p. 247–260, 1999.

PARANHOS, Aline G.O. *et al.* Analysis of tylosin in poultry litter by HPLC-UV and HPLC-MS/MS after LTPE. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, v. 101, n. 15, p. 2568–2585, 2021. Available at: <https://doi.org/10.1080/03067319.2019.1694921>.

PEREIRA-COELHO, Marina *et al.* Development of hollow fiber-membrane microporous liquid–liquid extraction (HF-MMLLE) procedure based on palladium nanoparticles for determination of PAH in leached extracts. **Microchemical Journal**, v. 169, n. April, p. 1–9, 2021.

PETRARCA, Mateus Henrique; GODOY, Helena Teixeira. Gas chromatography–mass spectrometry determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in baby food using QuEChERS combined with low-density solvent dispersive liquid–liquid microextraction. **Food Chemistry**, v. 257, n. September 2017, p. 44–52, 2018. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.02.135>.

PRATA, Rafaela *et al.* Method validation for GC-measurable pesticides and PAHs in baby foods using QuEChERS-based extraction procedure. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 129, n. February, 2024.

PubChem, National Center for Biotechnology Information (2024). Available at: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>. Accessed on: 22 Feb. 2024

PUSTAKA, B A B Tinjauan. Liquid Smoke Market Analysis. p. 8–12, 2020. Available at: <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/liquid-smoke-market>.

RACIOPPO, Angela *et al.* Optimizing liquid smoke conditions for the production and preservation of innovative fish products. **Food Bioscience**, v. 53, n. May, p. 102712, 2023. Available

at: <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2023.102712>.

RODRIGUES, Alessandra Aparecida Zinato *et al.* The efficacy of washing strategies in the elimination of fungicide residues and the alterations on the quality of bell peppers. **Food Research International**, v. 147, n. December 2020, 2021.

ROZUM, J. **Liquid Smoke (Smoke Condensate) Application**. Elsevier Ltd., 2014. v. 3 Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-384731-7.00146-X>.

RÜBENSAM, Gabriel *et al.* A liquid-liquid extraction procedure followed by a low temperature purification step for the analysis of macrocyclic lactones in milk by liquid chromatography-tandem mass spectrometry and fluorescence detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 705, n. 1–2, p. 24–29, 2011.

SAMPAIO, Geni Rodrigues *et al.* Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Foods : Biological Effects , Legislation , Occurrence , Analytical Methods , and Strategies to Reduce Their Formation. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 6010, p. 1–30, 2021.

SANTE. (2019). Analytical Quality Control and Method Validation Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed (SANTE/12682/2019)

SHAO, Wenjie *et al.* Using liquid smoke to control infestations of the ham mite, *Tyrophagus putrescentiae*, on dry-cured hams during aging. **Meat Science**, v. 200, n. October 2022, p. 109139, 2023. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2023.109139>.

SIBIYA, P. *et al.* Development and application of solid phase extraction method for polycyclic aromatic hydrocarbons in water samples in Johannesburg area, Southc Africa. **South African Journal of Chemistry**, v. 65, p. 206–213, 2012.

SIMON, Rupert *et al.* Composition and analysis of liquid smoke flavouring primary products. **Journal of Separation Science**, v. 28, n. 9–10, p. 871–882, 2005.

SOARES, Juliana Marques *et al.* Antimicrobial and antioxidant activity of liquid smoke and its potential application to bacon. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 38, p. 189–197, 2016. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ifset.2016.10.007>.

SOARES, Willian M *et al.* Enhanced Detection of Benzo [a] pyrene in Olive Oil through Low

Temperature Liquid-Liquid Extraction Coupled with Constant Energy Synchronous Fluorescence Spectroscopy. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 35, p. e-18230200, 2024.

SOBHANZADEH, Elham; NEMATİ, Keivan. Liquid-liquid extraction/low-temperature purification (LLE/LTP) followed by dispersive solid-phase extraction (d-SPE) cleanup for multi-residue analysis in palm oil by LC-QTOF-MS. **Journal of Chemistry**, v. 2013, 2013.

SOKAMTE TEGANG, Alphonse *et al.* Characterization of volatile compounds of liquid smoke flavourings from some tropical hardwoods. **Scientific African**, v. 8, p. e00443, 2020. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2020.e00443>.

STEPHANOU, P. *et al.* Alterations in central monoaminergic neurotransmission induced by polycyclic aromatic hydrocarbons in rats. **European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics**, v. 23, n. 4, p. 475–481, 1998.

SURMA, Magdalena; SADOWSKA-ROCIĘK, Anna; CIEŚLIK, Ewa. The application of d-SPE in the QuEChERS method for the determination of PAHs in food of animal origin with GC-MS detection. **European Food Research and Technology**, v. 238, n. 6, p. 1029–1036, 2014.

TROUVÉ, G. *et al.* Development of a Liquid/Liquid Extraction Method and GC/MS Analysis Dedicated to the Quantitative Analysis of PAHs and O-PACs in Groundwater from Contaminated Sites and Soils. **Polycyclic Aromatic Compounds**, v. 42, n. 7, p. 4000–4018, 2022. Available at: <https://doi.org/10.1080/10406638.2021.1880449>.

VALERA-TARIFA, Noelia María *et al.* Development and validation of a GC–MS/MS method for priority polycyclic aromatic hydrocarbons quantification in different types of water samples. **Separation Science Plus**, v. 1, n. 8, p. 539–548, 2018.

VIEIRA, Heulla Pereira; NEVES, Antônio Augusto; QUEIROZ, Maria Eliana Lopes Ribeiro de. Otimização e validação da técnica de extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura (ELL-PBT) para piretróides em água e análise por CG. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 535–540, 2007.

WĘGRZYN, E. *et al.* Modified analytical method for polycyclic aromatic hydrocarbons, using Sec for sample preparation and RP-HPLC with fluorescence detection. application to different food samples. **Acta Chromatographica**, n. 17, p. 233–249, 2006.

WILLIAMS, Madison L. *et al.* Matrix effects demystified: Strategies for resolving challenges in analytical separations of complex samples. **Journal of Separation Science**, v. 46, n. 23, 2023.

ZACHARA, Alicja; GAŁKOWSKA, Dorota; JUSZCZAK, Lesław. Contamination of smoked meat and fish products from Polish market with polycyclic aromatic hydrocarbons. **Food Control**, v. 80, p. 45–51, 2017.

ZHAO, Zhen Hua; QUAN, Wen Yi; TIAN, De Hai. Urinary 1-hydroxypyrene as an indicator of human exposure to ambient polycyclic aromatic hydrocarbons in a coal-burning environment. **Science of the Total Environment, The**, v. 92, n. C, p. 145–154, 1990.