

**UFRRJ**

**INSTITUTO DE TECNOLOGIA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E  
TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

**TESE**

**OTIMIZAÇÃO DA SEPARAÇÃO DE HIDROCARBONETOS  
POLICÍCLICOS AROMÁTICOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA  
DE ALTA EFICIÊNCIA UTILIZANDO METODOLOGIA DA  
SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA ANÁLISE DE AMOSTRAS DE  
MEXILHÃO E SALMÃO DEFUMADO**

**Cláudio Roberto Ribeiro Bobeda**

**2014**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA  
DE ALIMENTOS**

**OTIMIZAÇÃO DA SEPARAÇÃO DE HIDROCARBONETOS  
POLICÍCLICOS AROMÁTICOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA  
DE ALTA EFICIÊNCIA UTILIZANDO METODOLOGIA DA  
SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA ANÁLISE DE AMOSTRAS DE  
MEXILHÃO E SALMÃO DEFUMADO**

**CLÁUDIO ROBERTO RIBEIRO BOBEDA**

*Sob a orientação do Professor*  
**Ronoel Luiz de Oliveira Godoy**

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências**, no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, área de concentração em Ciência dos Alimentos.

**Seropédica, RJ  
Outubro/2014**

664.949 Bobeda, Cláudio Roberto Ribeiro, 1965-  
B663o Otimização da separação de hidrocarbonetos  
T policíclicos aromáticos por cromatografia líquida de  
alta eficiência utilizando metodologia da superfície  
de resposta para análise de amostras de mexilhão e  
salmão defumado / Cláudio Roberto Ribeiro Bobeda. -  
2014.

124f.: il.

Orientador: Ronoel Luiz de Oliveira Godoy.

Tese (doutorado) - Universidade Federal Rural do  
Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Ciência e  
Tecnologia de Alimentos.

Bibliografia: f. 79-89.

1. Mexilhão - Composição - Teses. 2. Salmão -  
Composição - Teses. 3. Hidrocarbonetos policíclicos  
aromáticos - Teses. 4. Alimentos - Contaminação -  
Teses. 5. Cromatografia a líquido de alta eficiência  
- Teses. I. Godoy, Ronoel Luiz de Oliveira, 1951-  
II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.  
Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de  
Alimentos. III. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE  
ALIMENTOS**

**CLÁUDIO ROBERTO RIBEIRO BOBEDA**

Tese submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de **Doutor em Ciências** ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos na área de concentração em Ciência dos Alimentos.

TESE APROVADA EM 08 DE OUTUBRO DE 2014.

---

Ronoel Luiz de Oliveira Godoy (D.Sc.) Embrapa  
(Orientador)

---

Maria Ivone Martins Jacintho Barbosa (D.Sc.)UFRRJ

---

Simone Pereira Mathias (D.Sc.)UFRRJ

---

Helena de Souza Torquillo (D.Sc.) IFRJ

---

Renata Galhardo Borguini (D. Sc.) Embrapa

## DEDICATÓRIA

*Aos meus pais Roberto e Marilú (in memoriam) pelo amor, dedicação e disciplina  
que tanto contribuíram para minha formação ética e intelectual.  
Meus exemplos de vida.*

*Aos meus irmãos Márcia, Alexandre e Roberto Júnior pelo carinho e estímulo  
para a realização deste trabalho.*

*“Se eu vi mais longe,  
foi por estar de pé sobre  
ombros de gigantes.”*

*Isaac Newton*

## AGRADECIMENTOS

*Ao D.Sc. Ronoel Luiz de Oliveira Godoy pela orientação, apoio, incentivo, amizade, paciência e por acreditar tanto em mim.*

*A D.Sc. Helena de Souza Torquillo pelas incansáveis correções, apoio, incentivo, amizade, paciência e por acreditar tanto em mim.*

*A D.Sc. Renata Galhardo Borguini pela colaboração.*

*A D.Sc. Simone Pereira Mathias pela colaboração.*

*A D.Sc. Maria Yvone Martins Jacintho Barbosa pelo apoio e colaboração nos momentos de dificuldades e pelo empenho na coordenação do PPGCTA.*

*Ao D.Sc. Sidney Pacheco pela colaboração, e discussões relevantes*

*A Lucimar Starck Teixeira pelo apoio e ajuda nos momentos de dificuldades e pelo empenho na coordenação do PPGCTA.*

*A Embrapa Agroindústria de Alimentos e ao Instituto Federal do Rio de Janeiro pela viabilização deste trabalho.*

*Ao programa de pós-graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.*

*Às colegas do Laboratório de Cromatografia Líquida da Embrapa, Manuela Cristina Pessanha de Araújo Santiago e Ana Cristina Miranda Senna Gouvea pelas boas conversas..*

*Com carinho especial, agradeço a Suellen que tanto colaborou com esse trabalho, nas tarefas de bancada.*

*Ao Professor José da Silva Martins Filho pela colaboração na revisão dos textos e na escrita deste trabalho.*

*Aos amigos do IFRJ, Ana Maria, Márcia Angélica, André Coelho e André Eidler, Vera Gomes e Vânia Caldas que de forma carinhosa e paciente, direta ou indiretamente, colaboraram com compreensão, incentivo e seus conhecimentos para a realização deste trabalho.*

*A Alice Vinhaes, minha “guru”, que com suas sábias palavras e orientações, contribuiu de forma decisiva para que o presente trabalho fosse finalizado.*

## RESUMO

BOBEDA, R. R. CLÁUDIO. **Otimização da separação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos por cromatografia líquida de alta eficiência utilizando metodologia da superfície de resposta para análise de amostras de mexilhão e salmão defumado.** Seropédica, UFRRJ, 2014. 124f. (Tese, Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Ciência dos Alimentos).

Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) podem ser absorvidos por seres humanos através do consumo de alimentos de origem animal e vegetal, que, por sua vez, foram contaminados por meio do solo, ar e da água, ou da adoção de técnicas de processamento térmicos como secagem, defumação, tostagem e grelhagem. HPAs são descritos como contaminantes em vários tipos de alimentos, como: carnes preparadas em braseiros, carnes defumadas, óleos, gorduras, hortaliças, frutas secas, cereais e em diversas formas de pescado, como: camarões, ostras, coquiles e mexilhões. Diante disso, o objetivo desse trabalho, realizado nos Laboratórios de Cromatografia Líquida da Embrapa e do Instituto Federal do Rio de Janeiro - Campus Nilópolis, foi otimizar a separação cromatográfica de 16 HPAs considerados prioritários pela Agência Ambiental Americana utilizando a metodologia da superfície de resposta para investigar a contaminação em amostras de mexilhão e salmão defumado. As amostras foram obtidas em redes de supermercados da cidade do Rio de Janeiro e liofilizadas para conservação e análise posterior. A otimização experimental foi realizada através da aplicação do delineamento composto central rotacional e da metodologia da superfície de resposta. O preparo das amostras para análise foi realizada utilizando extração por solvente em “soxhlet” e a separação e quantificação dos contaminantes foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência com os detectores de arranjo de diodos e fluorescência com comprimento de onda variável, acoplados em série. O tempo total de separação dos dos 16 HPAs foi de 21 minutos, com valores de resolução quantitativos ( $R_s > 1,5$ ), com limites de detecção e de quantificação que variaram de 0,0035 a 0,3523 $\mu\text{g}/\text{Kg}$  e 0,0107 a 0,9576 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ , respectivamente, e estão de acordo com a legislação vigente da Comunidade Européia (CE 835/2011). Nas amostras de mexilhão foram identificados os HPAs benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, dibenzo(a,h)antraceno, benzo(g,h,i)perileno e indeno(cd-1,2,3)pireno, em concentrações que variaram de 0,3548-2,1895 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ . Nas amostras de salmão defumado foram encontrados os HPAs benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, dibenzo(a,h)antraceno e benzo(g,h,i)perileno, em concentrações que variaram de 0,0420-2,5052 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ . Em ambas as amostras as concentrações destes contaminantes estão abaixo dos limites máximos permitidos pela Resolução 835/2011 da CE. Com estes resultados verifica-se que o processamento usado no preparo desses alimentos não eliminou a presença dos contaminantes, mostrando ser de fundamental importância o desenvolvimento ou o aperfeiçoamento de metodologias analíticas para o monitoramento de HPAs em amostras de pescado.

**Palavras-chave:** Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, metodologia da superfície de resposta, mexilhões, salmão defumado, CLAE.



## ABSTRACT

BOBEBBA, R.R.CLÁUDIO. **Optimization of the separation of polycyclic aromatic hydrocarbons by high performance liquid chromatography using surface response methodology for analysis of mussel and smoked salmon samples.** Seropédica: UFRRJ, 2014. 124f. (Tese, Master in Science and Technology of Food, Liquid Chromatography).

PAHs can be absorbed by humans over animal and vegetable food consumption. The contaminated soil, air, water, or the adoption of thermal techniques for food processing such as drying, curing, roasting and grilling may contribute to this type of contamination. Thus, PAHs are described in literature as contaminants in various foods such as barbecue meats, smoked meats, oils, fats, vegetables, nuts, cereals and also in seafood like shrimp, oysters, mollusks and mussels. These organisms are filter feeding and may accumulate PAHs due to the metabolism characteristics. Thus, the aim of this study carried out at the Laboratories of Liquid Chromatography of Embrapa and Federal Institute of Rio de Janeiro - Campus Nilópolis was develop and optimize the chromatographic separation methodology of 16 USEPA priority PAHs isomers and investigate the PAHs contamination of mussels and smoked salmon imported from Chile. Samples were acquired in market places in the city of Rio de Janeiro and lyophilized for conservation until analytical work. Analyses were performed using high performance liquid chromatography with diode array coupled to a variable wavelength fluorescence detector. The identification of the contaminants was performed by comparing their UV spectra with NIST spectral library. The method validation was performed by determining the limit of detection, limit of quantitation, linearity and dynamic range. The total analysis time for the 16 polycyclic aromatic hydrocarbons separation was optimized for 21 minutes with quantitative resolution values ( $R_s > 1,5$ ). The limits of detection and quantification of the method ranged from 0,0035 a 0,3523 $\mu\text{g}/\text{Kg}$  e 0,0107 a 0,9576 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ , respectively, and are in accordance with the current legislation of the European Community (CE 835/2011). The presence of benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, dibenzo(a,h)antraceno, benzo(g,h,i)perileno e indeno(cd-1,2,3)pireno PAHs were identified in the mussel samples in a concentration range of 0,3548-2,1895 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ . Benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, dibenzo(a,h)antraceno e benzo(g,h,i)perileno PAHs were identified in samples of smoked salmon in a concentration range of 0,0420-2,5052 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ . In both samples the concentrations of these contaminants are below the maximum contamination level (MCL) allowed by CE Resolution 835/2011. These results demonstrate that the processing used in the preparation of these foods did not eliminate the presence of contaminants, showing the fundamental importance for the development or improvement of analytical methodologies for monitoring PAHs in seafood samples.

**Key words:** Polycyclic aromatic hydrocarbons, surface response methodology, mussels, smoked salmon, HPLC

## LISTA DE ABREVIACÕES E SÍMBOLOS

- (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Hg** – Metil-mercúrio  
**ACL** – Acenaftileno  
**ACN** – Acenafteno  
**AHAs** – Aminas Heterocíclicas Aromáticas  
**ANOVA** – Análise de Variância  
**ANT** – Antraceno  
**ANVISA** - Agência Nacional de Vigilância Sanitária  
**As** – Arsênico  
**As<sup>3+</sup>** - Íon Arsênico Trivalente  
**As<sup>5+</sup>** - Íon Arsênico Pentavalente  
**ASE** – Extração acelerada por Solvente  
**ATSDR** – Agência Americana para Registro de Substâncias Tóxicas e Doenças  
**BaA** – Benzo[a]antraceno  
**BaP** – Benzo[a]pireno  
**BbF** – Benzo[b]fluoranteno  
**BgP** – Benzo[g,h,i]perileno  
**BkF** – Benzo[k]fluoranteno  
**C<sub>18</sub>** – Octadecil  
**C<sub>6</sub>** – Hexil  
**C<sub>8</sub>** – Octil  
**Cd** – Cádmio  
**CE** – Comunidade Européia  
**CFIA** – Agência Canadense para Inspeção de Alimentos  
**CG** – Cromatografia Gasosa  
**CG-DIC** – Cromatografia Gasosa com detecção por Ionização de Chama  
**CG-EM** – Cromatografia Gasosa com detecção por Espectrometria de Massas  
**CH<sub>3</sub>Hg** – Metil-mercúrio  
**CHR** – Criseno  
**CLAE** – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência  
**CLAE-EM** – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detecção por Espectrometria de Massas  
**CLAE-FLC** – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detecção por Florescência Molecular  
**CLAE-FR** – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Fase Reversa  
**CLAE-UV** – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detecção por Ultravioleta  
**CLAE-UV-FLC** – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detecção por Ultravioleta e Florescência Molecular  
**CMD** – Concentração Média Determinada  
**CNPq** – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.  
**CV** – Coeficiente de Variação  
**DAD** – Detector com Arranjo de Diodos  
**DBA** – Dibenzo[a,h]antraceno  
**DCCR** – Delineamento Composto Central Rotacional  
**DDT** – Dicloro-difenil-tricloroetano  
**DIC** – Detector de Ionização de Chama  
**DNA** – Ácido desoxirribonucleico

**DP** – Desvio Padrão  
**EC-FIL** – Eletroforese Capilar com Fluorescência Induzida por Laser  
**EFES** - Espectroscopia de Fluorescência com Efeito Shpolskii  
**EFS** – Espectroscopia de Fluorescência Sincronizada  
**EFVR** - Espectroscopia de Fluorescência com Varredura Rápida  
**ELISA** – Ensaio Imunoenzimático  
**EM** – Espectrometria de Massas  
**FAO** – Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentos  
**FDA** – Organização Americana para Administração de Alimentos e Drogas  
**FE** – Fase Estacionária  
**FEQL** – Fase Estacionária Quimicamente Ligada  
**FLC** – Florescência Molecular  
**FLN** – Fluoreno  
**FLT** – Fluoranteno  
**FM** – Fase Móvel  
**FR** – Fase Reversa  
**GL** – Grau de liberdade  
**Hg** – Mercúrio  
**HPAs** – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos  
**HPLC** – Cromatografia Líquida de Alta Performance  
**IARC** – Agência Internacional para a Pesquisa do Câncer  
**IcP** – Indeno[1,2,3-cd]pireno  
**INMETRO** – Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia  
**ISO** – International Standard Organization  
**JECFA** – Comitê Conjunto de Especialistas em Aditivos alimentares da FAO  
**LOD** – Limite de Detecção  
**LOQ** – Limite de Quantificação  
**MAE** – Extração Assistida por Microondas  
**MCL** – Nível de Contaminação Máxima  
**MECC** – Cromatografia Eletrocinética Micelar  
**NAP** – Naftaleno  
**OMS** – Organização Mundial de Saúde  
**PAHQ** – Aduto Hidrocarboneto Policíclico Aromático-Quinona  
**Pb** – Chumbo  
**PbS** – Sulfeto de Chumbo  
**PCBs** – Bifenilas Policloradas  
**PFE** – Extração por Fluido Pressurizado  
**PHN** – Fenantreno  
**POPs** – Poluentes Orgânicos Persistentes  
**PPS** – 3'-fosfoadenosina-5'-fosfosulfatase  
**PTFE** – Politetrafluoretileno  
**PYR** – Pireno  
**QM** – Média da Soma Quadrática  
**Rs** – Resolução Cromatográfica  
**RSM** – Metodologia da Superfície de Resposta  
**SFE** – Extração por Fluido Supercrítico  
**SPE** – Extração em Fase Sólida  
**SPME** – Microextração em Fase Sólida  
**SQ** – Soma dos Quadrados

**TEF** – Fator de Toxicidade Equivalente  
**UAE** – Extração Assistida por Ultrassom  
**USEPA** – Agência de Proteção Ambiental Americana  
**UV** – Ultravioleta  
**WHO** – Organização Mundial da Saúde

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Estruturas de alguns POPs; (a) aldrin, (b) endrin, (c) 4,6,5'triclorobifenila, (d)teraclorodioxina, (e) tetraclorofurano e (f) DDT. 6
- Figura 2:** Estruturas de algumas AHAs. Aminas pirolíticas:(a) Norharman, (b) Harman. Aminas téticas: (c) 2-amino-3-metilimidazo-[4,5-f]quinolina (IQ), (d) 2-amino-3,4-metilimidazo-[4,5-f]quinolina (MeIQ). 7
- Figura 3:** Estruturas dos 16 HPAs prioritários segundo orientações da Agência de Proteção Ambiental Americana USEPA) 9
- Figura 4:** Alguns dos mecanismos de formação de adutos entre HPAs e DNA. (a) Formação de diolepóxido; (b) Formação através de cátion-radical; (c) Formação através de quinonas; (d) Formação por oxidação benzílica 12
- Figura 5:** Metabolismo de Benzo(a)pireno em mamíferos. 15
- Figura 6:** Imagens de um agitador rotativo orbital (a) e um agitador magnético (b) 16
- Figura 7:** Imagem de um aparelho extrator Soxleht. 17
- Figura 8:** Imagens de um aparelho de ultrassom com sonda (a) e um aparelho de ultrassom por imersão (b) 18
- Figura 9:** Imagens de um aparelho de extração acelerada por solvente (ASE) 19
- Figura 10:** Diagrama de fases de uma substância pura 19
- Figura 11:** Imagens de um aparelho de extração por (SFE) preparativo. 20
- Figura 12:** Imagem de um aparelho de microondas para MAE. 21
- Figura 13:** Imagem de cartuchos para SPE (a) e suporte para múltiplos cartuchos SPE para ser utilizado por aspiração a pressão reduzida (b). 22
- Figura 14:** Esquema da microextração em fase sólida (SPME). 22
- Figura 15:** Planejamento  $2^2$  (2 níveis e 2 fatores) com ponto central. 32
- Figura 16:** Metodologia da superfície de resposta (RSM) e a o esquema representativo do caminho de máxima inclinação (CALADO & MONTGOMERY, 2003). 33
- Figura 17:** Superfície de Resposta de Primeira Ordem e o Caminho da Inclinação Ascendente (NETO, SCARMÍNIO & BRUNS, 2010). 33
- Figura 18:** Planejamentos compostos centrais: (a)  $2^2$  (2 níveis e 2 fatores) (b)  $2^3$  (2 níveis e 3 fatores). (●) planejamento fatorial, (■) pontos axiais e (O) ponto central. 37

- Figura 19:** Coluna cromatográfica YMC C<sub>30</sub> Carotenoid, 4,6x250mm (diâmetro x comprimento) e diâmetro de partícula de 3µm - YMC<sup>®</sup> (A). Coluna cromatográfica BDS HYPERSIL C<sub>18</sub>, 4,6x100mm (diâmetro x comprimento) e diâmetro de partícula de 2,4µm - THERMO FISHER SCIENTIFIC<sup>®</sup> (B). 46
- Figura 20:** Sistema cromatográfico constituído de : (a) Módulo de separação modelo Alliance e2695. (b) Detector com arranjo de diodos modelo 2998. (c) Detector de fluorescência de comprimento de onda variável modelo 2475. 47
- Figura 21:** Deslocamento em gradiente ascendente realizado na superfície de reposta. 51
- Figura 22:** Fluxograma resumido para análise de HPAs 52
- Figura 23:** Percentuais de títulos publicados possuindo como foco central o estudo de HPAs em alimentos, meio ambiente e água. 56
- Figura 24:** Percentuais de títulos publicados possuindo como foco central o estudo de HPAs em tipos diversos de alimentos. 57
- Figura 25:** Percentuais de bibliografias com foco no estudo de HPAs em tipos diversos de pescado. 57
- Figura 26:** Percentuais de títulos publicados possuindo como foco central o estudo de HPAs em alimentos, meio ambiente e água, no Brasil. 58
- Figura 27:** Percentuais de bibliografias com foco no estudo de HPAs em tipos diversos alimentos, no Brasil. 59
- Figura 28:** Dados percentuais da produção de pescado para os 20 países maiores produtores. FONTE: BRASIL, (2012). 59
- Figura 29:** Dados percentuais da produção de publicações com cerne na contaminação de HPAs em amostras de pescado para os países maiores produtores. 60
- Figura 30:** Cromatograma obtido por CLAE-FLR para os 16 padrões de HPAs utilizando a coluna cromatográfica Hypersil C18 (100 x 4,6 mm; 2,4 µm). 61
- Figura 31:** Diagrama de Pareto dos efeitos padronizados para a variável de resposta Rs[BaA-CHY]. 62
- Figura 32:** Gráfico dos valores previstos *versus* valores observados para a variável de resposta Rs[BaA-CHY]. 63
- Figura 33:** Gráfico das curvas de contorno em função do fluxo de fase móvel e da temperatura da coluna para a variável de resposta Rs[BaA-CHY]. 64
- Figura 34:** Diagrama de Pareto dos efeitos padronizados para a variável de resposta Rs[BgP-ICP]. 65

- Figura 35:** Gráfico dos valores previstos *versus* valores observados para a variável de resposta Rs[BgP-ICP]. 66
- Figura 36:** Gráfico das curvas de contorno em função do fluxo de fase móvel e da temperatura da coluna para a variável de resposta Rs[BgP-ICP]. 67
- Figura 37:** Gráficos das funções de desajustabilidade para as variáveis de resposta R<sub>s</sub>BaA-CHY e Rs[BGP-ICP]. 68
- Figura 38:** Cromatograma final obtido por CLAE-UV para os 16 padrões de HPAs utilizando a coluna cromatográfica Hypersil C<sub>18</sub> (100 x 4,6 mm; 2,4 μm). 69
- Figura 39:** Cromatograma obtido por CLAE-UV para os 16 padrões de HPAs utilizando a coluna cromatográfica YMC C<sub>30</sub> (250 x 4,6 mm; 3,0 μm). 69
- Figura 40:** Cromatograma final obtido por CLAE-UV para os 16 padrões de HPAs utilizando a coluna cromatográfica YMC C<sub>30</sub> (250 x 4,6 mm; 3,0 μm). 70
- Figura 41:** Cromatograma obtido por CLAE-UV-FLC para os padrões de HPAs utilizando a coluna cromatográfica YMC C<sub>30</sub> (250 x 4,6 mm; 3,0 μm). 71
- Figura 42:** Cromatograma obtido por CLAE-UV-FLC para a construção das curvas analíticas dos padrões de HPAs por padronização externa, nas concentrações de: (a) 0,50 μg/kg, (b) 1,00 μg/kg, 5,00 μg/kg, 10,00 μg/kg, 15,00 μg/kg e 20,00 μg/kg. 72
- Figura 43:** Cromatograma obtido por CLAE-UV-FLC (coluna cromatográfica YMC C<sub>30</sub>, 250 x 4,6 mm; 3,0 μm). (A) padrões 15 μg/Kg e (B) amostras (mexilhão). 74
- Figura 44:** Cromatograma obtido por CLAE-UV-FLC (coluna cromatográfica YMC C<sub>30</sub>, 250 x 4,6 mm; 3,0 μm). (A) padrões 15 μg/Kg e (B) amostras desalmão defumado. 76

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Algumas fontes antropogênicas e seus principais tipos de emissão de HPAs	8
<b>Tabela 2:</b> Classificação IARC (2006) para a carcinogenicidade dos HPAs prioritários.	13
<b>Tabela 3:</b> Algumas aplicações da FLC como técnica analítica na análise de HPAs em amostras biológicas e de alimentos	24
<b>Tabela 4:</b> Algumas aplicações das técnicas analíticas de imunensaio e radioensaio na análise de HPAs em amostras biológicas e de alimentos.	25
<b>Tabela 5:</b> Algumas aplicações das técnicas analíticas de CG-DIC e CG-EM na análise de HPAs em amostras biológicas e de alimentos.	36
<b>Tabela 6:</b> Algumas aplicações da função Desejabilidade em métodos analíticos	42
<b>Tabela 7:</b> Limites Máximos de Contaminantes para água potável	43
<b>Tabela 8:</b> Limites máximos de contaminantes (MCL) para BaP e a soma de 4 HPAs (BaA, CH, BbF e BaP) em alimentos segundo a Regulação 835/2011 da Comunidade Européia.	49
<b>Tabela 9:</b> Condições cromatográficas iniciais para os experimento de otimização multivariada utilizando o DCCR	50
<b>Tabela 10:</b> Matriz de experimentos codificados utilizada nos planejamentos experimentais multivariados.	50
<b>Tabela 11:</b> Valores reais dos fatores usados no primeiro DCCR e seus respectivos níveis codificados	51
<b>Tabela 12:</b> Condições cromatográficas iniciais para o experimento de otimização univariada com a coluna C <sub>30</sub> .	52
<b>Tabela 13:</b> Programação do fluxo em gradiente concentração de solventes para a fase móvel utilizada na análise por CLAE-UV-FLC	54
<b>Tabela 14:</b> Programação dos comprimentos de onda de excitação ( $\lambda_{ex}$ ) e emissão ( $\lambda_{em}$ ) usados no detector de FLC.	54
<b>Tabela 15:</b> Matriz de experimentos codificados para o primeiro DCCR e os respectivos resultados par a resolução cromatográfica dos pares de isômeros BaA-CHY e BgP-ICP.	61
<b>Tabela 16:</b> Coeficientes de regressão para a variável de resposta Rs[BaA-CHY].	62
<b>Tabela 17:</b> ANOVA para a variável de resposta Rs[BaA-CHY].	63



<b>Tabela 18:</b> Coeficientes de regressão para a variável de resposta Rs[BgP-ICP].	65
<b>Tabela 19:</b> ANOVA para a variável de resposta Rs[BgP-ICP].	66
<b>Tabela 20:</b> Resultados dos cálculos de confiabilidade das as curvas analíticas para a quantificação dos HPAs por padronização externa.	73
<b>Tabela 21:</b> Concentrações de HPAs em amostras de mexilhões processados e congelados comercializados em supermercados do Rio de Janeiro.	75
<b>Tabela 22:</b> Concentrações de HPAs em amostras de mexilhões processados e congelados comercializados em supermercados do Rio de Janeiro.	75
<b>Tabela 23:</b> Concentrações de HPAs em amostras de salmão defumado, congelados, comercializados em supermercados do Rio de Janeiro.	77
<b>Tabela 24:</b> concentrações de HPAs em amostras de salmão defumado, congelados, comercializados em supermercados do Rio de Janeiro.	77

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b>	<b>3</b>
2.1	Contaminantes Químicos em Alimentos	3
2.1.1	Contaminação de alimentos por metais pesados	3
2.1.2	Contaminação de alimentos por poluentes orgânicos persistentes (POPs)	5
2.2	Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs)	7
2.2.1	Propriedades dos HPAs	10
2.2.2	Benzo(a)pireno (BaP)	14
2.3	Técnicas de Preparo das Amostras Utilizadas para Análise de HPAs	16
2.3.1	Extração por solvente com agitação mecânica	16
2.3.2	Extração por solvente em aparelho soxhlet	16
2.3.3	Extração por solvente assistida por ultrassom (UAE)	17
2.3.4	Extração acelerada por solvente (ASE) ou extração por fluido pressurizado (PFE)	18
2.3.5	Fluid Supercritical Extraction” (SFE)	19
2.3.6	Extração por solvente assistida por microondas (MAE)	20
2.3.7	Extração em fase sólida (SPE)	21
2.3.8	Microextração em fase sólida (SPME)	22
2.4	Técnicas Analíticas Utilizadas no Estudo de HPAs	23
2.4.1	Espectroscopia de Fluorescência Molecular	23
2.4.2	Imunoensaios e radioimunoensaios	25
2.4.3	Cromatografia gasosa	25
2.4.4	Cromatografia líquida de alta eficiência	26
2.5	Métodos Estatísticos Multivariados	28
2.5.1	Métodos quimiométricos	29
2.5.2	Planejamento e análise de experimentos	29
2.5.3	Experimentos para triagem	30
2.5.3.1	Planejamentos fatoriais completos	30
2.5.3.2	Planejamentos fatoriais fracionários	30
2.5.4	Planejamentos fatoriais com ponto central	31
2.5.5	Método do Gradiente de Inclinação Ascendente ou Descendente	32
2.5.6	Função Desejabilidade	34
2.5.7	Metodologia de superfície de resposta (RSM)	35
2.5.8	Delineamento composto central rotacional (DCCR)	36
2.5.9	Otimização de sistemas cromatográficos	37
2.6	Validação e confiabilidade para metodologias analíticas	38
2.6.1	Seletividade	39
2.6.2	Linearidade	39
2.6.3	Faixa linear de trabalho	40
2.6.4	Precisão	40
2.6.5	Limite de detecção (LOD)	40
2.6.6	Limite de quantificação (LOQ)	41
2.6.7	Ensaio de recuperação	41
2.6.8	Robustez	42
2.7	Legislações de controle para HPAs	42

<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	45
3.1	Material	45
3.2	Métodos	47
3.2.1	Tipos de Pesquisa	47
3.2.1.1	Pesquisa Bibliográfica	48
3.2.1.2	Pesquisa Laboratorial	48
3.3	Preparo das Soluções-padrão de HPAs	48
3.4	Otimização Multivariada Da Separação Cromatográfica dos HPAs	49
3.5	Otimização Univariada Da Separação Cromatográfica dos HPAs	51
3.6	Análise de HPAs nas Amostras de Pescado	52
3.6.1	Aquisição das amostras de pescado	53
3.6.2	Liofilização das amostras de pescado	53
3.6.3	Extração de HPAs	53
3.6.4	Análise cromatográfica de HPAs por CLAE-UV-FLC	53
3.7	Preparo das Curvas Analíticas para a Quantificação dos HPAs	54
3.8	Determinação da Confiabilidade Analítica	54
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	56
4.1	Pesquisa Bibliográfica	56
4.2	Pesquisa laboratorial	60
4.2.1	Otimização multivariada da separação cromatográfica dos isômeros de HPAs	60
4.2.2	Otimização univariada da separação cromatográfica dos HPAs	69
4.2.3	Curvas analíticas dos padrões de HPAs	71
4.2.4	Análise cromatográfica de HPAs nas amostras de pescado	73
4.2.4.1	Amostras de mexilhão	73
4.2.4.2	Amostras de salmão defumado	75
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	78
<b>6</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	79
	<b>ANEXOS</b>	90
	ANEXO A	91
	ANEXO B	99

# 1 INTRODUÇÃO

Devido à crescente busca por uma melhor qualidade de vida e à conscientização dos consumidores quanto ao direito de adquirir produtos seguros à saúde, a segurança alimentar vem sendo um tema de discussão cada vez mais relevante, pois a presença de contaminantes em alimentos constitui risco à saúde humana. Contaminantes de alimentos são substâncias que podem ou não ser adicionadas intencionalmente aos gêneros alimentícios e estar presentes em alimentos como resíduo de sua forma de produção, de seu acondicionamento, de sua forma de transporte, de sua armazenagem, ou ainda, ser resultado de contaminação pelo próprio meio ambiente.

Contaminantes podem ser classificados como contaminantes microbiológicos: vírus, fungos, bactérias, protozoários ou parasitas; contaminantes químicos: metais pesados e poluentes orgânicos persistentes (POPs), como os agrotóxicos, os pesticidas e os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs). Assim, para reduzir ao mínimo o impacto negativo dos contaminantes sobre os gêneros alimentícios e sobre a saúde humana, é fundamental que sejam disponibilizados para o mercado produtor orientações e procedimentos para a produção de alimentos seguros. Ainda, intensificar a fiscalização e o controle de qualidade da produção de gêneros alimentícios, contribuindo para aumentar a sua garantia de qualidade, expandir o consumo por meio da confiança do consumidor e ampliar a participação comercial no mercado externo. Estas medidas também contribuirão para a superação das barreiras não tarifárias impostas por países importadores, baseadas em normas sanitárias e fitossanitárias, regulamentos técnicos ou de conformidade que são usadas como barreiras comerciais e protecionistas.

Desde o final do século XX, a constatação da presença de contaminantes no meio ambiente e seus efeitos nocivos sobre os organismos que nele vivem têm motivado o interesse de cientistas e pesquisadores pelo assunto, uma vez que a incorporação dessas substâncias pode ocorrer nos diversos níveis da cadeia alimentar, sendo absorvidas inclusive por seres humanos através do consumo de alimentos de origem animal ou vegetal, contaminados através do solo, do ar ou da água. Esse fenômeno vem sendo largamente observado em pescado devido à sua contaminação por xenobióticos, como os HPAs, presentes em ambientes marinhos e de água doce ou incorporados ao produto final após o processo de fumagem.

Os HPAs são compostos orgânicos apolares, tóxicos, formados por arranjos de dois ou mais anéis benzênicos agrupados de forma linear ou angular. Apresentam potencial carcinogênico, citotóxico e mutagênico. Podem ser encontrados em uma variedade de alimentos e bebidas e gerados por fontes antropogênicas e naturais. Os HPAs já foram descritos como contaminantes em vários tipos de alimentos como carnes preparadas em braseiros, carnes defumadas, óleos e gorduras, vegetais e frutas secas e cereais e ainda em diversas formas de pescado e frutos do mar. Sua ingestão e acumulação podem afetar a integridade do material genético celular, originando mutação e promovendo o crescimento de tumores. Em vista do exposto, disponibilizar para o mercado interno orientações e procedimentos para a produção de alimentos seguros, facilitará a fiscalização e o controle de qualidade dos alimentos, além de contribuir para a expansão do consumo por meio da confiança do consumidor.

Assim, o presente trabalho tem como objetivo geral:

Analizar Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) em amostras de mexilhão e salmão defumado, importados do Chile e vendidos comercialmente em supermercados da Cidade do

Rio de Janeiro, utilizando a técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detecção por Ultravioleta e Fluorescência (CLAE-UV-FLC).

Os objetivos específicos deste trabalho são:

Verificar a presença de 16 HPAs considerados prioritários por órgãos de controle sanitário nacionais e internacionais, nas amostras de pescado;

Verificar a presença de benzo(a)pireno nas amostras de pescado;

Otimizar a separação cromatográfica destes 16 HPAs utilizando as ferramentas quimiométricas para planejamento experimental;

Diminuir o tempo de separação cromatográfica das amostras de pescado, aumentando a eficiência do método analítico, diminuindo a utilização de solventes e o custo deste tipo de análise;

Quantificar benzo(a)pireno e os demais HPAs identificados nas amostras de pescado estudadas, comparando estes resultados com os valores de referência descritos na Regulamentação 835/2011 da Comunidade Européia.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Contaminantes Químicos em Alimentos

Em todo o mundo, autoridades de saúde e consumidores preocupam-se com a exposição a contaminantes químicos em alimentos, como os metais pesados: mercúrio (Hg), cádmio (Cd), chumbo (Pb) e arsênico (As); como os poluentes orgânicos persistentes (POPs): como os pesticidas - dicloro-difenil-tricloroetano (DDT), aldrin, dieldrin, endrin, clordano, heptacloro, hexaclorobenzeno, mirex e toxapheno; as bifenilas policloradas (PCBs), as dioxinas e furanos; e os HPAs. Esses contaminantes têm a capacidade de serem acumulados na biota, podendo chegar a serem absorvidos por seres humanos através de sua bioacumulação na cadeia alimentar. Estudos realizados pela comunidade científica sobre o grau de exposição dos seres humanos a esses contaminantes permitiram estabelecer níveis de tolerância para a ingestão semanal e níveis máximos para alguns deles, em alguns grupos de alimentos (ISLAM e TANAKA, 2004).

#### 2.1.1 Contaminação de alimentos por metais pesados

Elementos metálicos ocorrem naturalmente no meio ambiente. Entretanto, concentrações superiores deste tipo de contaminação podem ocorrer a partir de uma variedade de fontes antropogênicas. Assim, este tipo de contaminantes pode ser liberado para o meio ambiente através de dois tipos de atividades:

- Atividades naturais: vulcanismo, intemperismo, processos biológicos naturais, processos biogeoquímicos que emitem e pulverizam ar, solo, mares e rios com partículas metálicas;
- Atividades humanas: combustão de combustíveis fósseis (principalmente carvão), geração de energia por termelétricas, mineração de metais, fabricação de cimento, pesticidas, cloro, soda cáustica, disposição de lixo industrial e doméstico em aterros sanitários, uso de fumo do tabaco, fundição e a refinação de metais não-ferrosos, incineração de lixo, fabricação de fertilizantes fosfatados, reciclagem de materiais metálicos, disposição de lixo eletrônico, produção de tintas, soldagem, produção de cerâmica, vidro e cristais.

- **Mercúrio**

O mercúrio ocorre de forma natural e é altamente tóxico para a saúde. Existe nas formas: elementar ou metálico, inorgânico, como cloretos, nitratos ou sulfetos e orgânico, como o metil-mercúrio -  $\text{CH}_3\text{Hg}$  e o dimetil-mercúrio -  $(\text{CH}_3)_2\text{Hg}$ . Todas essas formas possuem diferentes toxicidades e implicações para a saúde humana. O mercúrio metálico é um líquido que, na forma de vapor, pode permanecer por até um ano na atmosfera sendo transportado e depositado globalmente em ambientes aquáticos ou no solo, onde é transformado por bactérias nas suas formas orgânicas mais tóxicas. (CHOWDHURY, MCDONALD e WOOD, 2004).

O mercúrio é principalmente absorvido e acumulado por organismos aquáticos e se liga fortemente às proteínas nos tecidos do animal, podendo ser absorvidos por seres humanos através da cadeia alimentar. A principal fonte de exposição humana ao mercúrio e seus compostos metilados é a ingestão de pescado contaminado. Peixes, moluscos ou crustáceos contaminados são a principal fonte de exposição ao metilmercúrio e o cozimento destes alimentos não eliminam estes contaminantes (WHO, 2007).

A principal fonte de exposição humana ao mercúrio e seus compostos metilados é a ingestão de pescado contaminado. Peixes, moluscos ou crustáceos contaminados são a principal fonte de exposição ao metilmercúrio e ao dimetilmercúrio e o cozimento destes alimentos não eliminam estes contaminantes. Os sintomas da contaminação para a saúde humana refletem o grau de exposição ao Hg, ao CH<sub>3</sub>Hg e ao (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Hg,; atingem o sistema nervoso central e incluem fraqueza muscular generalizada, fadiga, dores de cabeça, irritabilidade, dificuldade de concentração e, em casos mais graves, tremores, convulsões, coma e até mesmo a morte (FDA, 2007).

- **Cádmio**

A exposição humana ocorre, principalmente, a partir do consumo de alimentos contaminados e da inalação ativa ou passiva do metal no ar. Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), o cádmio é acumulado principalmente nos rins e sua meia-vida biológica em seres humanos é de 10 a 35 anos. Esta acumulação pode conduzir à disfunção renal, o que resulta no aumento da excreção de proteínas de baixo peso molecular na urina. A absorção de elevadas concentrações deste metal pode promover perturbações no metabolismo do cálcio levando à formação de calculos renais, ao amolecimento dos ossos e osteoporose. Além disso, a intoxicação crônica por meio da inalação de compostos de cádmio pode ser letal para seres humanos por resultar em pneumonia aguda com edema pulmonar (WHO, 2008).

Existem provas suficientes de que a exposição crônica ao cádmio contribui para o desenvolvimento de câncer de pulmão e ainda há evidências de que este metal também pode causar câncer de rim e de próstata (IARC, 2009).

O cádmio exerce efeitos tóxicos sobre os rins, o sistema esquelético e o sistema respiratório e é classificado como um elemento carcinogênico para seres humanos. Existe naturalmente presente no ambiente em níveis muito baixos, entretanto, o aumento da atividade humana tem contribuído para aumentar as concentrações deste metal tóxico no meio ambiente. O cádmio pode viajar longas distâncias a partir da fonte de emissão por meio de transporte atmosférico e é facilmente incorporado na cadeia alimentar, sendo bioacumulado em muitos organismos, principalmente em moluscos e crustáceos. Baixas concentrações deste contaminante também podem ser encontradas em vegetais, cereais e raízes ricas em amido (WHO, 2010a).

- **Chumbo:**

O chumbo é um metal cinza-azulado encontrado naturalmente em baixas concentrações na crosta terrestre, principalmente como sulfeto de chumbo (PbS). Os dois principais contaminantes contendo chumbo são usadas como aditivos antidetonantes para combustíveis e lubrificantes: o tetraetilchumbo e o tetrametilchumbo. Estas duas substâncias sofrem combustão liberando partículas de chumbo metálico no meio ambiente e são transportadas por correntes atmosféricas por todo mundo (MANAY et al., 2008).

A contaminação de seres humanos por este metal pode ocorrer pela inalação de partículas no ar atmosférico ou pela ingestão de alimentos contaminados. Este contaminante é absorvido principalmente pelos sistemas respiratório e digestório e pode provocar perda de apetite, gosto metálico na boca, constipação, anemia, palidez, mal-estar, fraqueza, insônia, dores de cabeça, irritabilidade, neuropatia periférica em adultos e encefalopatia criança, dores musculares e articulares, tremores, cólicas, hipertensão arterial e problemas renais (RENNER, 2009).

Bebidas, cereais, especiarias e vegetais são alguns exemplos de alimentos que podem possuir concentrações elevadas de chumbo, devido às características de materiais utilizadas em seu processo produtivo ou à contaminação do solo no qual foi cultivado o alimento. Além disso, a intensidade da contaminação pode ser influenciada pelas propriedades de acidez do alimento e por suas características de embalagem (WHO, 2010b).

- **Arsênico**

Compostos de arsênio são usados como desfolhante na agricultura, como fungicida, herbicida, inseticida, e algicida, na indústria madeireira como preservante da madeira, na indústria metalúrgica do cobre, chumbo e ligas de bronze, na indústria eletrônica como semicondutores e na indústria de tintas e pigmentos e anti-incrustantes. A intoxicação aguda por arsênio atinge os sistemas circulatório e digestório e pode provocar perturbações vasculares periféricas, trombose mesentérica, leucemia, vômito, dor abdominal esofágica e diarreia sanguinolenta, enquanto a intoxicação crônica pode levar ao desenvolvimento de câncer de pele, bexiga, pulmões e rins (FRANCESCONI, 2007).

O arsênio é um elemento metalóide que forma vários tipos de compostos venenosos. O arsênio é um componente natural da crosta terrestre e é amplamente distribuído em todos os ecossistemas. As formas mais tóxicas de arsênio para o ser humano são o arsênio inorgânico trivalente ( $As^{3+}$ ) e o arsênio inorgânico pentavalente ( $As^{5+}$ ). Esses contaminantes estão naturalmente presentes em níveis elevados nas águas subterrâneas de uma série de países, incluindo Argentina, Bangladesh, Chile, China, Índia, México e Estados Unidos da América, países nos quais os seres humanos são expostos a concentrações elevadas de arsênio inorgânico através da ingestão direta de água potável contaminada, ou por meio da preparação e irrigação das culturas de alimentos com água contaminada por este metal. Peixes, mariscos, crustáceos, carnes, aves, produtos lácteos e cereais podem ser fontes alimentares de arsênio em sua forma orgânica, tais como seus derivados metilados, arsenobetaína e arsenocolina, entretanto, esses contaminantes possuem grau de toxicidade menor do as formas inorgânicas (WHO, 2009).

### **2.1.2 Contaminação de alimentos por poluentes orgânicos persistentes (POPs)**

POPs são os compostos orgânicos capazes de resistir à degradação química, fotolítica e biológica. Estes compostos têm sido usados em grandes quantidades como inseticidas e produtos químicos para uso industrial, como por exemplo: endrin, aldrin, DDT, PCBs, dioxinas e furanos (Figura 1, p.6). Estes contaminantes podem persistir no meio ambiente por vários anos, sendo bioacumulados e biomagnificados através da cadeia alimentar por fatores de até 70.000 vezes (RITTER et al., 1995).

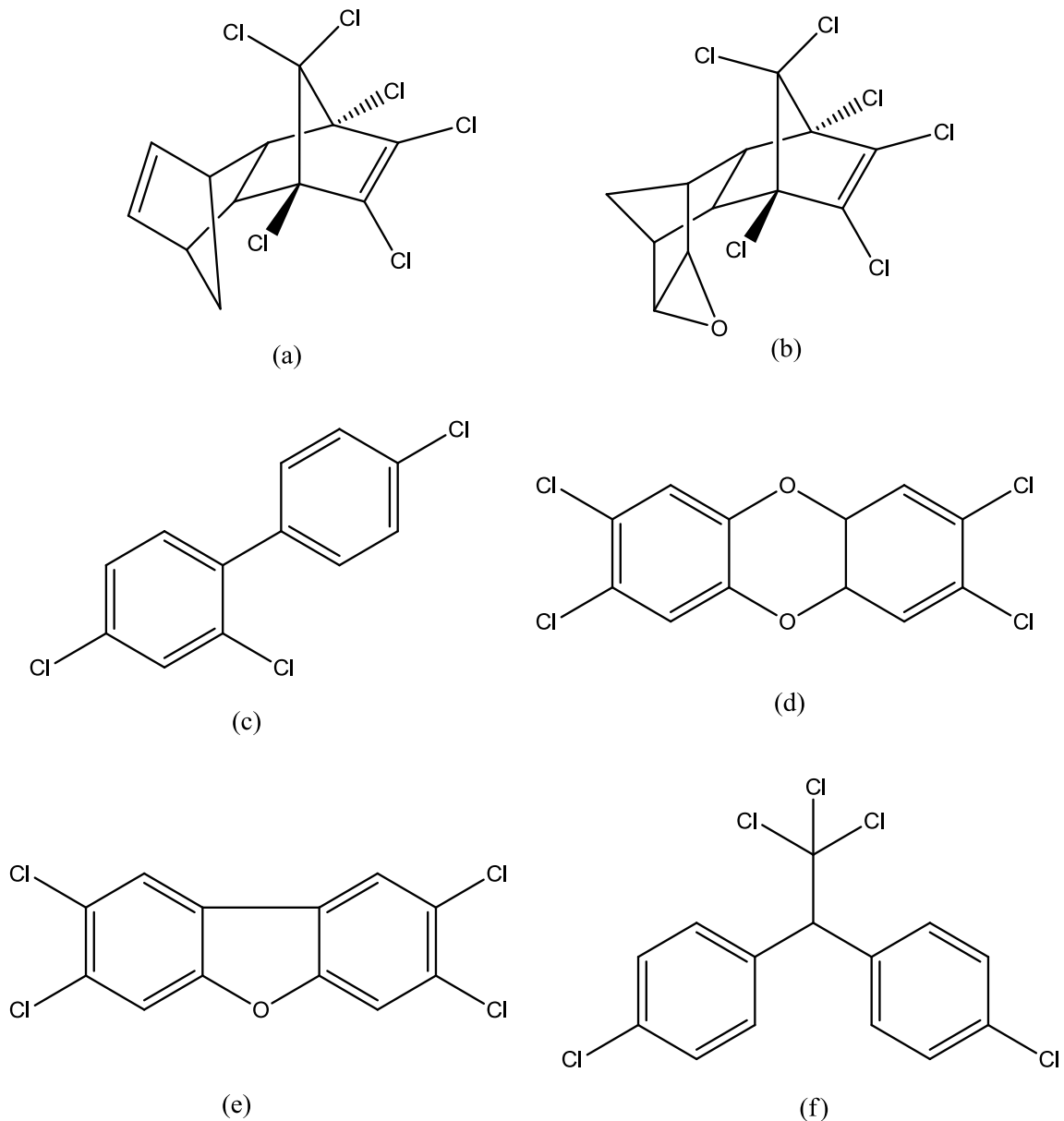
Um grupo de poluentes orgânicos persistentes de grande preocupação é o das aminas heterocíclicas aromáticas (AHAs). Estes contaminantes são geralmente produzidos durante a preparação por cozimento de carnes e pescados, como produtos da pirólise de proteínas ou das reações de Maillard (COSTA et al., 2009).

Dependendo do mecanismo de geração e dos tipos de precursores, as AHAs podem ser classificadas em dois grupos: as carbolinas ou aminas pirolíticas, que são produzidas em temperaturas de cozimento superiores a 300 °C, a partir da pirólise de aminoácidos e proteínas; e os aminoimidazoarenos ou aminas térmicas, as quais são produzidas em temperaturas entre 150 e 250 °C, como resultado de reações radiculares de Maillard

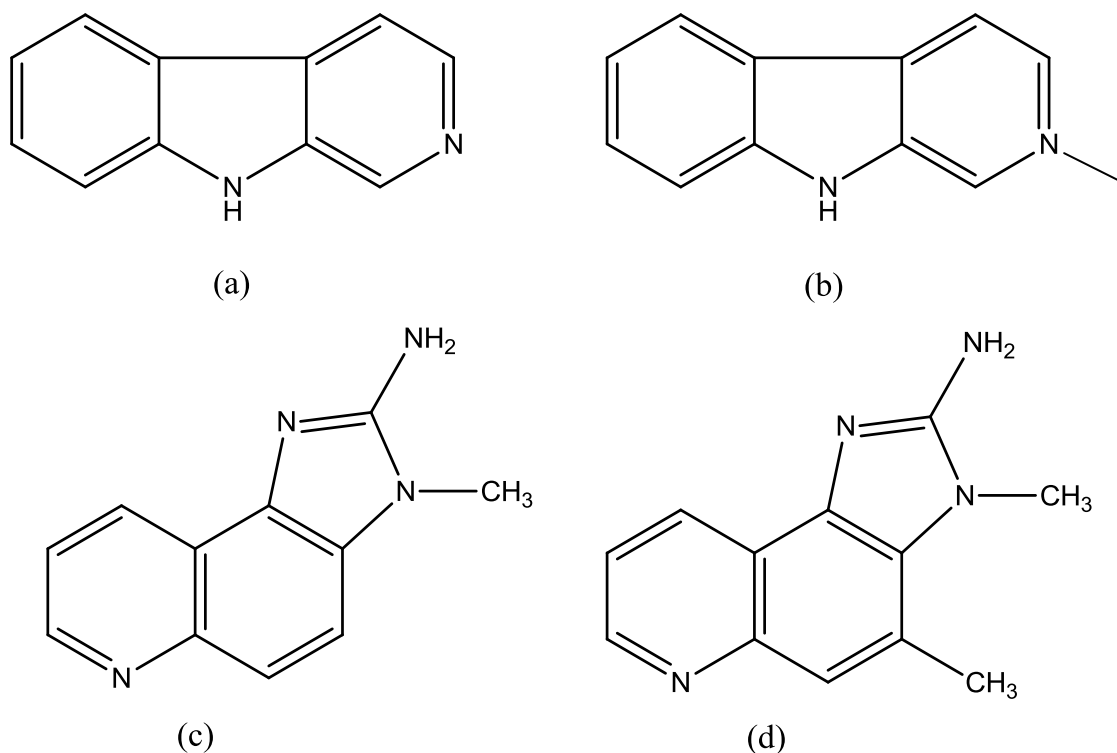


(ALAEJOS et al., 2008). Algumas estruturas deste tipo de substâncias são mostradas na Figura 2, (p.7).

São conhecidas cerca de 23 AHAs que possuem propriedades carcinogênicas e/ou mutagênicas isoladas e identificadas em alimentos cárneos e pescados cozidos e sua formação é dependente de fatores diversos, incluindo o tipo e a quantidade de comida, o tipo de equipamento usado para o cozimento, a temperatura e duração do processo de cozimento, a concentração dos precursores, a quantidade de lipídios, os aminoácidos e a creatinina livre dos alimentos e pH (COSTA et al., 2009 ).



**Figura 1:** Estruturas de alguns POPs; (a) aldrin, (b) endrin, (c) 4,6,5'-triclorobifenila, (d) tetraclorodioxina, (e) tetraclorofurano e (f) DDT.



**Figura 2:** Estruturas de algumas AHAs. Aminas pirolíticas: (a) Norharman, (b) Harman. Aminas télicas: (c) 2-amino-3-metilimidazo-[4,5-*f*]quinolina (IQ), (d) 2-amino-3,4-metilimidazo-[4,5-*f*]quinolina (MelQ).

Além dos compostos descritos anteriormente, há também uma classe de substâncias que possui elevada persistência no meio ambiente, que vem recebendo a atenção por parte do mundo acadêmico e constitui um outro importante grupo de contaminantes químicos para alimentos: os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos - HPAs.

## 2.2 Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos

O sistema de duplas conjugadas existentes nas estruturas de HPAs determinam as propriedades físicas e químicas destes compostos orgânicos. Quando expostos a temperaturas ambientes, todos os HPAs são sólidos e solúveis em água e apresentam, normalmente, elevadas temperaturas de fusão e ebulição e baixa pressão de vapor. Os índices referentes à pressão de vapor e à solubilidade em água diminuem, normalmente, a medida que a massa molecular aumenta (LOPES e ANDRADE, 1996).

A ocorrência de HPAs por pirólise é bastante complexa, diversificada e está relacionada a condições reacionais. Para este tipo de reação, observa-se que o esquema mecanístico reconhecido implica na polimerização por meio de radicais livres, em diversas fases, até a constituição de núcleos aromáticos condensados. A ocorrência de HPAs depende de condicionantes como a biomassa existente, a quantidade de oxigênio disponível, a pressão e, sobretudo, o calor, visto que a concentração de HPAs se propaga de forma linear a temperaturas na faixa de 400 a 1000°C (CONDE et al., 2004).

Há alguns HPAs que se apresentam como semi-voláteis. Outros, por sua vez, podem ser transportados até longas distâncias e absorvidos em material particulado. A grande maioria dos HPAs com dois ou três anéis aromáticos se apresenta na fase de vapor; os que possuem quatro anéis estão em uma fase intermediária do processo. A ocorrência com cinco ou mais

anéis aromáticos ocorre de forma predominante em particulados, como cinzas ou fuligens cujas partículas são inferiores a 2,5µm (CONDE et al., 2004).

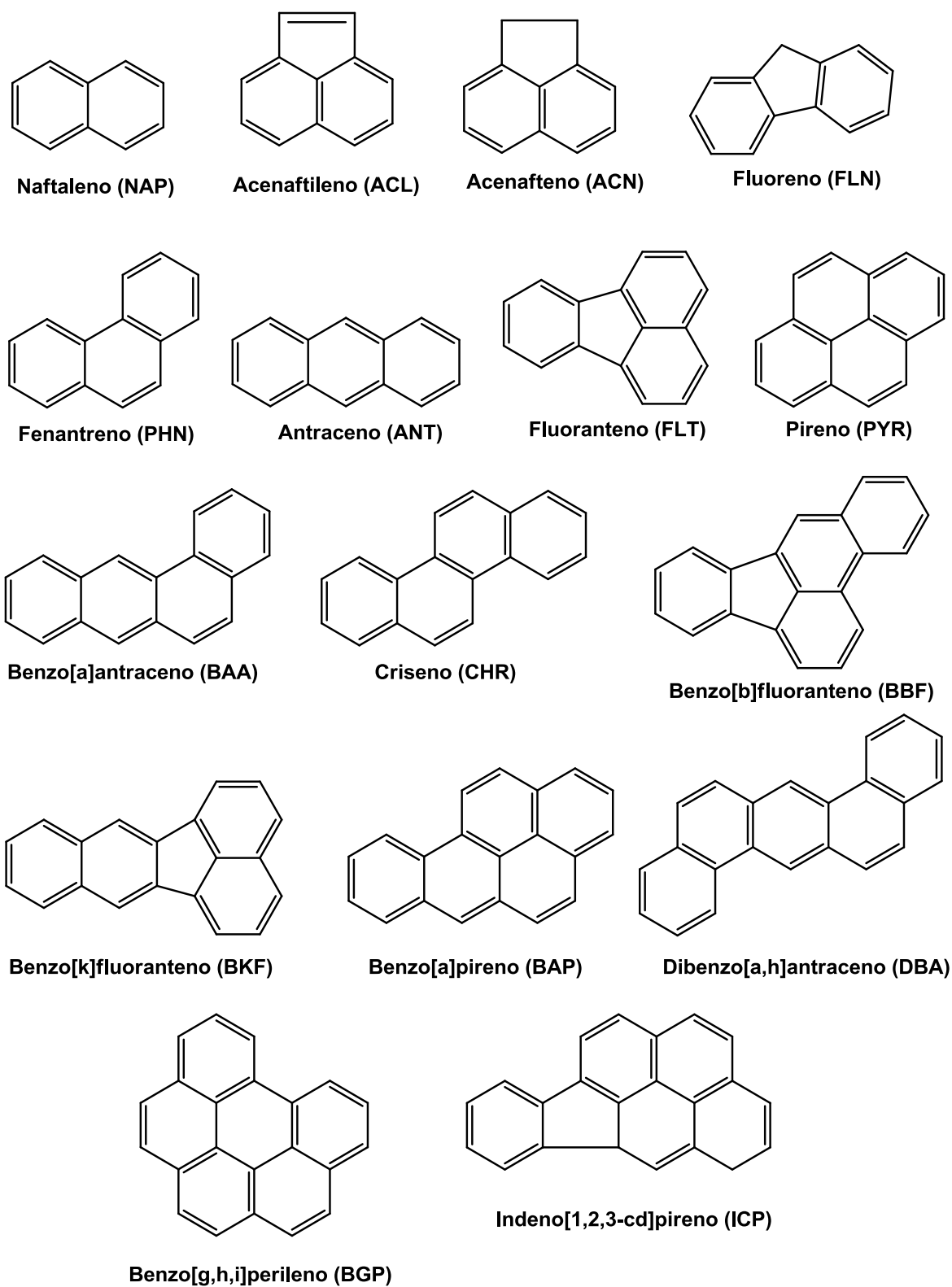
Os Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) constituem um grupo de mais de 100 diferentes substâncias químicas formadas por dois ou mais anéis benzênicos condensados (Figura 3, p.9). Consequência da combustão incompleta de matéria orgânica, os HPAs encontram-se largamente distribuídos em nosso meio ambiente e caracterizam-se pela constituição exclusiva de carbono e hidrogênio, pela sua fluorescência, pelo seu elevado ponto de ebulição e pelo alto grau de solubilidade em solventes orgânicos (STOLYHWO e SIKORSKI, 2005; BARRO et al., 2009).

As principais fontes dessas substâncias são: a queima de combustíveis fósseis pelos processos industriais, pelos veículos automotores, pela produção de energia por usinas termelétricas, pelo uso de incineradores de lixo e pelas emissões domésticas (Tabela 1). Além disso, HPAs podem também ser liberados para o meio ambiente por fontes termais em ambientes marinhos, por atividade vulcânica e por incêndios florestais (PANDEY et al., 2011).

**Tabela 1:** Algumas fontes antropogênicas e seus principais tipos de emissão de HPAs

	Aquecedores Residencial	Veículos a Diesel e Gasolina	Empresas de Fertilizantes	Refinarias de Petróleo	Centrais Termoeletricas a Carvão	Incineração de Lixo	Empresas de Fundição
FLN				X	X		
PHN		X	X	X	X	X	
ANT				X			
FLT		X	X		X		X
PYR	X	X		X		X	
BaA	X		X				X
CHR	X					X	
BbF							X
BeP						X	
BkF							
BaP		X					X
DaA							
PER			X				
BgP							
ICP		X					

**FONTE:** STOLYHWO e SIKORSKI, 2005.



**Figura 3:** Estruturas dos 16 HPAs prioritários segundo orientações da Agência de Proteção Ambiental Americana (“United States Environmental Protection Agency” - USEPA).

### 2.2.1 Propriedades dos HPAs

Na Inglaterra, estudos realizados em 1983, constataram que dentre os grupos de alimentos, o dos óleos, das gorduras e dos cereais apresentaram os maiores índices de contaminantes. Embora o grupo de óleos e de gorduras assinalar o maior índice de HPAs, cabe ressaltar que o grupo de cereais contribui para a ingestão de HPAs, tendo em vista o seu elevado consumo diário (DENNIS et al., 1983).

Na Holanda, por sua vez, estudos na dieta da população constataram a existência de dezessete HPAs nos grupos de alimentos mais relevantes e a ingestão de açúcar e correlatos como uma das maiores fontes de contaminação por HPAs. No açúcar e correlatos foram encontrados um alto índice de crisenone, o correspondente a 36µg/kg. Ainda na Holanda, pesquisadores assinalaram elevados índices de HPAs em mexilhão e em repolho. Segundo estudos, a probabilidade de ingestão diária de contaminantes foi de 1,1 a 22,0µg, por pessoa e por dia, dos quais 30% dessa proporção corresponde aos HPAs com ação carcinogênica (DEVOS et al., 1990).

Na Itália, os maiores responsáveis pela ingestão de HPAs foram os grupos dos cereais, dos produtos lácteos, das carnes, dos vegetais e das frutas. A proporção da ingestão foi de 3,0µg, por pessoa e por dia, com base em todos os HPAs, e de 1,4µg, por pessoa e por dia, com base nos HPAs carcinogênicos (LODOVICI et al., 1995).

No que diz respeito à sua propriedade lipofílica, os HPAs se acumulam, normalmente, em tecidos lipídicos de plantas e animais. Nas plantas, os HPAs se concentram, sobretudo, na superfície de peles e folhas, em detrimento de tecidos internos. Apesar de sua pouca solubilidade em água, os HPAs podem ser deslocados por meios aquáticos, adsorvidos em partículas de suspensão e, por fim, ficar depositados nos sedimentos. Moluscos e crustáceos são bioacumuladores de HPAs por possuírem a habilidade de filtrar água contendo estes contaminantes e a incapacidade de biotransformá-los (PERFETTI et al., 1992).

HPAs podem ser absorvidas por seres humanos através do consumo de alimentos de origem animal ou vegetal, contaminados através do solo, do ar ou da água, ou ainda, pela adoção de técnicas de processamento alimentar como secagem, defumação, tostagem e grelhagem. Desta forma, HPAs já foram descritos como contaminantes em vários tipos de alimentos, como carnes preparadas em braseiros, carnes defumadas, óleos e gorduras, vegetais e frutas secas e cereais e ainda em diversas formas de pescado e frutos do mar (PHILLIPS, 1999).

Para Pino e colaboradores (2000) há contínua presença desses contaminantes no meio ambiente é consequência direta de sua baixa solubilidade em água e de sua associação à matéria orgânica de solos e sedimentos, fonte alimentar para inúmeros organismos ocasionando assim a incorporação dessas substâncias em diversos níveis da cadeia alimentar.

A contaminação de alimentos é fruto da disseminação de HPAs no meio ambiente (ar atmosférico, solo ou água) ou do processo de processamento e de cozimento. As principais fases de processamento são a secagem e a defumação; as de cozimento são aquelas que empregam altas temperaturas, como as atividades de grelhar, de assar e de fritar. Em zonas afastadas de grandes centros urbanos e industriais, os índices de HPAs comprovados em alimentos não processados são proporcionais à contaminação ambiental (NETTO et al., 2000).

Ao longo dos anos, diversos estudos vêm sendo realizados com o intuito de identificar e avaliar os grupos de alimentos mais relevantes para a ingestão humana de HPAs.

Com base em alimentos representativos da dieta de onze regiões do Brasil, em valores médios de consumo per capita de alimentos e em dados analíticos dos índices de HPAs totais e carcinogênicos, pesquisadores estimaram a ingestão diária de HPAs pela população do

país. Em primeiro lugar, o grupo de óleos e de gorduras assinalaram os maiores índices de HPAs, seguido do grupo de açúcares e do grupo de vegetais. O grupo de óleos e de gorduras foi evidenciado como fonte de HPAs em dez regiões do Brasil. Belém foi a única cidade do país a apresentar o grupo das carnes como vetor significativo para a ingestão diária de HPAs (CAMARGO e TOLEDO, 2001, 2002).

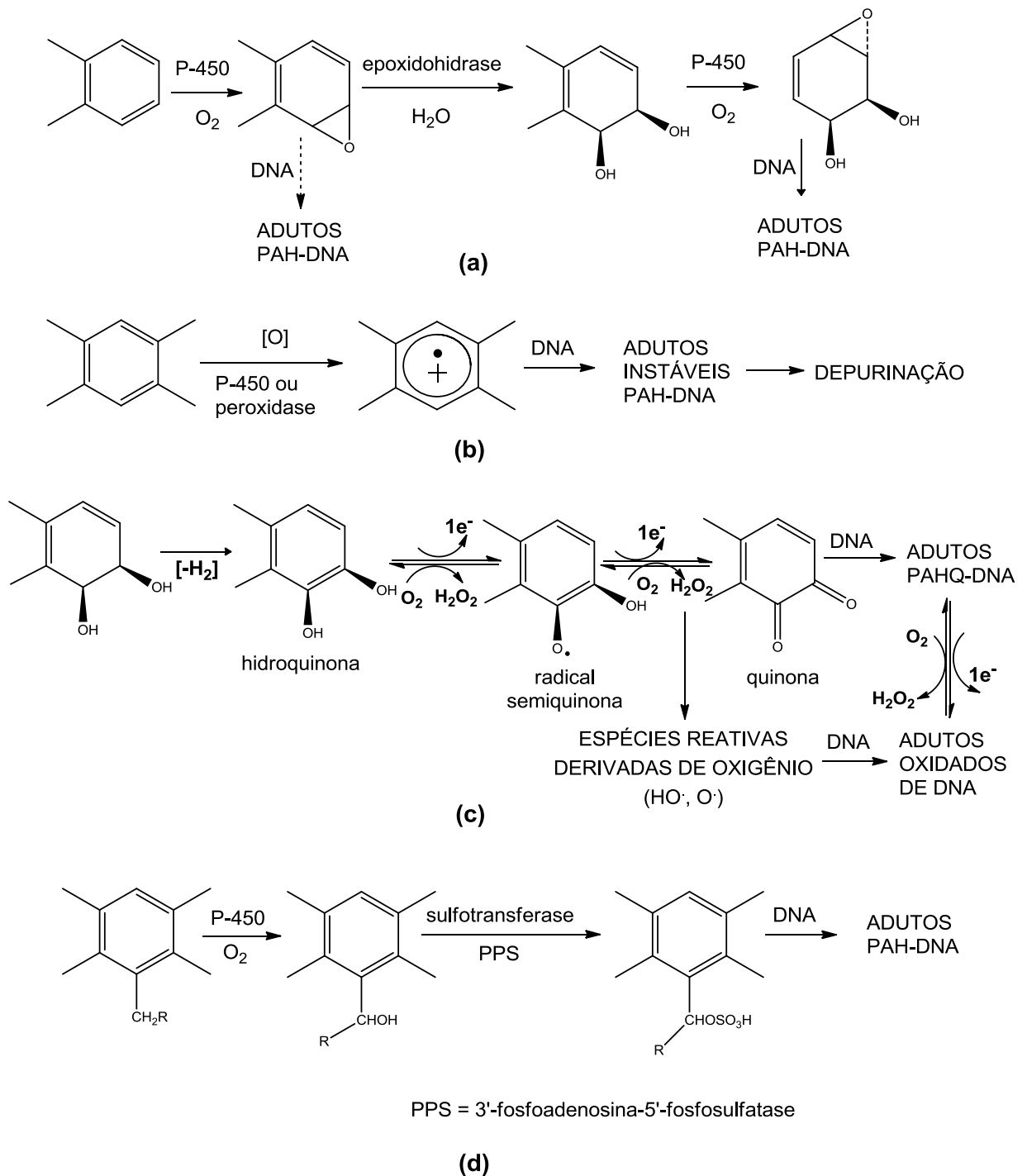
Geralmente, os HPAs podem sofrer, quimicamente, reações de substituição eletrofílica e de adição. Quanto às reações de adição, os compostos originados sofrem, normalmente, reações de eliminação, ocasionando a regeneração de sua aromaticidade (SANTOS e GALCERAN, 2002).

Outros estudos, por sua vez, assinalam a ocorrência de HPAs em diversas categorias de alimentos, como óleos vegetais, margarinas, maionese, produtos defumados, chás, café, leite e produtos lácteos, cereais, frutas, vegetais, carnes, peixes e frutos do mar (FALCO et al., 2003).

Inúmeros países, no âmbito do *Codex Alimentarius*, manifestaram a necessidade de estabelecimento de limites de HPAs em alimentos. O Comitê Conjunto FAO/OMS, em 1991, reavaliou o benzo(a)pireno e determinou a elaboração de procedimentos a serem adotados pelas empresas e pelos consumidores a fim de reduzir a exposição humana a este tipo de contaminante. Em fevereiro de 2005, em Roma, o mesmo Comitê classificou treze HPAs como genotóxicos e carcinogênicos, a saber: benzo(a)antraceno, benzo(b)fluoranteno, benzo(j)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, criseno, dibenzo(a,h)antraceno, dibenzo(a,e)pireno, dibenzo(a,h)pireno, dibenzo(a,i)pireno, dibenzo(a,l)pireno, indeno[1,2,3-cd]pireno e 5-metilcriseno (WHO/JECFA, 2005).

A constatação da presença de HPAs no meio ambiente e seus efeitos nocivos sobre os organismos que nele vivem motivam o interesse da comunidade científica pelo assunto, sobretudo, quanto à comprovação do potencial carcinogênico, mutagênico e citotóxico de alguns componentes desse grupo. Os HPAs fazem parte do grupo de poluentes ambientais cuja atividade cancerígena e mutagênica ocasiona o processo de formação de tumores em animais e de mutação em bactérias (POSTER et al., 2006).

A contaminação humana por HPAs acontece de diferentes formas, como a inalação, a absorção através da pele ou a ingestão de alimentos. A ativação da ação dos HPAs ocorre durante seu processo metabólico, quando são formados compostos hidrossolúveis que facilitam sua excreção. O processo de eliminação está condicionado à formação, primeiramente, de epóxidos e, em seguida, de compostos polihidroxilados, os quais demonstram ser mais solúveis em água, o que facilita sua eliminação pelas vias urinárias. Quando um destes intermediários reage com a guanina do DNA (Figura 4, p.12) e forma um aduto, o processo de tumoração é iniciado (CARUSO e ALABURDA, 2008).



**Figura 4:** Alguns dos mecanismos de formação de adutos entre HPAs e DNA. (a) Formação de diolépóxido; (b) Formação através de cátion-radical; (c) Formação através de quinonas; (d) Formação por oxidação benzílica. **FONTE:** NETTO et al., 2000).

De acordo com a Agência Internacional de Pesquisas sobre o Câncer (“International Agency for Research of Cancer” – IARC), a classificação dos HPAs está condicionada à constatação de carcinogenicidade em humanos e em animais experimentais. A Tabela 2 (p. 13) mostra a classificação IARC de alguns HPAs em função da constatação de carcinogenicidade.

**Tabela 2:** Classificação IARC para a carcinogenicidade dos 16 HPAs prioritários.

<b>HPA</b>	<b>Nº de anéis</b>	<b>Massa molecular (u.m.a.)</b>	<b>Classificação IARC<sup>(1)</sup></b>
NAP	2	128	Grupo 3
ACL	3	152	Grupo 3
ACN	3	154	Grupo 3
FLN	3	166	Grupo 3
PHN	3	178	Grupo 3
ANT	3	178	Grupo 3
FLT	4	202	Grupo 3
PYR	4	202	Grupo 3
BaA	4	228	Grupo 2B
CHY	4	228	Grupo 2B
BbF	5	252	Grupo 2B
BkF	5	252	Grupo 2B
BaP	5	252	Grupo 1
DBA	5	278	Grupo 2A
BgP	6	276	Grupo 3
ICP	6	276	Grupo 2B

(1)

Grupo 1: é cancerígeno para os seres humanos.

Grupo 2A: provavelmente cancerígeno para os seres humanos.

Grupo 2B: possivelmente cancerígeno para os seres humanos.

Grupo 3: não é classificável quanto à sua carcinogenicidade para os seres humanos.

O processamento do alimento é capaz de influenciar na contaminação do produto, visto que os que evidenciam os maiores índices de HPAs são os gêneros alimentícios que foram submetidos a processos de elevadas temperaturas, como secagem, torrefação e defumação. Nos cafés e nos chás, as concentrações de HPAs são, relativamente, inferiores, devido à baixa solubilidade destes contaminantes em água e o fato destes compostos permanecerem nas folhas e partículas do pó. As bebidas alcoólicas apresentam as concentrações mais baixas de HPAs, segundo a hipótese de que a destilação estimula a eliminação destas substâncias (CARUSO e ALABURDA, 2008).

No vasto grupo de HPAs, o benzo(a)pireno constitui o representante mais importante. Devido as suas características físico-químicas e toxicológicas, BaP tem sido um foco de vários tipos de pesquisas em diversas áreas do conhecimento científico a partir de sua descoberta na primeira metade do século XX (STOLYHWO e SIKORSKI, 2005).



### 2.2.2 Benzo(a)pireno

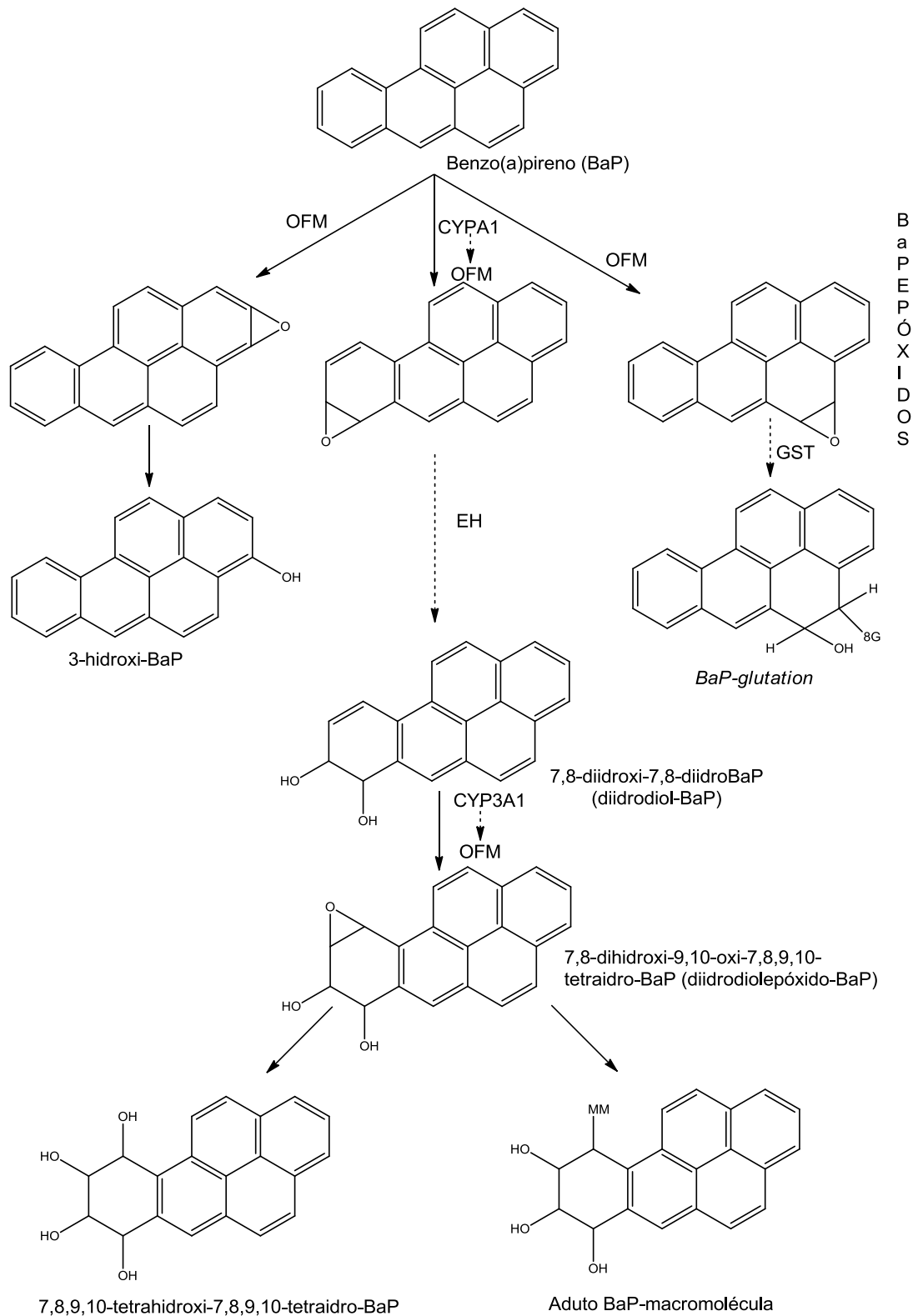
Segundo Souza e Nascimento (2010), o benzo(a)pireno foi isolado a partir do carvão e sintetizado em laboratório, primeiramente em 1931. Do ponto de vista cristalográfico, o BaP é um sólido amarelo, de fórmula molecular  $C_{20}H_{12}$ , constituído por cristais semelhantes a agulhas. O Benzo(a)pireno possui baixa volatilidade e pontos de fusão e de ebulição a pressão de 10mmHg são iguais a 178,1 e 310-312°C, respectivamente. Quando exposto à luz solar ou à radiação fluorescente, o BaP sofre foto-oxidação, reagindo com NO ou NO<sub>2</sub>, acarretando a formação de nitroderivados. Além disso, este contaminante pode ser oxidado por meio da ação do ozônio, o que acarretando a produção de benzo(a)pireno-(1,6 ou 3,6)-quinona.

Assim como os demais HPAs, o BaP é lipossolúvel e apresenta coeficiente de partição octanol/água igual a 6,04 e solubilidade em água de 3,8µg/L, a 25°C. Em sistemas aquosos, o BaP se concentra, normalmente, em sedimentos ou permanece ligado à matéria orgânica em suspensão.

Por ser embriotóxico e teratogênico, o BaP é tido como um dos contaminantes carcinogênicos mais potentes e comuns para mamíferos. Como consequência, vem sendo largamente empregado como indicador da existência dos demais HPAs em amostras ambientais, de alimentos e de bebidas. Após a absorção de HPAs por animais, o BaP é biotransformado no fígado por meio de uma classe enzimática conhecida como citocromo P-450 monooxigenases (Figura 5, p.15).

As reações catalisadas pela citocromo P450-monooxigenase ocorrem nas células hepáticas, precisamente, no compartimento celular composto de uma rede tridimensional de túbulos e cisternas interconectadas. Isso se dá desde a membrana nuclear até a membrana plasmática, ou seja, no retículo endoplasmático. Após as reações de biotransformação, os HPAs hidroxilados são eliminados da célula (NETTO et al., 2000).

A elevada toxicidade do BaP é consequência direta de sua ação pró-carcinogênica, visto que alguns metabólitos intermediários são intercalantes de DNA e, logo, agentes mutagênicos/oncogênicos. Após 6h do tratamento com concentração de BaP de, aproximadamente 250ppb, alguns processos neoplásicos podem ser nitidamente identificados em fígado de peixes e mamíferos (CARUSO & ALABURDA, 2008).



**Figura 5:** Metabolismo de Benzo(a)pireno em mamíferos. **FONTE:** NETTO et al. (2000).

## 2.3 Técnicas de Preparo de Amostras Utilizadas para Análise de HPAs

### 2.3.1 Extração por solvente com agitação mecânica

Este método simples e de baixo custo emprega a ação de agitar ou misturar para extrair os HPAs, em um frasco contendo amostra e solvente, em um agitador rotativo-orbital ou em uma placa agitadora magnética (Figura 6), com um bastão magnético submerso diretamente na mistura. Embora seja uma técnica de fácil manuseio, com o emprego de materiais de vidro comuns em laboratório e um volume mínimo de solvente para extração, este procedimento não tem sido amplamente utilizado devido a sua menor eficiência de extração e sua baixa seletividade para amostras de HPAs, o que acarreta em um aumento excessivo no tempo de agitação (GRAHAM et al., 2006).

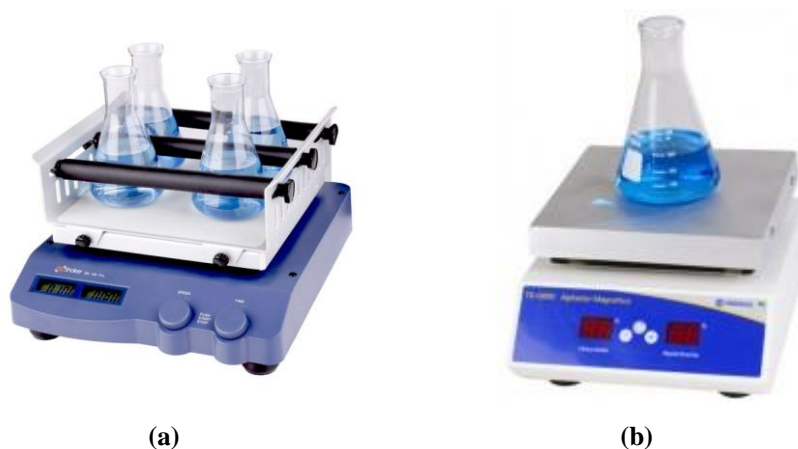
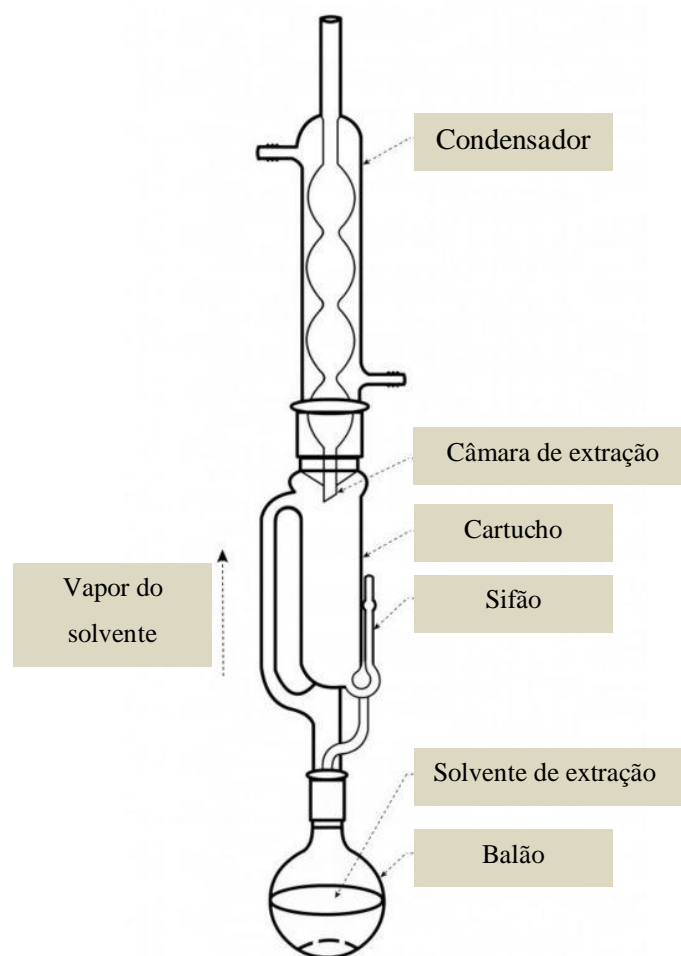


Figura 6: Imagens de um agitador rotativo orbital (a) e um agitador magnético (b).

### 2.3.2 Extração por solvente em aparelho soxhlet

A principal desvantagem deste processo de extração é o uso de grandes volumes de solvente e também é muito trabalhoso e demorado, tendo em vista que o solvente necessita permanecer em refluxo durante horas para alcançar uma eficiência de extração considerável. Além disso, a extração com Soxhlet demonstrou ser relativamente pobre para a seletividade de HPAs em relação a matéria orgânica presente nas amostras, pois estudos tem demonstrado que outros tipos de hidrocarbonetos e também gorduras podem ser co-extraídas com HPAs por meio desta técnica (HAWTHORNE et al., 2000).

Para melhorar ainda mais a eficiência da técnica de extração com Soxhlet, Edward Randall patenteou um método automatizado em 1974. O procedimento combina a fervura e a lavagem do sistema de modo que o tempo total de extração seja reduzido enquanto o solvente evapora e condensa rapidamente para reutilização, reduzindo a quantidade final de solvente necessário para o processo. O cartucho de extração é inicialmente colocado no frasco contendo o solvente, permitindo a extração e a dissolução simultâneas do material de interesse na própria solução extratora. Assim, a quantidade de solvente é reduzida para um nível abaixo do cartucho de extração, de modo que a configuração imita o extrator de Soxhlet tradicional, do qual os HPAs são extraídos por meio de refluxo do solvente condensado. Com esta modificação, a eficiência de extração de HPAs foi aumentada (SPORRING et al., 2005).



**Figura 7:** Imagem de um aparelho extrator Soxhlet.

A extração com Soxhlet é o método preferido por causa de seus resultados comparativos de extração com outros métodos mais modernos utilizados também para a extração de HPAs, tais como: a extração com fluido supercrítico (SFE), a extração assistida por microondas (MAE), a extração acelerada com solvente (ASE) e a extração assistida por ultrassom (EAU) (SMITH, K. E. C., NORTHCOTT, G. I. e JONES, K. C., 2006).

A extração por solvente utilizando Soxhlet (Figura 7) é muito usada como uma técnica de referência na extração de HPAs. Basicamente, a amostra sólida é colocada em um cartucho de extração que, então, sofre extração com um solvente adequado através de ciclos de refluxo. Uma vez em ebulição, o vapor do solvente passa através de um braço de derivação para o condensador, onde condensa e escorre de volta para o cartucho. Quando o solvente atinge o topo do braço do sifão, tanto o solvente como o extrato são desviados para o balão. Assim, o solvente entra novamente em ebulição repetindo o ciclo até que toda a amostra seja completamente extraída (LANÇAS et al., 2009).

### 2.3.3 Extração por solvente assistida por ultrassom (UAE).

O nível de eficiência de extração por ultrassom é altamente dependente da natureza da amostra e da concentração de contaminantes na mesma, sendo menos eficientes para HPAs de baixo peso molecular. Além disso, a exposição das mostras a este tipo de processo de extração

deve ser cuidadosamente controlada a fim de evitar a degradação dos contaminantes e a redução das taxas de extração de HPAs. Ainda, as técnicas de separação tais como centrifugação ou filtração são requeridas após o processo de extração (SUN, LITTLEJOHN e GIBSON, 1998).

A extração assistida por ultrassom (Figura 8) é uma técnica que envolve a energia acústica de ondas de ultrassom com uma frequência mínima de 16 kHz no líquido, causando a compressão rápida e a rarefação do movimento do fluido que resulta no fenômeno de cavitação, ou seja, a formação recorrente e o colapso de microbolhas. Esta agitação pode ser realizada tanto pela imersão de uma sonda de ultrassom diretamente na mistura de solvente e amostra como pela colocação da mistura de solventes e amostra em um frasco, num “banho” de ultrassom por imersão (LAU, GAN e NG, 2010).



**Figura 8:** Imagens de (a) aparelho de ultrassom com sonda e (b) aparelho de ultrassom por imersão.

### 2.3.4 Extração acelerada por solvente (ASE) ou extração por fluido pressurizado (SFE)

A extração acelerada por solvente (ASE) ou extração com fluido pressurizado (SFE) é uma tecnologia relativamente nova que aumenta a temperatura do solvente acima do seu ponto de ebulição mantendo-o na fase líquida pela elevação da pressão. Como resultado, a pressão elevada auxilia na solubilização das bolhas de ar, aumentando a superfície de contato da amostra para a extração pelo solvente, enquanto que o aumento da temperatura eleva a capacidade de solubilização do mesmo. O sistema ASE (Figura 9, p.19) é constituído de várias células de extração sobre um tabuleiro de carga na proximidade de um forno. Durante a extração, o solvente orgânico é bombeado para dentro das células de extração pré-carregados com as amostras, enquanto ocorre o aumento da temperatura e pressão para os valores pretendidos. Atualmente, os sistemas de ASE estão comercialmente disponíveis para extração de compostos orgânicos a partir de uma variedade de amostras sólidas (LIGUORI et al., 2006).

O uso desse sistema pode duplicar a eficiência de extração de HPAs em comparação com o método de extração utilizando Soxhlet, melhorando o índice de recuperação e a precisão no preparo de amostras. Outros benefícios da ASE incluem a redução de consumo de solventes e o tempo total necessária para a extração, pelo uso de altas pressões. O processo de extração pode ser totalmente automatizado e acoplado a sistemas de separação como a extração em fase sólida (SFE) e a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) ou a

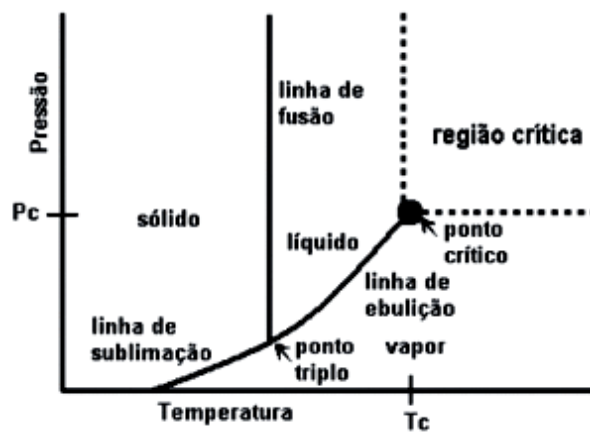
cromatografia gasosa (CG), evitando a perda de HPAs, por meio da diminuição do tempo de preparação da amostra, e a contaminação das mesmas (WANG et al., 2007).



**Figura 9:** Imagens de um aparelho de extração acelerada por solvente (ASE).

### 2.3.5 Extração por fluido supercrítico (SFE)

Fluidos supercríticos apresentam propriedades físicas características tanto de uma fase líquida como de uma fase gasosa (Figura 10.).



**Figura 10:** Diagrama de fases de uma substância pura.

Estudos de comparação entre a SFE e a extração por “Soxhlet” demonstraram que os índices de recuperação de HPAs para ambos os métodos foram muito similares, indicando que ambas as técnicas possuem bom grau de eficiência para o preparo de amostras contendo estes contaminantes. Ainda, embora a técnica de SFE (Figura 11) tenha demonstrado maior dificuldade para sua otimização, mostrou melhor seletividade para a extração de HPAs, diminuindo o percentual de co-extração de outros hidrocarbonetos e também de gorduras, produzindo extratos mais limpos.



**Figura 11:** Imagens de um aparelho de extração por (SFE) preparativo.

Além disso, este sistema permite sua integração direta com a SFE, evitando a necessidade de remoção manual do extrato. Em certos sistemas, os extratos produzidos por SFE podem ser também injetados e analisados diretamente por CG, evitando a contaminação que ocorre durante sua manipulação e também perdas do analito no preparo da amostra (REINER e SUAREZ, 1995).

Suas características físicas, incluindo densidade, viscosidade, difusividade e tensão superficial, facilitam sua penetração e a dissolução de materiais diversos em seus componentes. O dióxido de carbono que possui temperatura e pressão supercrítica de 31°C e 74 bar, respectivamente, é amplamente empregado em sistemas de SFE (ANITESCU e TAVILARIDES, 2006).

### **2.3.6 Extração por solvente assistida por microondas (MAE)**

A MAE é a técnica de extração na qual o sistema de amostra e o solvente são sujeitos ao calor, sendo submetidos a ondas eletromagnéticas de comprimento entre 1m e 1 mm com frequências de 300 MHz a 300 GHz. O aquecimento assistido por radiação de microondas é preferido, em comparação com o aquecimento convencional, pela sua rapidez, pela sua reprodutibilidade e pela menor perda energética, o que aumenta a eficiência de extração. Projetos modernos de fornos de microondas (Figura12, p.21) para uso em laboratório incluem carrosséis que podem conter, pelo menos, oito vasos-reatores de extração, permitindo extrações múltiplas e simultâneas (SHU et al., 2000).



**Figura 12:** Imagem de um aparelho de microondas para EAM.

As principais vantagens do método de MAE são as reduções de tempo e de volume de solvente, possuindo também custo inferior, em comparação com FSE. Além disso, este único mecanismo de aquecimento proporciona interação seletiva com moléculas polares, o que aumenta muito a eficiência de extração de HPAs. A principal desvantagem desta técnica, contudo, é a necessidade de adição de outras operações unitárias durante o preparo da amostra para a remoção da matriz da amostra do extrato final, tais como uma filtração ou uma centrifugação, após a conclusão da extração (WANG et al., 2007).

### 2.3.7 Extração em fase sólida (SPE)

Nesta técnica, a solução contendo o analito de interesse é aplicada no topo do cartucho e eluída através do sólido adsorvente, utilizando uma pequena pressão, com o auxílio de uma seringa, ou pelo uso de aspiração em suporte adequado, utilizando pressão reduzida. Após a fase líquida ser drenada, o analito retido no adsorvente é eluído com um solvente mais seletivo, de polaridade adequada e, finalmente, coletado para análise. A extração em fase sólida pode ser utilizada em diversos modos de operação, dentre os quais: a concentração ou o enriquecimento de amostras, o isolamento do analito (“clean up” e retenção do analito de interesse), o isolamento da matriz (“clean up” do analito de interesse e retenção dos interferentes da matriz), por fim, a estocagem da amostra (NETO e NUNES, 2003).

A extração em fase sólida é uma técnica de preparação de amostras introduzida na década de 70 do último século. Esta técnica de separação baseia-se nos mesmos mecanismos da cromatografia líquida de baixa pressão e, do ponto de vista prático, comporta-se como um sistema cromatográfico de coluna aberta que contém a fase sólida (Figura 13). A coluna é constituída de um cartucho de polipropileno contendo o sólido adsorvente para a extração entre dois discos de polietileno de porosidade igual a 20  $\mu\text{m}$  (LANÇAS et al., 2009).





**Figura 13:** Imagem de: (a) cartuchos para SPE e (b) suporte para múltiplos cartuchos SPE para ser utilizado por aspiração a pressão reduzida.

Por ser uma técnica rápida, versátil e bastante seletiva, a SPE vem sendo utilizada em diferentes matrizes de amostras de alimentos, como: carnes, pescado, cereais e bebidas, além de ser, também, muito usada em matrizes de amostras ambientais, como, água, solo e ar. O uso para a extração de HPAs tem mostrado excelente seletividade e também índices adequados de recuperação para estes contaminantes nestes diferentes tipos de matrizes. Além disso, esta técnica também pode ser utilizado diretamente acoplada às técnicas de ASE e SFE, o que contribui para diminuir o tempo de preparo da amostra para análise, a fim de evitar a perda do analito de interesse, que ocorre normalmente quando o preparo do extrato envolve etapas variadas, ou a contaminação do extrato devido a sua manipulação (LAU, GAN & NG, 2010).

### 2.3.8 Microextração em fase sólida (SPME):

A microextração em fase sólida é uma variação miniaturizada da SPE. Esta técnica é relativamente simples, livre de solventes e baseia-se na adsorção de analitos de interesse por uma fibra de sílica fundida quimicamente modificada com a fase de extração (sólido adsorvente), montado em um dispositivo tipo seringa para proteção e facilidade de manuseio, para posterior desorção térmica conforme demonstrado na Figura 14 (OUYANG e PAWLISZYN, 2006).



**Figura 14:** Esquema da microextração em fase sólida (SPME).

As principais vantagens do SPME são a sua forma de extração relativamente simples e rápida, sem o uso de solventes em pequenas quantidades de amostra, a sua seletividade e a análise de amostras sem qualquer tipo de pré-tratamento; ainda, a SPME pode ser transferida diretamente para a porta de injeção de um cromatógrafo gasoso, como um CG. Além disso, quando armazenado adequadamente em baixas temperaturas, este sistema de extração permite que a amostra extraída seja analisada posteriormente sem perda significativa de voláteis e com bons índices de recuperação (MESTER, STURGEON e PAWLISZYN, 2001).

Os dois principais modos de operação da SPME são a extração direta e a extração por “headspace”. Para a extração direta, o recobrimento com fibra é inserido diretamente na amostra, onde os analitos são transportados para a fase adsorvente. Para acelerar este processo pode ser empregada a agitação mecânica ou a agitação por ultrassom. Na extração por “headspace”, os analitos devem ser transportados através da barreira de ar até atingirem o recobrimento da fibra, protegendo as fibras de possíveis danos, aumentando a seletividade para analitos voláteis e eliminando interferentes com elevado peso molecular ou baixa volatilidade (LANÇAS et al., 2009).

Estudos da aplicação da técnica de SPME na extração de HAPs foram realizados por Ouyang e Pawliszyn (2006) e revelou que apenas compostos voláteis, com baixo peso molecular e estruturas com números de anéis condensados inferior a 4 foram detectados.

## **2.4 Técnicas Analíticas Utilizadas no Estudo de HPAs**

Na literatura encontramos diversas técnicas analíticas usadas para determinar os níveis de HPAs e seus metabólitos. As técnicas mais comumente usadas incluem a fluorescência molecular (FLC), o ensaio imunológico com ELISA (imunoensaio), o ensaio com marcador radiativo (radioimunoensaio), a cromatografia gasosa com detecção por ionização de chama (CG-DIC), a cromatografia gasosa com detecção por espectrometria de massas (CG-EM) e a cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por ultravioleta, por fluorescência ou por espectrometria de massas (CLAE-UV, CLAE-FLC ou CLAE-EM).

### **2.4.1 Espectroscopia de fluorescência molecular**

A fluorescência é o fenômeno no qual a absorção de fótons de luz é o responsável pela excitação de um elétron de valência, num orbital menos energético, para um orbital de maior energia, mantendo a orientação original de seu spin (estado singleto). Se a diferença de energia entre o estado singleto excitado e o estado fundamental é significativa, o retorno do elétron de seu estado excitado singleto para o seu estado fundamental ocorre com a emissão de fótons (fluorescência) e o grupo cromóforo é chamado de fluoróforo (NEVES, 2006).

A espectroscopia de fluorescência molecular ou espectrofluorimetria é uma técnica analítica muito utilizada por sua simplicidade, rapidez da análise, sensibilidade e seletividade. Fundamenta-se na detecção dos fótons emitidos por moléculas excitadas quando estas retornam para o estado fundamental. Esta técnica possui sensibilidade cerca de 100 vezes maior que a espectroscopia UV-VISÍVEL, com limites de detecção em concentrações de ng/mL. Além disso, a espectrofluorimetria possibilita a análise de moléculas que apresentam o fenômeno de fluorescência ou que possam ser convertidas em moléculas fluorescentes através de reações de derivatização (HOLLER, NIEMAN e SKOOG, 2002).

Em função de sua estrutura eletrônica, os HPAs e seus metabólitos apresentam fluorescência molecular. Entretanto, o emprego de espectroscopia de fluorescência molecular convencional demonstra ser limitado pelo alargamento das bandas de emissão, consequência direta da multiplicidade de estados vibracionais e rotacionais das moléculas destas

substâncias. Além disso, a espectrofluorimetria apresenta pouca seletividade e não identifica moléculas semelhantes, como os diversos isômeros de HPAs e seus produtos formados após sua metabolização, demandando uma fase prévia de separação (SELLI et al., 2004).

Para contornar as limitações de aplicação da espectroscopia de fluorescência convencional, outras técnicas de fluorescência vêm sendo utilizadas, como a espectroscopia de fluorescência sincronizada (EFS), a espectroscopia de fluorescência com Efeito Shpolskii (EFES) e a espectroscopia de fluorescência com varredura rápida (EFVR).

A EFS constitui uma técnica na qual uma varredura simultânea dos comprimentos de onda de excitação e de emissão é realizada com uma diferença de comprimento de onda regular, equivalente à diferença energética entre o estado excitado singleto e o estado fundamental. A EFS vem sendo usada para a determinação de adutos de HPAs com macromoléculas, tais como os adutos de benzo[a]pireno (VATSAVAI et al., 2008).

A EFES é uma técnica de fluorescência de alta resolução cujas medidas são realizadas em condições criogênicas utilizando fontes de luz convencionais ou lasers para a excitação eletrônica. Como a estrutura policristalina molecular apresenta orientações bem definidas, um espectro de linhas é originado, tendo em vista que é considerado apenas a diferença de energia entre o estado fundamental e o estado excitado singleto. Esta técnica é empregada na identificação de HPAs em amostras ambientais de diferentes origens e também em amostras biológicas (BORTOLATO et al., 2008).

A EFVR é, igualmente, uma técnica criogênica de alta resolução. Emprega lasers para a excitação das moléculas de interesse. Pode ser utilizada na identificação de diferentes moléculas. A espectroscopia de fluorescência com varredura rápida é usada na identificação de adutos de dibenzo(a,l)pireno e DNA (SPENCER, SINGH e ORREN, 2009).

A Tabela 3 apresenta aplicações dos diversos tipos de técnicas de espectroscopia de fluorescência para a análise de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em amostras biológicas e alimentos.

**Tabela 3:** Algumas aplicações da FLC como técnica analítica na análise de HPAs em amostras biológicas e de alimentos.

Tipo de amostra	Técnica analítica	Referência
Sangue	EFVR	SPENCER, SINGH e ORREN, (2009)
Água para consumo humano	EFES	WILSON & CAMPLIGLIA (2011)
Chá	EFS	LI et al. (2011)
Óleos comestíveis	FLC	ALARCON et al. (2012)
Água para consumo humano	EFS	ZHANG et al. (2012)
Óleos comestíveis	FLC	ALARCON et al. (2013)
Leite	EFS	KNOBEL et al. (2013)

FLC = Espectroscopia de fluorescência molecular convencional; EFS = Espectroscopia de fluorescência molecular sincronizada; EFES = Espectroscopia de fluorescência com Efeito Shpolskii; EFVR = Espectroscopia de fluorescência com varredura rápida

## 2.4.2 Imunoensaios e radioimunoensaios

A determinação de HPAs e de seus produtos de metabolização por meio de imunoensaios vem sendo bastante utilizado pelo fato de sua facilidade de aplicação e a disponibilidade de conjuntos reativos simples fazem com que os imunoensaios sejam uma alternativa de baixo custo e muito viável, quando comparados à outras técnicas utilizadas na análise de HPAs. Diversos imunoensaios podem empregados na identificação de adutos de HPA-DNA por meio da utilização de anticorpos específicos. Os imunoensaios mais utilizados são o ELISA e os radioimunoensaios. (NETTO et al., 2000).

Os anticorpos, no caso do ensaio tipo ELISA, são imobilizados por adsorção em uma fase sólida (tubo plástico, partículas poliméricas ou magnéticas). Esta imobilização ocasiona a separação entre os analitos de interesse e outros componentes da amostra, após reação, por meio de simples lavagem. A amostra apresentando HPAs em uma concentração conhecida de HPA identificado com uma enzima (normalmente peroxidase – HPA-E) é adicionada ao tubo com o anticorpo imobilizado. As moléculas de HPAs livres e as de HPA-E competem pelo anticorpo imobilizado. Após a remoção e lavagem, é adicionado um substrato passivo de reagir com a enzima imobilizada, dando origem a um produto colorido. A cor resultante é medida e correlacionada com a concentração do analito existente. Quanto mais intensa a cor, menor a concentração do analito. A detecção de metabólitos de HPAs na urina é realizado por meio de Ensaio imunoenzimático ELISA em concentrações entre 8,7 e 217 ng/ml (MAISONNETE et.al, 2006).

Para o uso de radioimunoensaios, é empregado um marcador radioativo ou um substrato previamente identificado (normalmente com um lantanídeo), visto que a determinação ocorrerá radioquimicamente. Este tipo de técnica apresenta uma sensibilidade de 1 aduto para  $10^8$  DNA. Contudo reações cruzadas são interferentes e podem conduzir a resultados equivocados. Além disso, a especificidade da técnica está condicionada exclusivamente ao tipo de anticorpo empregado. Radioimunoensaios vêm sendo empregados na identificação de benzo(a)pireno e de seus metabólitos no soro sanguíneo em concentrações entre 15 e 40 ng/ml (CHUNG et al., 2010).

A Tabela 4 mostra a aplicação de imunoensaios e radioimunoensaios para a análise de HPAs e seus metabólitos em amostras biológicas e de alimentos.

**Tabela 4:** Algumas aplicações das técnicas analíticas de imunensaio e radioimunoensaio na análise de HPAs em amostras biológicas e de alimentos.

Tipo de amostra	Técnica analítica	Referência
Urina	ELISA	MAISONNETE et al., (2006)
Carpa defumada Farinha de trigo	FCIA	MEIMARIDOU et al., (2010)
Sangue	Radioimunoensaio	CHUNG et al., (2011)

ELISA= Ensaio imunoenzimático; FCIA = Imunoensaio por citometria de fluxo.

## 2.4.3 Cromatografia gasosa

A cromatografia gasosa (CG) é uma técnica de separação analítica dos componentes de uma mistura volatilizável através de uma fase gasosa móvel sobre uma fase estacionária. Esta fase estacionária pode ser um sólido com grande área superficial ou uma camada delgada

de um líquido não volátil que recobre um suporte inerte, sendo este último tipo, o mais empregado nas aplicações atuais de CG (NETO e NUNES, 2003).

A cromatografia gasosa vem sendo amplamente utilizada para a separação de HPAs desde a década de 1970, sendo inicialmente, muito utilizada a cromatografia gasosa com detecção por ionização de chama (CG-DIC). Com a evolução da tecnologia, a técnica hifenizada com espectrometria de massas (CG-EM) tem sido preferencialmente empregada devido à elevada capacidade de resolução das colunas capilares comercialmente disponíveis, além de uma maior seletividade e uma maior sensibilidade na detecção destes contaminantes (CARUSO e ALABURDA, 2008).

#### **2.4.4 Cromatografia Líquida de alta eficiência**

A Cromatografia que vem do grego “Chroma”, cor e “grafein”, grafia é uma técnica de separação analítica muito difundida e utilizada atualmente, devido sua facilidade, confiabilidade e sua capacidade de separação misturas. Criada pelo botânico russo Mikhail S. Tswett no início do século XX que estudava pigmentos de folhas extraído de plantas, publicando em 1910 um livro no qual descrevia esta técnica de forma detalhada e suas teorias (NETO e NUNES, 2003).

No início da década de 1970, várias modificações foram introduzidas nesta área e o termo simples, cromatografia líquida moderna foi cunhado por Snyder e Kirkland para refletir essas mudanças. De acordo com estes autores, as diferenças entre a cromatografia líquida moderna e os procedimentos antigos, incluem detalhes de equipamentos, materiais, técnica e teoria. Portanto, uma revolução completa na técnica, cujas principais vantagens em relação aos procedimentos clássicos incluem conveniência, precisão, velocidade e a habilidade de efetuar separações de misturas complexas (PACHECO, 2014).

Os equipamentos de alta pressão, com detectores de elevada sensibilidade e pequeno volume morto, foram fundamentais para o desenvolvimento desta técnica, assim como, o ‘software’ e o ‘hardware’ para controle e automação dos sistemas cromatográficos. Além disso, a extensão da teoria de cromatografia gasosa à cromatografia líquida permitiu um rápido avanço na compreensão dos fenômenos envolvidos na separação e, assim, no desenvolvimento de materiais de alto desempenho para a técnica, como por exemplo, a diminuição do tamanho das partículas. O entendimento de como as diferentes variáveis devem ser selecionadas para otimizar a separação foram de grande importância no desenvolvimento da cromatografia líquida (MALDANER, COLLINS e JARDIM, 2010).

A técnica evoluiu, nas últimas décadas, no sentido de otimização de tempo e consumo de solvente, empregando bombas de alto desempenho para bombear a fase móvel. Além disso, diversos detectores vêm sendo empregados para as análises, utilizando de princípios físico-químicos diferentes e as colunas de separação evoluíram em relação as que diferentes para a separação de diversas matrizes (PACHECO, 2014).

Hoje em dia a técnica de cromatografia é muito difundida e utilizada para análises, tanto qualitativas, quanto quantitativas, em diversas áreas tanto na indústria quanto em pesquisa devido à variedade de colunas cromatográficas comercialmente disponíveis, onde o mecanismo de separação envolve os fenômenos de adsorção, partição, troca iônica e exclusão por tamanho. Com as dificuldades práticas relatadas na literatura para as separações por partição foi necessário o desenvolvimento das fases estacionárias quimicamente ligadas. Por convenção, quando a fase estacionária contém grupos apolares, tais como octadecil ( $C_{18}$ ), octil ( $C_8$ ), hexil ( $C_6$ ), o sistema de separação opera por fase reversa (FR). Mais recentemente, foram descritas na literatura as fases reversas  $C_{27}$  e  $C_{30}$ , as quais ainda possuem poucas aplicações práticas (LANÇAS, 2009).

As fases estacionárias (FE) empregadas em cromatografia líquida consistem de uma camada orgânica apolar ligada quimicamente, imobilizada ou apenas sorvida a um suporte cromatográfico. A forma de obtenção dessas camadas apolares e a variedade de óxidos empregados como suportes cromatográficos resultam nos diferentes tipos de FE. O método mais comum e também o mais empregado para a obtenção das FE consiste na introdução de monocamadas orgânicas através de reações com reagentes apropriados, que dá origem às fases estacionárias quimicamente ligadas (FEQL). As FEQL podem ser obtidas por diferentes processos, como esterificação, cloração seguida por reação com reagente de Grignard ou com compostos organo-lítio e organossilanização. Uma forma alternativa de preparo de FE é o método de recobrimento do suporte com polímeros orgânicos, que pode ser realizado de duas maneiras: mistura de um polímero pré-sintetizado de composição química bem definida em solução com o suporte e posterior evaporação do solvente e, polimerização *in situ* de uma solução de monômeros ou oligômeros, iniciada ou propagada na superfície do suporte, geralmente seguida de uma etapa de imobilização. Entretanto, dentre as formas de preparo de FE, as FEQL obtidas pelo processo de organossilanização apresentam melhor reprodutibilidade e também melhor estabilidade hidrolítica e, hoje, dominam o preparo das FE comerciais (BORGES, BOTTOLI e COLLINS, 2010).

Atualmente, a ênfase nas pesquisas e nos desenvolvimentos de novas FE para CLAE-FR está voltada para dois pontos principais:

- Estabilidade;
- seletividade das FE.

Ou seja, o aumento do tempo de vida das FE em condições adversas, principalmente em pH altos, e o desenvolvimento de FE que possuam características específicas para um composto ou para uma classe de compostos, respectivamente, tais como as fases estacionárias desenvolvidas para a separação de HPAs. Associado a esses dois pontos principais está a busca por melhorias na repetibilidade, na simetria de pico e no desenvolvimento de materiais aptos para serem empregados em análises rápidas e em temperaturas mais elevadas (BORGES, BOTTOLI e COLLINS, 2010).

Segundo Maldaner e colaboradores (2010) as características requeridas para que um suporte cromatográfico seja considerado ideal para ser empregado no preparo de FE são:

- as partículas devem ter uma faixa estreita de distribuição de tamanho e alta área superficial;
- os poros devem ter um diâmetro apropriado para o tamanho do analito e boa conectividade para permitir uma alta taxa de transferência de massa;
- resistir térmica, mecânica e quimicamente à degradação;
- possuir uma superfície que seja tanto energeticamente homogênea quanto quimicamente modificável;
- exibir o mínimo de intumescimento, no caso das FE poliméricas ou das FE preparadas por recobrimento polimérico.

Em vista das características citadas, a sílica continua sendo o material cromatográfico mais empregado e também o mais promissor para o desenvolvimento de novas FE. Entretanto, o uso da sílica como suporte cromatográfico “ideal” fica limitado em dois aspectos principais, a estabilidade química e térmica (MALDANER, COLLINS e JARDIM, 2010).

A estabilidade química das FE baseadas em sílica é limitada ao uso de fases móveis (FM) com pH na faixa de 2 a 8. Em pH acima de 8 ocorre a dissolução da sílica e o colapso da FE e, em pH menores que 2, ocorre a hidrólise da ligação siloxano (Si-O-Si-C), ou seja,

ocorre a quebra da ligação entre a fase ligada e o suporte cromatográfico, resultando em uma perda contínua de fase ligada, com subsequente perda de retenção do analito. A estabilidade térmica é limitada ao uso de temperaturas elevadas (acima de 60 °C) associadas ao uso de alta porcentagem de solvente aquoso na composição da FM, uma vez que nestas condições a sílica começa a solubilizar, ocorrendo o eventual colapso do leito cromatográfico, com conseqüente diminuição dos tempos de retenção dos analitos, e o tempo de vida da coluna é reduzido significativamente (BORGES, BOTTOLI e COLLINS, 2010).

Segundo Emenhiser (1995) *apud* Pacheco (2014), a separação de isômeros pode ser conseguida utilizando-se colunas C<sub>18</sub>, no entanto a análise utilizando essas colunas demandam um elevado tempo de análise. Fases poliméricas reversas C<sub>30</sub> foram desenvolvidas e otimizadas para a separação dos carotenóides e seus isômeros, apresentando seletividade para seis carotenóides e seus isômeros, fornecendo retenção adequada para resolução de carotenóides polares.

Pacheco (2014) considerou o fato dos carotenóides serem moléculas maiores que a cadeia das fases estacionárias das colunas C<sub>18</sub>, imaginando que interações mais extensivas deveriam ocorrer com fases estacionárias com cadeias mais longas, aumentando a seletividade das separações cromatográficas.

Desta forma, imaginou-se que as moléculas dos 16 HPAs considerados prioritários, por possuírem cadeias de C<sub>10</sub> a C<sub>22</sub>, não lineares e volumosas, poderiam ter uma melhor resolução de sua separação utilizando colunas C<sub>30</sub> do que as encontradas na literatura com o uso de colunas C<sub>18</sub>, melhorando a seletividade para as separações críticas de alguns pares isoméricos, como os pares benzo(a)antraceno e criseno; e benzo(g,h) oriperileno e indeno (1,2,3-cd) pireno.

## 2.5 Métodos Estatísticos Multivariados

A criação desta nova disciplina ocorreu, principalmente, devido à automação dos laboratórios com o aumento significativo no número de instrumentos analíticos que fornecem dados multivariados, ou seja, métodos que geram mais de uma medida para uma dada amostra. Além disso, outras importantes contribuições foram: a acessibilidade a microcomputadores e a disponibilidade de metodologias e softwares dedicados à realização de cálculos com dados multivariados. A quimiometria é suficientemente estabelecida e seu uso disseminado. Cada vez mais, metodologias quimiométricas estão sendo aperfeiçoadas e/ou desenvolvidas de maneira direcionada para os problemas de origem química (HASEGAWA e OZAKI, 2005).

A análise de dados multivariados tem se tornado, de modo crescente, uma importante área da química e de outras ciências. Isto sugere que a tendência atual do pensamento científico envolve um raciocínio multivariado, principalmente devido ao desenvolvimento tecnológico atingido neste último século (TEÓFILO, 2013).

Historicamente, segundo Massart (1998) *apud* Teófilo (2013), a análise de dados multivariados em química tem utilizado ferramentas desenvolvidas na área de ciências sociais como economia (econometria) e psicologia (psicometria). Apesar de serem interpretadas para objetivos específicos em cada área, a maioria destas ferramentas estão fundamentadas em sofisticados métodos matemáticos, estatísticos, computacionais e de lógica formal. Em química, as análises multivariadas são úteis para:

- (1) Planejar ou selecionar procedimentos experimentais ótimos.
- (2) Extrair o máximo da informação química relevante pela análise dos dados.
- (3) Obter conhecimentos sobre os sistemas químicos estudados.

Com a aplicação destas ferramentas sobre dados obtidos nas áreas da química, nasceu uma nova disciplina designada por Svante Wold em 1972, de quimiometria. Filosoficamente, partindo-se do ponto de vista de que a quimiometria é a aplicação de quaisquer métodos matemáticos e estatísticos para o tratamento de dados químicos, esta área de conhecimento foi iniciada em 1772 com Lavoisier, e este deve ser considerado o primeiro quimiometrista por ter sido o primeiro a usar métodos quantitativos em química. Porém, há um consenso geral no mundo científico de que a quimiometria foi estabelecida como uma nova área de conhecimento na década de 1970 após a publicação de diversos livros e trabalhos científicos, além de um simpósio ocorrido em São Francisco em 1976. O grande divulgador e entusiasta desta nova disciplina foi Bruce Kowalski. Foram dele os primeiros trabalhos, a primeira comunicação por escrito dirigida aos químicos e o primeiro livro editado anunciando esta nova área (TEÓFILO, 2013).

### **2.5.1 Métodos quimiométricos**

Embora, muitos métodos quimiométricos tenham sido originalmente desenvolvidos na área de ciências sociais, eles estão cada vez mais sendo aplicados como um procedimento de rotina na análise de dados oriundos de sistemas químicos. Assim, fica bem definido que a Quimiometria não é uma disciplina nem da matemática, nem da estatística ou da computação, mas sim da química. Os problemas que ela visa resolver são de interesse e originados na química, ainda que as ferramentas de trabalho provenham principalmente das áreas da matemática, da estatística e da computação. Informações químicas tais como, voltamogramas, espectros, cromatogramas, curvas de titulação e outras fontes podem ser digitalizadas formando uma série de números que podem ser representadas como vetores e matrizes (FERREIRA et al., 2004).

Dentre as diversas metodologias quimiométricas existentes, o planejamento experimental (“Design of Experiments” – DOE) tem sido amplamente utilizado na área de Ciência e Tecnologia de Alimentos para a otimização de técnicas de processamento e métodos de análise de gêneros alimentícios diversos.

### **2.5.2 Planejamento e análise de experimentos**

Um experimento é apenas um teste de uma série de testes. Experimentos são executados em todas as disciplinas científicas e são uma importante parte do nosso aprendizado sobre o funcionamento dos sistemas e processos. A validade das conclusões que são inferidas de um experimento depende da escala em que o experimento foi conduzido. Portanto, o planejamento de experimentos representa um dos principais papéis na eventual solução do problema que inicialmente motivou o experimento (BRERETON, 2003).

Os experimentos podem ser executados em duas ou mais variáveis (ou fatores) que o experimentalista supõe serem importantes, como por exemplo, pH e tipo de enzima. Os planejamentos fatoriais é uma poderosa ferramenta para investigar este tipo de problema. Geralmente, em um planejamento experimental, os ensaios são executados em todas as combinações dos níveis dos fatores, normalmente dois ou três (MONTGOMERY e RUNGER, 2003).

Por outro lado, a metodologia de superfície de resposta (“Response Surface Methodology” - RSM) é uma coleção de técnicas matemáticas e estatísticas que são úteis para modelar e analisar sistemas onde a resposta de interesse é influenciada por várias variáveis, e



cujo objetivo é otimizar a resposta. Neste caso, em relação aos planejamentos fatoriais, mais níveis das variáveis são investigados em uma maior região experimental (NETO, SCARMINIO e BRUNS, 2010).

### **2.5.3 Experimentos para triagem**

Muitas vezes em um sistema, diversos fatores ou variáveis podem influenciar a resposta desejada. Um experimento para triagem é executado com o objetivo de determinar as variáveis experimentais e as interações entre variáveis que têm influência significativa sobre as diferentes respostas de interesse. Após selecionar as variáveis que são possíveis de serem estudadas e que provavelmente interferem no sistema, é preciso avaliar a metodologia experimental e fixar os valores experimentais das variáveis que não forem selecionadas durante todo o experimento (LUNDSTEDT et al., 1998).

Em uma etapa seguinte, deve-se escolher qual planejamento usar para estimar a influência (o efeito) das diferentes variáveis no resultado. No estudo de triagem, as interações entre as variáveis (interações principais) e de segunda ordem, obtidas normalmente pelos planejamentos fatoriais completos ou fracionários, são de extrema importância para a compreensão do comportamento do sistema (CALADO e MONTGOMERY, 2003).

#### **2.5.3.1 Planejamentos fatoriais completos**

Segundo Teófilo (2013), em um planejamento fatorial são investigadas as influências de todas as variáveis experimentais de interesse e os efeitos de interação (sinergismo) entre elas na resposta ou respostas. Se a combinação de  $k$  fatores é investigada em dois níveis, um planejamento fatorial consistirá de  $2^k$  experimentos. Normalmente, os níveis dos fatores quantitativos, tais como: as concentrações de uma substância ou os valores de pH, são designados pelos sinais – (menos) para o nível mais baixo e + (mais) para o nível mais alto, porém o que importa é a relação inicial entre o sinal atribuído e o efeito obtido, não sendo um critério definido a nomeação dos sinais. Para fatores qualitativos, tais como os tipos de ácidos ou os tipos de catalisadores, como não existem valores altos ou baixos, fica a critério do experimentalista atribuir os seus níveis. Os sinais para os efeitos de interação as variáveis do planejamento, realizando todas as combinações possíveis, são obtidos pelo produto dos sinais originais das variáveis envolvidas. Desta maneira é possível construir as colunas de sinais para todas as interações e assim elaborar a matriz de coeficientes.

#### **2.5.3.2 Planejamentos fatoriais fracionários**

O planejamento fatorial completo necessita de  $2^k$  ensaios para sua execução, portanto sua principal desvantagem é o grande número de ensaios que devem ser realizados a cada fator adicionado ao estudo. Se considerarmos que os efeitos de altas ordens, principalmente para planejamentos com  $k > 4$ , são quase sempre não significativos, a realização de ensaios para estimar tais efeitos de interação é desnecessária. Desta maneira, com um número menor de experimentos, é possível obter informações daqueles efeitos mais importantes e retirar, na maioria das vezes, as mesmas conclusões caso fosse realizado um planejamento fatorial completo. Os planejamentos que apresentam estas características são conhecidos como planejamentos fatoriais fracionários (NETO, SCARMINIO e BRUNS, 2010)

Há muitos e diferentes tipos de planejamentos fatoriais fracionários descritos na literatura. O tamanho da fração influenciará no possível número de efeitos a serem estimados, e conseqüentemente, no número de experimentos necessários. Pode-se ainda dizer que há dois

tipos de frações: aquelas cujo objetivo é obter somente os efeitos principais e aquelas em que se adicionam experimentos para separar e estimar efeitos de interações, caso se assuma que tais interações apresentam influência sobre os resultados. Estes são conhecidos como planejamentos saturados ou planejamentos de Plackett-Burman (MONTGOMERY, 2005).

Um importante conceito, segundo Rodrigues e Lemma (2009), em planejamentos fatoriais fracionários é a resolução do planejamento, que é identificada por um número romano e que define a ordem em que os efeitos estudados são negligenciados. Além disso, quanto maior for a resolução do planejamento fracionário, maior será a utilidade prática do mesmo. Assim:

- Resolução III – Não confunde efeitos principais entre si, mas os confunde com efeitos de interação entre dois fatores.
- Resolução IV – Não confunde efeitos principais entre si e nem com efeitos de interação entre dois fatores, mas confunde efeitos principais com efeitos de interação entre três variáveis e os efeitos entre duas variáveis se confundem com outros efeitos, inclusive entre eles.
- Resolução V – Os efeitos principais são confundidos com efeitos de interação entre quatro variáveis e os efeitos de interação entre duas variáveis são confundidos com efeitos de interação entre três variáveis.

#### **2.5.4 Planejamentos fatoriais com ponto central**

Em muitos casos, a realização de repetições autênticas pode ser algo inconveniente por diversas razões. Para contornar este infortúnio e obter uma boa estimativa dos erros, um experimento é normalmente incluído no centro do planejamento (Figura 15, p.32), em que o valor médio dos níveis de todas as variáveis é empregado. São os conhecidos experimentos no ponto central (nível zero). Deste modo, é possível avaliar a significância dos efeitos ou coeficientes, tanto em planejamentos de triagem, como em metodologias de superfície de resposta. Além desta vantagem, recomenda-se este tipo de experimento pelas seguintes razões (LUNDSTEDT et al., 1998):

- O risco de perder a relação não linear entre os intervalos é minimizado;
- É possível estimar um modelo razoável e verificar se há falta de ajuste;

Logicamente não há como fugir das repetições, mas o número destas, na maioria dos casos, é significativamente reduzido. No entanto, esta metodologia é somente possível de ser aplicada quando se utilizam variáveis quantitativas, visto que, para variáveis qualitativas não há como adicionar níveis no ponto central (CALADO e MONTGOMERY, 2003).

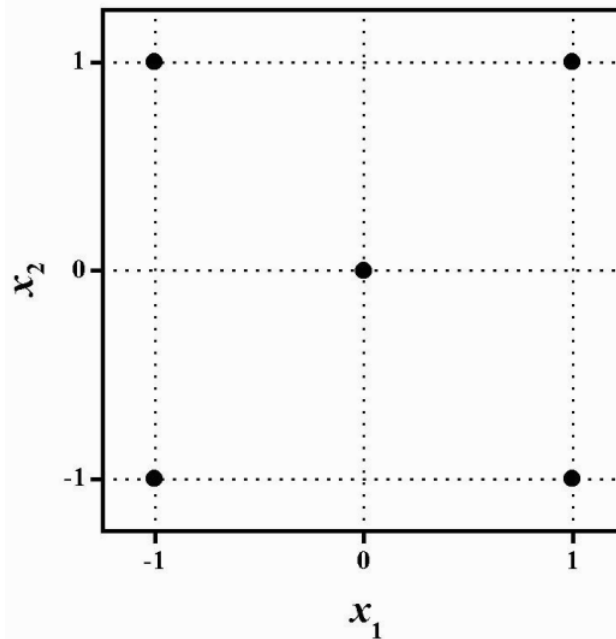


Figura 15. Planejamento  $2^2$  (2 níveis e 2 fatores) com ponto central.

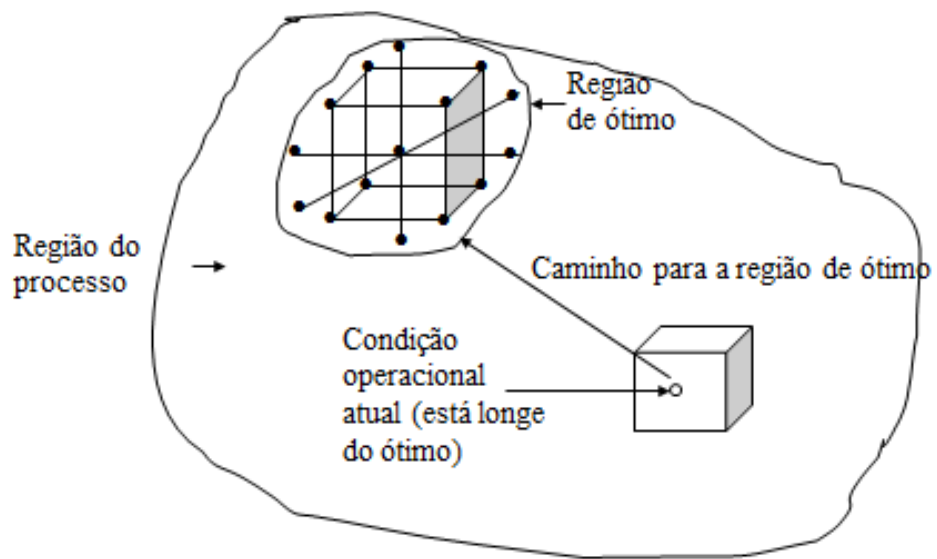
### 2.5.5 Método do gradiente de inclinação ascendente ou descendente

Segundo Calado e Montgomery (2003), metodologia de superfícies de resposta (RSM) possui duas etapas distintas:

- Modelagem do planejamento experimental.
- Deslocamento na superfície de resposta.

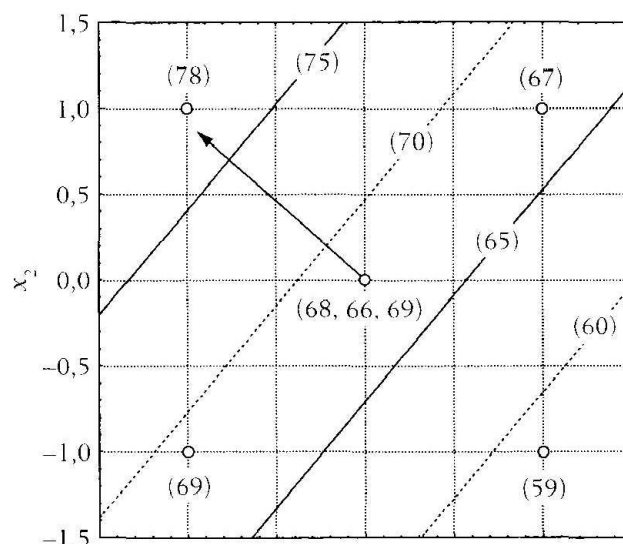
Estas etapas são repetidas tantas vezes quantas forem necessárias, com o objetivo de atingir uma região de respostas otimizadas na superfície investigada. A modelagem é realizada através do ajuste de modelos estatísticos simples às respostas obtidas por meio de planejamentos fatoriais ou planejamentos fatoriais ampliados. Já o deslocamento, é realizado sempre ao longo do caminho de máxima inclinação de um determinado modelo, que é a trajetória na qual a resposta irá variar de forma mais pronunciada (Figura 16, p.32)).

O caminho de máxima inclinação pode ser determinado algebricamente a partir dos coeficientes do modelo ou geometricamente na própria superfície de resposta. O objetivo desta metodologia é propor um procedimento que rapidamente identifique a região em que o ótimo se encontra. Um procedimento que permite o alcance deste objetivo é o método da máxima inclinação ascendente ou descendente (“Steepest Ascent or Descent”) (MONTGOMERY, 2005).



**Figura 16:** Metodologia da superfície de resposta (RSM) e o esquema representativo do caminho de máxima inclinação. FONTE: CALADO e MONTGOMERY, 2003.

Quando o objetivo é o de maximização da resposta, este método pressupõe que o caminho sequencial seja ao longo da direção de máxima inclinação ascendente (“Steepest Ascent”), isto é, na direção e no sentido em que ocorre o aumento máximo da variável resposta (Figura 17). Por outro lado, se o objetivo é o de minimização da resposta, o caminho sequencial será ao longo da direção de máxima inclinação descendente (“Steepest Descent”), ou seja, na direção e no sentido em que acontece a máxima diminuição da variável resposta (NETO, SCARMÍNIO e BRUNS, 2010).



**Figura 17:** Superfície de Resposta de Primeira Ordem e o Caminho da Inclinação Ascendente. FONTE: NETO, SCARMÍNIO e BRUNS, 2010.

### 2.5.6 Função Desejabilidade

A metodologia multicritérios é uma abordagem usada para solucionar problemáticas relacionadas à otimização de diversas respostas que devem ser consideradas simultaneamente para que sejam encontrados seus valores (BEZERRA et al., 2008).

Dentre as diversas metodologia multicritério existentes, atualmente, a função de Derringer ou função de preferência é a mais empregada. Esta metodologia baseia-se na elaboração de uma função de preferência para cada resposta individual. As propriedades medidas relacionadas a cada resposta são transformados em uma função desejabilidade (d). Através das funções individuais para cada resposta, o analista introduz as especificações que cada uma deve preencher para o procedimento de medição. Com as funções desejabilidades individuais, é então possível obter, a conveniência geral (D) (NETO, SCARMINIO e BRUNS, 2010).

Ainda, segundo Neto, Scarminio e Bruns (2010):

A função global de desejabilidade é definida como a média geométrica ponderada das funções individuais (d) segundo a seguinte equação:

$$D = \sqrt[m]{d_1 d_2 \dots d_m}$$

Onde:

m = número de respostas estudadas no processo de otimização.

Portanto, dessa forma, o procedimento de otimização simultânea é reduzido, a fim de definir os níveis de fatores que evidenciam o máximo global desejabilidade. Há inúmeros tipos de transformações possíveis de forma a obter a desejabilidade indivíduo. Caso o valor-alvo (T) para a resposta y é um máximo, a conveniência individual (d) é descrita pela seguinte equação:

$$d = \begin{cases} 0 & \text{se } y < L \\ \left(\frac{y-L}{T-L}\right)^s & \text{se } L \leq y \leq T \\ 1 & \text{se } y > T \end{cases}$$

Onde:

L = menor valor aceitável para a resposta y.

s = valor denominado "peso", definido pelo analista para indicar a importância de y estar próximo de valor do máximo.

Quando  $s = 1$ , a função desejabilidade é linear; quando  $s > 1$  é escolhida, a grande importância é dada para os pontos próximo do valor-alvo e quando  $s < 1$  é escolhido, este último a demanda é de baixa importância.

Contudo, caso o valor alvo para a resposta y seja um mínimo, a desejabilidade individual (d) é dada por:

$$d = \begin{cases} 1 & \text{se } T < y \\ \left(\frac{U - y}{U - T}\right)^t & \text{se } T \leq y \leq U \\ 0 & \text{se } y > U \end{cases}$$

Onde:

U = maior valor aceitável para a resposta y.

t = valor denominado "peso", definido pelo analista para indicar a importância de y estar próximo de valor do mínimo.

Caso o valor-alvo (T) esteja situado entre o limite inferior (L) e o limite superior (U), uma função bilateral deve ser utilizada. Esta função de desejabilidade é expressa pela seguinte equação:

$$d = \begin{cases} 0 & \text{se } y < L \\ \left(\frac{y - L}{T - L}\right)^s & \text{se } L \leq y \leq T \\ \left(\frac{U - y}{U - T}\right)^t & \text{se } T \leq y \leq U \\ 0 & \text{se } y > U \end{cases}$$

Como especificado, t e s controlam o índice de variação da desejabilidade funções. Caso estes parâmetros se alterem, é possível a obtenção de conveniência diferente para as respostas e, como consequência, há um aumento ou diminuição do intervalo de valores aceitáveis na otimização do processo.

O emprego de funções de desejabilidade em química analítica proporciona vantagens como a eficiência, a economia e a objetividade na otimização dos vários procedimentos de resposta. Embora seja considerada vantajosa, há poucos relatos de aplicação desta metodologia na otimização de analítico. A metodologia funções Derringer foi mais empregada na otimização de técnicas cromatográficas, sobretudo porque estes podem estabelecer, simultaneamente, condições para a melhor resolução entre os vários picos. A Tabela 5 (p.35) apresenta aplicações da função de preferência para a otimização de diversas respostas em química analítica.

### 2.5.7 Metodologia de superfície de resposta (RSM)

Após a realização dos experimentos de triagem, os fatores significativos são selecionados e uma metodologia de análise de superfícies de respostas pode ser executada para a otimização do experimento. Neste sentido, otimizar significa encontrar os valores das variáveis que irão produzir a melhor resposta desejada, isto é, encontrar a região ótima na superfície definida pelos fatores (BOX e DRAPER, 1987).

Segundo Myers e Montgomery (2002) a metodologia de superfície de resposta está fundamentada na construção de modelos matemáticos empíricos que geralmente empregam funções polinomiais lineares ou quadráticas, para descrever o sistema estudado e, conseqüentemente, dão condições de explorar (modelar e deslocar) o sistema até sua otimização. Este tipo de planejamento deve reunir os seguintes critérios:

- Proporcionar boas estimativas para todos os coeficientes, exigindo poucos experimentos;

- Fornecer condições de avaliação dos coeficientes e do modelo, ou seja, da regressão e da falta de ajuste.

Dos planejamentos experimentais descritos na literatura que usam a RSM, o Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) é um dos mais utilizado para a otimização de métodos analíticos.

**Tabela 5:** Algumas aplicações da função Desejabilidade em métodos analíticos.

<b>Produto Químico</b>	<b>Tipo de amostra</b>	<b>Técnica analítica</b>	<b>Referência</b>
Anestésicos	Plasma humano	CLAE	CHIAP et al. (2001)
Éter metil-t-butílico			
Álcool t-butílico	Águas subterrâneas	CG-EM	BIANCHI et al. (2002)
Benzeno e Tolueno			
Antraquinonas			
Biantronas	Ervas medicinais	MECC	KUO e SUN (2003)
Organoclorados			
Piretróides	Chá	CG	HU et al. (2005)
Vitamina B6 e B12			
Dexametazona e Lidocaina	Preparações farmacêuticas	EC	CANDIOTI et al. (2006)
Carboidratos	Amostras de alimentos	MECC	MEINHART et al. (2011)
Serotonina e seus precursores	Amostras de chocolate	CLAE-EM	GUILLÉN-CASLA et al. (2011)
Ácidos fenólicos			
Tanshinonas	Ervas medicinais	CLAE	FANG et al.(2012)
HPAs	Amostras de alimentos Amostras ambientais	EC-FIL	FEREY et al. (2013)
Carotenóides e Clorofilas	Macroalgas	CLAE	LU et. al. (2014)

CLAE = Cromatografia líquida de alta eficiência; CLAE-EM = Cromatografia líquida de alta eficiência-Espectrometria de massas; CG = Cromatografia gasosa; MECC = Cromatografia eletrocínética micelar; EC = Eletroforese capilar e EC-FIL = Eletroforese capilar-Fluorescência induzida por laser.

**FONTE:** CANDIOTI et al., 2014 e BEZERRA, et al. 2008.

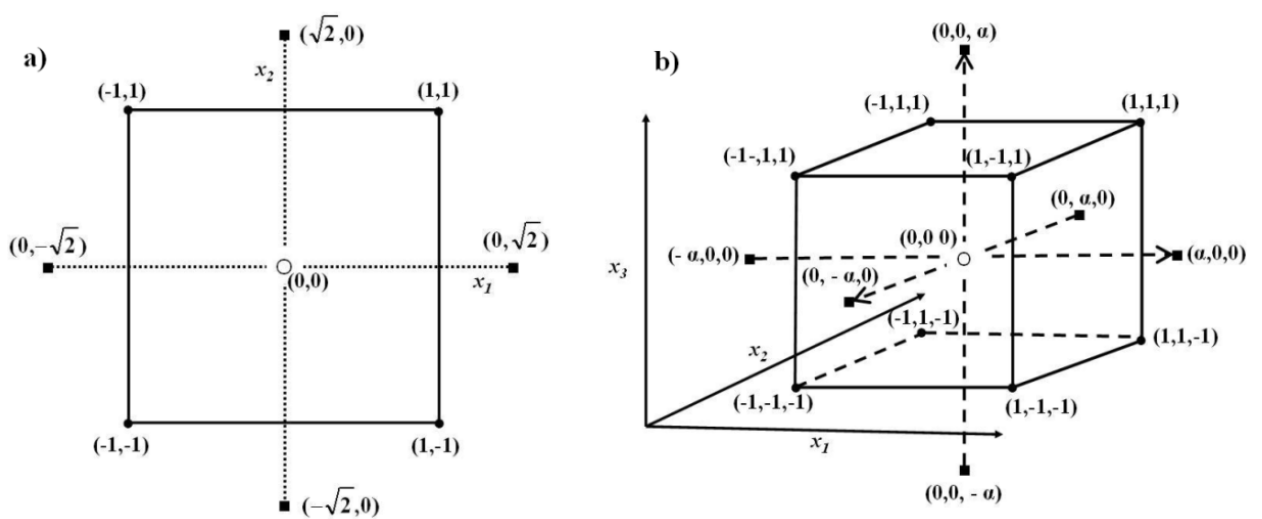
### 2.5.8 Delineamento composto central rotacional (DCCR)

Box e Wilson (1951) *apud* Teófilo (2013) apresentaram o planejamento DCCR como uma evolução aos planejamentos  $3^3$ , que necessitavam de muitos experimentos para um pequeno número de fatores, mesmo para planejamentos fracionários. Além de um menor número de ensaios, este tipo de metodologia apresenta como vantagens, a rotabilidade e

blocagem ortogonal, as quais foram obtidas devido à presença das seguintes partes no planejamento:

- Um planejamento fatorial completo de dois níveis;
- Experimentos no ponto central;
- Experimentos nos pontos axiais. Estes pontos são situados nos eixos do sistema de coordenadas e formam a parte estrela do planejamento.

Para construção de um planejamento DCCR é necessário definir o número de variáveis a serem estudadas, qual planejamento fatorial será empregado (completo ou fracionário) e quantos experimentos serão realizados no ponto central. A Figura 17 (p.44) ilustra os pontos experimentais no sistema de coordenadas, definidos pelos eixos  $x_i$ .



**Figura 18:** Planejamentos compostos centrais: (a)  $2^2$  (2 níveis e 2 fatores) (b)  $2^3$  (2 níveis e 3 fatores). (●) planejamento fatorial, (■) pontos axiais e (O) ponto central.

### 2.5.9 Otimização de sistemas cromatográficos

Segundo Ferreira e colaboradores (2007), a análise cromatográfica geralmente envolve três passos:

- Preparação de amostras.
- Separação cromatográfica.
- Quantificação dos analitos de interesse.

Destes, as etapas de preparação de amostra e separação dos compostos de interesse têm sido frequentemente otimizados empregando técnicas estatísticas multivariadas. Os métodos estatísticos multivariados mais utilizados em cromatografia requerem que o usuário forneça valores máximos e mínimos para cada um dos fatores que define o domínio experimental a ser investigado durante o processo de otimização.

A Otimização de sistemas cromatográficos pode ser realizada utilizando o seguinte procedimento:

- Escolha um delineamento experimental para investigar a região de interesse.



- Realizar os experimentos em ordem cronológica aleatória.
- Realizar análise de variância (ANOVA) na regressão dos resultados de modo a que o modelo mais apropriado, sem evidência de falta de ajuste pode ser usado para representar os dados. Validação muitas vezes não consta em aplicações de superfície de resposta, mesmo, embora seja necessário para saber se o sistema está realmente otimizado ou não.

O planejamento DCCR é uma das técnicas quimiométricas mais utilizadas para a otimização de sistemas cromatográficos. Esta metodologia tem sido usada para a determinação das condições críticas de fatores experimentais durante a otimização das etapas de extração (BRACHET et al., 2001), de aplicação de reações de derivação de separação (DIANA et al., 2002), de quantificação (MUIR, CARRICK e COOPER, 2002) e também de estudos de robustez (DESTANDAU et al., 2006), envolvidos em métodos cromatográficos.

Esta técnica quimiométrica tem sido aplicada para estudos de otimização de métodos cromatográficos para a determinação de espécies orgânicas e inorgânicas, em amostras de água (RODRIGUEZ et al., 2003), de drogas (HILLAERT et al., 2003), de matrizes biológicas (HERNANDEZ-BORGES et al., 2005) e de alimentos (GARCIA-VILLAR, SAURINA e HERNANDEZ-CASSOU, 2006).

Os estudos para a otimização de métodos cromatográficos para a análise de HPAs, através do uso de procedimentos quimiométricos como o DCCR e a RSM, tem sido aplicados para as técnicas de CLAE e CG, em amostras de solo (BUCCO et al., 2007), de água (BOURDAT-DESCHAMPS, DAUDIN e BARRIUSO, 2007), de combustíveis (ANDRADE-EIROA, DIEVART e DAGAUT, 2010), de peixes (RAMALHOSA et al., 2012), de peixes defumados (MOHAMMADI et al., 2013) e de sedimentos (SANTOS et al., 2014).

## 2.6 Validação e Confiabilidade para Metodologias Analíticas

A definição de validação é descrita de formas diferentes por diversas agências reguladoras que atuam na área da qualidade e está sempre sendo revisada para estar adequada às necessidades exigidas pelos procedimentos que são necessários para verificar a uniformidade e a qualidade das medições realizadas por metodologias analíticas. Assim:

Segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO, 1992): “É a avaliação sistemática de um procedimento analítico para demonstrar que está sob as condições nas quais deve ser aplicado”.

Pela EURACHEM (1998): “Validação é o processo de definir uma exigência analítica e confirmar que o método sob investigação tem capacidade de desempenho consistente com o que a aplicação requer”.

Para a Farmacopéia Americana (USPC, 1999): “É o processo que fornece uma evidência documental de que o método realiza aquilo para o qual é indicado para fazer, assegurando sua credibilidade para o uso rotineiro”.

De acordo com a “International Standard Organization” - ISO (1999): “E a confirmação por testes e a apresentação de evidências objetivas de que determinados requisitos são preenchidos pelo método para um dado uso intencional”.

Conforme a Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA (2003): “A validação deve garantir, através de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados”.

Segundo o Instituto Nacional de Metrologia – INMETRO (2007; 2011): “É a forma de demonstrar que um método analítico, nas condições em que é praticado, tem as características necessárias para a obtenção dos resultados com a qualidade exigida”.

Em 2004, Ribani e colaboradores verificaram que estava sendo cada vez mais necessário demonstrar a qualidade e a confiabilidade das medições feitas através de métodos de análise química. Para garantir que um método analítico gere informações confiáveis sobre uma amostra e caracterize um dado universo de análise, seu procedimento deve ser submetido a validação de seus resultados. A validação de métodos analíticos pode ser realizada de duas formas diferentes:

- A validação no laboratório (“in house validation”).
- A validação completa (“full validation”).

A validação no laboratório consiste na aplicação dos parâmetros de mérito analíticos usados para avaliar as características de desempenho de um novo procedimento analítico ou para verificar a adaptação de uma metodologia já utilizada, dentro de um único laboratório. Já a validação completa inclui a avaliação de todos os parâmetros de desempenho utilizados para a validação “in house” mais o estudo de desempenho entre laboratórios.

Na literatura, diversos trabalhos descrevem as figuras de mérito que podem ser utilizadas para avaliar, no laboratório, o desempenho de métodos cromatográficos, dentre eles: seletividade, linearidade, faixa linear de trabalho, precisão, limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), ensaios de recuperação e robustez (CASSIANO et al., 2009).

No Brasil, duas agências reguladoras disponibilizam guias para a orientação e a realização destes ensaios de credibilidade de metodologias analíticas:

- O Instituto Nacional de Metrologia Qualidade e Tecnologia (INMETRO).
- A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

Ambas as Instituições disponibilizam documentos de orientação para os procedimentos de validação de metodologias analíticas muito similares, através dos documentos INMETRO DOQ-CGCRE-008 (2011) e a ANVISA RE nº899 (2003). Por se tratar da publicação mais recente, os conceitos e orientações dos parâmetros descritos anteriormente seguirão a revisão realizada pelo INMETRO em julho de 2011. Assim:

### **2.6.1 Seletividade**

A seletividade de um método analítico é um critério que está relacionado à sua capacidade de separar de forma adequada um conjunto de espécies químicas. Quando um método analítico é capaz de separar e identificar apenas uma substância, este critério é denominado especificidade. A seletividade para um método cromatográficos é verificada através de sua capacidade de separar as espécies químicas em análise, na presença de interferentes, em uma amostra complexa.

### **2.6.2 Linearidade**

A linearidade é a capacidade de um método analítico em produzir respostas que sejam proporcionais à concentração da espécie química de interesse. A linearidade pode ser obtida por padronização interna ou externa e formulada como uma expressão matemática usada para o cálculo da concentração da substância a ser determinada na amostra real.

A aplicação prática do conceito de linearidade é feita através da curva de calibração (curva analítica) que é construída a partir da equação da reta que relaciona as variáveis resposta e a concentração. Desta forma:

$$Y = SX + B$$

Onde:

Y = Resposta (absorbância, transmitância, altura ou área de um pico cromatográfico).

X = Concentração da espécie química de interesse

S = Coeficiente angular da reta (sensibilidade)

B = Coeficiente linear da reta

### 2.6.3 Faixa linear de trabalho

É o intervalo de valores de massa ou de concentração da espécie química de interesse que possui uma relação linear descrita pela equação (1), na qual a curva analítica pode ser construída.

### 2.6.4 Precisão

A precisão avalia a dispersão dos resultados obtidos entre ensaios independentes e repetidos da análise de uma mesma amostra, de amostras semelhantes ou de padrões, nas condições analíticas utilizadas. As em formas mais comuns de considerá-la são por meio da repetitividade, da precisão intermediária e da reprodutibilidade, sendo usualmente expressas pelo desvio-padrão e pelo coeficiente de variação ou desvio padrão relativo (DPR), conforme a expressão:

$$CV \text{ ou } DPR = \left( \frac{DP}{CMD} \right) \times 100$$

Onde:

CV = Coeficiente de variação (%).

DP = Desvio padrão.

CMD = Concentração média determinada.

### 2.6.5 Limite de detecção (LOD)

O LOD representa a menor concentração da espécie química de interesse que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, por um determinado procedimento analítico. Este parâmetro pode variar em função do tipo de amostra e é um critério importante para a quantificação de concentrações-traço, sendo expresso como um valor de concentração.

Nos métodos cromatográficos é recomendado que seu valor seja 3 vezes superior ao ruído da linha de base. Assim, esta figura de mérito pode ser obtida através da curva de calibração utilizando a seguinte equação:

$$LOD = 3 \times \left( \frac{B}{S} \right)$$

Onde:

LOD = Limite de detecção.

B = Coeficiente linear da curva analítica.

S = Coeficiente angular da curva analítica.

### 2.6.6 Limite de quantificação (LOQ)

O LOQ representa a menor concentração da espécie química de interesse que pode ser medida utilizando um determinado procedimento analítico. Assim como o LD, o LQ é obtido através da curva de calibração e é recomendado que, em métodos cromatográficos, seu valor seja 10 vezes superior ao ruído da linha de base. Desta forma, o cálculo do LQ é definido pela expressão:

$$\text{LOQ} = 10 \times \left(\frac{B}{S}\right)$$

Onde:

LOQ = Limite de quantificação.

B = Coeficiente linear da curva analítica.

S = Coeficiente angular da curva analítica.

### 2.6.7 Ensaios de recuperação

Os ensaios de recuperação devem ser utilizados para a avaliação da confiabilidade da etapa de extração de um método analítico. O procedimento mais adequado seria a utilização de materiais de referência certificados semelhantes às matrizes das amostras analisadas (BURNS, DANZER e TOWNSHEND, 2002).

Devido inexistência de MRC adequado ou às dificuldades em se preparar tal material, os ensaios de recuperação podem ser realizados através da fortificação das amostras (“Spike”) em três diferentes concentrações. Entretanto, este tipo de procedimento possui limitação, já que a dispersão da substância na amostra pode ocorrer de forma heterogênea, fazendo com que a espécie química de interesse não esteja necessariamente na mesma forma que na amostra, resultando em valores superestimados ou subestimados de recuperação.

Esta figura de mérito pode ser calculada através da seguinte expressão:

$$\text{RECUPERAÇÃO} = \left(\frac{C_1 - C_2}{C_3}\right) \times 100$$

Onde:

C<sub>1</sub> = Concentração da espécie de interesse na amostra fortificada.

C<sub>2</sub> = Concentração da espécie de interesse na amostra não fortificada.

C<sub>3</sub> = Concentração da espécie de interesse adicionada à amostra fortificada.

## 2.6.8 Robustez

A robustez de um método analítico avalia a sensibilidade que o mesmo apresenta em relação a pequenas variações de seus parâmetros. A robustez de um método cromatográfico pode ser avaliada através de pequenas variações na concentração do solvente orgânico, pH e força iônica da fase móvel em CLAE ou a programação da temperatura e a natureza do gás de arraste em CG.

Esta avaliação de robustez é necessária para verificar as alterações que podem ocorrer quando um método analítico é transferido de um laboratório para outro laboratório ou executado por analistas diferentes ou executado em equipamentos diferentes, sendo muito utilizada nos procedimentos de validação completa em creditações interlaboratoriais.

Para determinar a robustez de um método analítico pode ser utilizado o teste de Youden. Este teste estatístico além de avalia esta figura de mérito ordenando a influência de cada uma das variações nos resultados finais e indicando o tipo de influência de cada variação que o método sofreu.

## 2.7 Legislações de Controle para HPAs

HPAs têm sido conhecidos como contaminantes ambientais por décadas, assim vários programas de monitoramento têm sido realizados para estimar a poluição do solo, água e ar. Como a questão ambiental é ampla e não está restrita a determinados territórios, padrões e orientações internacionais têm sido elaborados desde a Convenção de Poluição Atmosférica de Longo Alcance sobre POPs, em 1979 (ROSENCRANZ, 1981).

Entretanto, na área de produção e comercialização de alimentos, na falta de uma legislação mais ampla, vários países vêm adotando limites legais próprios para água e gêneros alimentícios, o que está causando muitos problemas no comércio de produtos alimentares:

Na década de 70, A Agencia de Proteção Ambiental Americana (USEPA) destacou 16 isômeros de HPAs como prioritários devido ao seu potencial carcinogênico e mutagênico para a saúde humana, tendo como principal foco o benzo(a)pireno. Em 1980, a USEPA implantou o limite máximo de contaminante (“Maximun Contaminant Level” – MCL) para o benzo(a)pireno e mais seis outros isômeros carcinogênicos, em água potável para consumo humano (Tabela 6) (USEPA, 1994).

**Tabela 6:** Limites Máximos de Contaminantes para água potável.

HPA	Limite Máximo de Contaminante (MCL)( $\mu\text{g}/\text{Kg}$ )
Benzo(a)antraceno	0,1
Benzo(a)pireno, Benzo(b)fluoranteno, Benzo(k)fluoranteno Criseno	0,2
Dibenzo(a,h)antraceno	0,3
Indeno(1,2,3-cd)pireno	0,4

FONTE: USEPA, 1994.

A inexistência de uma legislação europeia referente a limites e a métodos indicativos de HPAs tornou-se uma prioridade a partir de 2001, quando foi detectado um alto nível de contaminação em óleo de bagaço de azeitona ocorrido na República Checa. A partir deste fato, Espanha, Itália, Grécia e Suécia, estabeleceram um limite de 5mg/kg para oito tipos de HPAs, a saber: (Benzo(a)pireno; Dibenzo(a,h)antraceno (DbA); Benzo(a)antraceno (BaA); benzo(e)pireno (BeP); Benzo(b)fluoranteno (BbF); Benzo(k)fluoranteno (BkF); Indeno(1,2,3-cd)pireno (IcP); e Benzo(g,h,i)pireno (BgP)) e, ainda, o limite de 2 µg/kg para cada HPAs em óleo de bagaço de azeitona (WENZL et al., 2006).

Em 2011, a Comunidade Européia (CE) estabeleceu os limites para benzo(a)pireno, e o somatório das concentrações de benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno e benzo(a)pireno (HPA4), em alimentos (Tabela 7).

**Tabela 7:** Limites máximos de contaminantes (MCL) para BaP e a soma de 4 HPAs (BaA, CH, BbF e BaP) em alimentos segundo a Regulação 835/2011 da Comunidade Européia.

Produtos Alimentícios	Limite Máximo de Contaminantes (MCL) (µg/Kg)	
	BaP	Soma de 4HPAs
Alimentos à base de cereais e alimentos para bebês e crianças; Alimentos para lactentes e fórmulas de transição, incluindo leite infantil.	1	1
Alimentos dietéticos destinados a fins medicinais específicos; Alimentos dietéticos especificamente destinados a lactentes; Óleos e gorduras destinados ao consumo humano direto ou à utilização como ingrediente alimentar.	2	10
Óleo de coco para o consumo humano direto ou uso como ingredientes de alimentos.	2	20
Cacau e produtos derivados.	5 <sup>(a)</sup>	35 <sup>(b)</sup> 30 <sup>(c)</sup>
Arenques defumados e arenques defumados enlatados; Moluscos bivalves (frescos, resfriados ou congelados)	5	30
Carnes e produtos cárneos processados em altas temperaturas vendidos ao consumidor final (grelhados e churrascos) Os moluscos bivalves (defumados)	6 5 <sup>(d)</sup>	35 30 <sup>(e)</sup>
Peixes fumados e carne e produtos cárneos defumados	2 <sup>(f)</sup>	12 <sup>(g)</sup>

(a) Valor válido a partir de 01/04/2013.

(b) Valor válido de 01/04/2013 até 31/03/2015.

(c) Valor válido a partir de 01/04/2015.

(d) Valor válido até 31/08/2014.

(e) Valor válido de 01/09/2012 até 31/08/2014

(f) e (g) Valores válidos a partir de 01/09/2014.

**FONTE:** PURCARO et al., 2013.

Estes valores estão em vigor desde 1 de setembro de 2012, através da Regulamentação 835/2011. As classes de alimentos como grãos de cacau e derivados e leite de coco, não incluídas em regulamentações anteriores, foram introduzidas nesta nova legislação (PURCARO et al., 2013).

O Canadá fixou o limite de 3 µg/kg para os HPAs BaP, DbA, BaA, BbF, BkF, IcP, CH e BgP, com base no “Toxic Equivalent Factor” (TEF)(CFIA, 2001).

A Alemanha estabeleceu o limite de 5 µg/kg para HPAs pesados (contendo 4 a 6 anéis conjugados) e de 25 µg/kg para o somatório de todos os dezesseis HPAs priorizados pela Agência de proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA), encontrados em óleos e gorduras (WENZL et al., 2006).

No Brasil, as resoluções RDC 02/2007 e a portaria do Ministério da Saúde 2914/2011 estabeleceram os respectivos limites máximos para benzo(a)pireno, nos aromatizantes de fumaça e na água potável para consumo humanos, em 0,03 µg/Kg e 0,7 µg/L (ANVISA, 2007; BRASIL, 2011).

A Agência Americana para Administração de Drogas e Alimentos (“United States Food and Drug Administration” – FDA) não estabeleceu normas que regulem o teor de HAPs em alimentos (ATSDR, 2011).

## 3 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1 Material

#### • Vidrarias e metais

- Argola de metal com diâmetro de 10cm.
- Balões volumétricos com capacidade de 5, 100, e 1000mL.
- Balão com fundo redondo e capacidade de 500mL.
- Bastão de vidro com comprimento de 30cm.
- Béqueres com capacidade 50, 100, 250 e 1000mL.
- Cilindros graduados com tampa com capacidade de 100, 500 e 1000mL.
- Erlenmeyer com capacidade de 250mL.
- Extrator “soxhlet”.
- Espátula de aço inox com comprimento de 20cm.
- Funil de separação com capacidade de 500mL.
- Funis de vidro com colo curto e diâmetro de 5 e 10cm.
- Garras metálicas.
- Kitassato com capacidade de 1000mL.
- Redutor de volume para “vial” com volume de 200 $\mu$ L - Waters<sup>®</sup>.
- Sistema de filtração Milli-Q com placa de vidro sinterizado e capacidade de 250mL.
- Suporte universal.
- Tubo de vidro para centrífuga com capacidade de 10mL.
- Tubo de vidro com tampa de rosca com capacidade de 10 mL.
- “Vials” para injetor automático com capacidade para 1,8mL.

#### • Material de consumo

- Cartucho de celulose para extrator “soxhlet” de 33x80mm (diâmetro x comprimento).
- Membrana filtrante de politetrafluoretileno (PTFE), com poros 0,45 $\mu$ m e diâmetro de 47mm.
- Membrana filtrante de politetrafluoretileno (PTFE), com poros 0,45 $\mu$ m e diâmetro de 13mm.
- Filme para laboratório Parafilm M.
- Papel alumínio laminado.
- Ponteiras para pipeta automática com capacidade para 10 a 100 $\mu$ L.
- Ponteiras para pipeta automática com capacidade para 20 a 200 $\mu$ L.
- Ponteiras para pipeta automática com capacidade para 100 a 1000 $\mu$ L.
- Ponteiras para pipeta automática com capacidade para 500 a 5000 $\mu$ L.
- Saco polietileno com fecho “zip” para coleta de amostra.
- Seringa de vidro com capacidade de 10mL – BD<sup>®</sup>.

#### • Reagentes:

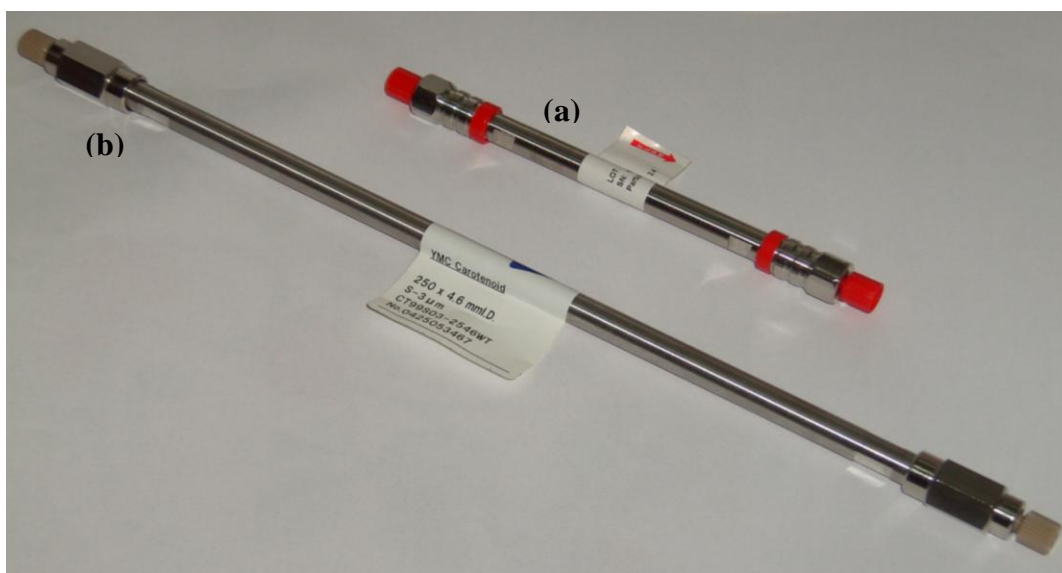
- Acetonitrila grau HPLC.
- Água purificada tipo I.
- Hidróxido de potássio P.A.
- Hexano grau HPLC.



- Metanol grau HPLC.
- Sulfato de sódio anidro P.A.

### • Equipamentos

- Agitador orbital.
- Balança analítica (0,1mg).
- Balança de precisão (0,01g).
- Centrífuga modelo 802B.
- Centrífuga modelo MCD2000.
- Coluna cromatográfica YMC C<sub>30</sub> Carotenoid, 4,6x250mm (diâmetro x comprimento) e diâmetro de partícula de 3µm.
- Coluna cromatográfica BDS HYPERSIL C<sub>18</sub>, 4,6x100mm (diâmetro x comprimento) e diâmetro de partícula de 2,4µm.



**Figura 19:** Coluna cromatográfica YMC C<sub>30</sub> Carotenoid, 4,6x250mm (diâmetro x comprimento) e diâmetro de partícula de 3µm - YMC<sup>®</sup> (a). Coluna cromatográfica BDS Hypersil C<sub>18</sub>, 4,6x100mm (diâmetro x comprimento) e diâmetro de partícula de 2,4µm - Thermo Fisher Scientific<sup>®</sup> (b).

- Estufa para secagem modelo Q317M.
- Evaporador rotativo modelo Rotavapor-RE.
- Liofilizador Liotop modelo L 101.
- Manta aquecedora 500mL modelo 52E.
- Microcomputador modelo C 20x.
- Pipeta automática com volume variável (10 a 100µL).
- Pipeta automática com volume variável (20 a 200µL).
- Pipetar automática com volume variável (100 a 1000µL).
- Pipeta automática com volume variável (500 a 5000µL).
- Programa para controle e aquisição de dados Empower 3.
- Programa para cálculos estatísticos Statistica 12.
- Programa Microsoft Office 2007.
- Programa End Note X7.
- Programa End Note Web 2007.

- Refrigerador *frost free* modelo RFCT450.
- Sistema para purificação de água Direct QUV3.
  
- Sistema cromatográfico (Figura 20):
  - (a) Módulo de separação modelo Alliance e2695.
  - (b) Detector com arranjo de diodos modelo 2998.
  - (c) Detector de fluorescência de comprimento de onda variável modelo 2475.
- Ultrasson digital modelo soniclean 15- SANDERS Medical.



**Figura 20:** - Sistema cromatográfico constituído de : (a) Módulo de separação modelo Alliance e2695 - Waters<sup>®</sup>. (b) Detector com arranjo de diodos modelo 2998 - Waters<sup>®</sup>. (c) Detector de fluorescência de comprimento de onda variável modelo 2475 - Waters<sup>®</sup>.

## • Padrões

Solução padrão original com 16 isômeros de HPAs, em concentração igual a 100 µg/mL, cada um, contendo: naftaleno (NAF), acenaftileno (ACL), acenafteno (ACN), fluoreno (FLN), fenantreno (PHN), antraceno (ANT), fluoranteno (FLT), pireno (PYR), benzo(a)antraceno (BaA), criseno (CHY), benzo(b)fluoranteno (BbF), benzo(k)fluoranteno (BkF), benzo(a)pireno (BAPTISTA; VASCONCELOS), dibenzo(a,h)antraceno (DaA), benzo(g,h,i)perileno (BgP) e Indeno(1,2,3-cd)pireno (IcP) – Sigma-Aldrich.

## 3.2 Métodos

### 3.2.1 Tipos de pesquisa

Segundo Vergara (1998) a pesquisa bibliográfica é classificada quanto aos meios e quanto aos fins.

Quanto aos meios utilizamos:

Pesquisa de laboratório: “Experiência realizada em local circunscrito, já que no campo seria praticamente impossível realizá-la”.

Pesquisa experimental “investigação empírica na qual o pesquisador manipula e controla variáveis independentes e observa as variações que tal manipulação e controle produzem em variáveis dependentes”.

Pesquisa bibliográfica “estudo sistematizado desenvolvido com base em material publicado em livros, revistas, jornais, redes eletrônicas e etc”.

Quanto aos fins utilizamos:

Pesquisa explicativa “Tem como principal objetivo tornar algo inteligível, justificá-lo os motivos, visa portanto, quais fatores contribuem de alguma forma, para a ocorrência de determinado fenômeno. Pressupõe pesquisa descritiva como base para suas explicações”.

### **3.2.1.1 Pesquisa bibliográfica**

O presente trabalho foi realizado a partir de pesquisa bibliográfica, em meio eletrônico, utilizando a base de dados principal do “Web of Science” (THOMSON REUTERS) e “Scielo” (CNPq), considerando o período de 1970 até 2014. O critério utilizado para a escolha da data inicial da pesquisa foi o ano em que o benzo(a)pireno foi primeiramente caracterizado como agente carcinogênico com disseminação mundial.

As principais palavras-chave utilizadas nessa pesquisa bibliográfica foram: “food”, “seafood” e “polycyclic aromatic hydrocarbon(s)”. Foram também associadas através da aplicação do operador booleano “and” ou como filtro de pesquisa os seguintes vocábulos e expressões: “mussel(s)”, “fish”, “oyster”, “bivalves”, “crustaceous”, “scallops”, “molluscs”, “smoked salmon” e “smoked tuna”.

Todas as informações e trabalhos completos publicados obtidos com a revisão bibliográfica foram, posteriormente, organizados e gerenciados através dos programas End Note X7 e End Note Web (THOMSON REUTERS), empregados de forma sincronizada com as bases de dados.

### **3.2.1.2 Pesquisa laboratorial**

O método utilizado foi baseado em Zhang (2010) e Bobeda (2013).

Desenvolvido primeiramente no laboratório de cromatografia líquida da Embrapa Agroindústria de Alimentos - RJ e finalizado no laboratório de análise instrumental do IFRJ - Campus Nilópolis RJ.

As amostras de mexilhão e de salmão defumado analisadas foram coletadas em redes de supermercados da cidade do Rio de Janeiro, no período de agosto de 2012 a fevereiro de 2013.

## **3.3 Preparo das Soluções-padrão de HPAs**

As soluções padrão utilizadas nos experimentos de otimização da separação cromatográfica e na elaboração das curvas analíticas foram preparadas em balões volumétricos de 100 e 5mL através de diluições sucessivas da solução padrão original com concentração de 100 µg/mL em acetonitrila. Para os experimentos de otimização da separação cromatográfica utilizou-se os padrões de HPAs na concentração original de 100 µg/mL e para a elaboração das curvas analíticas foram utilizadas cinco níveis de concentrações diferentes, conforme descritas a seguir:

Experimento	Concentração (µg/mL)					
Otimização da Separação Cromatográfica	100,00					
Elaboração da Curva Analítica	0,50	1,00	5,00	10,00	15,00	20,00

### 3.4 Otimização Multivariada da Separação Cromatográfica dos HPAs

Inicialmente, a separação cromatográfica dos 16 HPAs foi realizada utilizando uma solução padrão de concentração igual a 100µg/mL, adaptando-se as metodologias descrita por Zhang et al, (2010), nas condições cromatográficas descritas na Tabela 8.

**Tabela 8:** Condições cromatográficas iniciais para o experimento de otimização multivariada utilizando o DCCR.

Coluna	BDS HYPERSIL C <sub>18</sub> , 4,6x100mm, 2,4µm
Temperatura da Coluna (°C)	35
Temperatura da Amostra (°C)	25
Volume de injeção (µL)	5
Fase Móvel	Acetonitrila (solvente A) / Água (solvente B)
Fluxo da fase móvel (mL/min)	1,40
Tipo de eluição	Gradiente linear de 40 a 100% do solvente A
Detecção	Detector DAD com varredura de 200 – 400nm e monitoramento em 254 e 224nm, em linha com detector FLC, com $\lambda_{excitação} = 280 \text{ nm}$ e $\lambda_{emissão} = 430 \text{ nm}$

Posteriormente, foi realizada a otimização da separação cromatográfica dos pares de isômeros com valores de resolução ( $R_s$ ) críticos, abaixo de 1,5, pois este valor representa uma separação analítica cromatográfica quantitativa (99,9% de separação). Este parâmetro cromatográfico é de extrema importância já que uma separação de 100% nunca será obtida, pois os cromatogramas são curvas assíntotas.

Para tanto, foi empregada a metodologia da superfície de resposta (RSM), gerada a partir de um delineamento composto central rotacional (DCCR), conforme descrito por Ferreira e colaboradores (2007). As variáveis independentes ou fatores escolhidos foram fluxo da fase móvel (mL/min) e temperatura da coluna (°C) e a variável dependente ou de resposta  $R_s$ , foi calculada entre dois picos cromatográficos consecutivos através da seguinte expressão:

$$R_s = \frac{2(t_2 - t_1)}{w_1 + w_2}$$

Onde:

$R_s$  = resolução cromatográfica.

$t_1$  = tempo de retenção do primeiro pico cromatográfico.

$t_2$  = tempo de retenção do segundo pico cromatográfico.

$w_1$  = altura do primeiro pico cromatográfico.

$w_2$  = altura do segundo pico cromatográfico.

Os experimentos de otimização foram realizados empregando dois planejamentos experimentais completos com 2 fatores ( $2^2$ ), quatro pontos axiais ( $\alpha = \pm 1,41$ ) e três pontos centrais (pc), totalizando onze ensaios cada um, conforme mostrados na matriz experimental descrita na Tabela 9, realizados aleatoriamente.

**Tabela 9:** Matriz de experimentos codificados utilizada nos planejamentos experimentais multivariados.

Ensaio	Fluxo da Fase Móvel	Temperatura da Coluna
1	-1	-1
2	1	-1
3	-1	1
4	1	1
5	-1,41	0
6	1,41	0
7	0	-1,41
8	0	1,41
9	0	0
10	0	0
11	0	0

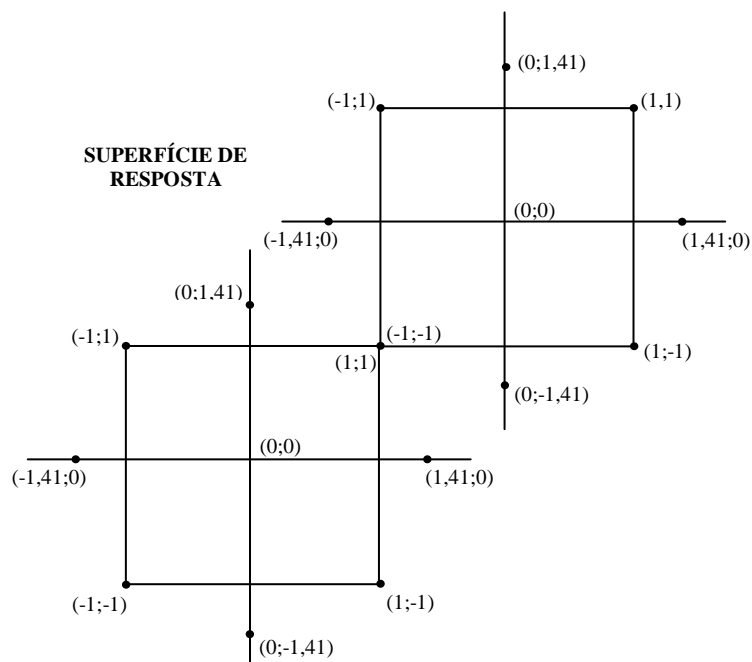
No primeiro procedimento de otimização multivariada foram utilizados os valores reais descritos na Tabela 10 para os valores codificados das variáveis independentes (fatores).

**Tabela 10:** Valores reais dos fatores usados no primeiro DCCR e seus respectivos níveis codificados

Fatores	Níveis codificados e Valores reais				
	- 1,41	- 1	0	+ 1	+ 1,41
<b>Fluxo da fase móvel (mL/min)</b>	1,26	1,30	1,40	1,50	1,54
<b>Temperatura da coluna (°C)</b>	27,95	30,00	35,00	40,00	42,05

Em seguida foi realizado um deslocamento através da superfície de resposta em direção à região onde o ponto de otimização poderia ser encontrado (Figura 21, p.51)) utilizando a metodologia do gradiente ascendente. Os novos valores reais para os fatores fluxo de fase móvel e temperatura de coluna foram proporcionais aos valores das condições experimentais utilizadas na primeira série de ensaios.

Assim, sequencialmente, no segundo procedimento de otimização multivariada foram utilizados os valores reais descritos na Tabela 11 (p.51) para os valores codificados das variáveis independentes.



**Figura 21:** Valores codificados para o deslocamento em gradiente ascendente realizado na superfície de reposta.

**Tabela 11:** Valores reais dos fatores usados no segundo DCCR e seus respectivos níveis codificados.

Fatores	Níveis codificados e Valores reais				
	- 1,41	- 1	0	+ 1	+ 1,41
<b>Fluxo da fase móvel (mL/min)</b>	1,46	1,50	1,60	1,70	1,74
<b>Temperatura da coluna (°C)</b>	37,95	40,00	45,00	50,00	52,05

Em um terceiro procedimento, uma última etapa de otimização multivariada para os fatores estudados, foi realizada através aplicação da metodologia de funções desejabilidade para otimizações experimentais com restrição.

Os dados experimentais foram analisados com auxílio do programa Statistica 12 para Windows e Microsoft Office Excel 2007 para Windows.

### 3.5 Otimização univariada da separação cromatográfica dos HPAs

A otimização univariada da separação cromatográfica dos 16 isômeros de HPAs foi realizada utilizando uma solução padrão de concentração igual a 100µg/mL, adaptando-se as condições experimentais obtidas no item 3.4 (p.64), nas condições cromatográficas descritas na Tabela12 (p.52).

**Tabela 12:** Condições cromatográficas iniciais para o experimento de otimização univariada com a coluna C<sub>30</sub>.

Coluna	YMC C <sub>30</sub> Carotenoid, 4,6x250mm, 3,0µm
Temperatura da Coluna (°C)	40
Temperatura da Amostra (°C)	20
Volume de injeção (µL)	5
Fase Móvel	Acetonitrila (solvente A) Água (solvente B)
Fluxo da fase móvel (mL/min)	1,50
Tipo de eluição	Gradiente linear de 40 a 100% do solvente A
Detecção	Detector DAD com varredura de 200 – 400nm e monitoramento em 254 nm, em linha com detector FLC, com $\lambda_{excitação}$ e $\lambda_{emissão}$ variável

### 3.6 Análise de HPAs nas Amostras de Pescado

A análise dos 16 hidrocarbonetos policíclicos aromáticos foi realizado em dois tipos de amostras de pescado:

- Mexilhões processados (descascados e eviscerados).
- Salmão defumado (filés com pele).

Todas as amostras eram processadas e importadas do Chile.

Os procedimentos analíticos são descritos abaixo e pode ser resumido conforme mostrado no fluxograma da Figura 22.



**Figura 22:** Fluxograma resumido para análise de HPAs.

### 3.6.1 Aquisição das amostras de pescado

As amostras de mexilhão e salmão defumado foram adquiridas mensalmente no período de agosto de 2012 a fevereiro de 2013, em redes de supermercados da cidade do Rio de Janeiro, observando-se o número do lote de fabricação para a sua diferenciação.

O critério utilizado para a escolha das amostras de mexilhão usadas neste trabalho considerou a possibilidade da efetiva contaminação deste tipo de pescado, já que 96% da produção de mexilhões no Chile vêm de fazendas que cultivam esses organismos localizadas na região de Los Lagos, próximas ao complexo de vulcões de Puyehue-Cordón Caulle, visto que a literatura científica confirma que atividades vulcânicas caracterizam fonte de produção de HPAs.

A escolha das amostras de salmão defumado é justificada como uma forma de verificar a aplicação da metodologia analítica numa outra matriz de alimento e também para verificar sua eficiência para analisar pescado que tenha sido defumado através do uso de aditivos aromatizantes como a fumaça líquida.

### 3.6.2 Liofilização das amostras de pescado

As amostras de pescado foram liofilizadas na Embrapa Agroindústrias de Alimentos e no Instituto Federal do Rio de Janeiro a  $-49\text{ }^{\circ}\text{C}$  e sob pressão reduzida de 0,632 mmHg, em liofilizador Liotop modelo L101.

### 3.6.3 Extração de HPAs

A extração de HPAs foi realizada através de uma hidrólise alcalina, utilizando um extrator “soxhlet”, em aproximadamente 20g de amostra liofilizada, com 200mL de KOH 0,4 mol/L em metanol:água (9:1 V/V), por um período de 24 horas a  $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Em seguida, foi realizada a partição desta solução alcalina com três porções de 100 mL de hexano. As frações deste extrato foram reunidas lavadas por 3 vezes com 50 mL de água ultrapura, em funil de separação. O extrato hexânico obtido foi seco com 3,00g sulfato de sódio anidro e centrifugado. Finalmente, o extrato seco foi concentrado para um volume de 300  $\mu\text{L}$  em evaporador rotatório, à pressão reduzida e temperatura de  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ , e filtrado em membrana de politetrafluoretileno (PTFE). Todos os extratos foram transferidos para tubos eppendorf e guardados em freezer a  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ , para posterior análise cromatográfica.

### 3.6.4 Análise cromatográfica de HPAs por CLAE-UV-FLC

A análise cromatográfica dos HPAs das amostras foi realizada usando sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) modelo Alliance (*Waters Corporation*), com injetor automático e detectores de ultravioleta com arranjo de diodos (UV-DAD) e fluorescência (FLC) com comprimento de onda variável, modelos 998 e 475 (*Waters Corporation*), respectivamente, acoplados em série. O sistema analítico foi composto também por coluna cromatográfica YMC C<sub>30</sub> Carotenoid, 4,6x250mm, 3,0 $\mu\text{m}$  de diâmetro de partícula (YMC Inc.), com temperaturas de  $35^{\circ}\text{C}$  e  $20^{\circ}\text{C}$  para a coluna e para o injetor automático, respectivamente. O volume de injeção utilizado foi de 15 $\mu\text{L}$  e a fase móvel utilizada foi composta de acetonitrila (Solvente A) e água (Solvente B) com a programação de fluxo e gradiente de concentração descrita na Tabela 13 (p.54).



**Tabela 13:** Programação do fluxo em gradiente concentração de solventes para a fase móvel utilizada na análise por CLAE-UV-FLC.

<b>Tempo de análise (minutos)</b>	<b>Fluxo de fase móvel (mL/minuto)</b>	<b>Solvente A (%)</b>	<b>Solvente B (%)</b>
0,00	1.40	60.00	40.00
12.00	1.40	100.00	0.00
13.00	1.70	100.00	0.00
20.00	1.70	100.00	0.00
21.00	1.40	60.00	40.00

A detecção cromatográfica por UV-DAD foi realizada através de varredura na faixa de comprimento de onda de 200 a 400 nm e as aquisições dos cromatogramas foram realizadas em 254,0 nm. A detecção por FLC foi realizado usando-se a programação descrita na Tabela 14.

**Tabela 14:** Programação dos comprimentos de onda de excitação ( $\lambda_{ex}$ ) e emissão ( $\lambda_{em}$ ) usados no detector de FLC.

<b>Tempo de análise (minutos)</b>	<b><math>\lambda</math> excitação (<math>\lambda_{ex}</math>)</b>	<b><math>\lambda</math> emissão (<math>\lambda_{em}</math>)</b>
0,00	280	330
8,30	250	370
10,00	330	430
12,50	270	390
14,50	280	430
19,20	290	505
20,00	280	330

### 3.7 Preparo das Curvas Analíticas para a Quantificação dos HPAs

As curvas de calibração para a quantificação dos HPAs por padronização externa foram construídas graficamente como função da área obtida pela integração de cada um dos picos cromatográficos obtidos e a concentração do hidrocarboneto analisado, em  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . As condições de separação cromatográficas empregadas foram as mesmas descritas no item 3.6.4 (p.51), as concentrações utilizadas para cada um dos contaminantes foi de 0,50, 1,00, 5,00, 10,00, 15,00 e 20,00  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , injetadas em triplicata cada uma. Todos os gráficos foram elaborados pela aplicação do programa Microsoft Office Excell 2007.

### 3.8 Determinação da Confiabilidade Analítica

Após a otimização da separação cromatográfica dos 15 isômeros de HPAs, a confiabilidade desta etapa metodológica foi avaliada usando os parâmetros de linearidade, limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ) e faixa linear dinâmica conforme método descrito por Ribani (2004) e a orientação INMETRO (2011).

A linearidade da resposta do detector para cada um dos 15 isômeros foi obtida através dos gráficos de resíduos adquiridos através da curva analítica.

LOD e LOQ foram calculados a partir das respectivas curvas analíticas para cada um dos 15 isômeros HPAs, através das seguintes fórmulas:

$$\text{LOD} = 3 \left( \frac{\sigma}{a} \right)$$

$$\text{LOQ} = 10 \left( \frac{\sigma}{a} \right)$$

Onde:

$\sigma$  = desvio padrão dos valores do intercepto.

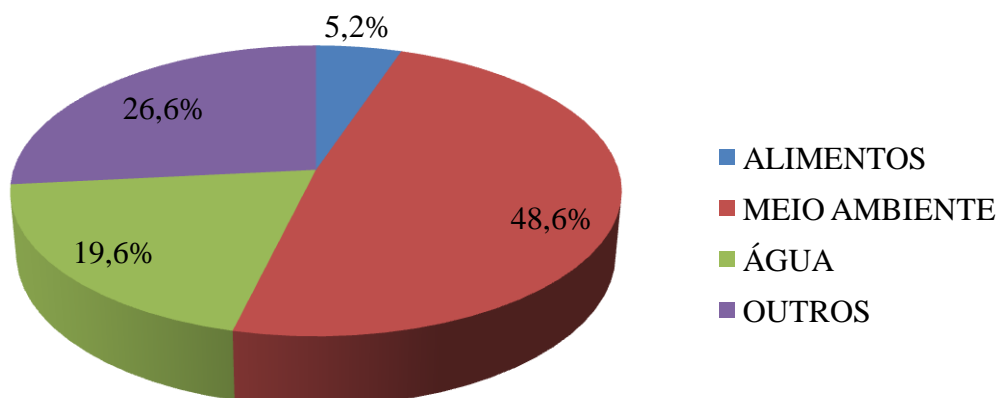
$a$  = média dos valores do coeficiente angular.

Os resultados foram obtidos utilizando-se a ferramenta tratamento de dados do programa Microsoft Office Excel 2007 para Windows.

## 4 RESULTADO E DISCUSSÃO

### 4.1 Pesquisa Bibliográfica

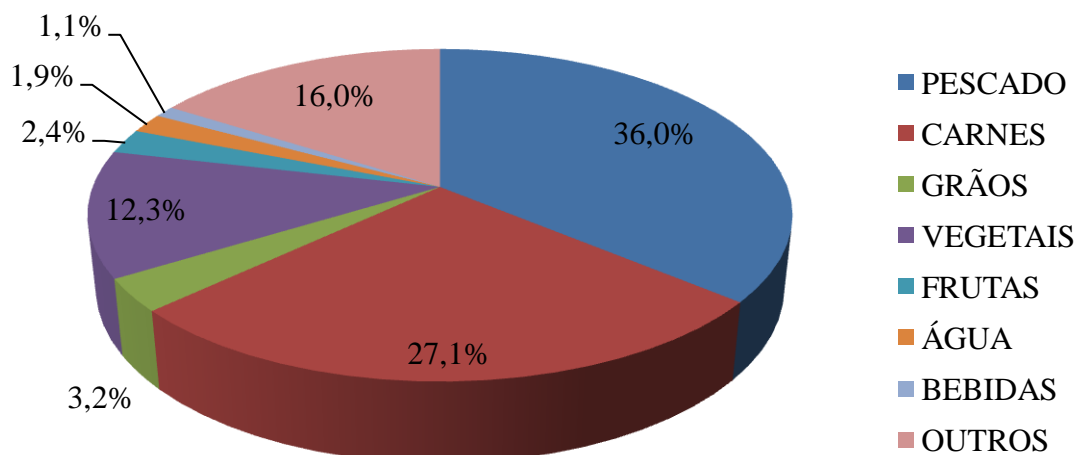
A pesquisa bibliográfica resultou em 12.110 títulos publicados com o foco de estudos em HPAs, nas bases de dados utilizadas, no período estudado. O percentual das publicações que possuem o foco de estudo em amostras de alimentos foi de 5,2%. Já os percentuais das publicações, em áreas correlatas, com foco de estudos em amostras ambientais e de água, mostraram por sua vez um total de 48,6% e 19,6%, respectivamente. Outros focos de estudos tendo hidrocarbonetos policíclicos aromáticos como tema central corresponderam a um percentual de 26,6% (Figura 23).



**Figura 23:** Percentuais de títulos publicados possuindo como foco central o estudo de HPAs em alimentos, meio ambiente e água, no mundo.

Estes resultados mostram que os estudos realizados em hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em amostras de alimentos são muito menores quando comparados aos estudos já realizados com amostras ambientais e de água, indicando que a área de alimentos, por sua indubitável importância, deve ser considerada enfoque relevante de estudos futuros, permitindo publicações inovadoras e pertinentes para o meio acadêmico, novas medidas de controle de alimentos e, conseqüentemente, melhoria da qualidade dos gêneros alimentícios para o consumo humano.

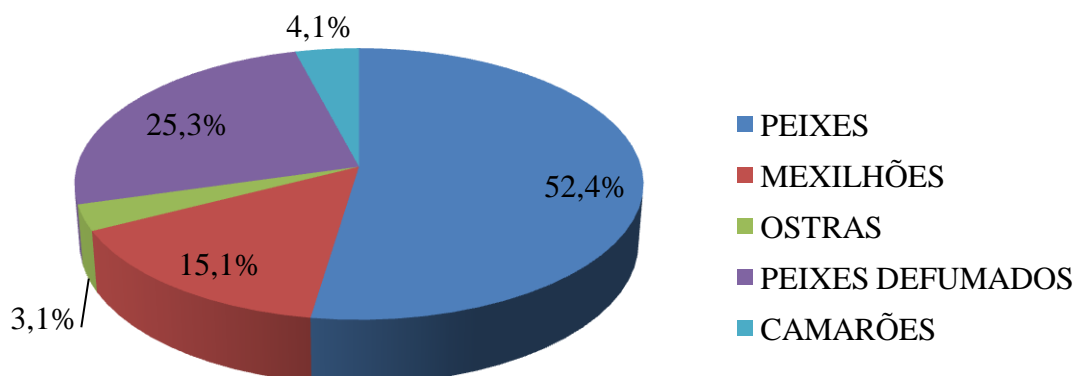
Em outra pesquisa bibliográfica focou-se o estudo de HPAs em amostras de alimentos, o que resultou em 625 títulos publicados. Destes, 36,0% foram estudos em amostras de pescado, 27,1% de carnes, 12,3% de vegetais, 3,2% de grãos, 2,4% de frutas, 1,9% de água para consumo humano e 1,1% de bebidas. Outros títulos com foco em estudos sobre HPAs em amostras de alimentos somaram um percentual de 16,0% (Figura 24, p.57).



**Figura 24:** Percentuais de títulos publicados possuindo como foco central o estudo de HPAs em tipos diversos de alimentos, no mundo.

Os resultados dos estudos sobre HPAs em alimentos mostram que as amostras de pescados e carnes têm recebido maior atenção, pois, são importantes fontes de proteínas para a alimentação humana. Além disso, pescados e carnes e seus derivados são produtos alimentícios com elevado valor agregado na à sua comercialização e que podem ser facilmente contaminados através de por meio de métodos de processamento como a secagem, a defumação e a grelhagem.

Considerando também as bibliografias com foco em estudos sobre HPAs em amostras de pescado a pesquisa resultou em 225 títulos publicados. Os percentuais encontrados para alguns tipos de pescado foram de 52,4% para peixes, 15,1% para mexilhões, 25,3% para peixes defumados, 4,1% para camarões e 3,1% para ostras, como podemos verificar na Figura 25.



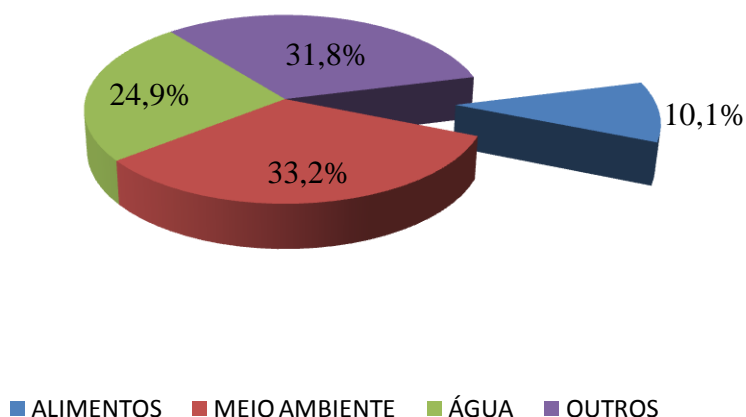
**Figura 25:** Percentuais de bibliografias com foco no estudo de HPAs em tipos diversos de pescado, no mundo.

Estes resultados mostram que o meio científico tem dado maior importância aos estudos realizados em amostras de peixes “in natura” ou oriundas de processo de defumação. O motivo desta relevância pode ser explicado pela possibilidade real de contaminação deste tipo de alimento pelo processo de defumação e, também, pelo aumento da aceitação e do consumo desta fonte proteica no mundo, conforme descrito em FAO (2012).

Entretanto, mexilhões, ostras e camarões devem ter seus estudos estendidos e aprofundados, pois ao contrário de vertebrados, não são eficazes na metabolização e eliminação de HPAs. Estes organismos são filtradores e acumulam estes contaminantes em seus tecidos, atuando como biomagnificadores destes na cadeia alimentar e, assim, podem afetar a qualidade da alimentação humana ao enquanto vetores destas substâncias.

A Figura 26 nos mostra os percentuais das publicações no Brasil, com cerne nos estudos de HPAs em amostras de alimentos, de água e também e também do meio ambiente, totalizando 10,1; 24,9 e 33,2%, respectivamente. Outras obras tendo HPAs como tema central corresponderam a 31,8% das publicações.

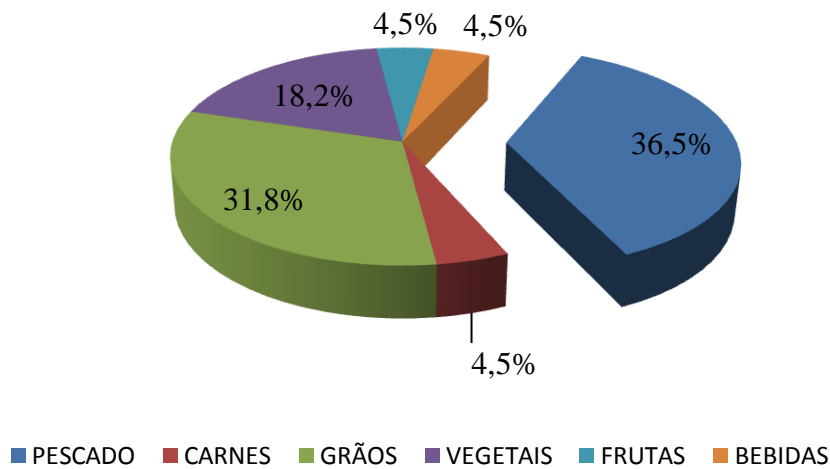
Os resultados mostram que o Brasil segue a tendência de publicações mundiais, possuindo poucas publicações na área de alimentos com foco em HPAs, apesar, apesar de o país ser considerado um importante produtor, exportador e importador de gêneros alimentícios.



**Figura 26:** Percentuais de títulos publicados possuindo como foco central o estudo de HPAs em alimentos, meio ambiente e água, no Brasil.

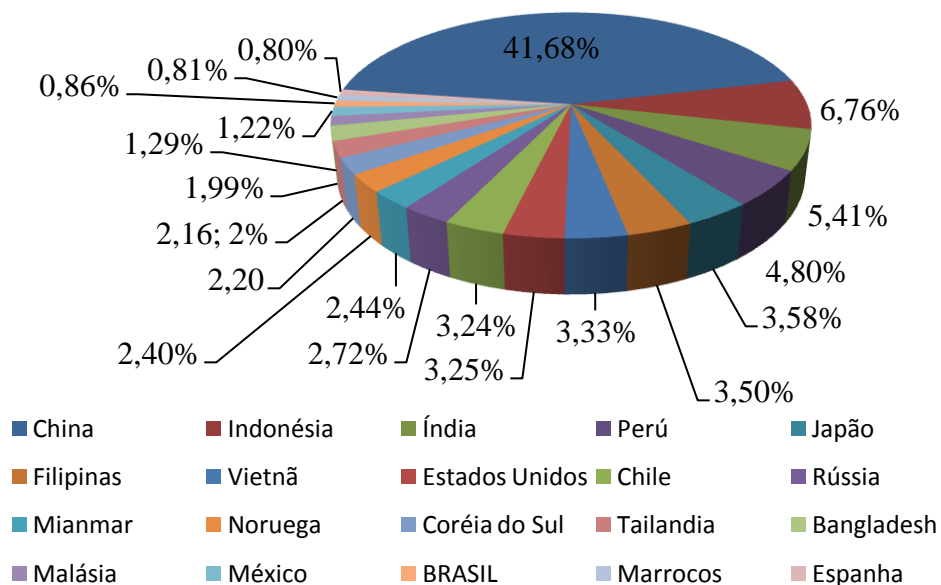
Dentre os diversos tipos de alimentos que podem sofrer contaminação por HPAs, o número de publicações no Brasil foi elevado para amostras de pescados (36,5%), de grãos (31,8%) e de vegetais (18,2%). Amostras de bebidas, frutas e carnes corresponderam, cada uma, a somente 4,5% das obras. Amostras de água para consumo humano não aparecem entre as publicações brasileiras na base de dados utilizada (Figura 27, p.59).

Os resultados mostram que o Brasil acompanha a tendência mundial, focando estudos e publicações em amostras de pescado e vegetais. Entretanto, ao contrário do que foi verificado nas publicações internacionais, poucas publicações brasileiras foram realizadas descrevendo estudos com HPAs em amostras de carne e um maior número de obras foi publicado envolvendo o estudo destes contaminantes em amostras de grãos.



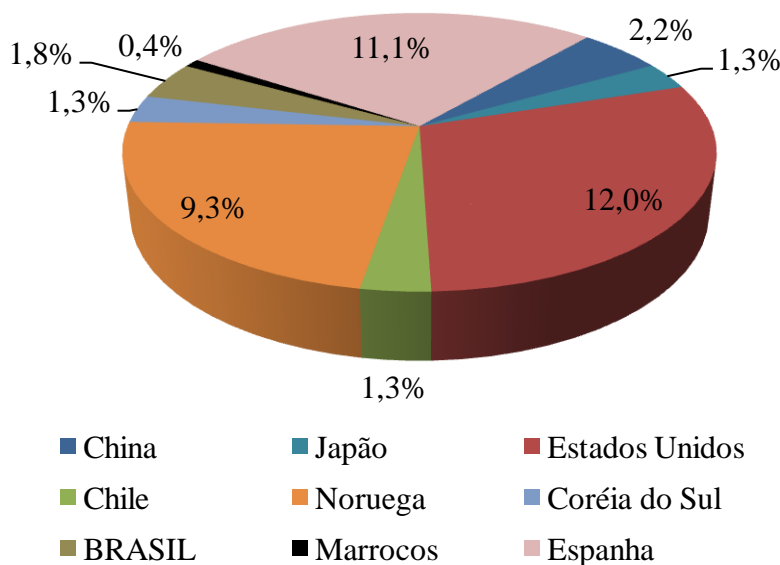
**Figura 27:** Percentuais de bibliografias com foco no estudo de HPAs em tipos diversos alimentos, no Brasil.

A produção mundial de pescado, tanto da pesca extrativa quanto da aquicultura, alcançou aproximadamente 146 milhões de toneladas. A Figura 28 mostra os dados em percentual para os 20 países que se destacaram na atividade no ano de 2010. Os maiores produtores foram a China, com aproximadamente 60,5 milhões de toneladas, a Indonésia, com 9.8 milhões de toneladas, a Índia com 7,9 milhões de toneladas, e o Peru com cerca de 7 milhões de toneladas. Neste contexto, o Brasil contribuiu com 1.264.765 de toneladas, o que representou 0,86% da produção mundial de pescado, ocupando o 18º lugar dentre os maiores produtores de pescado do mundo e o 3º lugar dentre os países da América do Sul onde, dos quais despontam o Peru e o Chile no 1º e 2º lugares, respectivamente (BRASIL, 2012).



**Figura 28:** Dados percentuais da produção de pescado para os 20 países maiores produtores. FONTE: BRASIL (2012).

Entretanto, quando comparamos os dados de produção de pescado com o percentual de trabalhos publicados com foco em estudos sobre contaminação de HPAs em amostras de pescado, apresentados na Figura 29, pode-se verificar que países como o Japão, o Chile, a Coreia do Sul, o Marrocos e a China, maior produtor e exportador mundial de pescado, possuem um número de publicações muito baixo em estudos sobre contaminação de HPAs neste gênero alimentício.



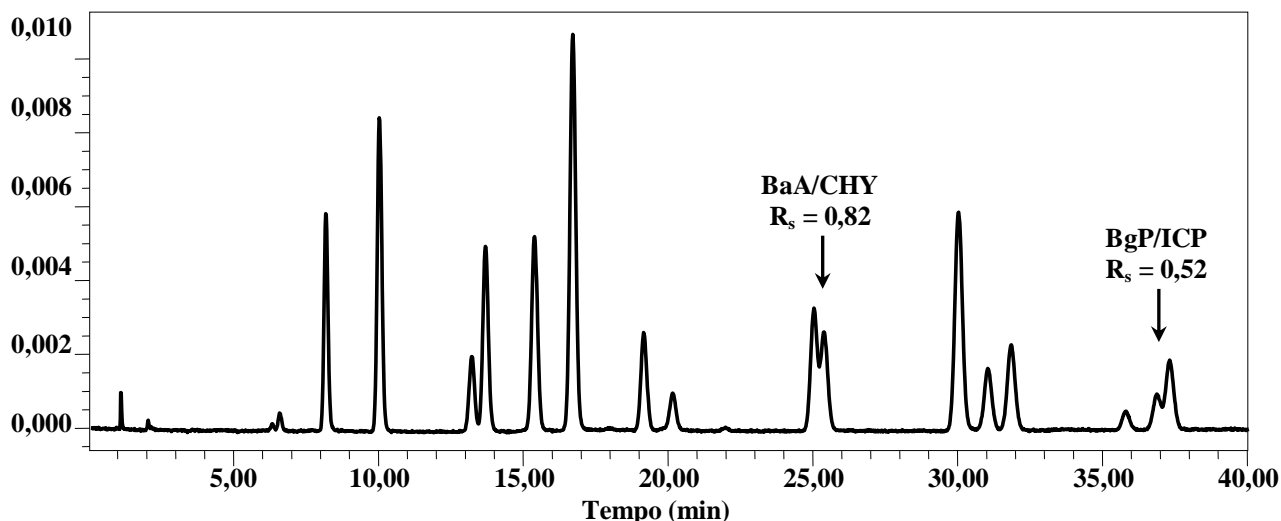
**Figura 29:** Dados percentuais da produção de publicações com cerne na contaminação de HPAs em amostras de pescado para os países maiores produtores.

Outra observação interessante é que os Estados Unidos da América, a Espanha e a Noruega que, no período estudado (1970-2014), produziram um número maior de publicações: 12,0; 11,1 e 9,3%, respectivamente. Estes países já possuem uma política estabelecida com relação a este tipo de contaminação, seja de saúde pública ou de exigência comercial, como as barreiras não tarifárias de comércio. A Indonésia e o Peru, que ocupam respectivamente a 2ª e 3ª posições dentre os 20 maiores produtores mundiais, além dos demais países considerados não aparecem em publicações sobre o tema, na base de dados pesquisados, no mesmo período.

## 4.2 Pesquisa Laboratorial

### 4.2.1 Otimização multivariada da separação cromatográfica dos isômeros de HPAs

A otimização da separação cromatográfica foi realizada para os dois pares de isômeros de HPAs: benzo(a)antraceno/criseno e benzo(g,h,i)perileno/indeno(1,2,3-cd)pireno, que apresentaram valores de resolução cromatográfica ( $R_s$ ) iguais a 0,82 e 0,52, respectivamente, menores que 1,5, conforme mostrado no cromatograma da Figura 30 (p.61).



**Figura 30:** Cromatograma inicial obtido por CLAE-UV para os 16 padrões de HPAs utilizando a coluna cromatográfica Hypersil C<sub>18</sub> (100 x 4,6 mm; 2,4 µm).

No primeiro conjunto de experimentos para a otimização da  $R_s$  foram obtidos os valores apresentados na Tabela 15. Estes resultados foram utilizados para o cálculo dos coeficientes de regressão e da análise de variância (ANOVA) para a obtenção dos modelo preditivos para a separação dos pares críticos de HPAs BaA/CHY e BgP/ICP.

**Tabela 15:** Matriz de experimentos codificados para o primeiro DCCR e os respectivos resultados par a resolução cromatográfica dos pares de isômeros BaA-CHY e BgP-ICP.

Ensaio	Fluxo da Fase Móvel	Temperatura da Coluna	$R_s(\text{BaA/CHY})$	$R_s(\text{BgP/ICP})$
1	-1	-1	0,82	0,70
2	1	-1	0,75	0,87
3	-1	1	0,94	0,62
4	1	1	1,00	0,79
5	-1,41	0	0,82	0,68
6	1,41	0	0,89	0,83
7	0	-1,41	0,62	0,85
8	0	1,41	1,00	0,74
9	0	0	0,83	0,77
10	0	0	0,85	0,73
11	0	0	0,89	0,75

Os resultados obtidos para a separação de BaA/CHY são mostrados nas Tabela 16 (p 62).

Observando a Tabela 16 (p.62), verifica-se que a resolução cromatográfica do par BaA/CHY foi influenciada positivamente somente pelo fator linear temperatura da coluna, com 90% de confiança. Isto pode ser verificado na tabela acima, já que o coeficiente de regressão apresentou um número positivo (0,113979) e que o seu  $p$ -valor  $< 0,10$ . A significância estatística deste termo linear pode ser comprovada pelo gráfico de Pareto (Figura 31, p.62), onde somente o fator temperatura da coluna apresenta efeito padronizado maior que  $p = 0,10$ .

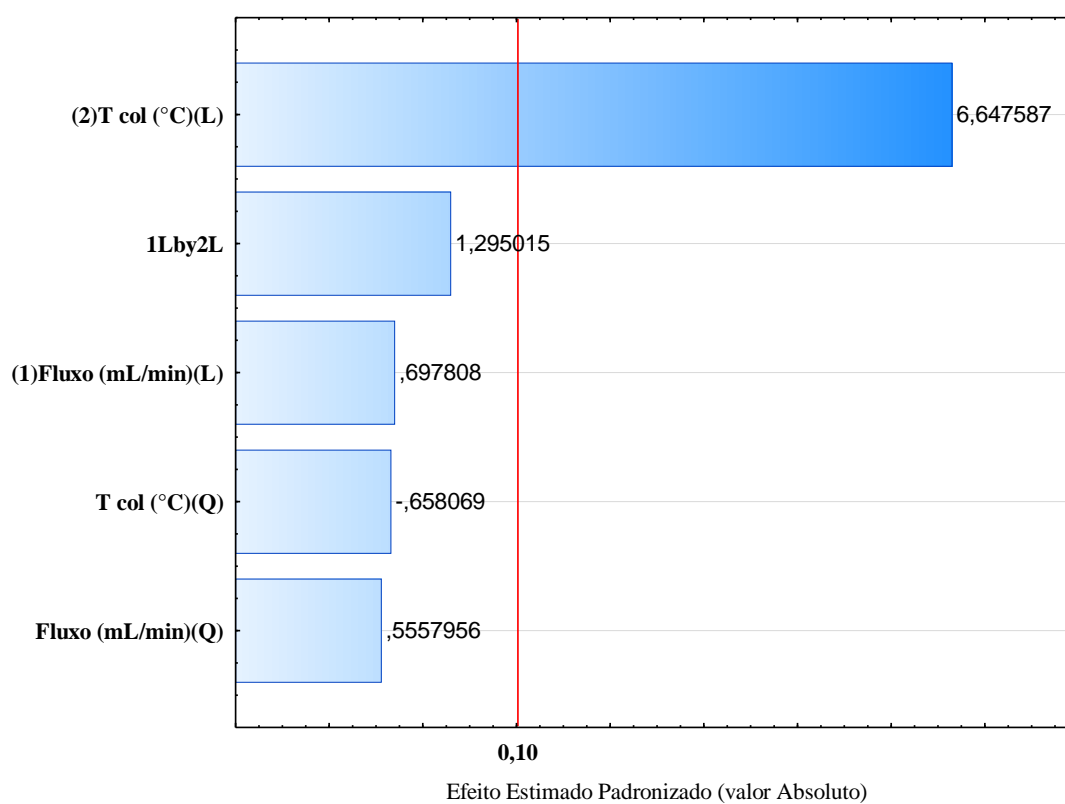


**Tabela 16:** Coeficientes de regressão para a variável de resposta Rs[BaA-CHY].

Fatores	$R^2 = 0,90458$					Limite de Conf. -90,%	Limite de Conf. +90,%
	Coeficiente de Regressão	Erro Padrão	t(5)	p-valor			
Média	<b>0,858153</b>	<b>0,027957</b>	<b>30,69528</b>	<b>0,000001</b>		<b>0,786287</b>	<b>0,930019</b>
(1)Fluxo Móvel(L) Fase	0,011965	0,017146	0,69781	0,516407		-0,032110	0,056040
Fluxo Móvel(Q) Fase	0,011371	0,020460	0,55580	0,602302		-0,041222	0,063964
(2)Temp. Coluna(L)	<b>0,113979</b>	<b>0,017146</b>	<b>6,64759</b>	<b>0,001162</b>		<b>0,069904</b>	<b>0,158054</b>
Temp. Coluna(Q)	-0,013464	0,020460	-0,65807	0,539581		-0,066057	0,039129
1L por 2L	0,031355	0,024212	1,29502	0,251885		-0,030884	0,093593

(L) = Termo Linear

(Q) = Termo Quadrático



**Figura 31:** Diagrama de Pareto dos efeitos padronizados para a variável de resposta Rs[BaA-CHY].

Os demais termos foram incorporados ao resíduo para o cálculo da ANOVA que está apresentado na Tabela 17.

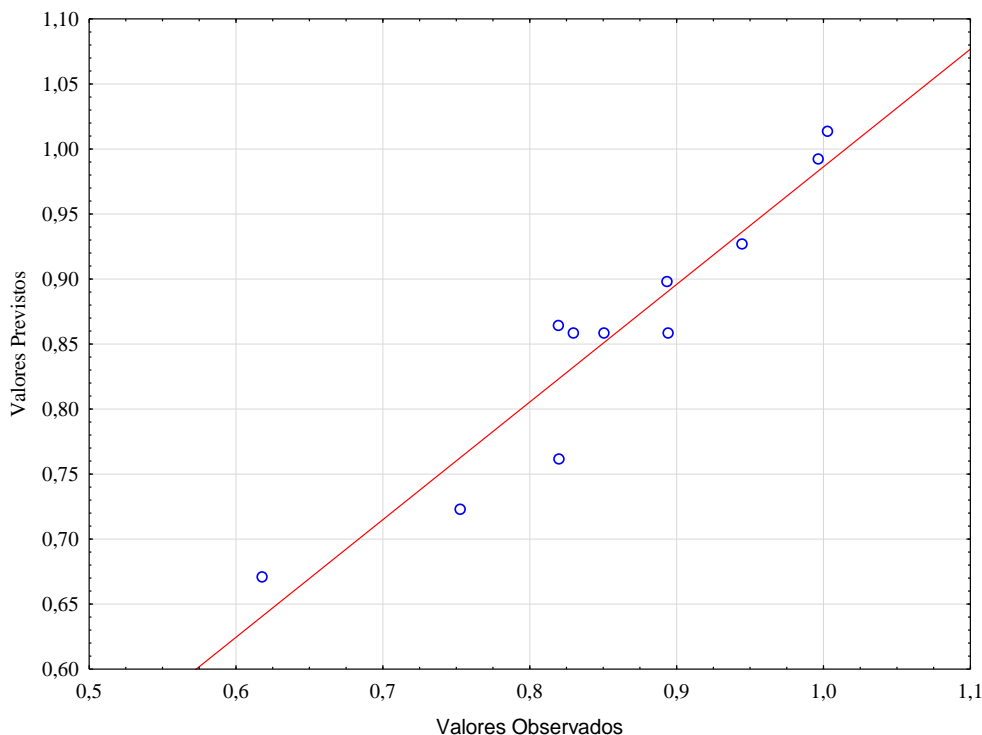
**Tabela 17:** ANOVA para a variável de resposta Rs[BaA-CHY].

	SQ	GL	QM	Fcalculado	Ftabelado
Regressão	0,10362	1	0,10362	45,46	3,36
Resíduo	0,01925	9	0,00214		
Total	0,12287	10			

Os resultados da ANOVA mostram que o valor dos teste F calculado de 45,46 é cerca de 13,5 vezes maior que o valor de F tabelado de 3,36, indicando que o modelo linear de 1ª ordem obtido é estatisticamente significativo para a variável estudada. Assim, nas condições experimentais utilizadas, a resolução cromatográfica de BaA/CHY pode ser predita através da seguinte equação:

$$Rs [BaA-CHY] = 0,86 + 0,12 T \text{ col.} \quad (\text{Eq.: 1})$$

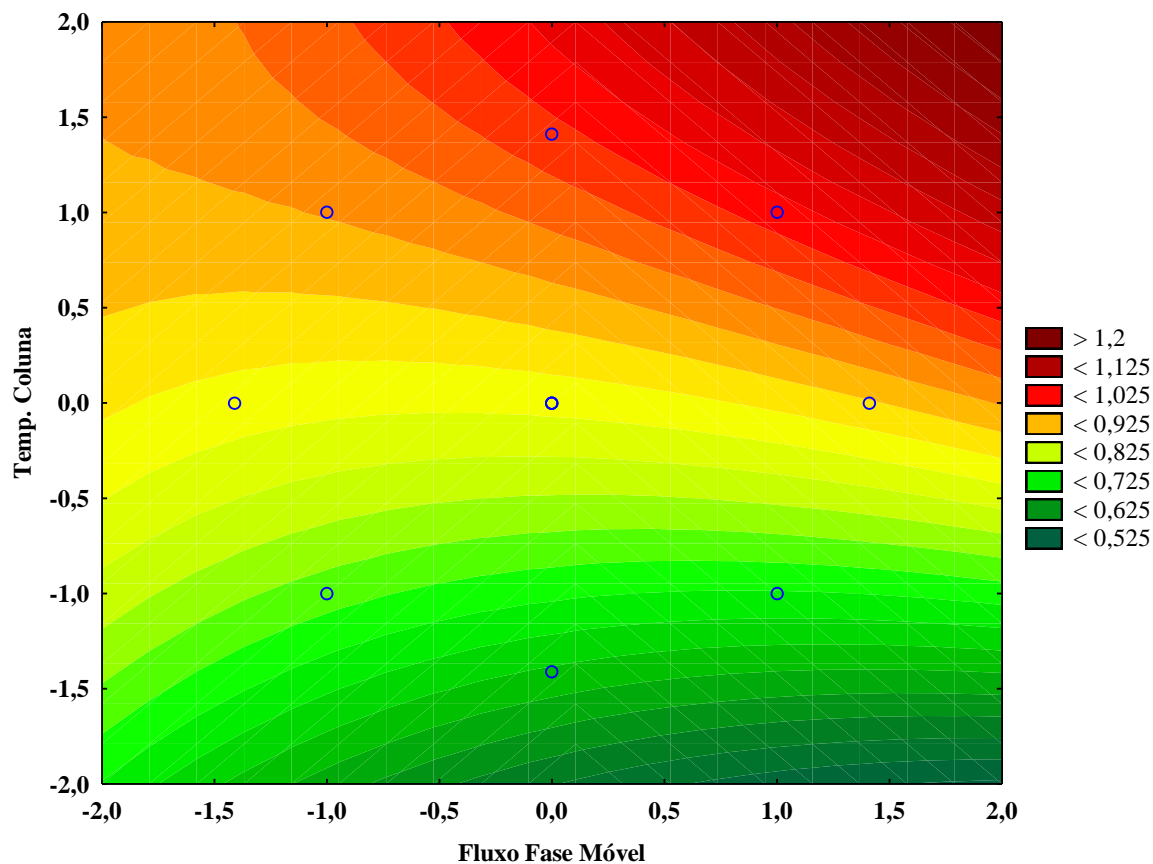
A variação explicada pelo modelo apresentou-se satisfatória, com um  $R^2$  igual a 90,5%, o que pode ser comprovada pela baixa dispersão dos dados no gráfico de valores previstos *versus* valores observados (Figura 32).



**Figura 32:** Gráfico dos valores previstos *versus* valores observados para a variável de resposta Rs[BaA-CHY].

Assim, a partir do modelo proposto na equação 1, obteve-se o gráfico da superfície de resposta para os fatores estudados (Figura 33, 64), evidenciando que as variáveis temperatura da coluna e fluxo da fase móvel, possuem influencia positiva sobre a resolução

cromatográfica de BaA/CHY, demonstrando também que a influência da temperatura da coluna é significativa estatisticamente, enquanto que a influência do fluxo da fase móvel não é.



**Figura 33:** Gráfico das curvas de contorno em função do fluxo de fase móvel e da temperatura da coluna para a variável de resposta  $R_s$ [BaA-CHY].

Os resultados obtidos para a separação de BgP/ICP são mostrados na Tabela 18 (p.65), onde verifica-se que a resolução cromatográfica do par BgP/ICP foi influenciado positivamente pelo fator linear fluxo de fase móvel e negativamente pelo fator linear temperatura da coluna, com 90% de confiança. Isto pode ser verificado na tabela abaixo já que os valores do coeficiente de regressão para esses fatores apresentaram um número positivo (0,068323) e um número negativo (-0,038965), com seus  $p$ -valores  $< 0,10$ , respectivamente.

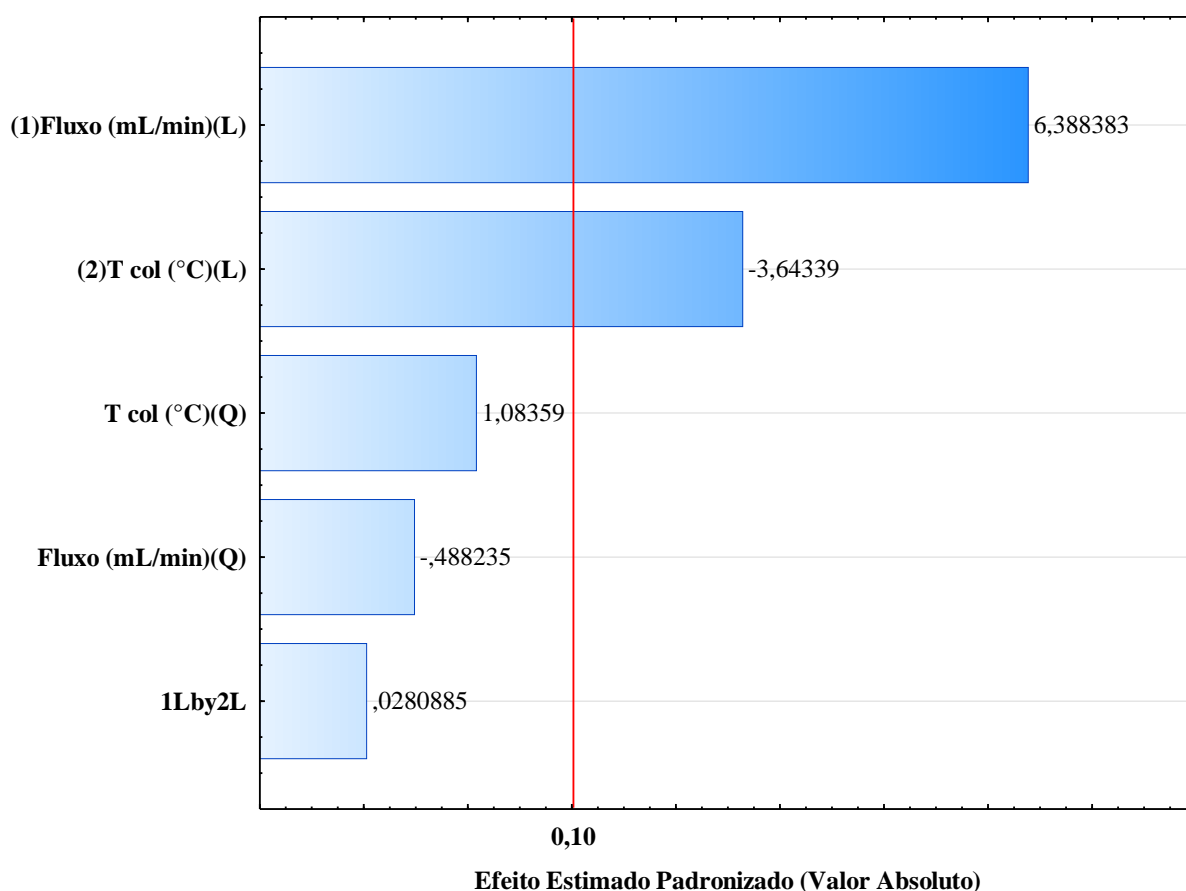
**Tabela 18:** Coeficientes de regressão para a variável de resposta Rs[BgP-ICP].

		$R^2 = 0,91799$						
Fatores		Coeficiente de Regressão	Erro Padrão	t(5)	p-valor	Limite de Conf. -90,%	Limite de Conf. +90,%	
Média		<b>0,751407</b>	<b>0,017438</b>	<b>43,08934</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,706580</b>	<b>0,796233</b>	
(1)Fluxo Móvel(L)	Fase	<b>0,068323</b>	<b>0,010695</b>	<b>6,38838</b>	<b>0,001392</b>	<b>0,040831</b>	<b>0,095814</b>	
Fluxo Móvel(Q)	Fase	-0,006231	0,012762	-0,48823	0,646041	-0,039036	0,026574	
(2)Temp. Coluna(L)		<b>-0,038965</b>	<b>0,010695</b>	<b>-3,64339</b>	<b>0,014851</b>	<b>-0,066457</b>	<b>-0,011474</b>	
Temp. Coluna(Q)		0,013828	0,012762	1,08359	0,328011	-0,018977	0,046633	
1L por 2L		0,000424	0,015102	0,02809	0,978678	-0,038397	0,039246	

(L) = Termo Linear

(Q) = Termo Quadrático

A significância estatística destes termos lineares pode ser comprovada pelo gráfico de Pareto (Figura 34), onde os fatores fluxo da fase móvel e temperatura da coluna apresentaram efeitos padronizados maiores que o valor  $p = 0,10$ .



**Figura 34:** Diagrama de Pareto para os efeitos padronizados para a variável de resposta Rs[BgP-ICP].

Os demais termos foram incorporados resíduo para o cálculo da ANOVA que está apresentado na Tabela 19.

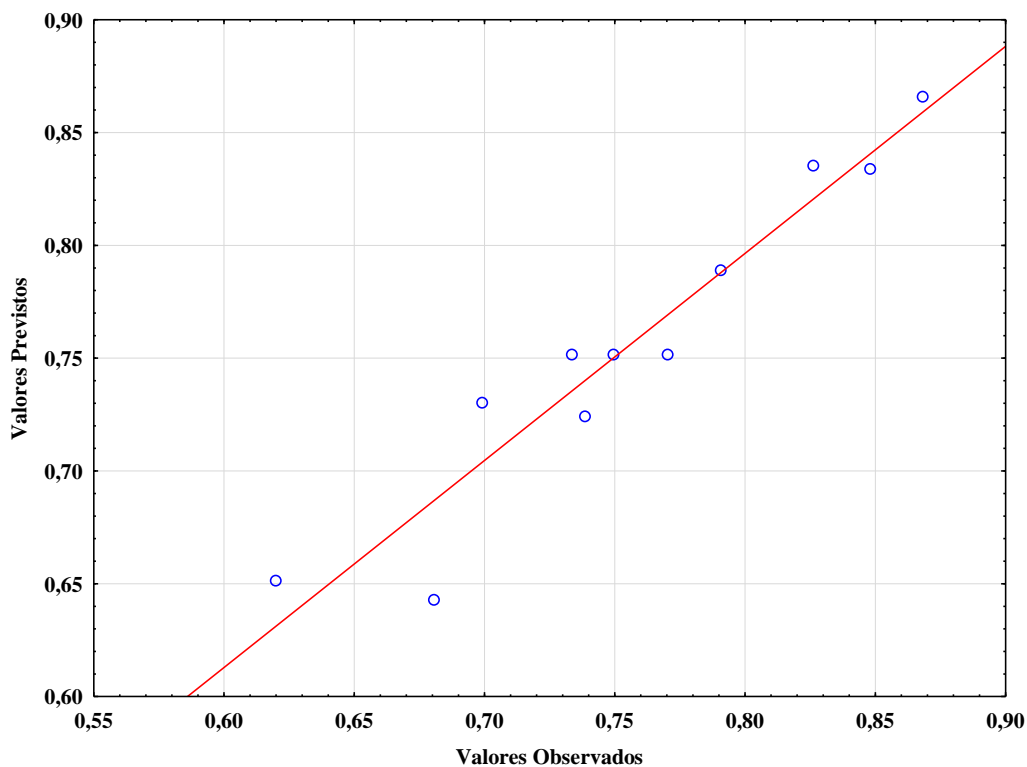
**Tabela 19: ANOVA para a variável de resposta Rs[BgP-ICP] – 1ª otimização.**

	SQ	GL	QM	Fcalculado	Ftabelado
Regressão	0,04934	2	0,02467	31,44	3,11
Resíduo	0,00628	8	0,00078		
Total	0,05562	10			

Os resultados da ANOVA mostram que o valor do teste F calculado de 31,44 é cerca de 10,1 vezes maior que o valor de F tabelado de 3,11 indicando que o modelo não linear de 1ª ordem obtido é estatisticamente significativo para a variável estudada. Assim, nas condições experimentais utilizadas, a resolução cromatográfica de BgP/ICP pode ser predita através da seguinte equação:

$$Rs [BgP-ICP] = 0,75 + 0,07 \text{ Fluxo Fase Móvel} - 0,04 T \text{ col.} \quad (\text{Eq.: } 2)$$

Obtivemos uma resposta satisfatória quanto a variação explicada pelo modelo, com um  $R^2$  igual a 91,8%, o que pode ser comprovada pela baixa dispersão dos dados no gráfico de valores previstos *versus* valores observados (Figura 35).

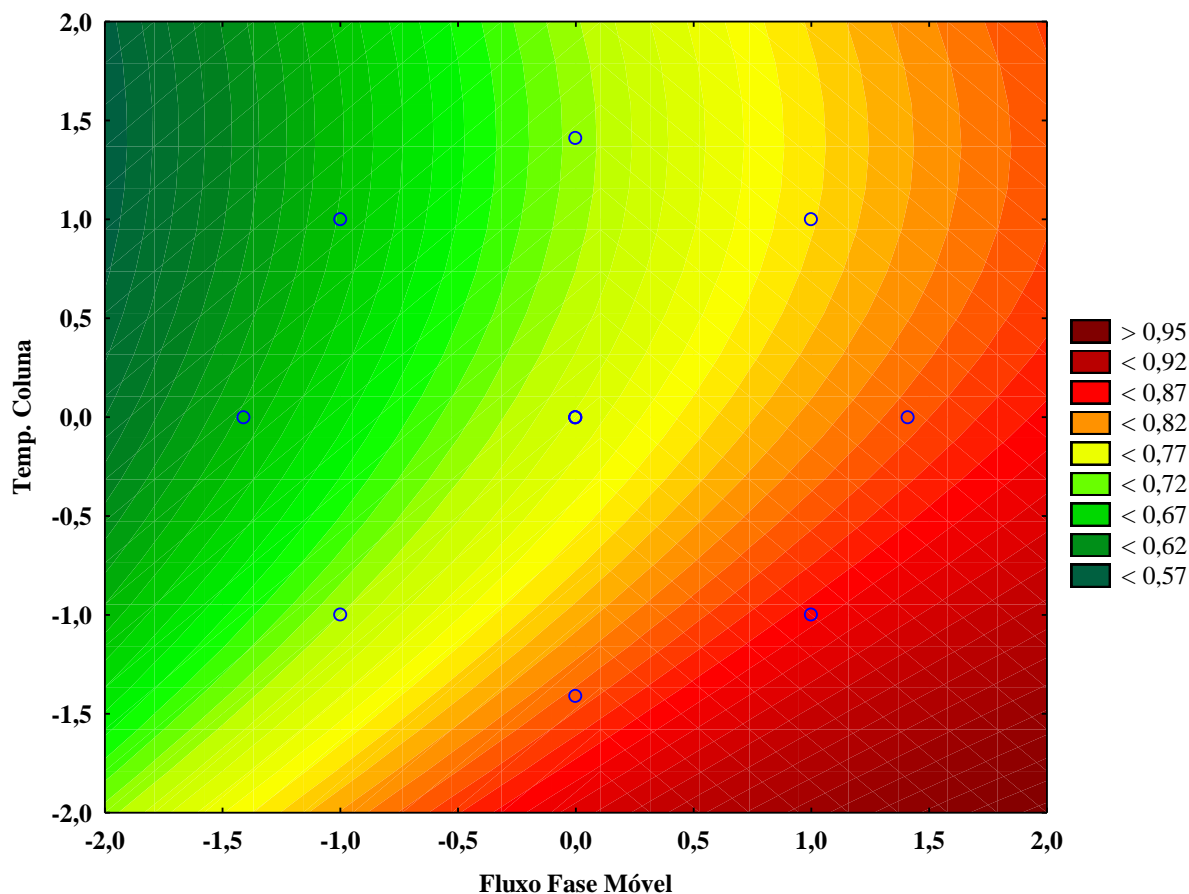


**Figura 35:** Gráfico dos valores previstos *versus* valores observados para a variável de resposta Rs[BgP-ICP].

A partir do modelo proposto pela equação 2 foi obtido o gráfico da superfície de resposta para os fatores estudados (Figura 36), evidenciando que a temperatura da coluna possui influência negativa sobre a resolução cromatográfica de BgP/ICP, enquanto que o fluxo da fase móvel atua positivamente sobre a mesma. Além disso, para o par de isômeros de HPAs estudado e nas condições analíticas usadas, ambos os fatores são significantes estatisticamente.

Após serem efetuados os deslocamentos sobre as respectivas superfícies de resposta para os fatores temperatura de coluna e fluxo de fase móvel que influenciam na separação dos pares BaA/CHY e BgP/ICP, o segundo conjunto de 11 experimentos não pode ser realizado nas condições experimentais calculadas devido à limitação do equipamento de CLAE, pois em algumas das condições cromatográficas utilizadas para a otimização, a pressão interna do equipamento ultrapassou o limite de segurança de 4000 psi, fazendo com que o programa de controle do cromatógrafo interrompesse automaticamente a corrida cromatográfica.

Assim, para a finalização da otimização das condições cromatográficas de temperatura da coluna e de fluxo de fase móvel para a separação de BaA/CHY e BgP/ICP, nas condições analíticas estudadas obteve-se os resultados das funções desejabilidade, que são utilizadas para a otimização experimental em condições de restrição conforme mostrado na Figura 37 (p.68).



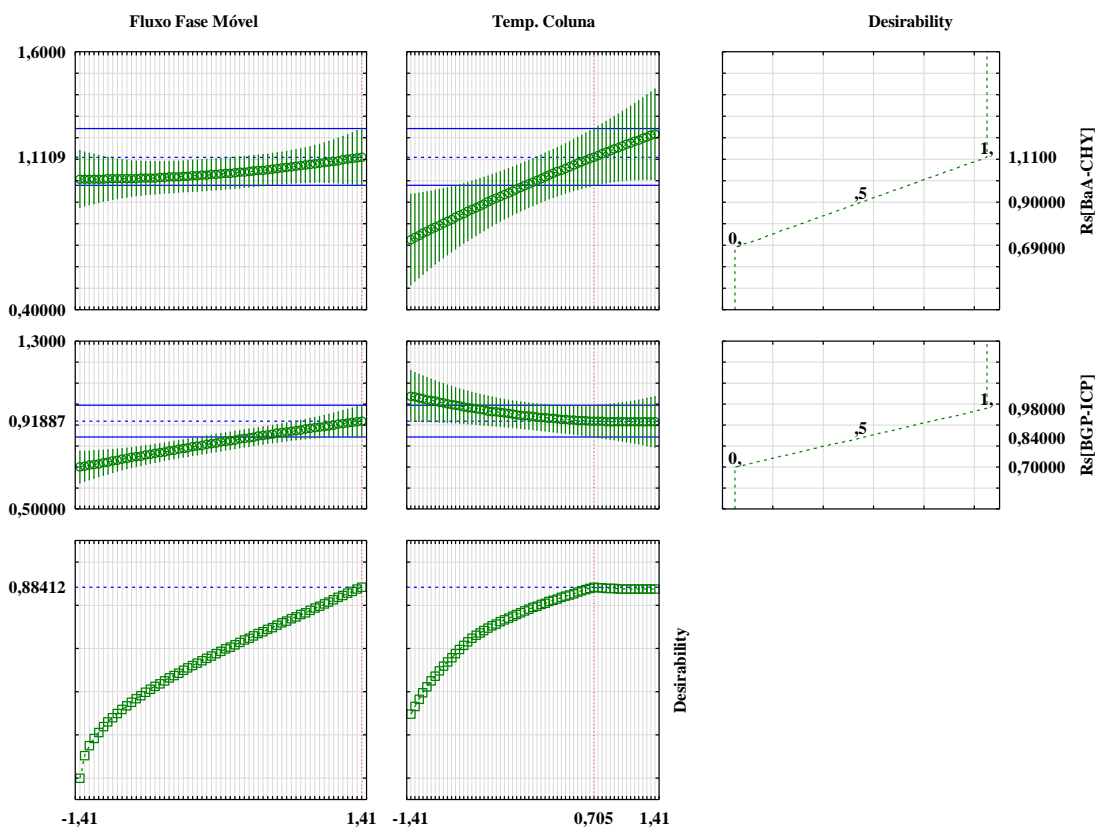
**Figura 36:** Gráfico das curvas de contorno em função do fluxo de fase móvel e da temperatura da coluna para a variável de resposta  $R_s$ [BgP-ICP].

O que se verifica é que o programa usou os dois modelos preditos anteriormente (Eqs.: 1 e 2) sobrepondo os modelos e calculando novos valores experimentais otimizados que satisfaçam ambas as condições descritas pelos modelos preditivos das respectivas equações.

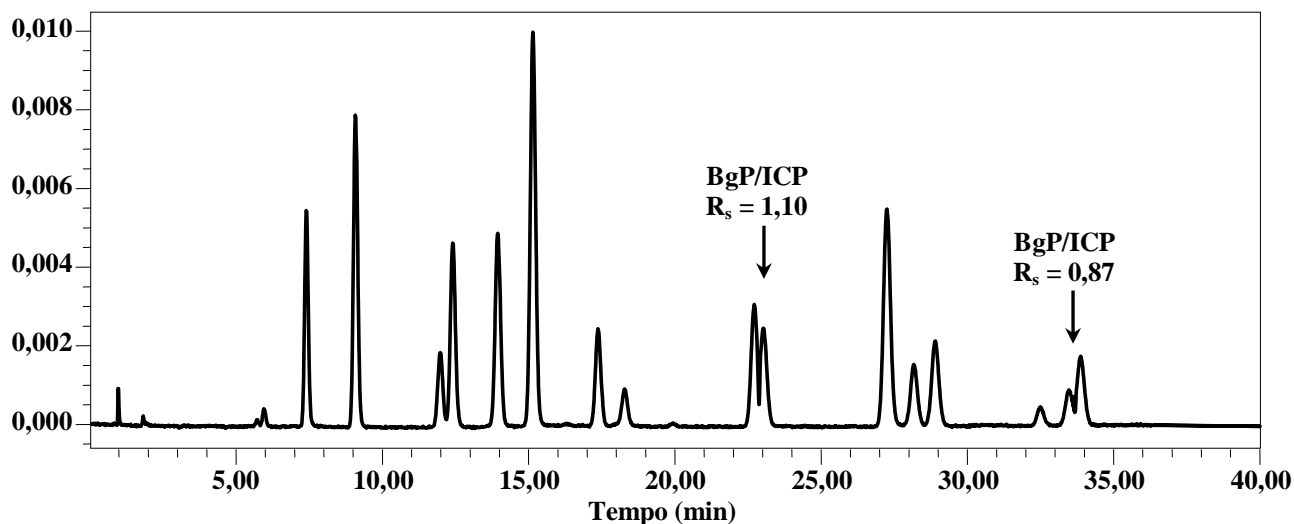
Os novos valores dos fatores experimentais codificados e otimizados obtidos foram 0,705 e 1,41 que correspondem aos valores reais de 40,0°C e 1,50 mL/minuto, respectivamente para as variáveis temperatura da coluna e fluxo da fase móvel.

Utilizando-se estes valores como as condições cromatográficas finais dos experimentos de otimização multivariada obteve-se o cromatograma mostrado na Figura 38 (p.69), onde foi obtida uma melhora nas condições de separação dos HPAs BaA/CHY e BgP/ICP, conseguindo-se valores de resolução de 1,10 e 0,87, respectivamente, porém ainda abaixo quando comparados ao parâmetro de 1,5, considerado satisfatório para a resolução da separação cromatográfica de dois picos adjacentes.

Nas novas condições analíticas utilizadas, os resultados obtidos para os valores da resolução cromatográfica para os pares de isômeros BaA/CHY e BgP/ICP ainda permaneceram abaixo do valor ótimo para este parâmetro cromatográfico (1,5). Assim, foi estabelecido modificar a coluna cromatográfica para proceder à otimização da resolução.



**Figura 37:** Gráficos das funções desejabilidade para as variáveis de resposta  $R_s$ BaA-CHY e  $R_s$ BGP-ICP.



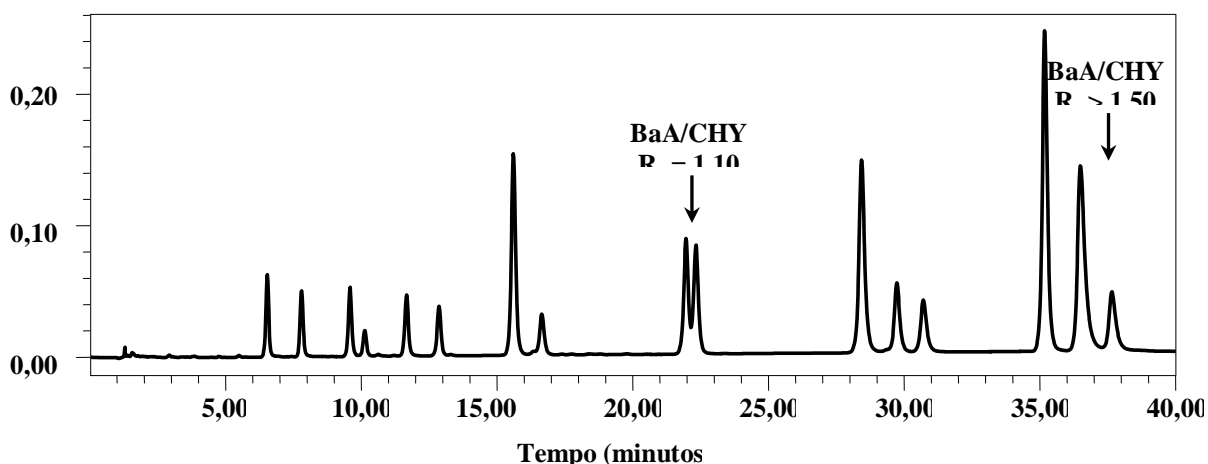
**Figura 38:** Cromatograma final obtido por CLAE-UV para os 16 padrões de HPAs utilizando a coluna cromatográfica Hypersil C<sub>18</sub> (100 x 4,6 mm; 2,4 µm).

#### 4.2.2 Otimização univariada da separação cromatográfica dos HPAs

A escolha da nova coluna cromatográfica foi feita considerando-se a hipótese de que uma coluna com fase estacionária C<sub>30</sub>, sendo mais hidrofóbica por possuir uma cadeia mais longa, teria também uma melhor interação com moléculas apolares volumosas como os HPAs.

Assim, aplicando-se os valores de temperatura de coluna (40°C) e fluxo de fase móvel (1,50 mL/minuto) obtidas na última etapa da otimização multivariada como as condições cromatográficas iniciais com o objetivo de melhorar a separação cromatográfica dos pares críticos de isômeros de HPAs com a coluna cromatográfica C<sub>30</sub> e estudar as melhores condições de separação entre os pares BaA/CHY e BgP/ICP. Os resultados estão mostrados no cromatograma da Figura 39.

Fica evidente que a separação cromatográfica dos isômeros BaA/CHY permaneceu com valor de  $R_s = 1,10$ , entretanto os pares de isômeros BGP e ICP foram adequadamente separados, apresentando valor de  $R_s > 1,5$  o que abre a perspectivas da inédita utilização deste tipo de coluna para separação de substâncias apolares de cadeia curta e volume molecular grande, diferentemente dos carotenoides, até então citados na literatura, e para os quais essa coluna foi inicialmente desenvolvida.

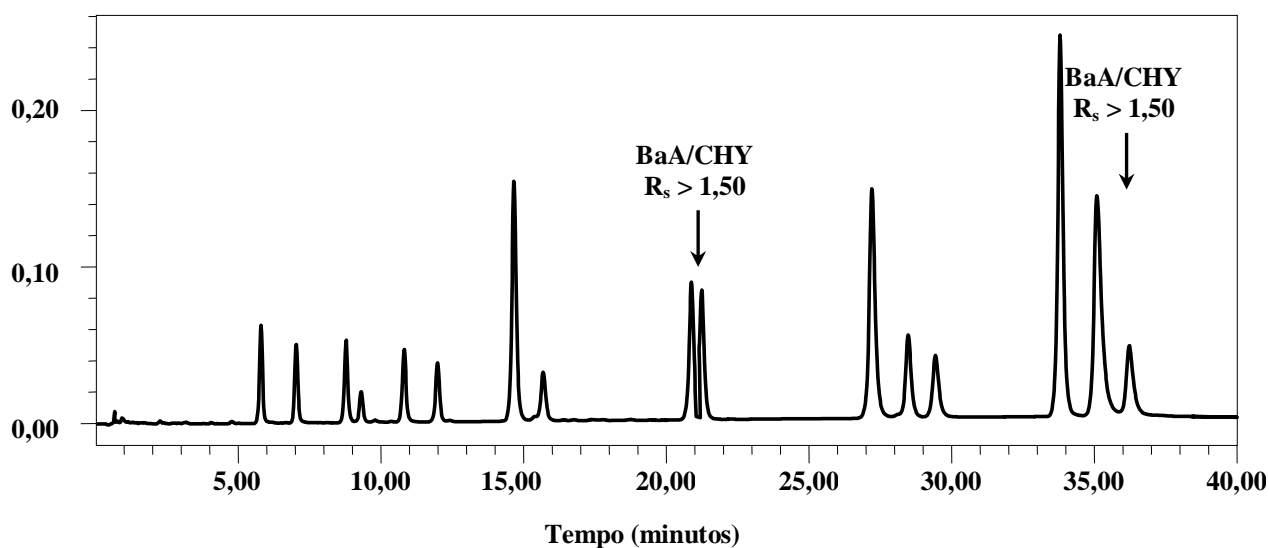


**Figura 39:** Cromatograma obtido por CLAE-UV para os 16 padrões de HPAs utilizando a coluna cromatográfica YMC C<sub>30</sub> (250 x 4,6 mm; 3,0 µm).



Considerando que somente a diminuição da temperatura da coluna seja o fator que influencia a resolução cromatográfica do par de isômeros BaA/CHY, conforme resultado obtido anteriormente através do planejamento experimental multivariado, um valor menor de temperatura da coluna consequentemente ocasionaria uma diminuição da viscosidade da fase estacionária, um aumento da retenção do soluto, um aumento da seletividade da fase estacionária e da resolução da separação.

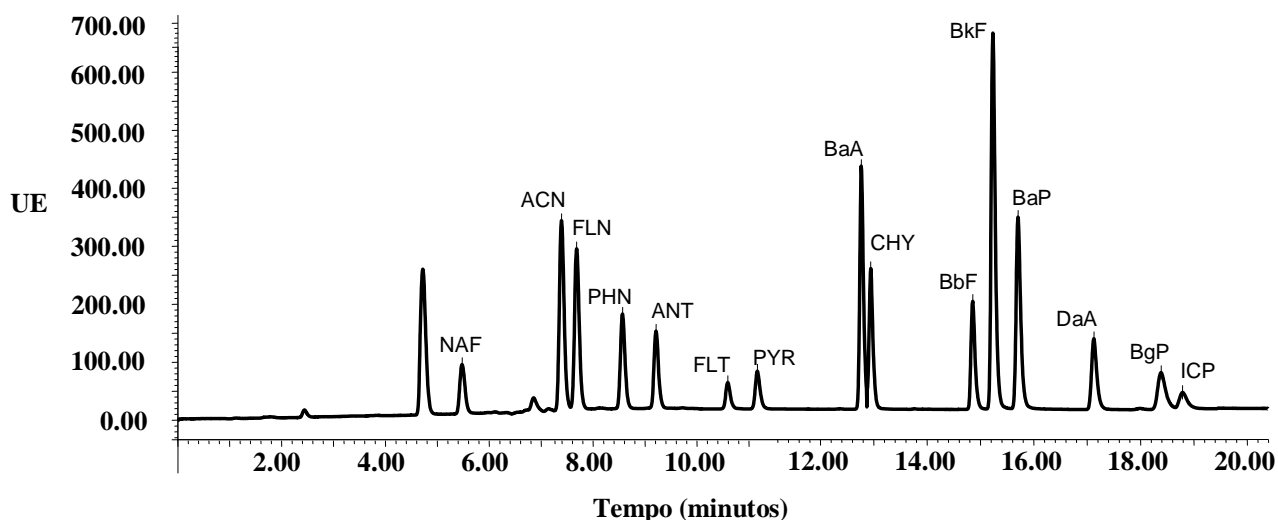
Assim, a temperatura da coluna foi diminuída de 40°C para 35°C, mantendo-se o fluxo de fase móvel igual a 1,50 mL/minuto, conseguindo-se um excelente resultado na separação dos pares de isômeros BaA e CHY com resolução maior que 1,5, conforme mostrado no cromatograma da Figura 40.



**Figura 40:** Cromatograma final obtido por CLAE-UV para os 16 padrões de HPAs utilizando a coluna cromatográfica YMC C<sub>30</sub> (250 x 4,6 mm; 3,0 µm).

Outro procedimento foi otimizar o tempo total de corrida cromatográfica que era de 40 minutos, o qual tem a desvantagem de gerar maiores gastos de reagentes, maior produção de resíduos e consequentemente maior custo da análise, tentou-se amenizar estas desvantagens, diminuindo o tempo total da corrida cromatográfica, aumentando-se o fluxo da fase móvel para 1,70 mL/minuto. Entretanto, mais uma vez a pressão interna do equipamento ultrapassou o limite de segurança de 4000 psi, fazendo com que o programa de controle do cromatógrafo interrompesse automaticamente a corrida cromatográfica.

Este obstáculo foi superado, depois de várias procedimentos experimentais, modificando-se a extensão do gradiente linear de solvente da fase móvel, que inicialmente era de 40 a 100% de acetonitrila em 20 minutos, para um gradiente linear de 60 à 100% de acetonitrila em 13 minutos, com fluxo de fase móvel de 1,40 mL/minutos, seguido de fluxo de fase móvel isocrático até 20 minutos em acetonitrila 100%.



**Figura 41:** Cromatograma obtido por CLAE-UV-FLC para os padrões de HPAs utilizando a coluna cromatográfica YMC C<sub>30</sub> (250 x 4,6 mm; 3,0 µm).

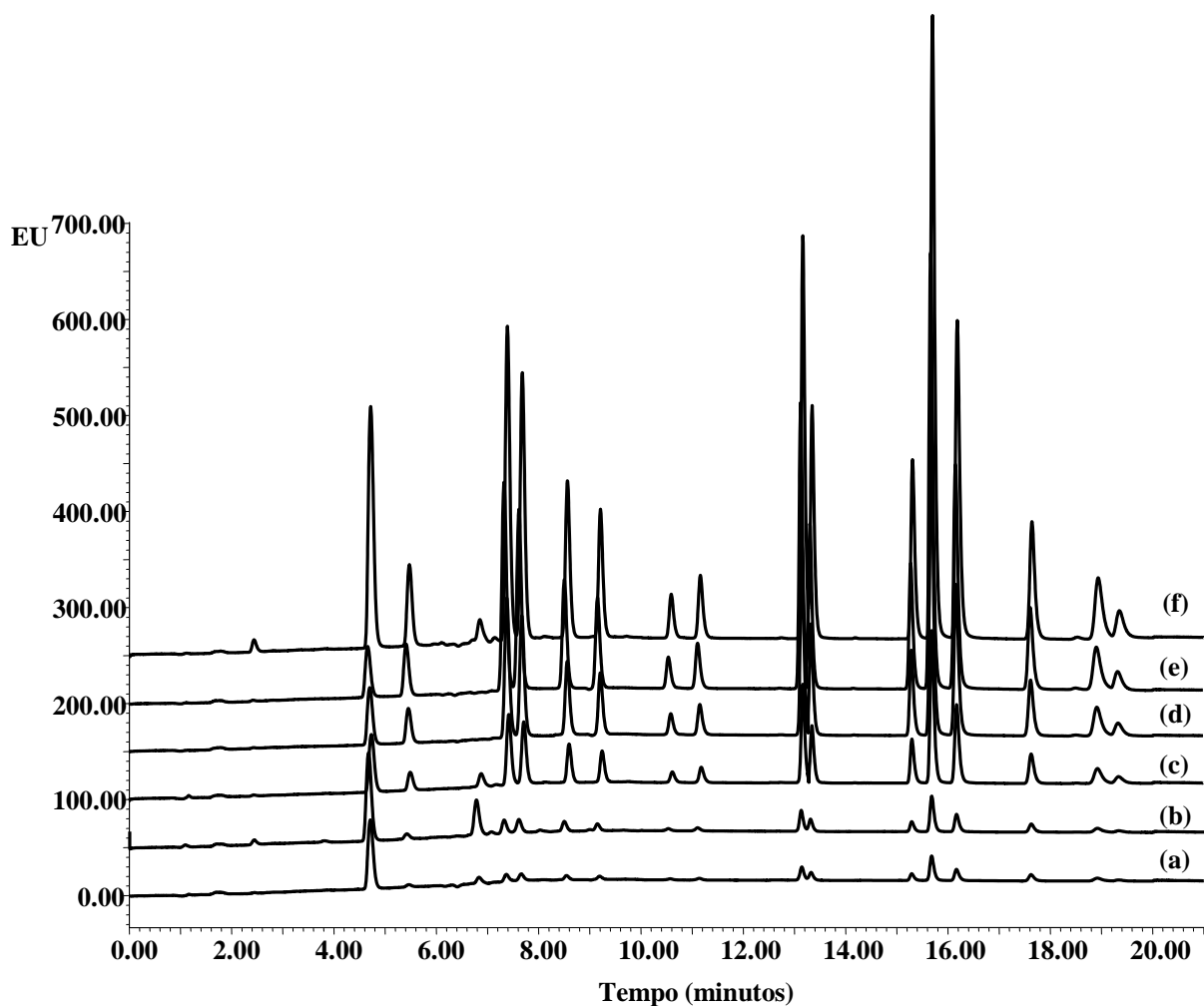
Como resultado a pressão interna do sistema cromatográfico aos 13 minutos de corrida diminuiu para 2000 psi, conseguindo-se que a pressão de trabalho permanecesse num patamar de segurança tal que, o cromatógrafo não desligasse, permitindo que houvesse menores variações da pressão interna do equipamento favorecendo assim, uma melhor performance para o desenvolvimento do procedimento experimental.

Logo, o processo de separação cromatográfica para os 16 isômeros de HPAs foi iniciado com um fluxo de 1,40 mL/minuto, até 13 minutos em gradiente linear de 60 a 100% de acetonitrila, seguido de um fluxo de fase móvel isocrático de 1,70 mL/minuto em 100% de acetonitrila com temperatura de coluna de 35°C, obtendo-se um sucesso na separação cromatográfica destes contaminantes com  $R_s > 1,5$  num tempo total de corrida de 20 minutos, representado pelo cromatograma da Figura 41.

#### 4.2.3 Curvas analíticas dos padrões de HPAs

As curvas de calibração individuais para a quantificação dos HPAs por padronização externa foram construídas graficamente como função da área obtida pela integração de cada um dos respectivos picos cromatográficos de cada contaminante e a concentração dos padrões analisados, em µg/mL. Cada uma das concentrações utilizadas para os padrões de HPAs foram injetadas em triplicata, nas condições cromatográficas descritas no item 3.6.4 (p.51).

Os cromatogramas obtidos para cada um dos 6 níveis de concentrações usadas para a construção das curvas analíticas são mostrados na Figura 42 (p.72).



**Figura 42:** Cromatograma obtido por CLAE-UV-FLC para a construção das curvas analíticas dos padrões de HPAs por padronização externa, nas concentrações de: (a) 0,50 µg/kg, (b) 1,00 µg/kg, 5,00 µg/kg, 10,00 µg/kg, 15,00 µg/kg e 20,00 µg/kg.

Os resultados encontrados para os valores dos parâmetros de confiabilidade para as curvas analíticas dos isômeros de HPAs são sumarizados na Tabela 20 (p.73).

Os valores do coeficiente de regressão ajustado ( $R^2$ ) variaram no intervalo de 0,9863 a 0,9983, indicando que os modelos matemáticos utilizados para a construção de cada uma das curvas de calibração conseguem explicar adequadamente cerca de 98,00 a 99,00% das variações dos sinais analíticos de cada um dos picos cromatográficos em função das concentrações de padrão utilizadas, evidenciando uma excelente correlação quando comparado com o parâmetro de referência citados por INMETRO (2011), que é de 90,00%.

Os valores elevados para a estatística de Fisher (F), maior que o valor crítico ( $F_{\text{crítico}} = 4,49$ ), indicam a homocedasticidade para cada conjunto de dados utilizados para a construção das curvas de calibração de cada contaminante, confirmando a homogeneidade de variância para os mesmos.

A linearidade da resposta do detector para as variações de sinal observadas em cada um dos 6 níveis de concentração usadas para a construção das curvas de calibração de cada

contaminante foi confirmada através da observação padrão aleatório dos valores de resíduos na faixa de trabalho utilizada, nos gráfico do Anexo B (p.95) , evidenciando um sistema de pontos livre de tendências e confirmando a linearidade do método.

**Tabela 20:** Resultados dos cálculos de confiabilidade das as curvas analíticas para a quantificação dos HPAs por padronização externa.

HPAs	Equação da reta	R <sup>2</sup>	Fcalculado	LOD (µg/Kg)	LOQ (µg/Kg)
Naftaleno	$y = 436889x - 33448$	0,9942	2012,64	0,2526	0,7656
Acenafteno	$y = 1,0 \times 10^6 x - 67719$	0,9960	2088,51	0,2235	0,6772
Fluoreno	$y = 789565 x + 3187,8$	0,9945	2903,33	0,0133	0,0404
Fenantreno	$y = 680289 x - 48919$	0,9910	1915,54	0,2373	0,7191
Antraceno	$y = 2,0 \times 10^6 x - 169479$	0,9921	1690,92	0,2546	0,7715
Fluoranteno	$y = 229648 x - 20391$	0,9976	30,35	0,2930	0,8879
Pireno	$y = 171824 x + 3546,5$	0,9982	8887,58	0,0681	0,2064
Benzo(a)antraceno	$y = 919796 x + 37463$	0,9973	6012,18	0,1344	0,4073
Criseno	$y = 602351 x + 64308$	0,9983	8598,12	0,3523	1,0676
Benzo(b)fluoranteno	$y = 765800 x + 878,9$	0,9972	5739,36	0,0038	0,0115
Benzo(k)fluoranteno	$y = 764425 x + 19787$	0,9974	6996,33	0,0854	0,2588
Benzo(a)pireno	$y = 1,0 \times 10^6 x - 1069,1$	0,9937	2282,41	0,0035	0,0107
Dibenzo(a,h)antraceno	$y = 534815 x + 1578,3$	0,9970	48,07	0,0097	0,0295
Benzo(ghi)perileno	$y = 394140 x - 7254,5$	0,9924	921,27	0,0607	0,1841
Indeno(1,2,3-cd)pireno	$y = 280683 x + 601,66$	0,9863	185,75	0,0071	0,0214

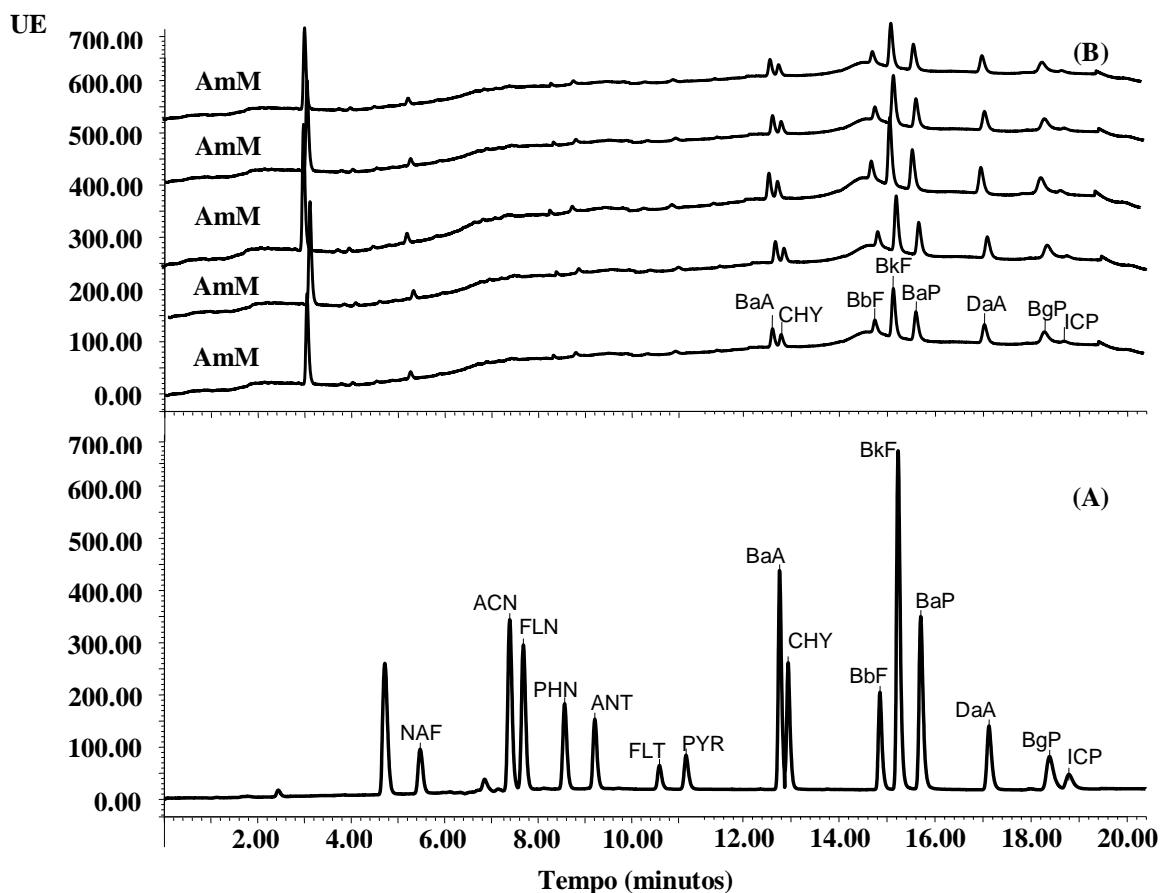
Os respectivos valores de LOD e LOQ variaram de 0,0035 a 0,3523 µg/Kg e de 0,0107 a 0,9576 µg/Kg estão de acordo com as orientações da Resolução 835/2011 da CE.

#### 4.2.4 Análise cromatográfica de HPAs nas amostras de pescado

##### 4.2.4.1 Amostras de mexilhão

Foram analisadas 5 amostras de mexilhão. Após injeção individual dos 5 extratos das amostras foram obtidos cromatogramas com perfis semelhantes o que está demonstrado na Figura 43, (p.74)), porém no intervalo de tempo de retenção de 4 a 12 minutos não conseguimos identificar a presença dos HPAs de baixo peso molecular, contendo 2, 3 e 4 anéis aromáticos conjugados. Por outro lado obtivemos resultados positivos para os HPAs de peso molecular elevado contendo 5 ou 6 anéis aromáticos conjugados, sendo identificados qualitativamente o benzo(a)antraceno (BaA), o criseno(CHY), o benzo(b)fluoranteno (BbF), o

benzo(k)fluoranteno (BkF), o benzo(a)pireno (BaP), o dibenzo(a,h)antraceno(DaA), o benzo(g,h,i)perileno (BgP) e o indeno(cd-1,2,3)pireno (ICP).



**Figura 43:** Cromatograma obtido por CLAE-UV-FLC (coluna cromatográfica YMC C<sub>30</sub>, 250 x 4,6 mm; 3,0 µm). (A) padrões 15 µg/Kg e (B) amostra (mexilhão).

Utilizando as curvas de calibração analítica (Anexo A, p.91) foram determinados os valores para os limites de detecção e de quantificação, verificando-se que os mesmos estão dentro dos parâmetros aceitos pela Comunidade Europeia  $LOD \leq 0,3 \mu\text{g/Kg}$  e  $LOQ \leq 0,9 \mu\text{g/Kg}$  para cada HPA (CE - Resolução 835/2011), ressaltando que a utilização dos parâmetros da CE foram escolhidos neste trabalho por não existir no Brasil uma legislação específica que defina os limites máximos de concentração para esses contaminantes, nas matrizes de amostras analisadas.

Outra informação obtida através das curvas analíticas foram as concentrações individuais dos 8 contaminantes em cada um dos 5 extratos das amostras de mexilhão estudadas. As respectivas concentrações calculadas encontram-se listadas na Tabela 21 (p.75).

**Tabela 21:** Concentrações de HPAs em amostras de mexilhões processados e congelados comercializados em supermercados do Rio de Janeiro.

HPAs	Concentração em µg/Kg					LOD	LOQ
	Am M1	Am M2	Am M3	Am M4	Am M5	(µg/Kg)	(µg/Kg)
<b>BaA</b>	<b>0,8356</b>	<b>0,9232</b>	<b>0,9521</b>	<b>0,9407</b>	<b>0,8426</b>	<b>0,1344</b>	<b>0,4073</b>
<b>CHY</b>	<b>0,7283</b>	<b>0,8201</b>	<b>0,8665</b>	<b>0,7702</b>	<b>0,7262</b>	<b>0,3523</b>	<b>1,0676</b>
<b>BbF</b>	<b>0,5302</b>	<b>0,6846</b>	<b>0,6519</b>	<b>0,6205</b>	<b>0,6019</b>	<b>0,0038</b>	<b>0,0115</b>
BkF	1,9346	2,1895	1,2946	2,1561	2,0252	0,0854	0,2588
<b>BaP</b>	<b>0,7420</b>	<b>0,8457</b>	<b>0,6560</b>	<b>0,8969</b>	<b>0,8701</b>	<b>0,0035</b>	<b>0,0107</b>
DaA	0,8866	1,0200	1,1121	0,9222	0,9777	0,0097	0,0295
BgP	0,8544	0,9547	0,8823	0,7753	0,8177	0,0607	0,1841
ICP	0,3817	0,4009	0,4258	0,3548	0,3619	0,0071	0,0214

Verificou-se que os teores calculados das respectivas concentrações individuais dos 8 HPAs, estão acima dos valores encontrados para os limites de detecção e quantificação, indicando que os mesmos podem ser considerados para a quantificação analítica destes contaminantes.

Comparando nossos resultados com os valores de concentração de HPAs indicados pela Resolução 835/2011 da CE para os Limites máximos de contaminantes (LMC) permitidos para BaP de 5µg/Kg e a soma de 4 HPAs (BaA, CHY, BbF e BaP) de 30µg/Kg em moluscos bivalves frescos, resfriados ou congelados listados na Tabela 22. Pode-se concluir que as amostras de mexilhão analisadas possuem concentrações de contaminantes menores que os limites indicados pela CE, podendo ser consumidos por seres humanos.

**Tabela 22:** Concentrações de HPAs em amostras de mexilhões processados e congelados comercializados em supermercados do Rio de Janeiro.

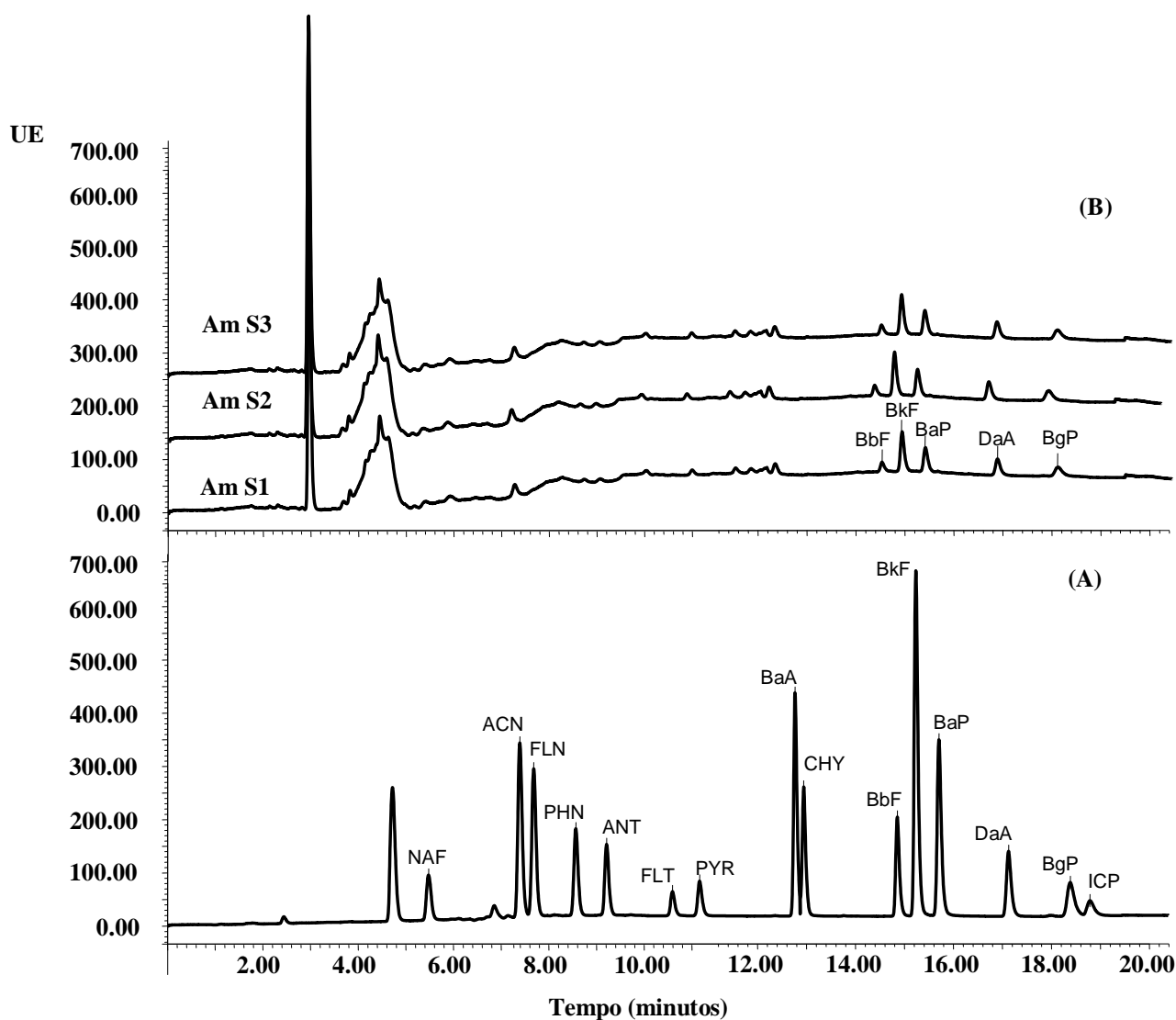
Amostra	Concentração em µg/Kg	
	BaP	Σ (BaA+CHY+BbF+BaP)
Am M1	<b>0,7420</b>	<b>2,8360</b>
Am M2	<b>0,8457</b>	<b>3,2737</b>
Am M3	<b>0,6560</b>	<b>3,1266</b>
Am M4	<b>0,8969</b>	<b>3,2284</b>
Am M5	<b>0,8701</b>	<b>3,0407</b>

#### 4.2.4.2 Amostras de salmão defumado

Foram analisadas 3 amostras de salmão defumado congelado e após injeção individual dos 3 extratos das amostras, obteve-se cromatogramas com perfis semelhantes, conforme Figura 44 (p.76). Observa-se, porém, que no intervalo de tempo de retenção entre 4 e 14 minutos, que apesar de utilizarmos um detector de fluorescência multivariado com uma programação de valores de excitação e emissão dos diferentes comprimentos de onda, contribui para elevar e regular automaticamente a sensibilidade para os diferentes isômeros de HPAs, a presença de sinais cromatográficos que não puderam ser distinguidos entre analitos de interesses (HPAs) e contaminantes presentes nos extratos das amostras, que por apresentarem concentrações muito baixas nem mesmo esse tipo de detector pode ajudar na identificação.

Por outro lado obtivemos resultados positivos para os HPA de peso molecular elevado contendo 5 ou 6 anéis aromáticos conjugados, sendo identificados qualitativamente o benzo(b)fluoranteno (BbF), o benzo(k)fluoranteno (BkF), o benzo(a)pireno (BaP), o dibenzo(a,h)antraceno(DaA) e o benzo(g,h,i)perileno (BgP).

Utilizando as curvas de calibração analítica (Anexo A, p.91) foram determinados os valores para os limites de detecção e de quantificação, verificando-se que os mesmos estão dentro dos parâmetros aceitos pela Comunidade Europeia  $LOD \leq 0,3 \mu\text{g/Kg}$  e  $LOQ \leq 0,9 \mu\text{g/Kg}$  para cada HPA (CE - Resolução 835/2011), ressaltando que a utilização dos parâmetros da CE foram escolhidos neste trabalho por não existir no Brasil uma legislação específica que defina os limites máximos de concentração para esses contaminantes, nas matrizes de amostras analisadas.



**Figura 44:** Cromatograma obtido por CLAE-UV-FLC (coluna cromatográfica YMC C<sub>30</sub>, 250 x 4,6 mm; 3,0  $\mu\text{m}$ ). (A) padrões 15  $\mu\text{g/Kg}$  e (B) amostras de salmão defumado.

Outra informação obtida através das curvas analíticas foram as concentrações individuais de 5 contaminantes em cada um dos 3 extratos das amostras de salmão defumado estudadas. As concentrações de BaA e CHY não puderam ser calculadas por estarem em concentrações abaixo dos limites de detecção e do limite de quantificação. Como os sinais destes dois contaminantes poderiam encontrar-se na região de 4 a 14 minutos, estes não puderam ser detectados pelas mesmas razões descritas anteriormente. Assim utilizou-se como critério analítico não ausenta-los da amostra e deixa-los como possibilidade analítica abaixo dos respectivos LOD e LOQ determinados através das curvas analíticas. As respectivas concentrações calculadas encontram-se listadas na Tabela 23.

**Tabela 23:** Concentrações de HPAs em amostras de salmão defumado, congelados, comercializados em supermercados do Rio de Janeiro.

HPAs	Concentração em µg/Kg				
	Am S1	Am S2	Am S3	LOD (µg/Kg)	LOQ (µg/Kg)
<b>BaA</b>	< LOD e LOQ	< LOD e LOQ	< LOD e LOQ	<b>0,1344</b>	<b>0,4073</b>
<b>CHY</b>	< LOD e LOQ	< LOD e LOQ	< LOD e LOQ	<b>0,3523</b>	<b>1,0676</b>
<b>BbF</b>	<b>1,1599</b>	<b>1,1265</b>	<b>1,0278</b>	<b>0,0038</b>	<b>0,0115</b>
BkF	0,7234	0,7185	0,6038	0,0854	0,2588
<b>BaP</b>	<b>0,4505</b>	<b>0,4020</b>	<b>0,3809</b>	<b>0,0035</b>	<b>0,0107</b>
DaA	0,7316	0,6681	0,5557	0,0097	0,0295
BgP	0,2640	2,5052	0,0420	0,0607	0,1841

Comparando nossos resultados (Tabela 24) com os valores de concentração de HPAs indicados pela Resolução 835/2011 da CE para os Limites máximos de contaminantes (LMC) permitidos para BaP de 2µg/Kg e a soma de 4 HPAs (BaA, CHY, BbF e BaP) de 12µg/Kg em moluscos bivalves frescos, resfriados ou congelados, pode-se concluir que as amostras de salmão defumado analisadas possuem concentrações de contaminantes menores que os limites indicados pela CE, podendo ser consumidos por seres humanos.

**Tabela 24:** Concentrações de HPAs em amostras de salmão defumado, congelados, comercializados em supermercados do Rio de Janeiro.

Amostra	Concentração em µg/Kg	
	BaP	Σ (BaA+CHY+BbF+BaP)
Am S1	<b>0,4505</b>	<b>1,6104</b>
Am S2	<b>0,4020</b>	<b>1,5285</b>
Am S3	<b>0,3809</b>	<b>1,4087</b>



## 5 CONCLUSÕES

As concentrações de HPAs encontradas no presente estudo evidenciam um nível de contaminação baixo nas amostras de mexilhão e salmão defumado analisadas, indicando que os mesmos estão seguros para serem consumidos sem riscos de intoxicação aguda para a saúde humana.

Os parâmetros de confiabilidade analítica apresentaram excelentes resultados para método de separação cromatográfica proposto, com seus respectivos limites de detecção de quantificação abaixo dos valores limites estabelecidos pela Resolução 835/2011 da Comunidade Européia.

Ao longo das últimas décadas, o aumento da versatilidade e aplicabilidade da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), deve-se ao desenvolvimento de novas fases estacionárias para a uso da técnica em fase reversa, o que tem permitido o seu emprego para a separação de substância de polaridade intermediária com valores de resolução adequada.

As ferramentas quimiométricas de DCCR, RSM e desejabilidade, utilizadas para a otimização da separação cromatográfica dos pares críticos de HPAs, mosntraram aplicabilidade satisfatória e excelentes resultados, nas condições analíticas empregadas, demonstrando a robustez dessa ferramenta estatística.

O uso da coluna C<sub>30</sub> mostrou ser uma alternativa inovadora para ser utilizada na separação cromatográfica concomitante dos 16 isômeros de HPAs, indicando que por possuir maior hidrofobicidade, este tipo de coluna também pode ser utilizada para a análise de contaminantes apolares que possuam grande volume molecular (“bulky”), em amostras de alimentos.

O processamento utilizado no preparo para comercialização de mexilhões e salmão defumado não é capaz de eliminar a contaminação de HPAs, mostrando a necessidade do constante monitoramento destes contaminantes e o desenvolvimento de procedimentos que permitam a produção de pescado dentro de normas de segurança sanitária adequadas.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALAEJOS, M. S., PINO, V. & AFONSO, A. M. Metabolism and toxicology of heterocyclic aromatic amines when consumed in diet: influence of the genetic susceptibility to develop human câncer. A review. **Food Research International**, v.4, n.41, p327-340, 2008.
- ALAEJOS, M. S., PINO, V., & AFONSO, A. M. Metabolism and toxicology of heterocyclic aromatic amines when consumed in diet: Influence of the genetic susceptibility to develop human cancer. A review. **Food Research International**, v.41, n.4, p.327–340, 2008.
- ALARCON, F *et al.*. Screening of edible oils for polycyclic aromatic hydrocarbons using microwave-assisted liquid-liquid and solid phase extraction coupled to one- to three-way fluorescence spectroscopy analysis. **Talanta**, v.100, p.439-446, 2012.
- ALARCON, F *et al.* Feasibility of the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in edible oils via unfolded partial least-squares/residual bilinearization and parallel factor analysis of fluorescence excitation emission matrices. **Talanta**, v.103, p.361-370, 2013
- ANDRADE-EIROA, A.; DIEVART, P.; DAGAUT, P. Improved optimization of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) mixtures resolution in reversed-phase high-performance liquid chromatography by using factorial design and response surface methodology. **Talanta**, v. 81, n.1-2, p. 265-274, 2010.
- ANITESCU, G.; TAVLARIDES, L. L. Supercritical extraction of contaminants from soil and sediments. **Journal of Supercritical Fluids**, v.38, n.2, p.167-180, 2006.
- ANVISA. Agência Nacional De Vigilância Sanitária. **Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos**. Resolução RE n° 899 de 29/05/2003.
- ANVISA. Agência Nacional De Vigilância Sanitária. **Regulamento técnico sobre aditivos aromatizantes**. Resolução RE n° 2 de 15/01/2007.
- ATSDR. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). **Case Studies in Environmental Medicine: Toxicity of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs)**. 2011, 68p.
- BARRO, R. *et al.* Analysis of industrial contaminants in indoor air: Part 1. Volatile organic compounds, carbonyl compounds, polycyclic aromatic hydrocarbons and polychlorinated biphenyls. **Journal of Chromatography A**, v.1216, p.540-566, 2009.
- BIANCHI, F. *et al.* Use of experimental design for the purge-and-trap-gas chromatography-mass spectrometry determination of methyl tert.-butyl ether, tert.-butyl alcohol and BTEX in groundwater at trace level. **Journal of Chromatography A**, v.975, n.1, p.113-121, 2002.
- BEZERRA, M. A. *et al.* Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. **Talanta**, v.76, p.965-977, 2008

BOBEDA, C.R.R.; GODOY, R. L. O.; PACHECO, S.; PACHECO, S.; BORGUINI, R. G. ; TORQUILHO, H. S.. Avaliação da presença de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) em Amostras de Mexilhões importados do Chile. **Higiene Alimentar** , v.27, p.2174-2178, 2013.

BORGES, E. M.; BOTTOLI, C; B. G.; COLLINS, C. H. Possibilidades e limitações no uso da temperatura em cromatografia líquida de fase reversa. **Química Nova**, v.33, n.4, p.945-953, 2010.

BORTOLATO, S. A.; ARANCIBIA, J. A.; ESCANDAR, G. M. A novel application of nylon membranes to the luminescent determination of benzo[a]pyrene at ultra trace levels in water samples. **Analytica Chimica Acta**, v.613, n.2, p.218-227, 2008.

BOURDAT-DESCHAMPS, M.; DAUDIN, J. J.; BARRIUSO, E. An experimental design approach to optimise the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons from rainfall water using stir bar sorptive extraction and high performance liquid chromatography-fluorescence detection. **Journal of Chromatography A**, v.1167, n.2, p.143-153, 2007.

BOX, G. E. P.; DRAPER, N. R.. **Empirical Model Building and Response Surfaces**. 2ª ed. New York, NY.:John Wiley and Sons Inc., 1987, 543p.

BRACHET, A. *et al.*. Optimisation of accelerated solvent extraction of cocaine and benzoylecgonine from coca leaves. **Journal Of Separation Science**, v.24, n.10, p.865-873 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 2914 de 12/12/2011. **Procedimentos de controle de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade**, 2011, 38p.

BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura. **Boletim estatístico da pesca e aquicultura: Brasil 2010**. Brasília, 2012, 129p.

BRERETON, R. G.. **Chemometrics: data analysis for the laboratory and chemical plant**. 3ª ed. Chichester, UK.: John Wiley and Sons Inc., 2003, 407p.

BUCO, S. *et al.*. An experimental design approach for optimizing polycyclic aromatic hydrocarbon analysis in contaminated soil by pyrolyser-gas chromatography-mass spectrometry. **Environmental Research**, v.104, n.2, p.209-215, 2007.

BURNS, D.T.; DANZER, K.; TOWNSHEND, A. Use of the terms recovery and apparent recovery in analytical procedures: IUPAC recommendations 2002. **Pure and Applied Chemistry**, v.74, n.11, p.2201-2205, 2002

CALADO, V.; MONTGOMERY, D. **Planejamento de experimentos usando o estatística**. Rio de Janeiro, RJ.: E-papers Serviços Editoriais Ltda, 2003, 260p.

CAMARGO, M. C. R.; TOLEDO, M. C. F. Avaliação da ingestão de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) através da dieta, em diferentes regiões do Brasil. **Revista Brasileira de Toxicologia**, v.2, n.14, p.23-30, 2001.

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

CANDIOTI, L. V. *et al.*. Multiple response optimization applied to the development of a capillary electrophoretic method for pharmaceutical analysis. **Talanta**, v.69, n.1, p.140-147, 2006.

CANDIOTI, L. V. *et al.*. Experimental design and multiple response optimization. Using the desirability function in analytical methods development. **Talanta**, v.124, p.123-138, 2014.

CARUSO, M. S.; ALABURDA, J. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos – benzo(a)pireno: uma revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v 67, n. 1, p. 1-27, 2008.

CASSIANO, N. M. *et al.*. Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas. **Química Nova**, v.32, n.4, p.1021-1030, 2009.

CE. European Commission. Health and Consumer Protection Directorate-General. **Polycyclic aromatic hydrocarbons - occurrence in foods, dietary exposure and health effects**. SCF/CS/CNTM/PAH/29/ADD, Bruxelas, 2002.

CFIA. Canadian Food Inspection Agency. Industry Advisory: monitoring for polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked food, 2001, 2p.

CHIAP, P. *et al.*. Liquid chromatographic analysis of local anesthetics in human plasma after sample preparation by on-line dialysis. Optimization by use of experimental design. **Chromatographia**, v.53, n.11-12, p.678-686, 2001.

CHOWDHURY, M. J.; MCDONALD, D. G.; WOOD, C. M. Gastrointestinal uptake and fate of cadmium in rainbow trout acclimated to sublethal dietary cadmium. **Aquatic Toxicology**, v.69, p.149-163, 2004.

CHUNG, M. K. *et al.*. A sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for adducts of polycyclic aromatic hydrocarbons with human serum albumin. **Analytical Biochemistry**, v.400, n.1, p.123-129, 2010.

CONDE F. J., *et al.*. Optimization of a sampling method to determine polycyclic aromatic hydrocarbons in smoke from incomplete biomass combustion. **Analytica Chimica Acta**, v.4; p.524:287-94, 2004.

COSTA, M. *et al.* Heterocyclic aromatic amine formation in barbecued sardines (*Sardina pilchardus*) and atlantic salmon (*Salmo salar*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. N.57, p. 3173-3179, 2009.

COSTA, M., VIEGAS, O., MELO, A., PETISCA, C., PINHO, O. e FERREIRA, I.M. P. Heterocyclic aromatic amine formation in barbecued sardines (*Sardina pilchardus*) and atlantic salmon (*Salmo salar*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.57, p.3173-3179, 2009.

COTTA, J. A. O. *et al.* Avaliação de solvents de Extração por ultrassom usando-se cromatografia líquida de alta eficiência para a determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em solos contaminados. **Química Nova**, v. 32, n 8, p. 2026-2033, 2009.

DENNIS, M.J. *et al.* Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in UK total diets, **Journal of Food Chemical Toxicology**, v.21, n.5, p. 569-574, 1983.

DESTANDAU, E. *et al.* Robustness study of a reversed-phase liquid chromatographic method for the analysis of carboxylic acids in industrial reaction mixtures. **Analytica Chimica Acta**, v.572, n,1, p.102-112, 2006.

De VOS *et al.* Polycyclic aromatic hydrocarbons in dutch total diets samples (1984-1986), **Journal of Food Chemical Toxicology**, v.28, n.4, p. 263-268, 1990.

DIANA, J. *et al.* Development and validation of an improved liquid chromatographic method for the analysis of oxytetracycline. **Chromatographia**, v.56, n. 5-6, p.313-318, 2002.

EURACHEM. Eurachem Working Group. **The fitness for purpose of analytical methods: a laboratory guide to method validation and related topics**, 1998.

FAO. Food And Agriculture Organization of The United Nations. **The state of world fisheries and aquaculture**. FAO Fisheries and Aquaculture Department, Roma, 2012, 212p.

FALCO, G. *et al.* Polycyclic aromatic hydrocarbons in food: human exposure through the diet in Catalonia, Spain, **Journal of Food Protection**, v.66, n.12, p.2325-2331, 2003.

FANG, X.. Simultaneous extraction of hydrosoluble phenolic acids and liposoluble tanshinones from *Salviae miltiorrhizae radix* by an optimized microwave-assisted extraction method. **Separation And Purification Technology**, v.86, p.149-156, 2012.

FDA. **Mercury in fish: cause for concern?** Washington DC: Food and Drug Administration Consumer, 1995, 7p.

FEREY, L. *et al.* Use of response surface methodology to optimize the simultaneous separation of eight polycyclic aromatic hydrocarbons by capillary zone electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. **Journal of Chromatography A**, v.1302, p.181-190, 2013.

FERREIRA, S. *et al.* Doehlert matrix: a chemometric tool for analytical chemistry – review. **Talanta**, v.63, n. 4, p.1061-1067, 2004.

FERREIRA, S. L. C. *et al.* Statistical designs and response surface techniques for the optimization of chromatographic systems. **Journal of Chromatography A**, v.1158, p.2-14, 2007.

FRANCESCONI, K. A. Toxic metal species and food regulations-making a healthy choice. **The Analyst**, v.132, p.17-20, 2007.

GARCIA-VILLAR, N.; SAURINA, J.; HERNANDEZ-CASSOU, S.. High-performance liquid chromatographic determination of biogenic amines in wines with an experimental design optimization procedure. **Analytica Chimica Acta**, v.575, n.1, p.97-105, 2006.

GRAHAM M. C. *et al.* Investigation of extraction and clean-up procedures used in the quantification and stable isotopic characterization of PAHs in contaminated urban soils. **Science of Total Environment**, v.360, n.3, p81-89, 2006.

GUILLEN-CASLA, V. *et al.* Direct chiral liquid chromatography determination of aryloxyphenoxypropionic herbicides in soil: deconvolution tools for peak processing. **Analytical And Bioanalytical Chemistry**, v.400, n.10, p.3547-3560, 2011.

HASEGAWA, T.; OZAKI, Y. New development in chemometrics. **Bunseki Kagaku**, v.54, n. 1, p.1-26, 2005

HAWTHORNE, S. B. *et al.* Comparisons of soxhlet extraction, supercritical fluid extraction subcritical water extraction for environmental solids: recovery, selectivity and effects on sample matrix. **Journal of Chromatography A**, v.892, n.2, p.421-433, 2000.

HERNANDEZ-BORGES, J. *et al.* Analysis of pesticides in soy milk combining solid-phase extraction and capillary electrophoresis-mass spectrometry. **Journal of Separation Science**, v.28, n.9-10, p.948-956, 2005.

HILLAERT, S. *et al.* Optimization and validation of a micellar electrokinetic chromatographic method for the analysis of several angiotensin-II-receptor antagonists. **Journal of Chromatography A**, v.984, n.1, p.135-146, 2003.

HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A.; SKOOG, D. A. **Princípios de análise instrumental**. São Paulo, SP.: Editora Bookman, 2002, 1056p.

HU, Y. Y. *et al.* Response surface optimization for determination of pesticide multiresidues by matrix solid-phase dispersion and gas chromatography. **Journal of Chromatography A**, v.1098, n.1-2, p.188-193, 2005.

HUA, GX. *et al.* Rapid quantification of polycyclic aromatic hydrocarbons in hydroxypropyl-beta-cyclodextrin (HPCD) soil extracts by synchronous fluorescence spectroscopy (SFS). **Environmental Pollution**, v. 148, n. 1, p. 176-181, 2007.

IARC. International Agency for Research on Cancer. **Monographs on the evaluation of carcinogenic risk of chemicals to humans – some industrial chemical dyestuffs**, v.29, 2009. Acessado em 17/07/2014. Disponível em: [www.monographs.iarc.fr/ENG/monographs/vol29/volum29.pdf](http://www.monographs.iarc.fr/ENG/monographs/vol29/volum29.pdf).

INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. **Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaios Químicos**. DOQ-CGCRE-008, 2007.

INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. **Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaios Químicos**. DOQ-CGCRE-008, revisão 03, 2011.

ISLAM, M. D.; TANAKA, M.. Impacts of pollution on coastal and marine ecosystems including coastal and marine fisheries and approach for management: a review and synthesis. **Marine Pollution Bulletin**, v.48, p.624–649, 2004.

ISO. International Standard Organization. **General Requirements for the Competence of Testing and Calibration Laboratories**. ISO/IEC 17025, 1999.

KNOBEL, G., CALIMAG-WILLIAMS, K., CAMPIGLIA, A. D. Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites in cow's milk by liquid-liquid extraction and synchronous room-temperature fluorescence spectroscopy. **Analytical Methods**, v.5, n.6, p.1577-1582, 2013.

KUO, C. H.; SUN, S. W. Analysis of nine rhubarb anthraquinones and bianthrone by micellar electrokinetic chromatography using experimental design. **Analytica Chimica Acta**, v.482, n.1, p.47-58, 2003.

LANÇAS, F. M. **Cromatografia líquida moderna: HPLC/CLAE**. Campinas, SP.: Editora átomo Ltda, 2009, 382p.

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.

LI, X. Y., *et al.* A Novel Synchronous Fluorescence Spectroscopic Approach for the Rapid Determination of Three Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Tea with Simple Microwave-Assisted Pretreatment of Sample. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.59, n.11, p.5899-5905, 2011.

LIGUORI, I *et al.* An automated extraction approach for isolation of 24 polyaromatic hydrocarbons (PAHs) from various marine matrixes. **Analytica Chimica Acta**, v.574, p.181-188, 2006.

LODOVICI, M. *et al.* Polycyclic aromatic hydrocarbons contamination in italian diet, **Food Additives Contamination**, v.12, n.5, p.703-7013, 1995.

LOPES W. A. e ANDRADE J. B. Fontes, formação, reatividade e quantificação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) na atmosfera. **Química Nova**, v.19, n.5, p.497-516, 1996.

LU, J. *et al.* Optimization of subcritical fluid extraction of carotenoids and chlorophyll a from *Laminaria japonica* Aresch by response surface methodology. **Journal Of The Science Of Food And Agriculture**, v.94, n.1, p.139-145, 2014.

LUNDSTEDT, *et al.* Experimental design and optimization. **Chemometrics Intelligent Laboratory Systems**, v.42, p.3-40, 1998.

MAISONNETTE, C. *et al.* Selective immunoclean-up followed by liquid chromatography for the monitoring of a biomarker of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in urine at the ng/1 level. **Journal Of Chromatography A**, v.1120, n.2, p.185-193, 2006.

MALDANER, L.; COLLINS, C. H.; JARDIN, I. C. S. F. Fases estacionárias modernas para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa. **Química Nova**, v.33, n.7, p.1559-1568, 2010.

MAÑAY *et al.*. Lead contamination in Uruguay: the “La Teja” neighborhood case. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, v.195, p.93-115, 2008.

MEIMARIDOU, A. *et al.* Color encoded microbeads-based flow cytometric immunoassay for polycyclic aromatic hydrocarbons in food. **Chemical Research in Toxicology**, v.672, n.2, p.9-14, 2010.

MEINHART, D. *et al.* Chemometrics optimization of carbohydrate separations in six food matrices by micellar electrokinetic chromatography with anionic surfactant. **Talanta**, v.85, n.1, p.237-244, 2011.

MESTER, Z., STURGEON, R.; PAWLISZYN, J. Solid phase microextraction as tool for trace element speciation. **Spectrochimica Acta part B**, v.53, n.3, p.233-260, 2001.

MOHAMMADI, A. *et al.* Enzyme-assisted extraction and ionic liquid-based dispersive liquid-liquid microextraction followed by high-performance liquid chromatography for determination of patulin in apple juice and method optimization using central composite design. **Analytica Chimica Acta**, v.804, p.104-110, 2013

MONTGOMERY, D.C.; RUNGER, G. C.. **Applied Statistics and probability for engineers**. 3<sup>a</sup> ed. New York, NY.: John Willey and Sons Inc., 2003, 703p.

MONTGOMERY, D.C. **Design and analysis of experiments**. 6<sup>a</sup> ed. New York, NY.: John Willey and Sons Inc., 2005, 684p.

MUIR, B.; CARRICK, W. A.; COOPER, D. B. Application of central composite design in the optimisation of thermal desorption parameters for the trace level determination of the chemical warfare agent chloropicrin. **Analyst**, v.127, n.9, p.1198-1202. 2002.

MYERS, R. H.; MONTGOMERY, D. C. **Response Surface Methodology**. 1<sup>a</sup> ed. New York, NY.: John Willey and Sons Inc., 2002, 734p.

NETO, B. B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. 4<sup>a</sup> Ed. Porto Alegre: Artmed/Bookman Editora S.A., 2010, 414p.

NETO, F. R. A.; NUNES, D. S. S. **Cromatografia – princípios básicos e técnicas afins**. Rio de Janeiro, RJ.: Editora Interciência Ltda, 2003, 187p.

NETTO, A. D. P. *et al.* Avaliação da contaminação humana por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (hpas) e seus derivados nitrados (nhpas): uma revisão metodológica. **Química Nova**, v.23, n.6, p.765-773, 2000.



NEVES, R. L. S. **Avaliação da contaminação de óleo no ambiente estuarino da bahia de guanabara (RJ) pela determinação fluorimétrica de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos na bilis de peixe *Mugil liza***. 2006. Dissertação (Mestrado em Ciências). Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 120f.

OUYANG, G.; PAWLISZYN, J. Recent developments in SPME for on-site analysis monitoring. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 25, n. 7, p. 692-703, 2006.

PACHECO, S. **Melhoria e implantação de metodologias de análise de alimentos por cromatografia líquida de alta eficiência**. 2014. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 147f.

PANDEY *et al.*. A review of techniques for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in air. **Trends in Analytical Chemistry**, v.30, n.11, p.1716-1739.

PEREIRA NETO, A.D. *et al.* Avaliação da contaminação humana por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) e seus derivados nitrados (NHPAs): uma revisão metodológica, **Química Nova**, v.26, n.06, p.765-773, 2000.

PERFETTI, G.A. *et al.* Determination of polycyclic aromatic hydrocarbon in seafood by liquid chromatography with fluorescence detection, **Journal of AOAC International**, v.75, n.05, p.872-877, 1992.

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

PINO, V. *et al.*. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in marine sediments by high-performance liquid chromatography after microwave-assisted extraction with micellar media. **Journal of Chromatography A**, v.869, n.1-2, p.515-522, 2000.

POSTER, D. L. *et al.*. Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in environmental samples: a critical review of gas chromatographic (GC) methods. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.386, n.4, p.859-881, 2006.

PURCARO, G.; MORET, S.; CONTE, L. S. Overview on polycyclic aromatic hydrocarbons: occurrence, legislation and innovative determination in foods. **Talanta**, v.105, p.292-305, 2013.

RAMALHOSA, M. J. *et al.*. Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in fish: Optimisation and validation of microwave-assisted extraction. **Food, Chemistry**, v.135, n.1, p. 234-242, 2012.

REIMER, G.; SUAREZ, A. Comparison of supercritical fluid extraction and Soxhlet extraction for the analysis of native polycyclic aromatic hydrocarbons in soils. **Journal of Chromatography A**, v 699, n.1-2, p.253-263, 1995.

RENNER, R. Out of plumb: when water treatment causes lead contamination. **Environmental Health Perspectives**. v.12, n.17, p.A543-A547, 2009.

RIBANI, M. *et al.*. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v.27, n.5, p.71-780, 2004

RINNER, G. & SUAREZ, A. Comparison of supercritical fluid extraction and soxhlet extraction for the analysis of native polycyclic aromatic hydrocarbons in soils. **Journal of Chromatography A**, v.699, n.2, p. 253-263, 1995.

RITTER, L. *et al.* (1995). The International Programme on Chemical Safety (IPCS). Inter-Organization Programme for the Sound Management of Chemicals (IOMC). **A review of selected persistent organic pollutants**, 1995, 145p.

RODRIGUEZ, I. *et al.*. Determination of acidic drugs in sewage water by gas chromatography-mass spectrometry as tert.-butyldimethylsilyl derivatives. **Journal of Chromatography A**, v.985, n.1-2, p.265-274, 2003.

RODRIGUES, M. I.; LEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**. 2ª ed. Campinas, SP.: Casa do Espírito Amigo Fé e Amor, 2009, 358p.

ROSENCRANZ, A. The ECE convention of 1979 on long-range transboundary air pollution. **The American journal of international Law**, v. 75, p.975-982, 1981.

SANTOS, F. J.; GALCERAN, M. T. V. The application of gas chromatography to environmental analysis. **Trends in Analytical Chemistry**, v.21, p. 672-685, 2002.

SANTOS, M. D. R. *et al.*. Box-Behnken design applied to ultrasound-assisted extraction for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in river sediments by gas chromatography/mass spectrometry. **Analytical Methods**, v.6, n.6, p.1650-1656, 2014.

SELLI, E.; *et al.*. Application of multi-way models to the time-resolved fluorescence of polycyclic aromatic hydrocarbons mixtures in water. **Water Research**, v.38, n.9, p. 2269-2276, 2004.

SHU *et al.* Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in sediment reference material by microwave-assisted extraction. **Chemospher**, v.41, n.11, p.1709-1716, 2000.

SMITH, K. E. C.; NORTHCOTT, G. I.; JONES K. C. Influence of the extraction methodology on the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in pasture vegetation. **Journal of Chromatography A**, v.1116, n.1, p.20-30, 2006.

SOUSA, M.M.; NASCIMENTO, V. L. V. Benzo(a)pireno em alimentos. **Revista ACTA Tecnológica**, v.5, n.1, 2010.

SPENCER, W. A.; SINGH, J.; ORREN, D. K. Formation and differential repair of covalent dna adducts generated by treatment of human cells with (+/-)-anti-dibenzo[a,l]pyrene-11,12-diol-13,14-epoxide. **Chemical Research in Toxicology**, v.22, n.1, p.81-89, 2009

SPORRING, S. *et al.* Comprehensive comparison of classic soxhlet extraction with soxtec extraction, ultrasonication extraction, supercritical fluid extraction, microwave-assisted extraction and accelerated solvent extraction for determination of polychlorinated biphenyls in soil. **Journal of Chromatography A**, v.1090, n.2, p.1-9, 2005.

STOLYHWO, A. & SIKORSKI, Z. E. Polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked fish – a critical review. **Food Chemistry**, n. 91, p. 303-311, 2005.

SUN, F.; LITTLEJOHN, D.; GIBSON, M. D. Ultrasonication extraction and solid phase extraction clean-up of US EPA 16 priority pollutant polycyclic aromatic hydrocarbons in soils by reversed-phase liquid chromatography with ultraviolet absorption detection. **Analytical Chimica Acta**, v.363, n.3, p.1-11, 1998.

TEÓFILO, R. F. **Métodos quimiométricos: uma visão geral – conceitos básicos de quimiometria**. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, v.1, 2013

USEPA. U.S. Environmental Protection Agency. **Integrated Risk Information System (IRIS): Benzo[a]pyrene**. Washington DC.1994, 20p.

USPC. United States Pharmacopeia Convention; US Pharmacopeia 24. **Validation of Compendial Methods**, n.1225, Rockville, 1999.

VATSAVAI, K. *et al.* Direct quantification of monohydroxy-polycyclic aromatic hydrocarbons in synthetic urine samples via solid-phase extraction-room-temperature fluorescence excitation-emission matrix spectroscopy. **Analytical Biochemistry**, v.376, n.2, p.213-220, 2008.

VERGARA, S. C.. **Projetos e relatórios de pesquisa em administração**. 9ª ed. São Paulo: Editora Atlas Ltda, 2007.

WANG, W. *et al.*. Extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons and organochlorine pesticides from soils: a comparison between soxhlet extraction, microwave-assisted extraction and accelerated solvent extraction techniques. **Analytica Chimica Acta**, v.602, n.2, p.211-222, 2007.

WENZEL, T. *et al.*. Analytical methods for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in food and the environment need for new food legislation in the European Union. **Trends in Analytical Chemistry**, v.25, n.7, p716-725, 2006.

WHO. **World Health Organization Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations**, n.823. 32<sup>nd</sup> report, WHO Technical Report Series, Geneva, 1992.

WHO. International Programme on Chemical Safety – IPCS. **Polycyclic aromatic hydrocarbons**, Geneva. 1998.

WHO. International Agency for Research on Cancer - IARC. **Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans**. Polycyclic aromatic hydrocarbons, Geneva. 2006.

WHO. Cadmium. In: **Guidelines for drinking-water quality**, v.1, 3<sup>a</sup> ed, Geneva, 2008, 3p.

WHO. Preventing Disease Through Healthy Environments. **Exposure to mercury: a major public health concern**. Geneva, 2007, 4p.

WHO. Preventing Disease Through Healthy Environments. **Exposure to cadmium: a major public health concern.** Genebra, 2010a, 4p.

WHO. Preventing Disease Through Healthy Environments. **Exposure to lead: a major public health concern.** Genebra, 2010b, 6p.

WHO. Preventing Disease Through Healthy Environments. **Exposure to arsenic: a major public health concern.** Genebra, 2009, 5p.

WHO/JECFA (2005). Joint FAO/WHO Expert Committee on food additives, Roma. Acessado em 23/04/2014). Disponível em: [www.who.int/ipcs/food/jecfa/en](http://www.who.int/ipcs/food/jecfa/en).

WILSON, W. B.; CAMPIGLIA, A .D. Analysis of co-eluted isomers of high-molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons in high performance liquid chromatography fractions via solid-phase nanoextraction and time-resolved Shpol'skii spectroscopy. **Journal Of Chromatography A**, v.1218, n.39, p.6922-6929, 2011

ZHANG, F. *et al.* Use of metal-enhanced fluorescence spectroscopy for detection of polycyclic aromatic hydrocarbons in diesel oil emulsions in artificial seawater. **Environmental Technology**, v.33, n.18, p.2071-2075, 2012.

ZHANG, H *et al.* Determination of polycyclic aromatic hidrocarbons in aquatic products by hpla-fluorescence. **Journal of Food Composition and Analysis**, n.23, p.469-474, 2010.

## ANEXOS

ANEXO A: Gráficos das Curvas Analíticas obtidas para a quantificação dos HPAs por padronização externa.

ANEXO B: Gráficos dos Resíduos para a análise da linearidade do método a partir das Curvas Analíticas obtidas para a quantificação dos HPAs por padronização externa.

ANEXO A

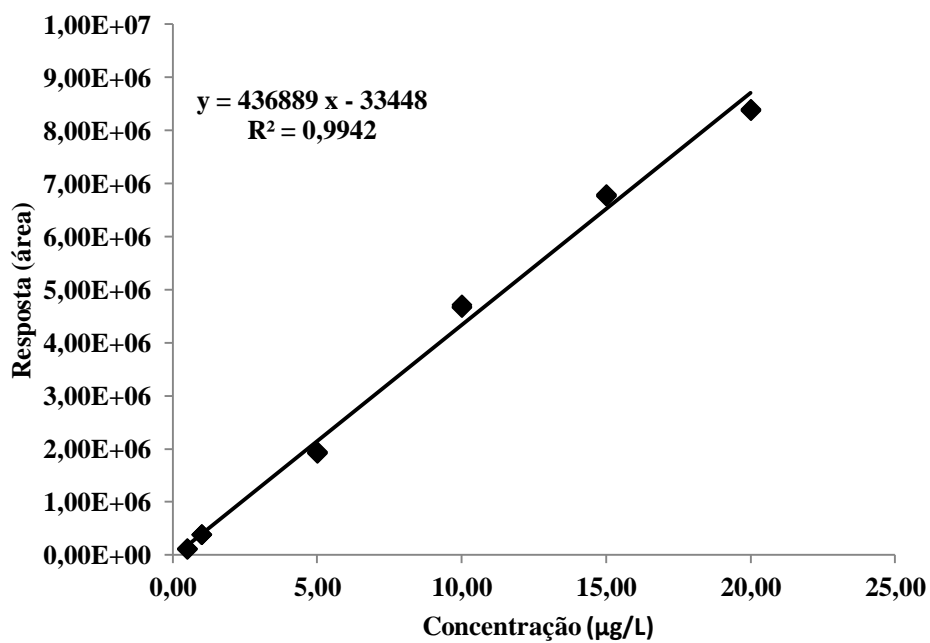


Figura 45: Curva analítica do naftaleno.

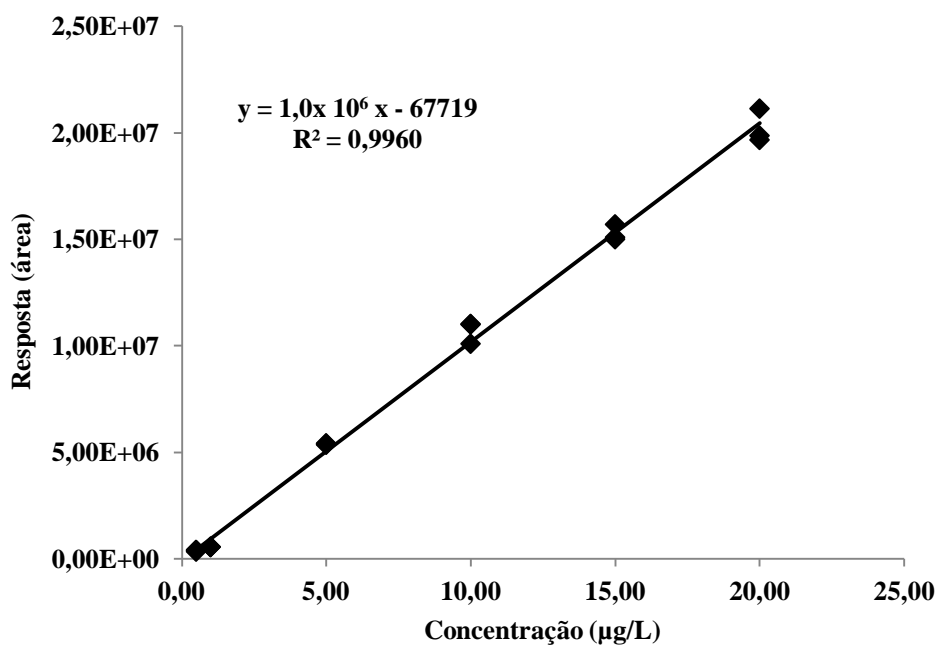


Figura 46: Curva analítica do acenafteno.

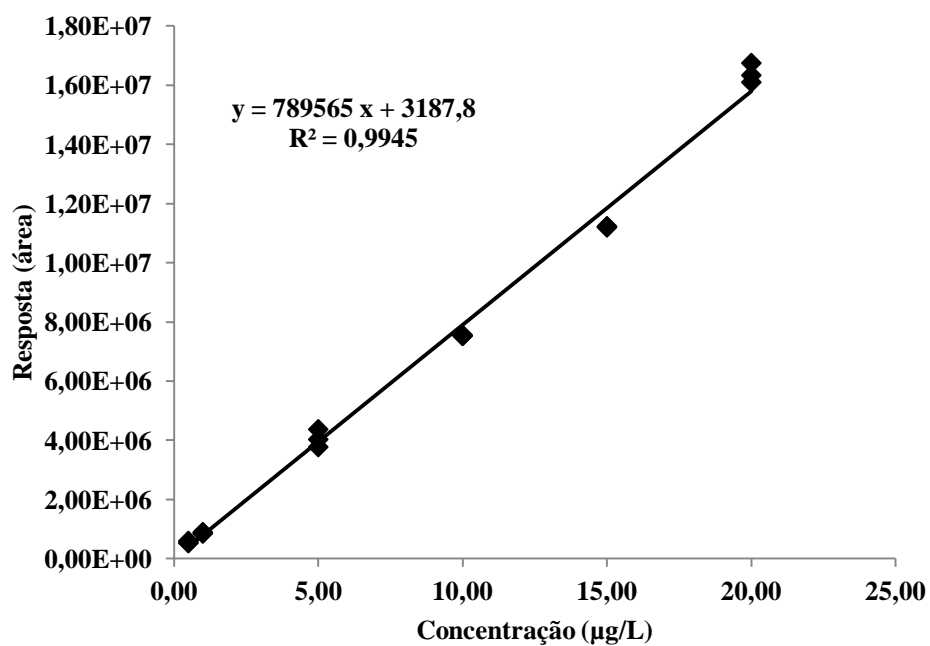


Figura 47: Curva analítica do fluoreno.

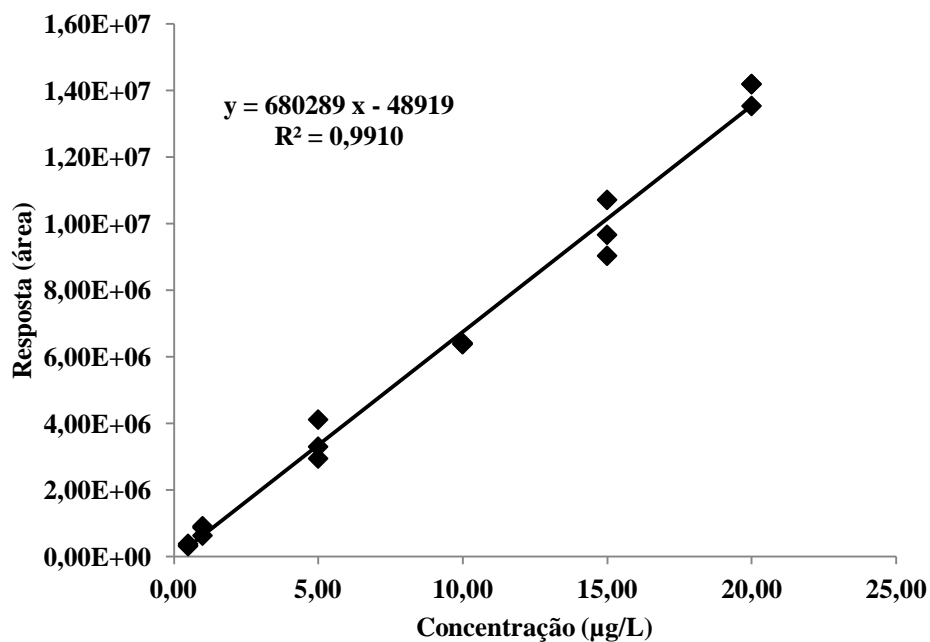


Figura 48: Curva analítica do fenantreno.

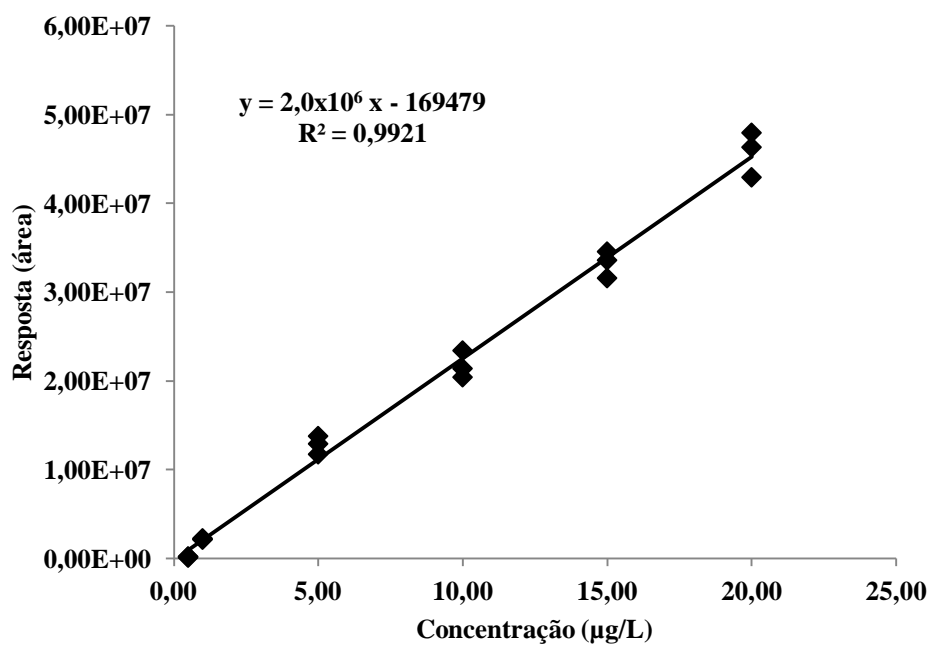


Figura 49: Curva analítica do antraceno.

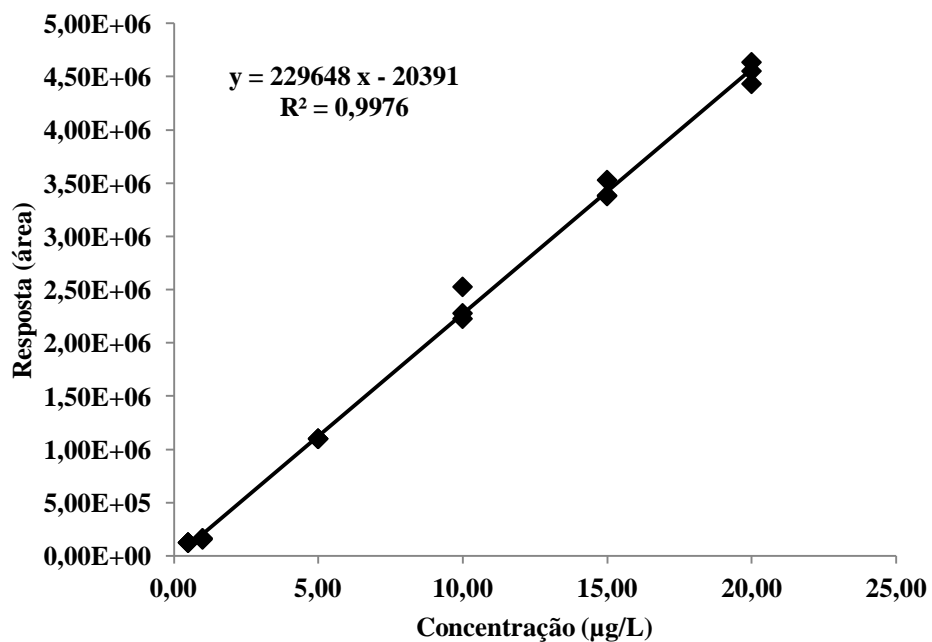
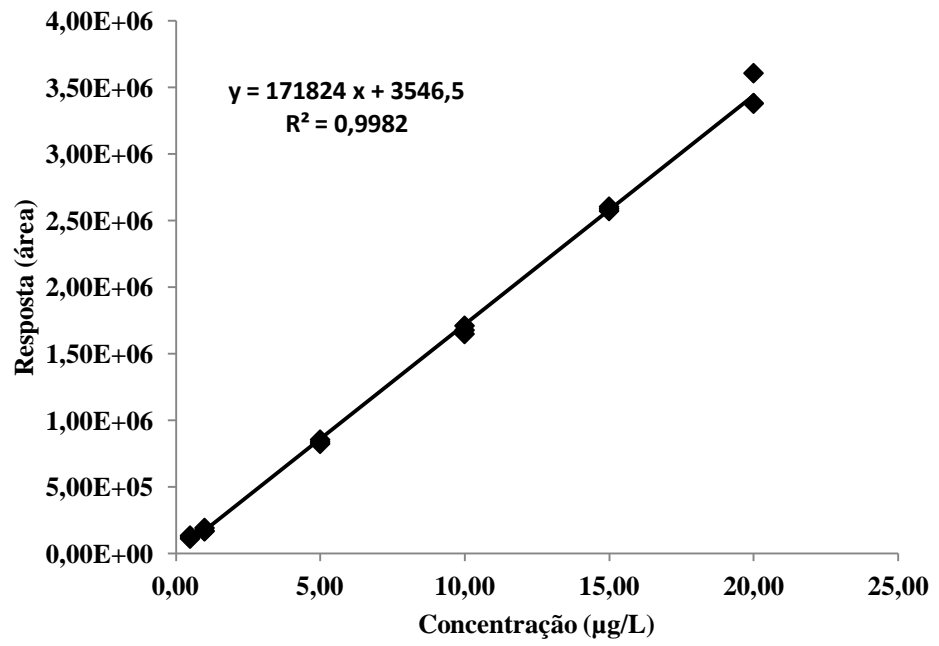
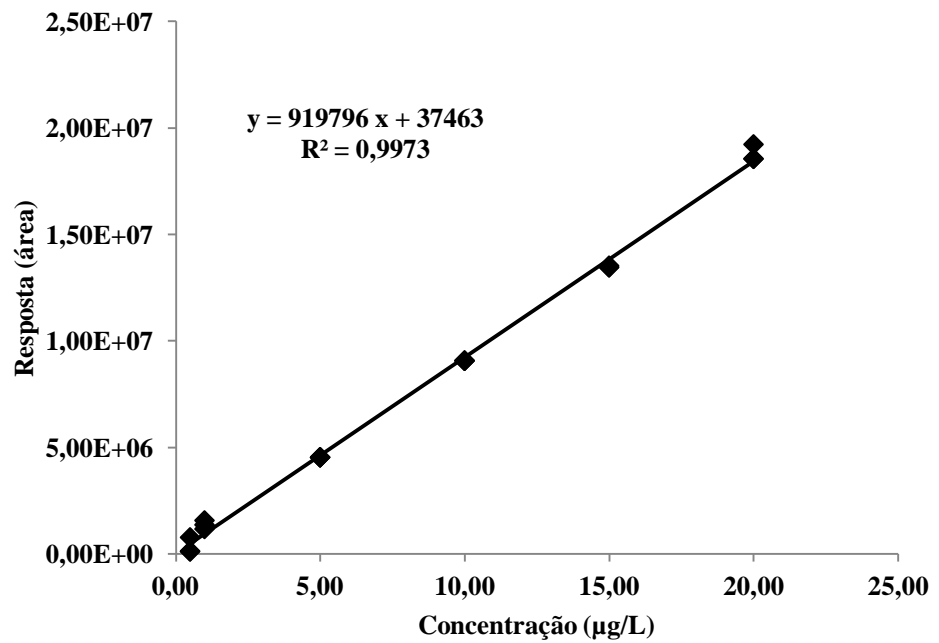


Figura 50: Curva analítica do fluoranteno.

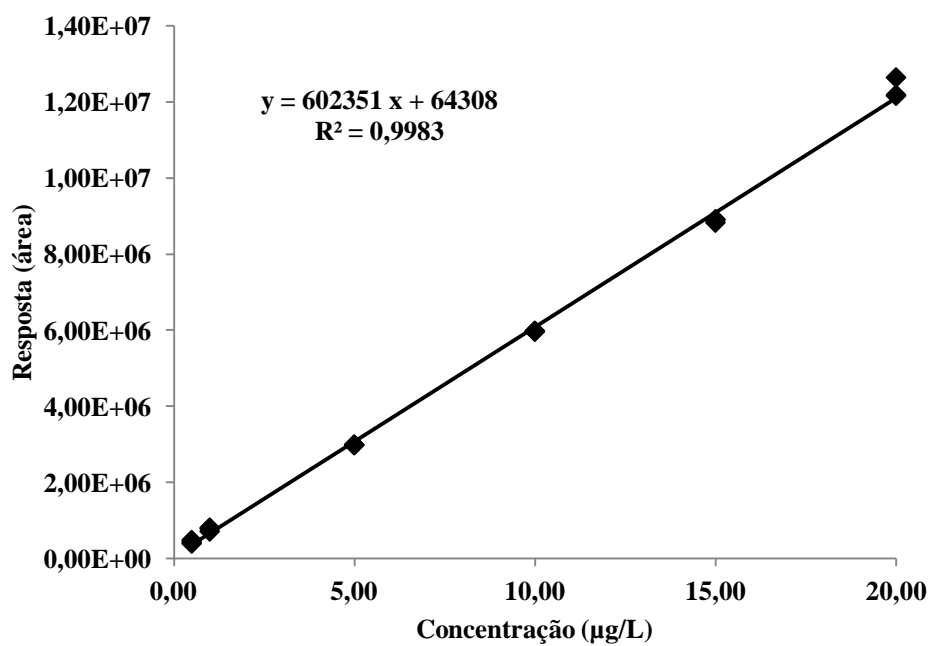




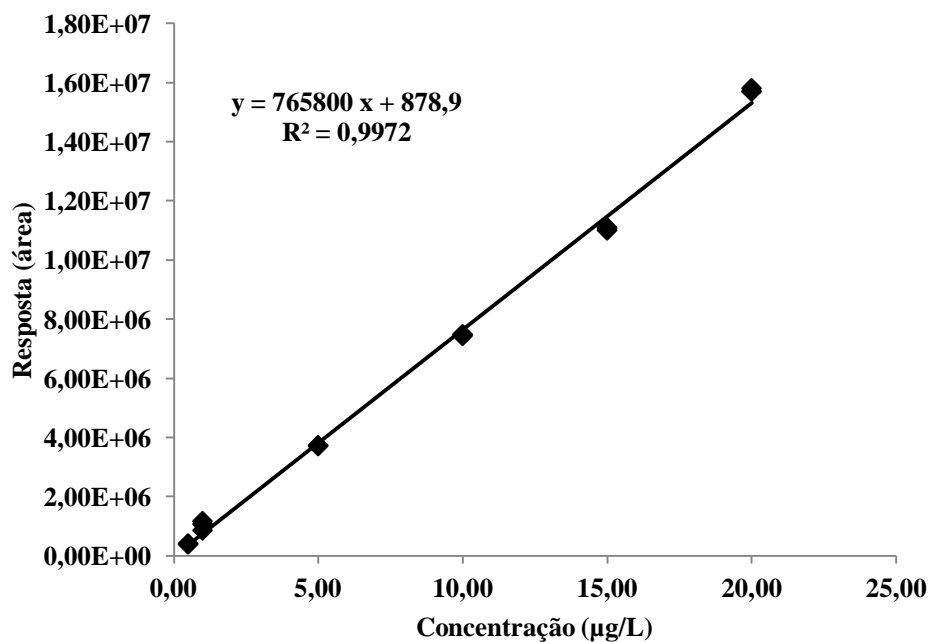
**Figura 51:** Curva analítica do pireno.



**Figura 52:** Curva analítica do benzo(a)antraceno.



**Figura 53:** Curva analítica do criseno.



**Figura 54:** Curva analítica do benzo(b)fluoranteno.

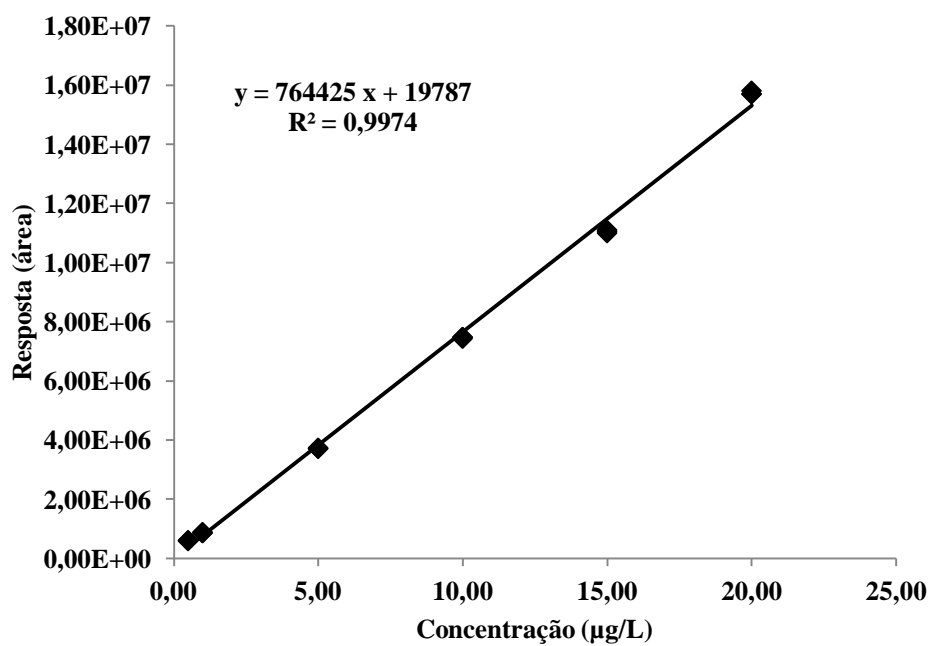


Figura 55: Curva analítica do benzo(k)fluoranteno.

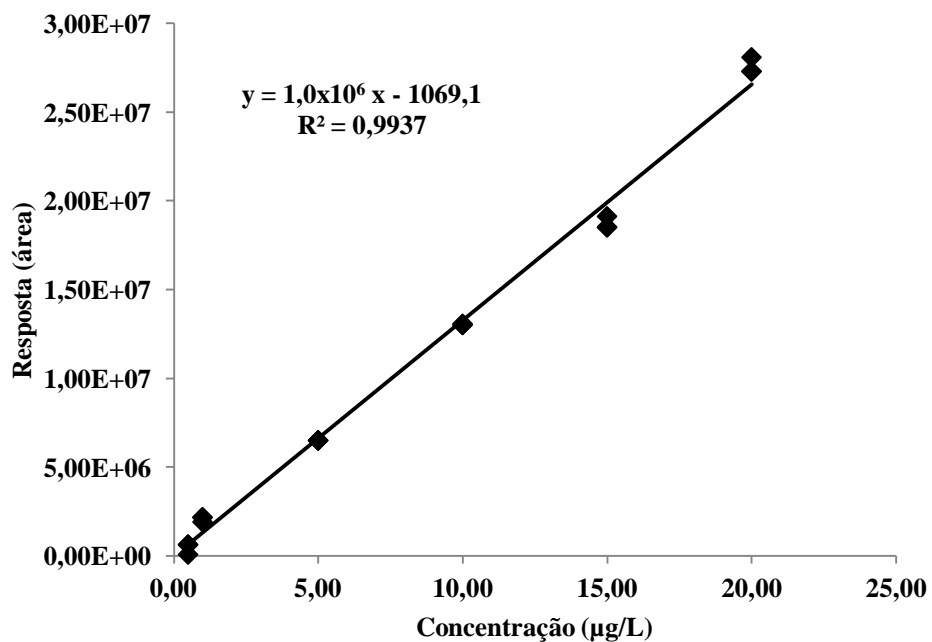
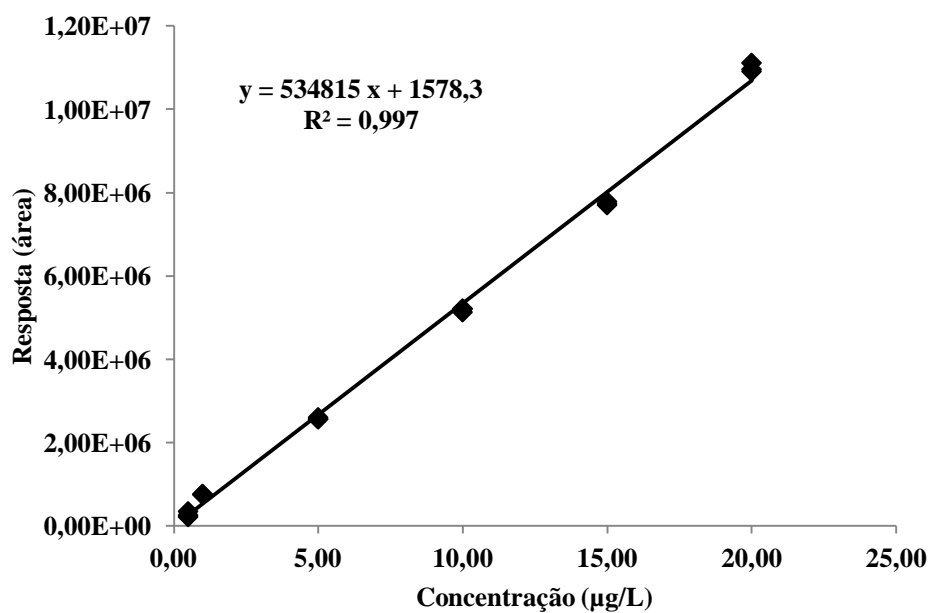
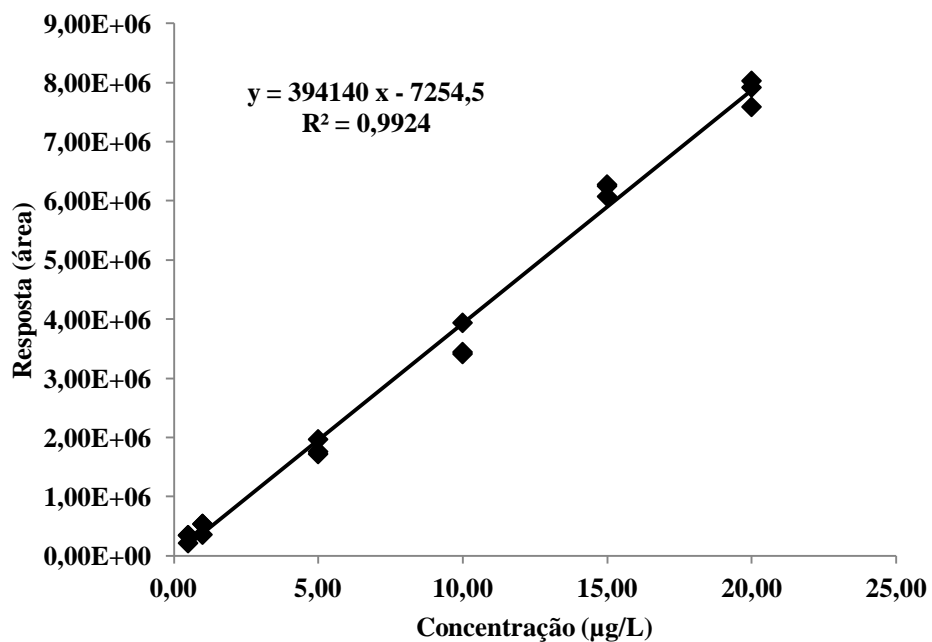


Figura 56: Curva analítica do benzo(a)pireno.



**Figura 57:** Curva analítica do dibenzo(a,h)antraceno.



**Figura 58:** Curva analítica do benzo(g,h,i)perileno.

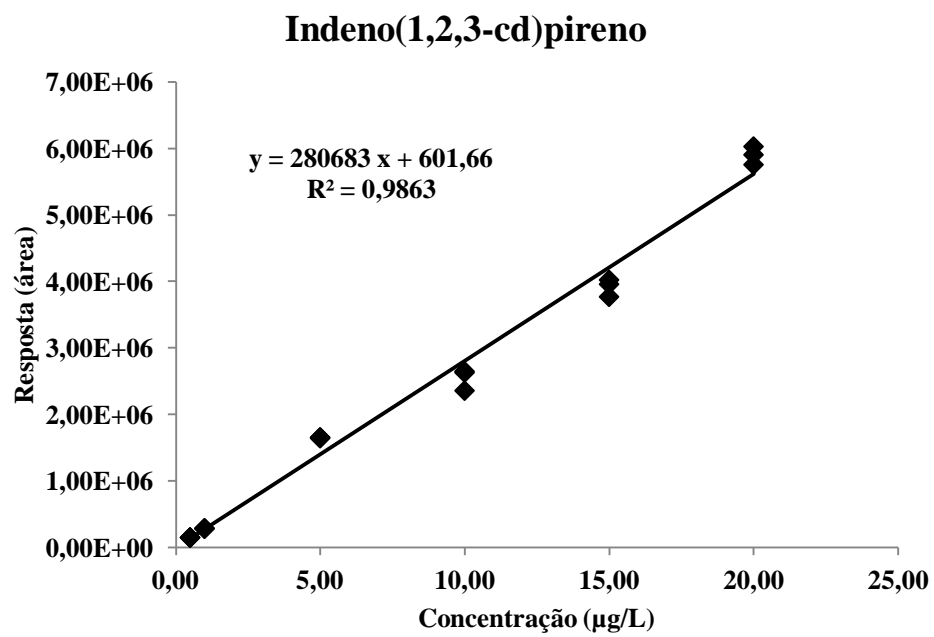


Figura 59: Curva analítica do indeno(1,2,3-cd)pireno.

ANEXO B

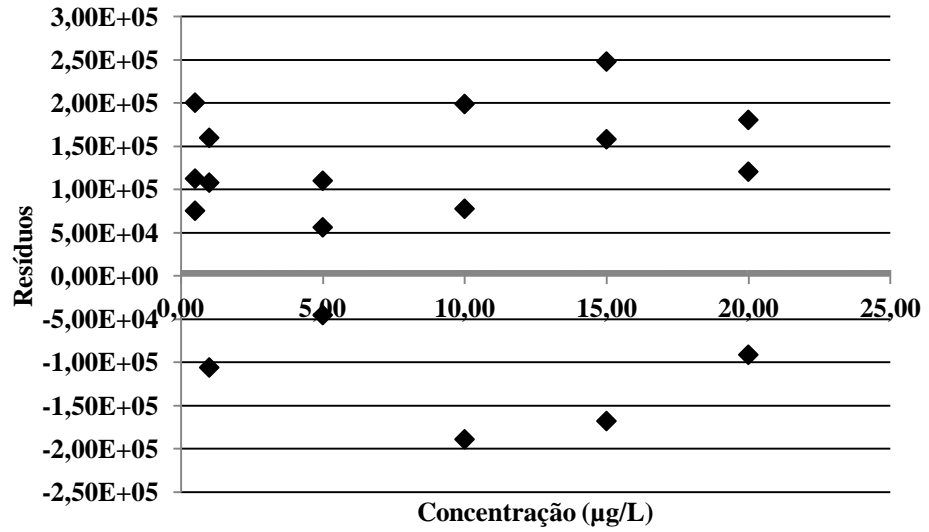


Figura 60: Gráfico de resíduos para a curva analítica do naftaleno.

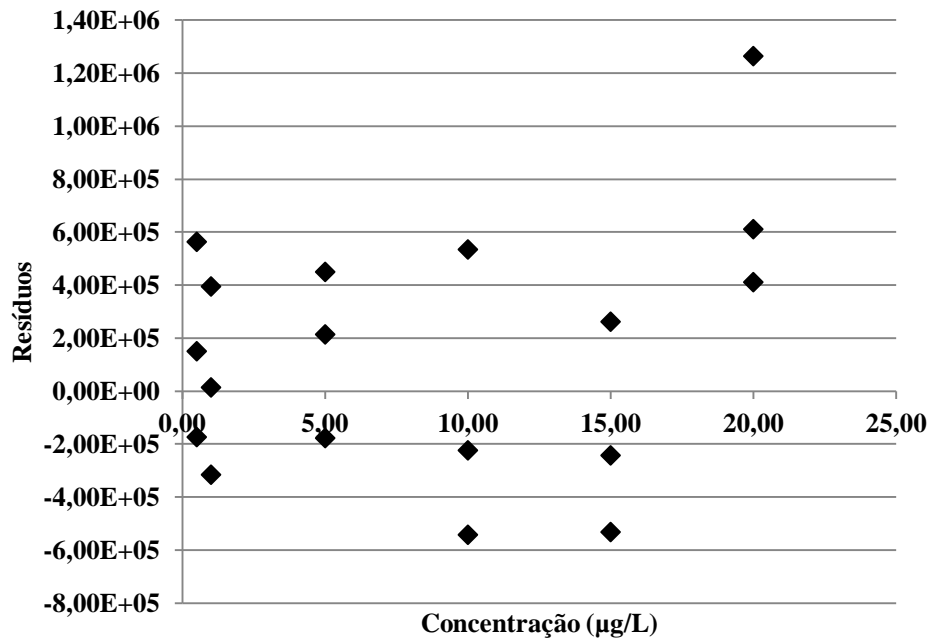


Figura 61: Gráfico de resíduos para a curva analítica acenaftheno.

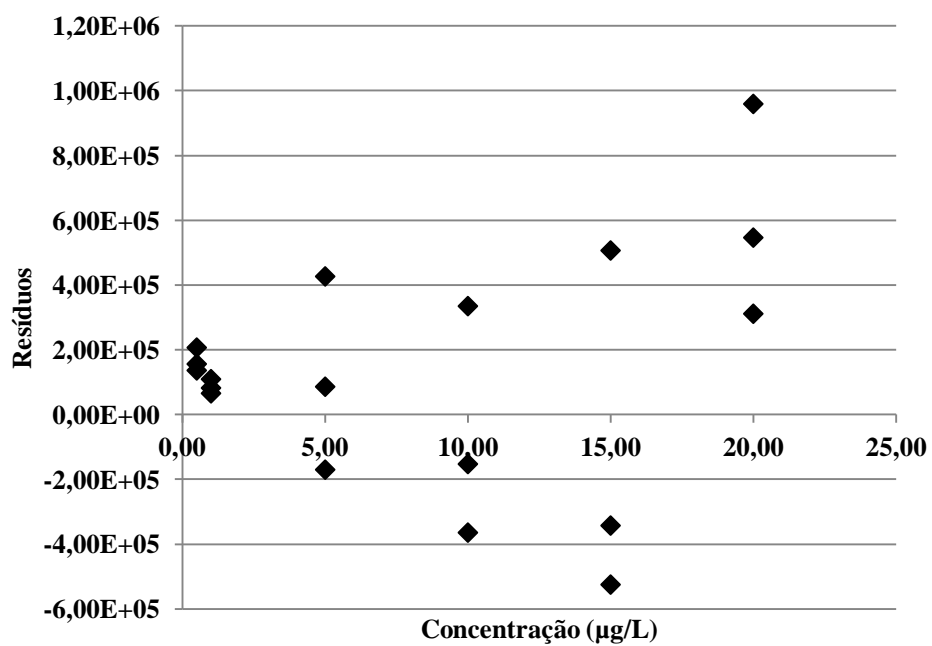


Figura 62: Gráfico de resíduos para a curva analítica do fluoreno.

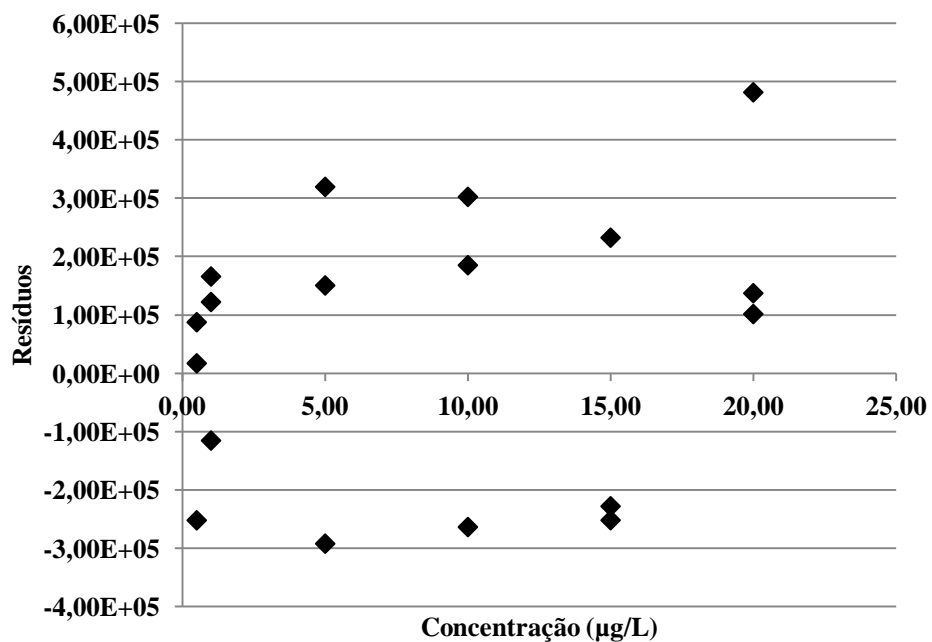


Figura 63: Gráfico de resíduos para a curva analítica do fenantreno.

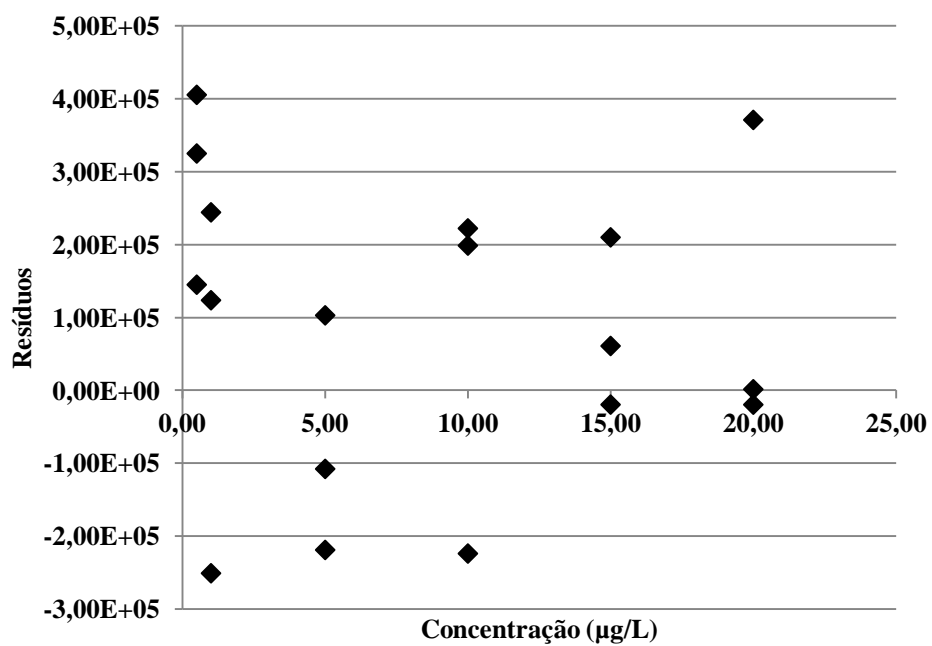


Figura 64: Gráfico de resíduos para a curva analítica do antraceno.

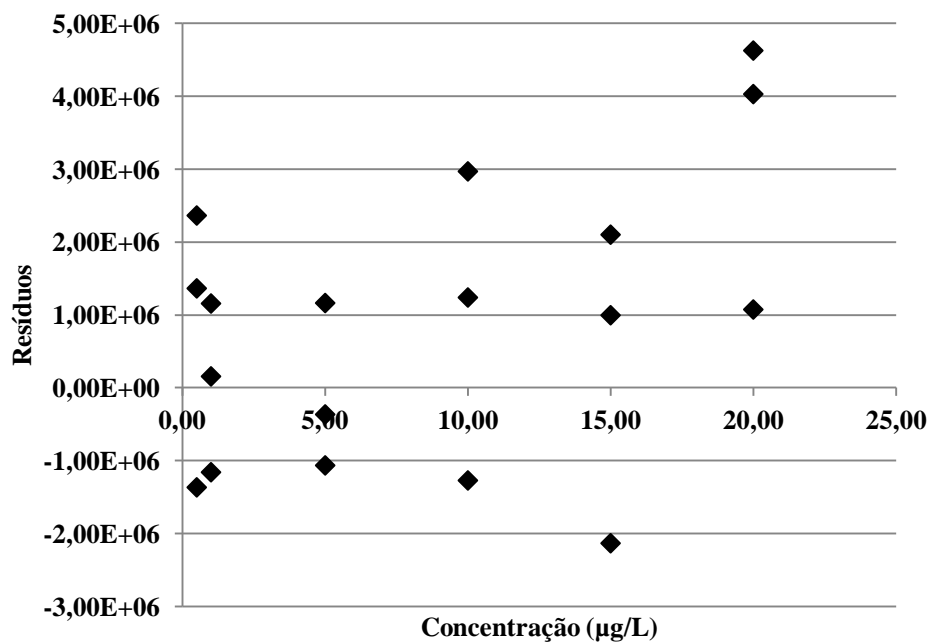


Figura 65: Gráfico de resíduos para a curva analítica do fluoranteno.



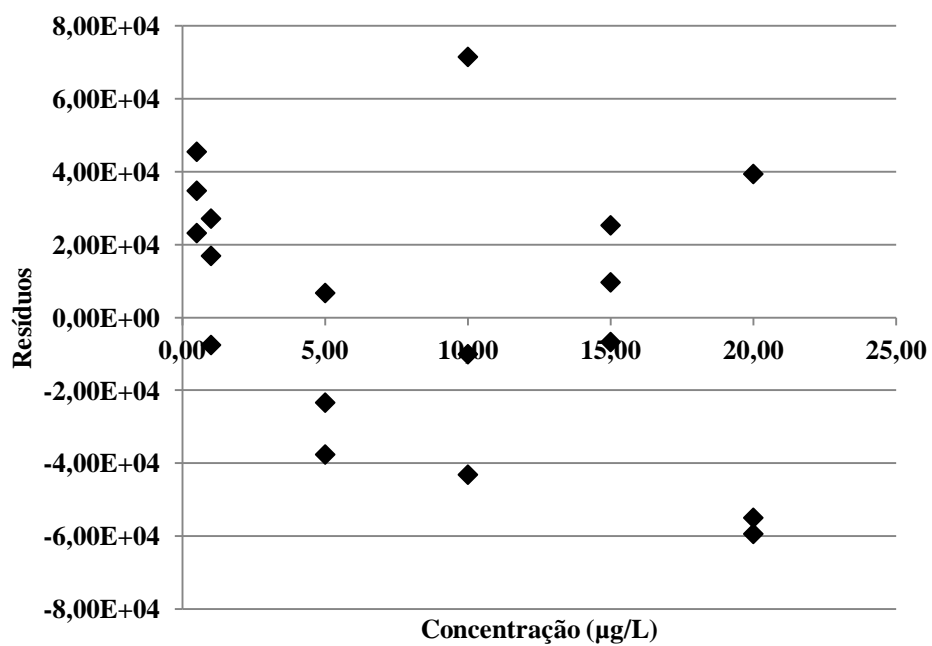


Figura 66: Gráfico de resíduos para a curva analítica do pireno.

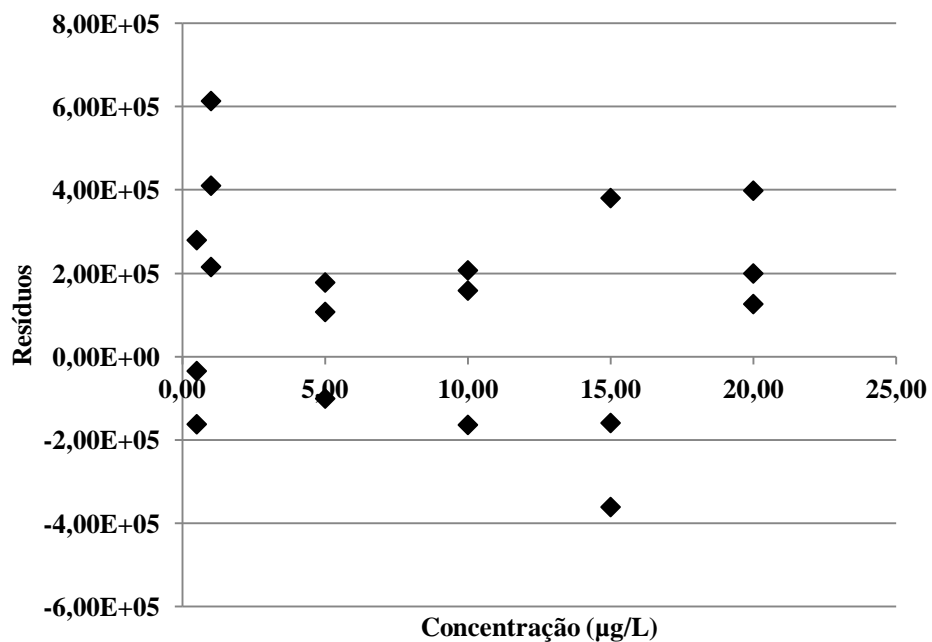


Figura 67: Gráfico de resíduos para a curva analítica do benzo(a)antraceno.

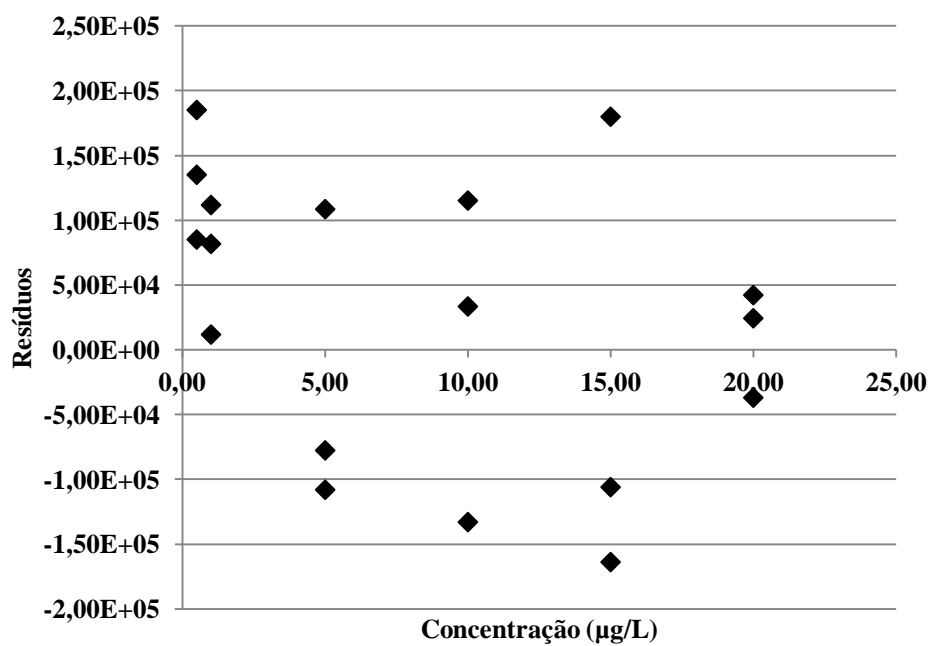


Figura 68: Gráfico de resíduos para a curva analítica do criseno.

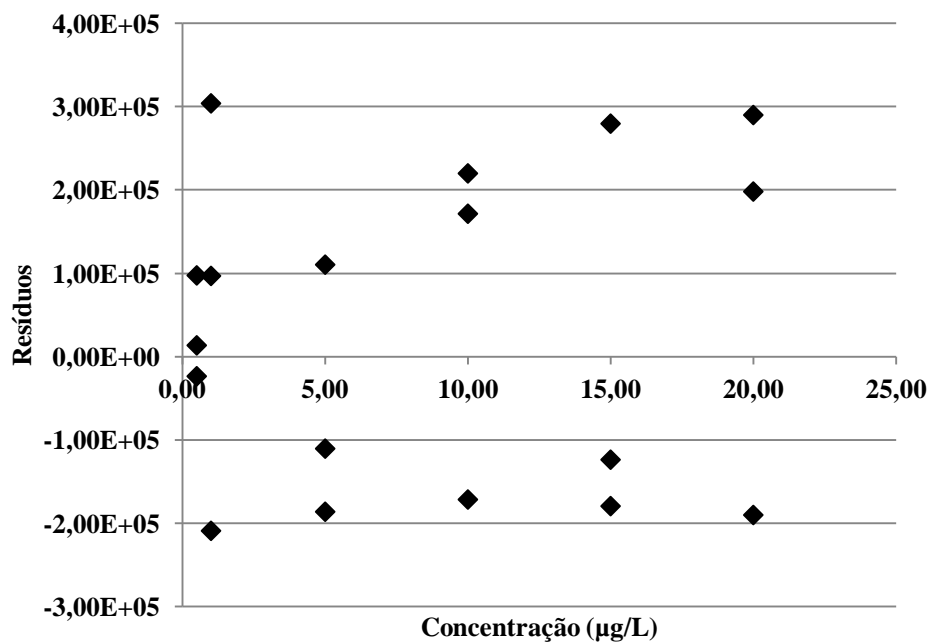


Figura 69: Gráfico de resíduos para a curva analítica do benzo(b)fluoranteno.

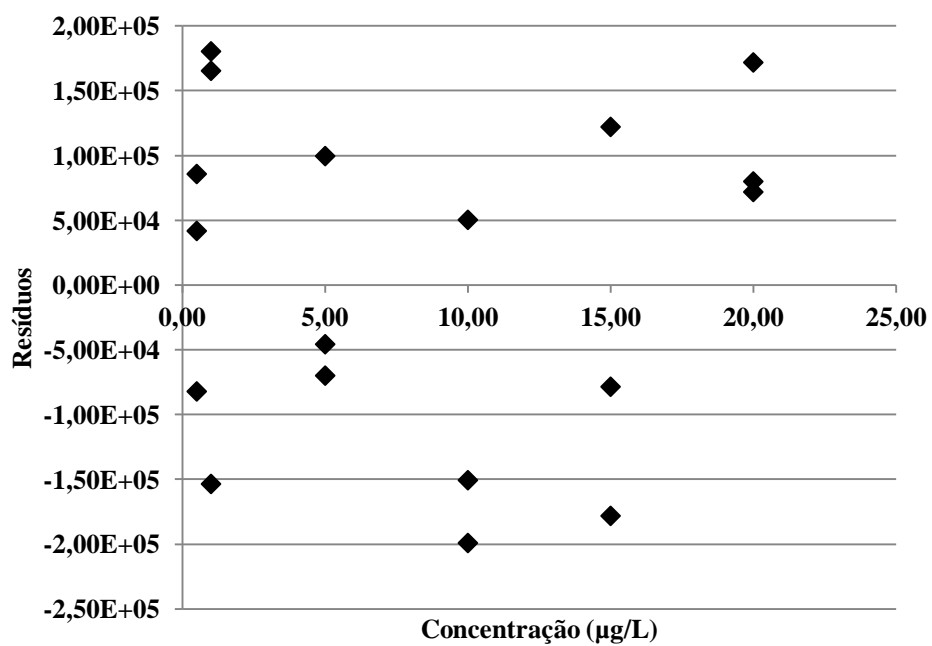


Figura 70: Gráfico de resíduos para a curva analítica do benzo(k)fluoranteno.

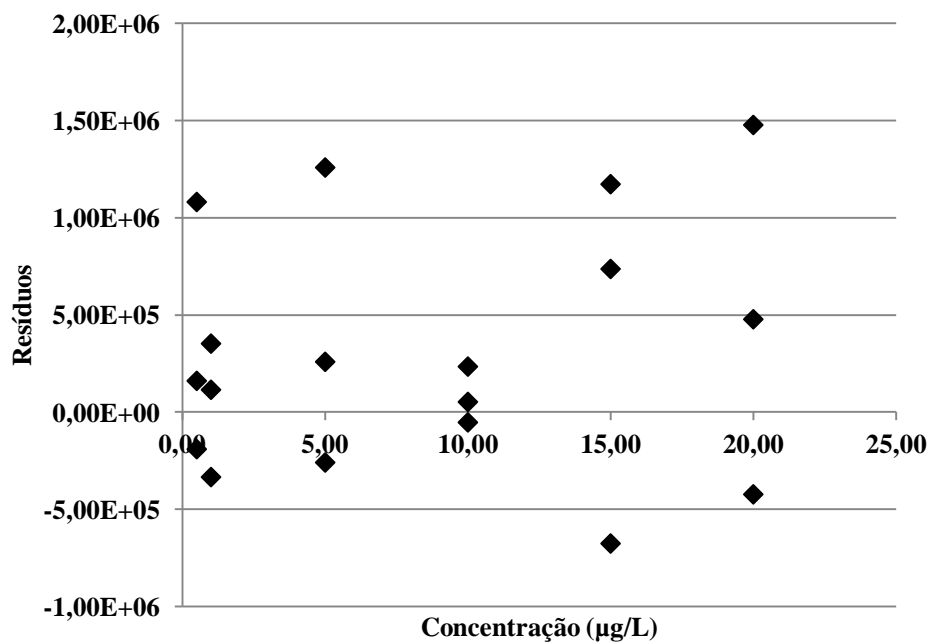


Figura 71: Gráfico de resíduos para a curva analítica do benzo(a)pireno.

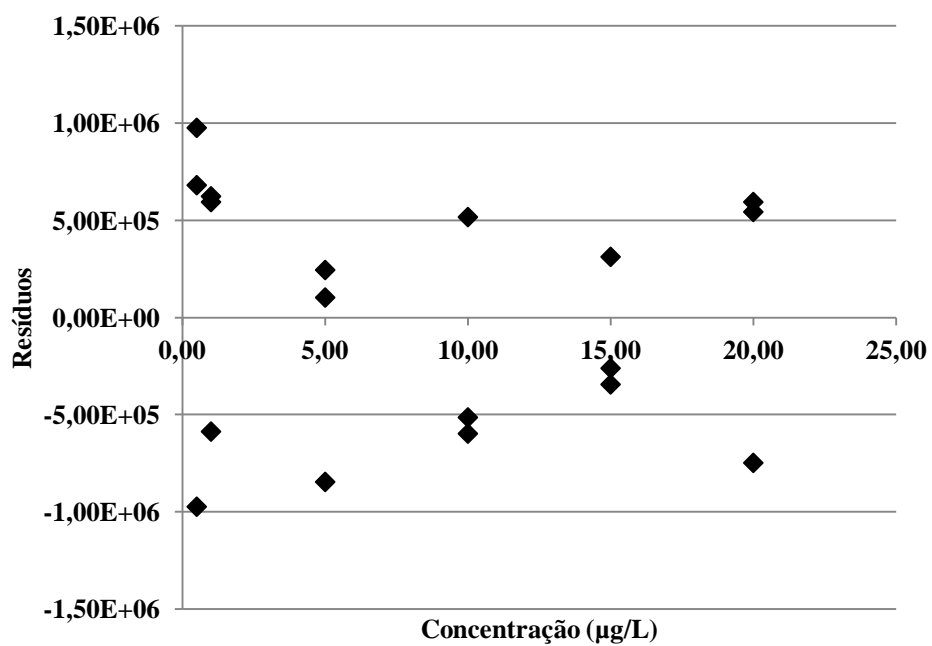


Figura 72: Gráfico de resíduos para a curva analítica do dibenzo(a,h)antraceno.

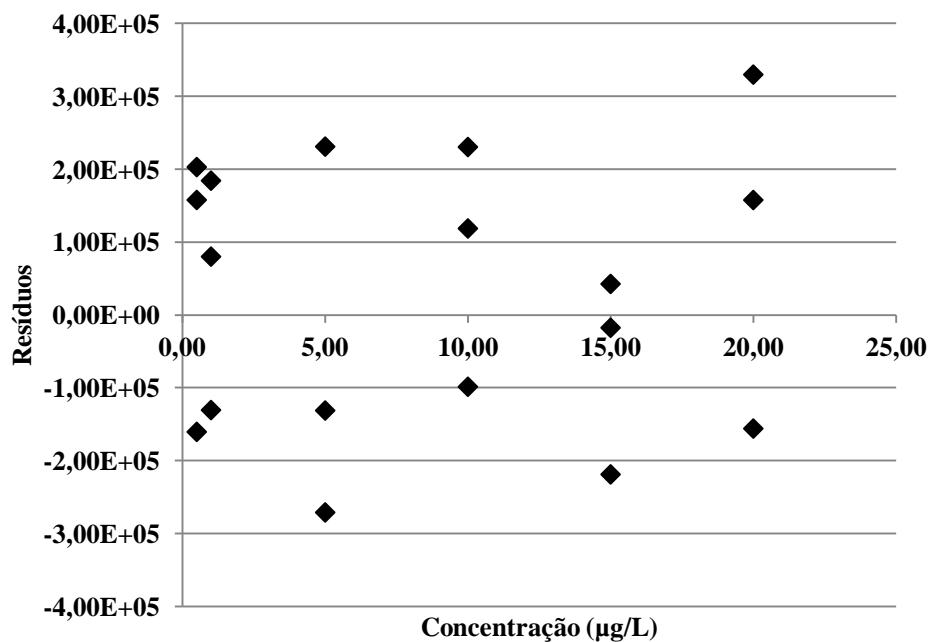
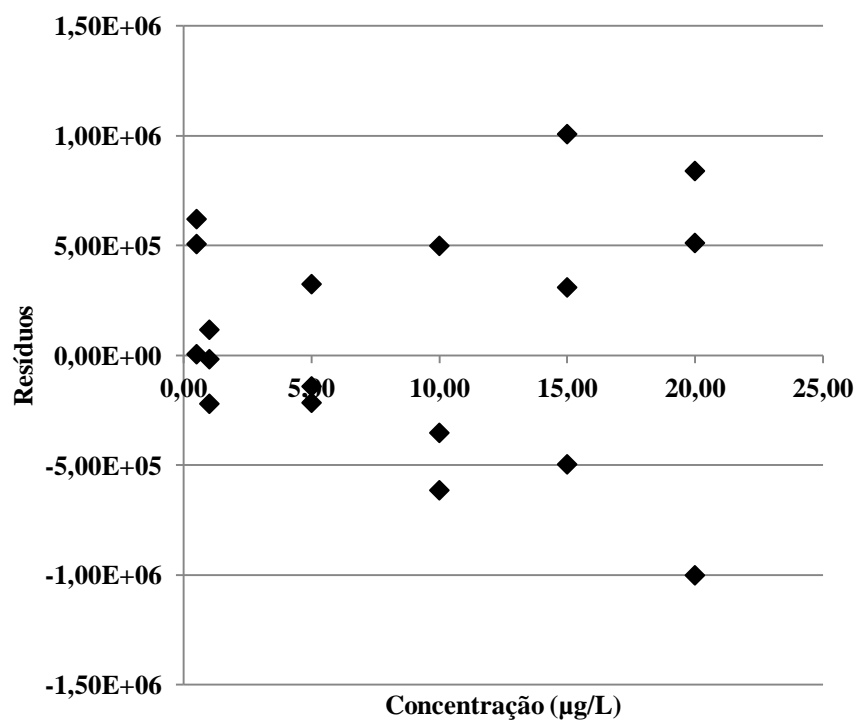


Figura 73: Gráfico de resíduos para a curva analítica do benzo(g,h,i)perileno.



**Figura 74:** Gráfico de resíduos para a curva analítica do inden(1,2,3-cd)pireno.