



UNESP – UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“Júlio de Mesquita Filho”
Instituto de Química de Araraquara
Programa de Pós-graduação em Química



Lucy Elaine Sugauara

Influência da fuligem da queima da palha de cana-de-açúcar na presença de HPA em hortaliças de consumo humano.

Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química.

Orientadora: *Profa. Dra. Mary Rosa Rodrigues de Marchi*

Araraquara
2014
DADOS CURRICULARES

Lucy Elaine Sugauara

1. Dados Pessoais

Nascimento: 26 de junho de 1979

Nacionalidade: Brasileira

Naturalidade: São Paulo-SP

Filiação: Walter Sugauara

Inês Takabayashi

Estado Civil: Solteira

Profissão: Química

Documento de Identidade: 34286180-3 SSP

Cadastro de Pessoa Física: 275822558-10

Endereço: Avenida Itápolis, 2169.

Bairro Bela Vista

Araraquara-SP

CEP: 14800-040

e-mail: lucy_sugauara@yahoo.com.br

2. Formação Acadêmica/ Titulação

2.1. Graduação

Licenciatura em Química_ UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “Júlio de Mesquita Filho”_concluído em 24 de janeiro de 2011.

3. Produção Bibliográfica

3.1. Resumos apresentados em congressos

- SUGAUARA, L. E. ; MARCHI, M. R. R. . 1-Hidroxipireno em urina: validação de método e aplicação estudo de exposição ocupacional. SIMCRO, 2010. Campos do Jordão-SP.
- SUGAUARA, L. E. e MARCHI, M. R. R. Otimização e validação de método de extração e quantificação de HPAs em hortaliças de consumo humano. 36 Reunião Anual Sociedade Brasileira de Química, 2013. Águas de Lindóia-SP.
- SUGAUARA, L. E. e MARCHI, M. R. R. PAH in leafy vegetables under the influence of sugarcane burning in Brazil. International Symposium on polycyclic aromatic compounds, 2013. Corvallis-OR. USA.

3.2. Artigos científicos publicados.

- PRADI, G.F.; ZANETTA, D.M.; ARBEX, M.A.; BRAGA, A.L.; PEREIRA, L.A.; DE MARCHI, M.R.; DE MELO LOUREIRO, A.P.; MARCOURAKIS, T.; SUGAUARA, L.E.; GATTÁS, G.J.; GONÇALVES, F.T; SALGE, J. M.; TERRA FILHO, M.; DE PAULA SANTOS, U. Burnt sugarcane harvesting: particulate matter exposure and the effects on lung function, oxidative stress, and urinary 1-hydroxypyrene. **Science Total Environment**, 2012.

4. Participação em Eventos

- Simpósio de Cromatografia SIMCRO, 2010. Campos do Jordão-SP.
- 36 Reunião Anual Sociedade Brasileira de Química, 2013. Águas de Lindóia-SP.
- International Symposium on polycyclic aromatic compounds, 2013. Corvallis-OR.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Professora Mary pela confiança em aceitar me orientar e pela paciência em passar todo o conhecimento necessário na difícil tarefa de formar.

Agradeço a meus queridos professores que me guiaram neste caminho que tanto sonhei e graças a eles tornei real, em especial Tia Rosa que me alfabetizou, Professoras Meire e Rita por ajudarem no supletivo a despertar um sonho adormecido e Professora Marian da graduação um exemplo a ser seguido.

Agradeço as minhas queridas amigas-irmãs de república Jú, Sara e Line por toda paciência e risadas, pelas inúmeras vezes que secaram minhas lágrimas de alegrias e tristezas.

Agradeço aos amigos do IQ que de alguma maneira contribuíram nestes anos, por toda ajuda, amizade e paciência em todos os momentos que necessitei Dona Marilei, Flávio, Guilherme, Sara, Claudia, Tuane, Zé Luiz, Mari, Cadu, Suzy, Lilian, Dany, Jé, Alana, Juzinha, William, Douglas, Araketu, Denise e Marcelo.

Agradeço aos meus queridos adotantes Painho (Elissandro) e Mainha (Claudinha) que por tantas vezes me “acudiram” me acolheram e me ajudaram com toda paciência do mundo.

Agradeço aos meus filhotes de 4 patas por completarem a minha vida e por permitirem que eu sinta todos os dias o amor incondicional o olhar de ternura e carinho.

Agradeço a minha querida família por todo amor e apoio, minha mãezinha Muchi Dodo, minha “hermana” Ivy, meus amados sobrinhos Toffinho e Kaitinho (B.M).

Agradeço a minha querida família Monteiro Borges, por me aceitar, me amar e apoiar, meus adorados sogro (S. João) e sogra (D. Mercia), as minhas amadas titia Fátima e vovó Anna e o mais especial de todos por aguentar todo meu stress e mau humor meu amado Ferlombinho.

Agradeço a todos os funcionários do IQ pois sem eles nada disso seria possível.

“Ser feliz sem motivo é a mais autêntica forma de felicidade”

Carlos Drummond de Andrade

Os melhores indicadores do caráter de uma pessoa são: a maneira que ela trata as pessoas que não podem lhe trazer benefício e como ela trata as pessoas que não podem revidar.

Abigail Van Buren

RESUMO

Os HPA são contaminantes orgânicos formados tanto na queima da palha de cana-de-açúcar quanto de combustível fóssil e por suas características físico-químicas estão associados ao material particulado fino, podendo assim ser transportado a longas distâncias em um curto espaço de tempo dependendo das condições climáticas. Pelas características de mutagenicidade, carcinogenicidade e alteração endócrina são substâncias que tem merecido interesse dos pesquisadores na avaliação da exposição humana por diversas vias, sendo a via alimentar a menos explorada atualmente. Este trabalho teve por objetivo otimizar e validar um método para determinação de HPA em hortaliças e avaliar a presença destas substâncias em alface, couve e rúcula, em localidades com e sem a influência da queima de cana-de-açúcar (Araraquara e Itu). O método otimizado e validado neste trabalho envolve extração por banho de ultrassom e detecção por HPLC/FLU, possui valores aceitáveis de LD e LQ de acordo com a União Européia, 0,3 e 0,9 $\mu\text{g kg}^{-1}$ respectivamente e valores de CV (<11,6%) e recuperação (70~119%), de acordo com os valores preconizados pela ANVISA.

Amostras de alface, rúcula e couve cultivados em duas cidades em três diferentes locais, Araraquara (zona rural e zona urbana) e Itu (zona urbana) no período correspondente a safra (agosto de 2012) e entressafra (março 2013) da cana-de-açúcar foram analisadas. As concentrações de HPA encontradas nestas hortaliças situaram-se abaixo dos níveis reportados na literatura em folhas de diferentes espécies vegetais. No entanto, quando considerada a ingestão de 200g/dia, metade do preconizado pela OMS (Organização Mundial de Saúde) para ingestão diária recomendada de legumes, frutas e verduras, infere-se que a quantidade de HPA ingerida por esta via corresponderia a uma dieta de alta exposição MOE (Margin of Exposure) <10 000 próximos aos limites considerados preocupantes pela União Européia.

Palavras-chaves: hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, HPA, queima de cana-de-açúcar, HPLC/FLU, vegetais folhosos, absorção via alimentar.

ABSTRACT

The PAH are a class of organic contaminants which are formed in burning of sugarcane and fossil fuel. The physicochemical properties are associated with their affinity for fine particulate matter and can therefore be transported over long distances in a short time depending on the weather. The PAH have characteristics of mutagenicity, carcinogenicity and endocrine disruption, because of these characteristics they are substances that have earned interest of researchers in the evaluation of human exposure via different routes of uptake, and currently the dietary is the less explored. This study aimed to optimize and validate a method for the determination of PAH in vegetables and evaluate the presence of these substances in lettuce, kale and arugula, in locations with and without the influence of sugarcane burning (Araraquara and Itu). The optimized and validated method in this work involves extraction by ultrasound bath and detection by HPLC/FLU, also has acceptable values of LOD and LOQ in accordance with the European Union, 0.3 and 0.9 $\mu\text{g kg}^{-1}$ respectively, and the CV (<11.6%) and recovery values (70 ~ 119 %), are also in accordance to the values recommended by ANVISA.

Samples of lettuce, arugula and kale grown in two different cities on three sites, Araraquara (rural and urban areas) and Itu (urban area) corresponding to the harvest period (August 2012) and sugarcane off season (March 2013) were analyzed. Concentrations of PAH found in these vegetables were below the levels reported in the literature in leaves of different plant species. However, when considering the intake of 200g/day, half the daily intake of fruits and vegetables recommended by WHO (World Health Organization) it is inferred that the amount of PAH ingested in this way corresponds to a High exposure diet with MOE (Margin of exposure) < 10 000 near the limits considered worrisome by the European Union.

Keywords: polycyclic aromatic hydrocarbons, PAH, sugarcane burning, HPLC/FLU, leafy vegetables, dietary intake.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química dos HPA indicados pela EPA para monitoramento ambiental.....	21
Figura 2. Proposta hipotética de síntese do Benzo(a)pireno a partir do acetileno: 1-acetileno; 2-Benzo(a)pireno.	22
Figura 3. Ilustração das vias de incorporação de HPA pelas plantas.	26
Figura 4. Casos estimados de displasia para 2014 para homens (verde) e mulheres (roxo) nas regiões brasileiras.....	32
Figura 5. Mecanismo proposto para a ação mutagênica do benzo(a)pireno.	34
Figura 6. Região de Baía nas estruturas parciais dos epóxido-diastereoisômero I e II.	35
Figura 7. Disfunções endócrinas: (a) resposta natural; (b) efeito agonista; (c) efeito antagonista.....	36
Figura 8. Regiões de cultivo de cana-de-açúcar no território nacional.....	37
Figura 9. Temperatura e precipitação pluviométrica no Estado de São Paulo. Médias para o período 1933-2011.....	39
Figura 10. Planejamento em estrela	48
Figura 11. Superfícies de respostas geradas por modelos quadráticos na otimização de duas variáveis: (a) máximo; (b) platô; (c) máximo; fora da região experimental; (d) mínimo e (e) superfície de sela.....	49
Figura 12. Preferência no consumo de hortaliças no Brasil, em porcentagem dos entrevistados (n = 1420).	60
Figura 13. (a) localização do município de Araraquara e (b) área cultivada de cana-de-açúcar no município, detalhando as áreas com queimada.	61

Figura 14. Mapa do município de Araraquara, locais de queima de cana-de-açúcar e pontos de amostragem (A e B).	62
Figura 15. (a) localização do município de Itu e (b) área cultivada de cana-de-açúcar no município, com destaque para as áreas em que a queimada é praticada, dados safra de 2011.....	63
Figura 16. Mapa do município de Itu, locais de queima de cana-de-açúcar e ponto de amostragem (D).	64
Figura 17. Cromatogramas (a) mistura padrão; (b) amostra testemunha (alface)...	67
Figura 18. Cromatogramas (HPLC/FLU) de cada padrão individual, nas condições otimizadas.	69
Figura 19. Dois exemplos de aplicação e resultado do Teste de Huber, onde há a presença de outlier e onde não há.....	70
Figura 20. Cromatogramas das amostras testemunhas (extraídas com n-hexano:acetona) indicando os tempos de retenção (t_R) dos compostos de interesse.	72
Figura 21. Curva analítica do fluoranteno no solvente (azul), na alface (verde) e na couve (vermelho).....	73
Figura 22. Curvas analíticas do benzo(g,h,i)perileno no solvente e nas matrizes (alface e couve-manteiga).....	74
Figura 23. Método para extração de HPA das matrizes de interesse neste trabalho.	82
Figura 24. Cromatogramas HPLC/FLU (a) mistura padrão; (b) amostra testemunha (alface); (c) amostra de alface fortificada; (d) amostra testemunha (couve); (e) amostra de couve fortificada.	83
Figura 25. Gráfico de pareto da soma normalizada dos resultados de recuperação dos 11 HPA.	91

Figura 26. Gráficos de curva de todos os HPA.....	97
Figura 27. Gráficos de contorno dos fatores estudados e as máximas desejabilidades obtidas (a) tempo versus % n-hexano; (b) volume versus % n-hexano; (c) volume versus tempo.....	98
Figura 28. Superfície de resposta geradas através dos resultados do PCC (a) volume x tempo (b) % n-hexano x volume (c) % n-hexano x tempo.....	99
Figura 29. Gráficos de distribuição de Ryan-Joner para todas as amostras nos três pontos de coleta nas duas épocas amostradas: (a) ITU entressafra; (b) ITU safra; (c) BELA VISTA entressafra; (d) BELA VISTA safra; (e) QUITANDINHA entressafra; (f) QUITANDINHA safra.....	104
Figura 30. Gráficos Boxplot para amostras de Itu: (a) entressafra; (b) safra.	106
Figura 31. Gráficos Boxplot para amostras de Araraquara-Quitandinha: (a) entressafra; (b) safra.....	106
Figura 32. Gráficos Boxplot para amostras de Araraquara-Bela Vista: (a) entressafra; (b) safra.....	107
Figura 33. Dados do INMET para a região de Araraquara na época da safra da cana-de-açúcar (meses julho, agosto e setembro), temperaturas e níveis pluviométricos diários registrados.....	114
Figura 34. Comparativo entre as quantidades de BaP e Σ HPA8 para 200 g de alface e as quantidades reportadas na literatura para uma dieta de média exposição.....	116
Figura 35. Comparativo de quantidades de HPA (Σ HPA8), ingeridas em 200 g de vegetais, nos locais e épocas inseridos neste trabalho com a estimativa de ingestão da União Européia, considerando vegetais + castanhas.....	118
Figura 36. Estrutura das folhas.....	123
Figura 37. Partículas na parede celular e partículas encapsuladas.....	124

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Estimativa da exposição diária de um adulto não fumante a HPA, por diferentes fontes de exposição (ng/pessoa/dia).	23
Tabela 2. Contribuições dos Grupos alimentares na ingestão de HPA na dieta do Reino Unido.....	24
Tabela 3. Relações de diagnóstico (RATIOS) encontradas na literatura.	28
Tabela 4. Propriedades físico-químicas, massa molar, número CAS (EPA, 1986), classificação IARC (2010 e 2012) quanto a carcinogenicidade e estrutura molecular dos HPA de interesse neste trabalho.....	30
Tabela 5. Métodos de extração (M.E) e média aritmética das concentrações encontrados na literatura para HPA em vegetais e frutas.(*solo contaminado).....	43
Tabela 6. Concentrações em ng mL ⁻¹ dos padrões diluídos da mistura de HPA.....	56
Tabela 7. Condições de análise HPLC-FLU.....	57
Tabela 8. Concentração média em ng m ⁻³ dos HPA em material particulado MP _{2,5} na cidade de Araraquara em 2009.....	65
Tabela 9. Condições de análise no HPLC-FLU.....	66
Tabela 10. Parâmetros das curvas analíticas para cada HPA e os intervalos lineares.	71
Tabela 11. Parâmetros das curvas analíticas construídas em solvente e nos extratos das matrizes (alface e couve-manteiga).	74
Tabela 12. Valores de LD e LQ, instrumentais, em ng mL ⁻¹ para todos os HPA estudados.....	75
Tabela 13. Alguns métodos, selecionados da literatura, para extração de HPA a partir de matrizes vegetais	77

Tabela 14. Resultados do estudo para escolha do volume de solvente na extração em banho de ultrassom (3 x volume estipulado) (n=9) por 15 minutos, 20 mg amostra liofilizada, n-hexano como solvente de extração.	79
Tabela 15. Resultados do estudo para escolha do tempo de extração em banho de ultrassom (3 x 5 mL) (n=9) 20 mg de amostra liofilizada, n-hexano como extrator. .	80
Tabela 16. Resultados do estudo para escolha do solvente(n=9), para alface, na extração em banho de ultrassom (3x 5 mL) 20 mg de amostra liofilizada.	81
Tabela 17. Resultados do estudo para escolha do solvente(n=9), para couve, na extração em banho de ultrassom (3x 5mL) 20 mg de amostra liofilizada.	81
Tabela 18. Concentrações dos HPA nas amostras fortificadas em ng g ⁻¹ de amostra liofilizada.	85
Tabela 19. Resultados do estudo de recuperação nas matrizes alface e couve-manteiga.	86
Tabela 20. Valores de LD e LQ do método para as duas matrizes em ng g ⁻¹ de hortaliça liofilizada (peso seco).	87
Tabela 21. Variáveis envolvidas no processo de extração por ultrassom.	88
Tabela 22. Condições experimentais do planejamento fatorial fracionado.	89
Tabela 23. Resultados em porcentagem de recuperação do planejamento fatorial fracionado (PFF) e resposta normalizada (Rn).	90
Tabela 24. Fatores e níveis estudados no planejamento do composto central (PCC).	92
Tabela 25. Parâmetros experimentais aplicados ao planejamento do composto central seus níveis.	93
Tabela 26. Resultados em porcentagem de recuperação do planejamento do composto central e resposta normalizada.	94
Tabela 27. Condições otimizadas através da função de desejabilidade global.	98

Tabela 28. Concentrações dos HPA nas amostras fortificadas em ng g^{-1} de amostra liofilizada.....	100
Tabela 29. Resultados do estudo de recuperação da alface utilizando o método validado pela análise multivariada.	101
Tabela 30. Comparativo entre os fatores otimizados pelo método univariado e multivariado.....	102
Tabela 31. Valores de LD e LQ em ng g^{-1} para os dois métodos otimizados para a alface.	103
Tabela 32. Medianas e intervalo das concentrações individuais dos HPA, ΣHPA8 e ΣHPA11 em hortaliças nos municípios de Itu e Araraquara, em duas épocas, concentrações em ng g^{-1} p.s. e *p.u.	109
Tabela 33. Concentrações encontradas para amostras de diversas espécies de folhas em diferentes países e nas hortaliças neste estudo.	112
Tabela 34. Valores de relações diagnóstico para $\text{Flu}/(\text{Flu}+\text{Pi})$	121

LISTA DE ABREVIACÕES e SIMBOLOS

ACN: acetonitrila
ASE: Accelerated Solvent Extraction
ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BaA: benzo(a)antraceno
BaP: benzo(a)pireno
BghiP: benzo(ghi)perileno
CAS: Chemical Abstracts Service
CNA: Confederação Nacional dos Agricultores
CG-MS: Gas Chromatography-Mass Spectrometry
CONAMA: Conselho Nacional do Meio Ambiente
CONC: concentração
CONTAM Panel: European Food Safety Authority Panel on Contaminants in the Food Chain
CV: coeficiente de variação
D: desejabilidade global
d: desejabilidade individual
DahA: dibenzo(a,h)antraceno
DCM: diclorometano
DOE: Design of Exposure
EEA: European Environment Agency
EFSA: European Food Safety Authority
EMBRAPA: Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuária
EPA: Environmental Protection Agency
Fe: fenantreno
Flu: fluoranteno
FLU: fluorescência
g: grama
hER: Human estrogen receptor
HPA: Hidrocarboneto policíclico aromático
HPLC: High Performance Liquid Chromatograph

IARC: International Agency for Research on Cancer

ICH: International Conference on Harmonization

INCA: Instituto Nacional do Câncer

Ind: indeno(1,2,3-cd)pireno

INMET: Instituto Nacional de Meteorologia

INMETRO: Instituto Nacional de Metrologia Qualidade e Tecnologia

IPCS: International Programme on Chemical Safety

kg: quilograma

k_{OA} : coeficiente octanol-air

k_{OW} : coeficiente octanol-water

L: litro

LC: liquid chromatograph

LD: limite de detecção

LQ: limite de quantificação

ME: método de extração

MeOH: metanol

mL: mililitro

mm: milímetros

MM: massa molar

MOE: Margin of Exposure

MP: material particulado

MVA: Multivariate Analysis

ng: nanograma

OMS: Organização Mundial de Saúde

ORPLANA: Organização de Plantadores de Cana da Região Centro-Sul do Brasil

PCC: Planejamento do Composto Central

P.E.: ponto de ebulição

P.F.: ponto de fusão

PFF: Planejamento Fatorial Fracionado

Pi: pireno

RE: Receptores de estrógeno

Rec: recuperação

Rn: Resposta normalizada

RSM: Response Surface Methodology

SCF: Scientific Committee on Food

SOXWAVE: soxhlet+ultrassom

SPE: Solid phase extraction

t_R : tempo de retenção

UE: União Européia

UM: unidade de medida

UNICA: União da Indústria de Cana-de-açúcar

μg : micrograma

μL : microlitro

$^{\circ}\text{C}$: grau Celsius

λ : lambda (comprimento de onda)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
1.1. HPA.....	21
1.1.1. Origem e formação dos HPA	22
1.1.2. Exposição aos HPA.....	23
1.1.3. HPA na alimentação.....	24
1.1.4. Marcadores de queima de gramíneas	27
1.1.5. Propriedades físico-químicas dos HPA estudados.....	29
1.1.6. Efeitos dos HPA sobre a saúde humana	31
1.1.6.1. Carcinogenicidade, mutagenicidade e genotoxicidade.....	31
1.1.6.2. Alteração endócrina.....	35
1.2. Cana-de-açúcar no Brasil	36
1.2.1. Corte da cana-de-açúcar	38
1.3. Dispersão e remoção dos HPA na atmosfera	39
1.4. Legislação nacional queima de cana-de-açúcar.....	40
1.5. Legislação em alimentos.....	40
1.6. Análise de HPA em amostras vegetais	41
1.7. Técnicas de extração.....	42
1.8. Planejamento Experimental.....	46
1.8.1. Superfície de Resposta.....	47
1.9. Validação Analítica	49
1.9.1. Seletividade.....	50
1.9.1.1. Efeito Matriz.....	50
1.9.2. Linearidade.....	51
1.9.3. Precisão.....	52
1.9.4. Exatidão.....	52
1.9.5. Limite de detecção	52
1.9.6. Limite de quantificação.....	52

1.9.7. Robustez	52
2. OBJETIVOS	53
3. PARTE EXPERIMENTAL:	54
3.1. Materiais e Métodos	54
3.1.1. Materiais:	54
3.1.1.1. Solventes	54
3.1.1.2. Padrões.....	54
3.1.1.3. Equipamentos	55
3.1.2. Métodos	55
3.1.2.1. Preparo de soluções padrão	55
3.1.2.2. Método cromatográfico	57
3.1.2.3. Estratégia de Amostragem	57
3.1.2.4. Tratamento das Amostras	58
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
4.1. Escolha das hortaliças	59
4.2. Amostragem.....	61
4.2.1. Locais de Amostragem	61
4.2.2. Épocas de Amostragem.....	64
4.3. Otimização e validação do método analítico	66
4.3.1. Otimização das Condições Cromatográficas	66
4.3.1.1. Avaliação da resposta analítica nas condições de análise otimizadas	68
4.3.1.2. Seletividade do Método.....	71
4.3.1.3. LD e LQ do Método Instrumental	75
4.3.2. Otimização do Método de Extração.....	76
4.3.2.1. Método Univariado	78
4.3.2.1.1. Otimização do Volume de Solvente de Extração.....	79
4.3.2.1.2. Otimização do Tempo de Extração	80
4.3.2.1.3. Escolha do Solvente de Extração.....	80

4.3.2.1.4. Validação do método	84
4.3.2.2. Método Multivariado	87
4.3.2.2.1. Variáveis significativas	88
4.3.2.2.2. Planejamento do Composto Central	92
4.3.2.2.3. Validação do método multivariado	100
4.3.3. Comparativo entre os métodos otimizados e validados	102
4.4. Dados obtidos para as amostras de hortaliças e discussão ambiental	103
4.4.1. Resultados do teste de normalidade e significância	103
4.4.2. Comparações Ambientais: HPA em folhas	107
4.4.3. HPA em alface	115
4.4.4. Limites de Σ HPA8 e BaP em vegetais	117
4.5. Fonte dos HPA.....	120
4.6. Principais vias de incorporação dos HPA	122
4.6.1. Incorporação entre as amostras	122
5. CONCLUSÕES	125

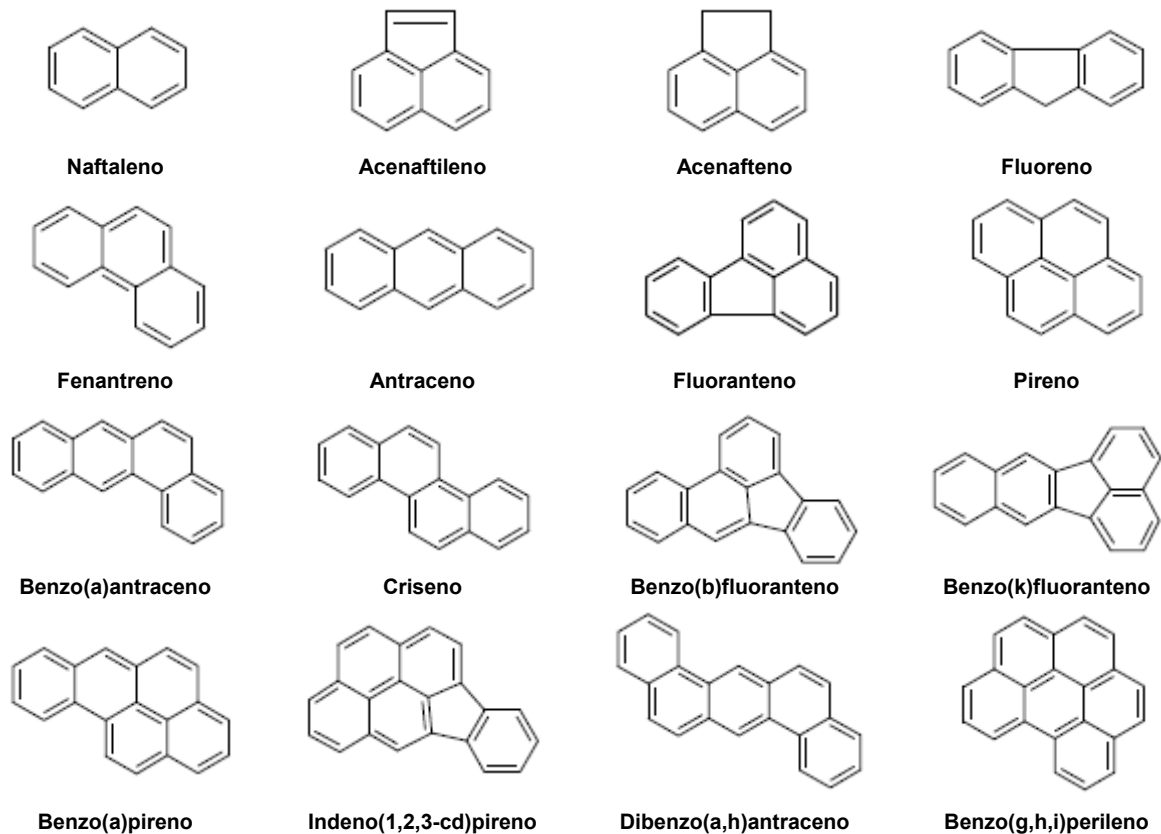
1. INTRODUÇÃO

1.1. HPA

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos são uma classe que engloba centenas de moléculas constituídas apenas por átomos de carbono e hidrogênio formando estruturas com dois ou mais anéis aromáticos (LEE, NOVOTNY e BARTLE, 1981).

Dezesseis HPA são considerados prioritários para investigação por diversos órgãos de proteção ambiental como a Agência Norte Americana de Proteção Ambiental (USA EPA) (EPA, 1999) e a Agência Européia do Ambiente (EEA) (EFSA, 2008) por suas características de ocorrência e toxicidade. Na Figura 1 estão apresentadas as estruturas dos 16 HPA considerados prioritários pela EPA.

Figura 1. Estrutura química dos HPA indicados pela EPA para monitoramento ambiental.



Fonte: (adaptado de European Commission, 2010)

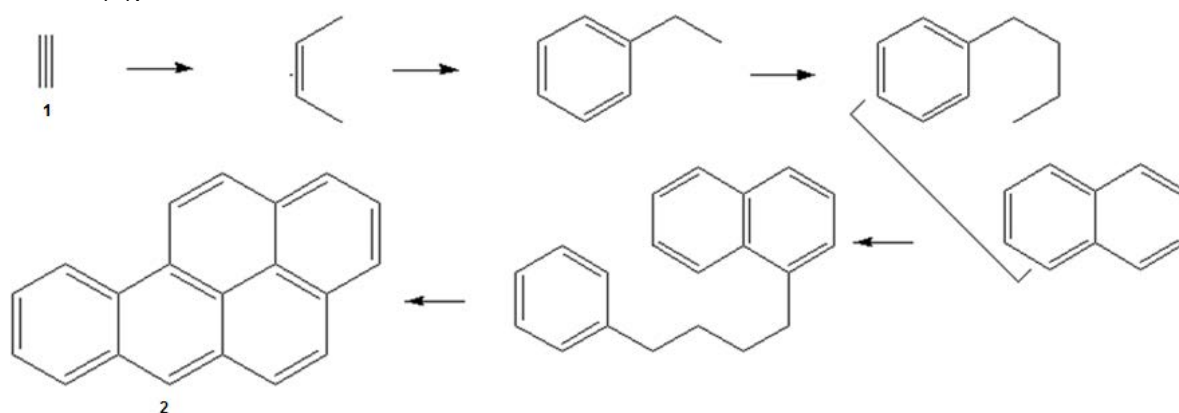
1.1.1. Origem e formação dos HPA

Os HPA são originados principalmente em processos de queima incompleta de biomassa e combustíveis fósseis, tendo como fonte preponderante atividades antropogênicas como o uso destes combustíveis fósseis em automóveis e sistemas de aquecimento; processos industriais e o uso de queimada como prática agrícola (EMBRAPA, 2010).

Acredita-se que estejam envolvidos dois processos distintos na formação de HPA proveniente desta combustão incompleta de matéria orgânica: a pirólise e a pirossíntese. Em altas temperaturas, durante a pirólise, compostos orgânicos são convertidos em moléculas pequenas não estáveis, em sua maioria radicais. Estas moléculas e outros radicais reagem para produzir moléculas maiores e mais estáveis como os HPA (pirossíntese). Uma vez formados, os HPA podem participar das reações pirossintéticas, originando estruturas mais complexas com anéis altamente condensados (LEE, NOVOTNY e BARTLE, 1981).

Os HPA não são obrigatoriamente fracionados em fragmentos menores antes da pirossíntese, podendo resistir à fragmentação parcial seguida pela hidrogenação dos seus radicais primários (LEE, NOVOTNY e BARTLE, 1981).

Figura 2. Proposta hipotética de síntese do Benzo(a)pireno a partir do acetileno: 1-acetileno; 2-Benzo(a)pireno.



Fonte: LEE, NOVOTNY e BARTLE, 1981

1.1.2. Exposição aos HPA

A exposição humana (e de outros animais) a HPA pode ocorrer por diferentes vias. As mais importantes são a inalação de ar poluído e a ingestão de alimentos ou de água contaminada. Na Tabela 1, são apresentados alguns valores médios da exposição humana estimada, para cada uma destas vias.

Tabela 1. Estimativa da exposição diária de um adulto não fumante a HPA, por diferentes fontes de exposição (ng/pessoa/dia).

HPA	Alimento ^a	Água Potável ^b	Ar Inalado ^c
Antraceno	<30-340	-	20
Fenatreno	<330-4510	-	400
Fluoranteno	600-1660	2-200	100
Pireno	600-1090	0,2-10	100
Benzo[a]Antraceno	<20-410	0,2-10	20
Criseno	200-1530	200 ^d	20
Benzo[b]Fluoranteno	5-360	0,1-2	20
Benzo[j]Fluoranteno	<30	0,02-0,2	-
Benzo[k]Fluoranteno	40-140	0,02-2	20
Benzo[b+j+k]Fluoranteno	<70-1100	-	60
Benzo[a]Pireno	50-290	0,2-2	20
Benzo[e]Pireno	200	-	20
Benzo[ghi]Perileno	120-360	0,2-2	20
Indeno[1,2,3-cd]Pireno	<20-460	0,2-2	20
Dibenzo[a,h]Antraceno	<10-80	-	2

a) Faixa de valores médios

b) Faixa de ordem de magnitude de concentração, assumindo a ingestão de 2L/dia

c) Ordem de magnitude assumindo uma taxa de ventilação de 20m³/dia, sem a exposição ocupacional.

d) Criseno+Trifenileno

Fonte: Scientific Committee on Food (2002)

A alimentação é a via de exposição mais importante já que nela estes compostos se encontram em maior concentração do que no ar e na água. Os alimentos podem sofrer exposição aos HPA por diferentes maneiras como por exemplo: quando são expostos naturalmente (cana-de-açúcar, hortaliças, legumes e frutas), são expostos durante o processo de industrialização (carnes defumadas e

grãos torrados) e quando são derivados de matérias primas que contenham estes compostos (rapadura, cachaça e açúcar, óleos provenientes de grãos pré-tratados, dentre outros). Diversos alimentos, naturais ou processados, contém lipídios que por interagirem com os HPA, facilitam sua absorção.

Em relação à exposição humana devem ser consideradas ainda outras fontes, como o tabagismo (ativo ou passivo) e a exposição ocupacional em atividades e processos envolvendo a produção ou manuseio de matérias-primas que contenham estes compostos (EUROPEAN UNION, 2002)

1.1.3. HPA na alimentação

Estudos desenvolvidos no Reino Unido mostram as contribuições dos grupos alimentares na ingestão diária de HPA em duas épocas: 1983 e 2002 (Tabela 2).

Tabela 2. Contribuições dos Grupos alimentares na ingestão de HPA na dieta do Reino Unido.

	Denis et al., 1983		Cot, 2002	
	BaP	Σ11 HPA	BaP	Σ 19 HPA
Óleos e Gorduras	50%	34%	6%	3%
Cereais	30%	31%	24%	35%
Vegetais	8%	12%	12%	13%

BaP = benzo(a) pireno

Fonte: European Union, 2002.

Dentre os três grupos alimentares considerados, os vegetais foram os que apresentaram maior incremento da contribuição para ingestão de BaP, o mais carcinogênico dos HPA, enquanto para os óleos e gorduras e cereais esta contribuição diminuiu. O aumento na contribuição proveniente do consumo de vegetais pode ser atribuído em parte ao aumento da ingestão deste tipo de alimento, o que correspondeu a 8% entre 1990 e 2001 (Scientific Committee on Food, 2002).

No Brasil, um estudo do Ministério da Saúde, revelou que 30,4% da população com mais de 18 anos optam pelo consumo de frutas e hortaliças cinco ou

mais vezes na semana. Esta mesma pesquisa apontou que 18,9% dos entrevistados consumiram cerca de cinco porções diariamente em 2009 – 2,6 vezes mais que o registrado em 2006 (7,1%). Isso equivale as 400 gramas diárias recomendadas pela Organização Mundial de Saúde. Foram entrevistadas 54.367 pessoas entre os dias 12 de janeiro e 22 de dezembro de 2009 (Vigitel, 2010).

Os vegetais desempenham um importante papel tanto na dispersão no ambiente, quanto na exposição humana aos contaminantes orgânicos.

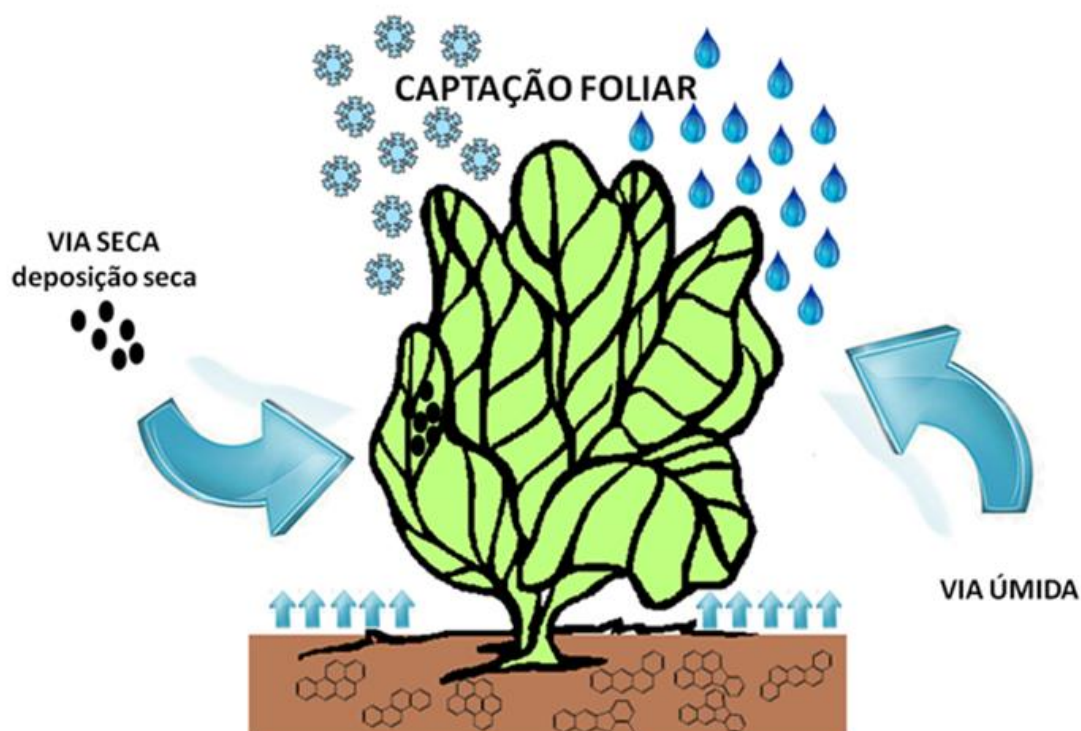
1.1.3.1. Incorporação dos HPA nos vegetais folhosos

As folhas dos vegetais são recobertas por uma camada denominada cutícula constituída de uma matriz de bio polímero, comumente denominado cera. As ceras normalmente constituem cerca de 20 a 60% da massa total da cutícula e são uma complexa mistura de cadeias alifáticas. A composição e estrutura desta cera podem variar de acordo com a diferença entre espécies, estados de desenvolvimento e fatores de estresse ambiental durante o crescimento (YEATS, et al. 2009).

A incorporação de HPA em plantas pode ocorrer pela captação foliar, que inclui a deposição seca (sedimentação de partículas) ou por via úmida (precipitação de chuva ou neve), desta maneira a incorporação ao vegetal ocorrerá através da cera cuticular ou por absorção estomática. A deposição seca de partículas suspensas foi apontada como sendo o principal caminho no processo de exposição de folhas de Azalea (*Rhododendron oomurasaki*) a alguns HPA como benzo(a)pireno e perileno. (NAKAJIMA et al., 1995 apud COLLINS; FRYER e GROSSO, 2006, p. 48). Segundo TREMOLADA et al., (1996) a absorção via radicular também pode ocorrer com possibilidade de translocação para as partes aéreas da planta, porém neste processo as plantas necessitam de água proveniente das raízes em direção as outras extremidades da planta não sendo assim considerado um bom mecanismo de distribuição de moléculas hidrofóbicas como os HPA. Muitos estudos demonstram que a partição entre o solo e os vegetais não ocorre em grande extensão para as moléculas lipofílicas, como demonstrou TUTEJA, ROUT e BISHNOI (2011, p. 615-616) que relataram a ocorrência de HPA em concentrações maiores em vegetais folhosos como o fenacho (*Trigonella*

foenum-graecum) e *couve-flor* do que nos vegetais de raízes como a batata, rabanete e nabo. No entanto, solos contaminados podem contribuir para o aumento na concentração destas moléculas através da volatilização (SIMONICH & HITES, 1994). A Figura 3 ilustra os processos de incorporação de HPA por plantas.

Figura 3. Ilustração das vias de incorporação de HPA pelas plantas.



Fonte: a autora

Algumas pesquisas demonstram que há diferença na incorporação (absorção ou adsorção) de HPA provenientes de material particulado entre diferentes tipos de folhas. De acordo com JOURAEVA et al., (2002, p. 335), as folhas de *Tilia Euchlora* (árvore da tília) possuem maior capacidade em incorporar HPA associados a partículas do que as folhas de *Pyrus calleryana* (árvore da pêra) e segundo os autores, estas habilidades não podem ser explicadas pela quantidade de cera cuticular das folhas. Esta afirmação é reforçada por HOWSAM, JONES e INESON (2000) que relataram pouca relação entre o conteúdo lipídico das folhas e a concentração de HPA em folhas caídas de árvores de freixo, carvalho e avelã.

Em 2008 a União Européia através do European Food Safety Authority Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM Panel 2008), desenvolveu um estudo que buscou estabelecer quais HPA presentes nos alimentos, poderiam estar associados ao risco de carcinogenicidade. Foram inseridas neste estudo 9714 amostras de 33 categorias/subcategorias de alimentos e destes, 30% foram analisados para todos os 15 HPA prioritários recomendados pela SCF (*Scientific Committee on Food*). O resultado das análises mostrou a presença de outros HPA considerados carcinogênicos apesar dos testes apresentarem-se negativos para o benzo(a)pireno. Grupos individuais foram somados para certificar qual soma poderia refletir melhor a ocorrência de carcinogenicidade e mutagenicidade dos HPA. O *CONTAM Panel* concluiu que oito HPA individualmente ou combinados devem ser monitorados para avaliação do potencial carcinogênico dos HPA em alimentos. São eles: benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, dibenzo(a,h)antraceno, benzo(g,h,i)perileno e indeno(1,2,3-cd)pireno (EUROPEAN UNION, 2008).

1.1.4. Marcadores de queima de gramíneas

Sabe-se que na época de safra de cana-de-açúcar não somente há o aumento de exposição humana e ambiental aos HPA pela queima da palha desta cultura como também pelo aumento das atividades de transporte da mesma por veículos de grande porte movidos por combustível fóssil. No intuito de identificar a influência da queima da palha de cana-de-açúcar no aumento das concentrações de HPA em vegetais, optou-se por adicionar três HPA neste estudo baseando-se nas conclusões do estudo efetuado por ANDRADE et al. (2010) em material particulado atmosférico PM₁₀ na cidade de Araraquara, no período de 2002 a 2004. Neste estudo o fenantreno e fluoranteno foram indicados como sendo os HPA mais emitidos durante a época de queima da palha de cana-de-açúcar e o pireno como marcador de queima de gramínea. Sendo estes três HPA utilizados para indicar se houve aumento na emissão de HPA oriundos da queima da palha de cana-de-açúcar na região de Araraquara.

Outra maneira de se estimar se os HPA são provenientes de queima de gramínea são as chamadas relações de diagnóstico ou RATIOS, que podem ser calculadas com HPA de mesma massa molecular onde é esperado por possuírem características físico-químicas semelhantes, que tenham assim comportamento também semelhantes. Os RATIOS são utilizados no diagnóstico da fonte emissora em vários tipos de matrizes ambientais como água, sedimento, solo, folhas, espinhos de coníferas e mexilhões (TOBISZEWSKI & NAMIESNIK, 2012).

Há diversos valores na literatura onde são estabelecidos as faixas atribuídas a cada fonte emissora. As relações de diagnóstico calculadas com moléculas de mesma massa molecular (A e B) são efetuadas da seguinte forma: $A/(A+B)$. Na tabela 3 pode-se observar os HPA utilizados no cálculo, valores de diagnóstico, fontes emissoras e autores do estudo.

Tabela 3. Relações de diagnóstico (RATIOS) encontradas na literatura.

AUTORES	A	B	VALORES	FONTES
RAVINDRA et al. 2008	Fluoreno	Pireno	<0,5	Emissão petróleo
			>0,5	Emissão diesel
PIES et al. 2008	Antraceno	Fenantreno	<0,1	Petrogênica
			>0,1	Pirogênica
DE LA TORRE et al. 2009	Fluoranteno	Pireno	<0,4	Petrogênica
			0,4-0,5	Combustível fóssil
			>0,5	Combustão de madeira e gramíneas
YUNKER et al. 2002	Benzo(a)antraceno	Criseno	<0,2	Petrogênica
			>0,35	Combustão

Fonte: TOBISZEWSKI & NAMIESNIK, 2012

1.1.5. Propriedades físico-químicas dos HPA estudados

As propriedades físico-químicas são de grande importância para o entendimento do comportamento ambiental e biológico dos HPA. Os HPA são pouco solúveis em meio aquoso, sendo que a solubilidade em água e a volatilidade diminuem com o aumento da massa molar. Na Tabela 4, estão apresentadas algumas das propriedades físico-químicas das substâncias estudadas neste trabalho e a classificação da IARC (International Agency for Research on Cancer) quanto a carcinogenicidade (IARC, 2010 e 2012).

Tabela 4. Propriedades físico-químicas, massa molar, número CAS (EPA, 1986), classificação IARC (2010 e 2012) quanto a carcinogenicidade e estrutura molecular dos HPA de interesse neste trabalho.

HPA	Fórmula	N. de anéis	MM (g/mol)	CAS	P.F. (°C)	P.E. (°C)	Solubilidade*	Log K _{ow}	Log K _{OA}	C. Henry à 25°C**	T _½ solo	IARC
Fen	C ₁₄ H ₁₀	3	178,23	81-01-8	98,5	332	1,1	4,46	7,5	3,24	2 d	3
Flu	C ₁₆ H ₁₀	4	202,26	206-44-0	108	384	0,2	8,90	8,6	1,037	-	3
Pi	C ₁₆ H ₁₀	4	202,26	129-00-0	149-151	404	0,13	8,80	8,6	0,98	210 d -5,2 a	3
BaA	C ₁₈ H ₁₂	4	228,29	56-55-3	158	438	0,011	5,80	9,5	0,581	-	2B
Cri	C ₁₈ H ₁₂	4	228,29	218-01-9	253	448	0,0019	5,73	10,4	0,065	-	2B
BbF	C ₂₀ H ₁₂	5	252,31	205-99-2	163-165	-	-	-	9,5~11,0	0,046	269 d - 8,2a	2B
BkF	C ₂₀ H ₁₂	5	252,31	207-08-9	215-217	480	0,0008	6,50	9,5~11,0	-	-	2B
BaP	C ₂₀ H ₁₂	5	252,31	50-32-8	176	495	0,0015	6,35	10,8	0,016	-	1
DahA	C ₂₂ H ₁₄	5	278,35	53-70-3	266-267	524	0,0005	6,50	>11	-	-	2A
BghiP	C ₂₂ H ₁₂	6	276,33	191-24-2	278	500	0,00014	6,63	>11	0,075	< 9,5 a	3
Ind	C ₂₂ H ₁₂	6	276,33	193-39-5	161-163	535	0,00019	6,70	>11	0,003	-	2B

Fen: Fenantreno
 Flu: Fluoranteno
 Pi: Pireno
 BaA: Benzo(a)antraceno

Cri: Criseno
 BbF: benzo(b)fluoranteno
 BkF: Benzo(k)fluoranteno
 BaP: Benzo(a)pireno

DahA: Dibenzo(a,h)antraceno
 BghiP: benzo(g,h,i)perileno
 Ind: Indeno(1,2,3-cd)pireno
 T_½: tempo de meia vida

*em água (25°C) mg/L
 ** (Pa m³.mol⁻¹)
 d: dias
 a: anos

1.1.6. Efeitos dos HPA sobre a saúde humana

1.1.6.1. Carcinogenicidade, mutagenicidade e genotoxicidade

A mutagenicidade se refere a propriedade que uma substância ou fenômeno possui em ser capaz de induzir ou aumentar a frequência de mutações no organismo. As mutações podem ocorrer espontaneamente, ou ser provocadas por agentes físicos (mutagênicos físicos) ou químico (mutagênicos químicos) (HOJO, 1981).

O DNA, material genético dos organismos vivos, contém a informação genética codificada na sequência de suas bases nitrogenadas. Se esta sequência é alterada por mutação, a informação genética torna-se também alterada (genotoxicidade), se ocorre em células germinativas, pode ser transmitida de geração para geração (HOJO, 1981).

Por outro lado, quando esses agentes atingem o DNA de células somáticas, isto é, das demais células do corpo, as substâncias químicas podem dar origem a células cancerosas, por alterarem os mecanismos celulares normais codificados no DNA que controlam a multiplicação celular. Uma grande variedade de dados científicos dá força à hipótese de que fatores ambientais constituem a maior causa de câncer, conforme explica a teoria da mutação somática. Existem também muitas evidências experimentais de que as substâncias carcinogênicas ou seus derivados metabólicos são também mutagênicos, este fato fortalece a hipótese de que estes agentes químicos atuam de modo a produzir alteração no DNA, por meio de reações químicas (HOJO, 1981).

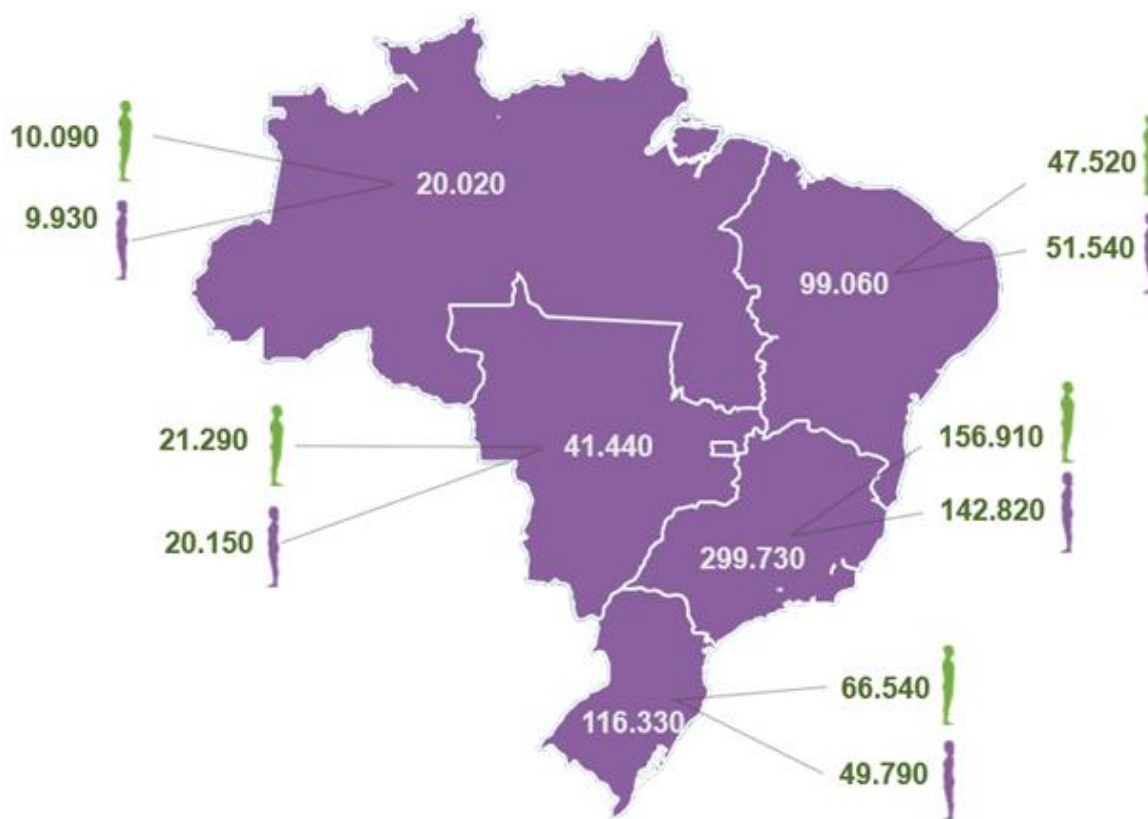
Conhecido há muitos séculos, o câncer foi amplamente considerado como uma doença de países desenvolvidos e com grandes recursos financeiros. Há aproximadamente quatro décadas, a situação vem mudando, e a maior parte do ônus global do câncer pode ser observada em países em desenvolvimento, principalmente aqueles com poucos e médios recursos (INCA 2011).

Assim, nas últimas décadas, o câncer ganhou uma dimensão maior, convertendo-se em um problema evidente de saúde pública mundial. A Organização Mundial de Saúde (OMS) estimou que, no ano de 2030, pode-se esperar 27 milhões de novos casos de câncer, 17 milhões de mortes por câncer e 75 milhões de pessoas com

câncer, diagnosticado ou não. O maior efeito desse aumento vai incidir em países de baixa e média renda (INCA 2011).

No Brasil, as estimativas de 2014 serão válidas também para o ano de 2015 e apontam a ocorrência de aproximadamente 580.000 novos casos de câncer como apresentado no mapa da Figura 4 divididos por sexo (INCA 2013).

Figura 4. Casos estimados de displasia para 2014 para homens (verde) e mulheres (roxo) nas regiões brasileiras.



Fonte: INCA 2013

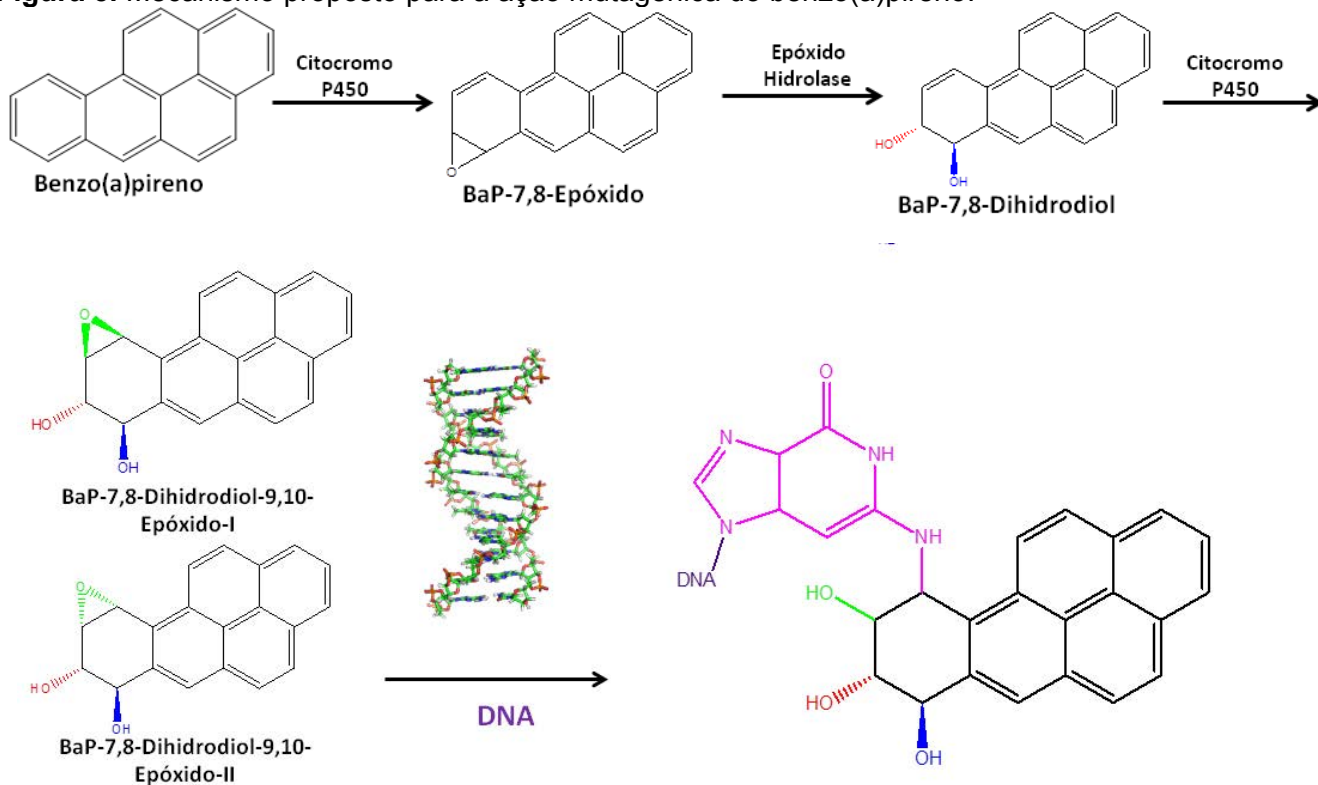
Os HPA são moléculas com grande potencial carcinogênico e/ou mutagênico (CARUSO, 2007) e por isso há grande interesse no desenvolvimento de métodos que possam diagnosticar a ocorrência e dinâmica ambiental destes compostos, bem como a exposição do homem e da biota em geral. A atividade carcinogênica de um composto em particular é dependente de diversos fatores estruturais da molécula como forma, tamanho, fatores estéricos e potencial de ionização.

Várias investigações estão sendo efetuadas para decifrar o mecanismo de ação carcinogênica quando empregado altas doses de HPA em sistemas biológicos, tumores de animais e em sistemas de bioensaios. As características comuns dentre os carcinógenos orgânicos é a reatividade química de um de seus metabólitos quando exposto ao sistema metabólico da espécie suscetível, uma fração do composto administrado é convertido em um metabólito reativo o qual pode iniciar o processo carcinogênico. MILLERS e MILLERS p.737 (1971, apud KATIYAR, AGARWAL e MUKHTAR, 1993, p. 11) sumarizaram pela primeira vez a relação estrutura-atividade indicando que todos os carcinógenos são eletrofílicos no início ou são transformados em um metabólito eletrofílico.

A atividade carcinogênica dos HPA foi descrita por BROOKES e LAWLEY p. 781 (1964 apud KATIYAR, AGARWAL e MUKHTAR, 1993, p. 11):

Os metabólitos responsáveis pela atividade carcinogênica devem ser também os responsáveis pela ligação covalente com o DNA, uma vez que após o tratamento dérmico com HPA radioativos em estudos com ratos, estes são encontrados ligados covalentemente ao DNA da pele.

A maioria dos carcinógenos especialmente os HPA são quimicamente inertes. Para se tornar reativos os HPA devem, então, ser ativados metabolicamente pelas enzimas do sistema citocromo P450, principalmente pelas responsáveis pelas reações oxidativas. O metabólito reativo formado é capaz de se ligar ao DNA e iniciar a resposta carcinogênica final (Figura 5).

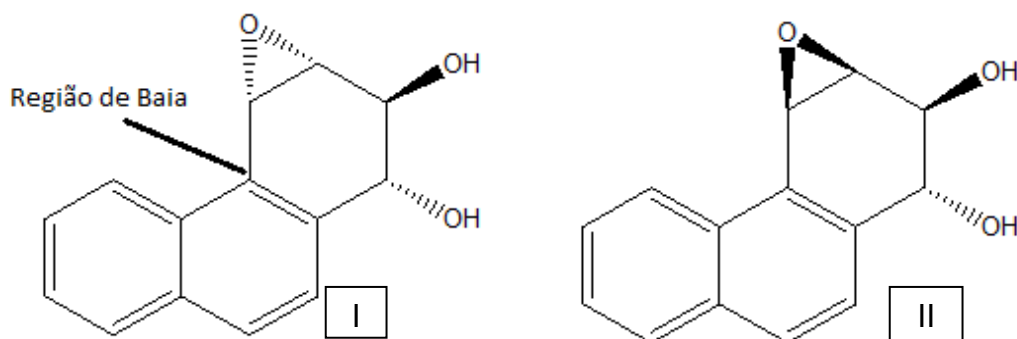
Figura 5. Mecanismo proposto para a ação mutagênica do benzo(a)pireno.

Fonte: a autora.

Para que ocorra a reação de modificação de um composto inerte para um reativo no organismo humano JERINA et al. p.1 (1980 apud KATIYAR, AGARWAL e MUKHTAR, 1993, p. 11) sugeriram:

A região de baía (Bay region) é a estrutura característica necessária para a atividade carcinogênica pois a ativação de muitos metabólitos provenientes dos HPA podem ocorrer na região de baía vicinal ao epóxido dihidrodiol, onde o anel epóxido é adjacente a região de baía (Figura 6).

O termo região de baía é utilizado para descrever a área côncava da periferia dos hidrocarbonetos aromáticos.

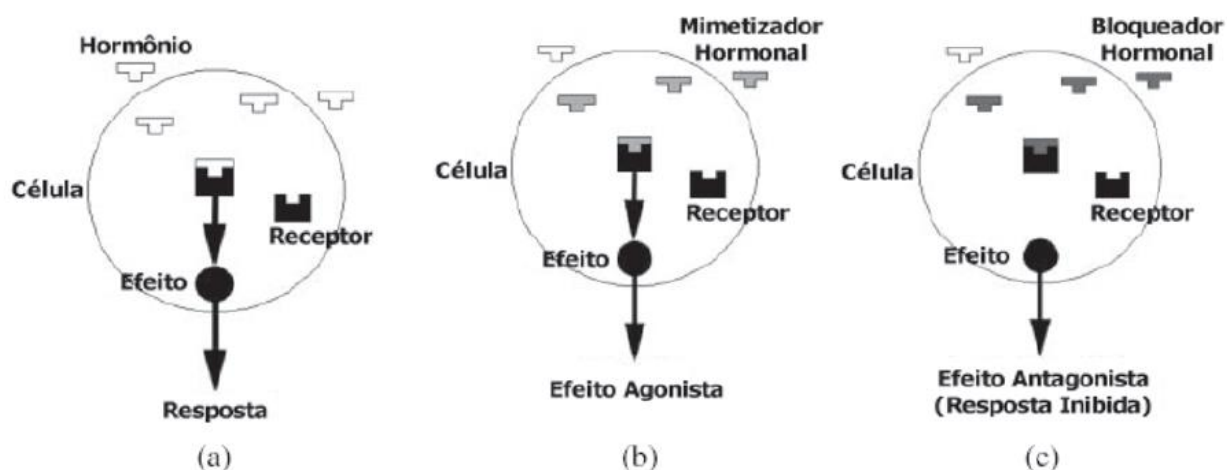
Figura 6. Região de Baía nas estruturas parciais dos epóxido-diastereoisomero I e II.

Fonte. LAKSHMAN, SAYER E JERINA (1991)

1.1.6.2. Alteração endócrina

O Sistema Endócrino é constituído por diversas glândulas e tecidos que secretam substâncias responsáveis pelo controle da maioria das funções biológicas. As substâncias secretadas são chamadas hormônios que atuam em tecidos alvos ligando-se a receptores específicos.

Algumas publicações sugerem que os HPA, seus derivados hidroxilados e os nitro HPA contendo 4 e 5 anéis podem interagir como alteradores endócrinos, sendo propostos três mecanismos de ação. O primeiro é a atuação da mesma maneira que o hormônio duplicando assim seus efeitos fisiológicos; o segundo é a competição inibindo assim o efeito hormonal e o terceiro mecanismo inclui a modificação do hormônio disponível ou da expressão hormonal no tecido alvo (SANTODONATO, 1997). Todos os três mecanismos estão ilustrados na Figura 7.

Figura 7. Disfunções endócrinas: **(a)** resposta natural; **(b)** efeito agonista; **(c)** efeito antagonista.

Fonte: GHISELLI e JARDIM, 2007

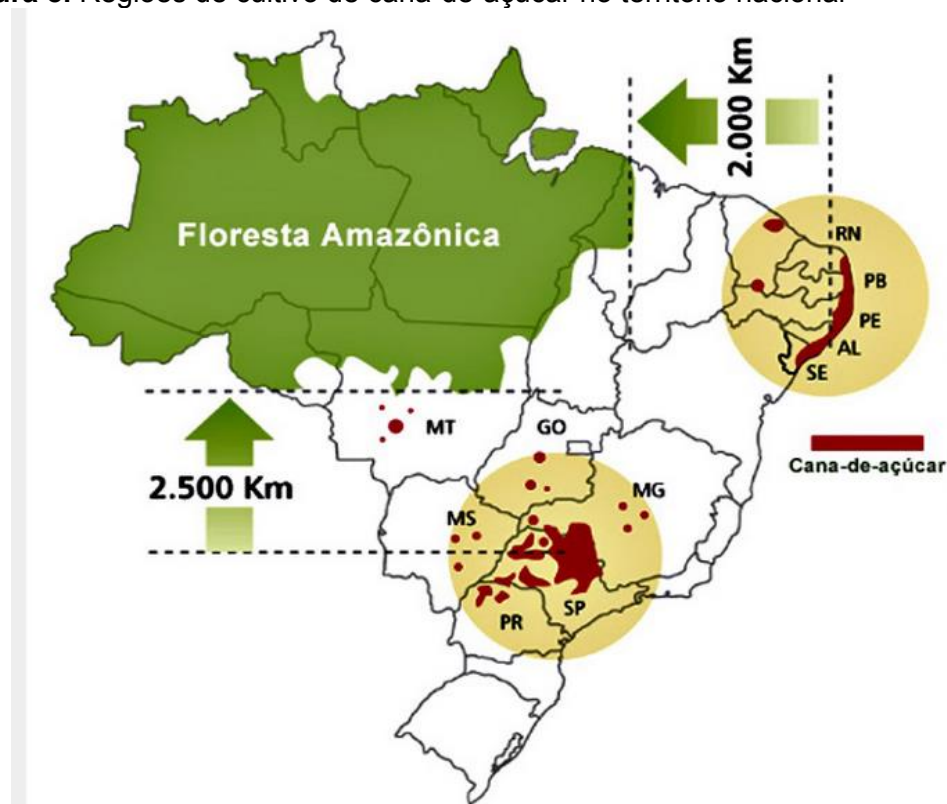
Estudos de exposições prolongadas ao benzo(a)pireno em células de Leyding (células que quando estimuladas produzem o hormônio testosterona) de ratos mostraram uma diminuição da qualidade do espermatozoides do epididimo (pequeno ducto que coleta e armazena os espermatozoides produzidos nos testículos) que pode estar associado a redução nos níveis de testosterona (CHUNG et al., 2011).

Alguns hidroxi nitro HPA testados em leveduras híbridas que expressão o gene *hER* (human estrogen receptor) apresentaram forte atividade estrogênica maior que o bisfenol e anti-estrogênicas maior que típicos antagonistas ER (receptores de estrógeno) (KAMEDA et al., 2011). Os hidroxi HPA que possuem 4 anéis aromáticos tais como hidroxi benzo(a)antraceno, hidroxicriseno e hidroxibenzo(c)fenantreno, são apontados como forte interruptores da atividade endócrina.

1.2. Cana-de-açúcar no Brasil

Introduzida no período colonial, a cana-de-açúcar se transformou em uma das principais culturas da economia brasileira. O Brasil não é apenas o maior produtor de cana, mas também o primeiro do mundo na produção de açúcar e etanol conquistando cada vez mais, o mercado externo com o uso do biocombustível como alternativa energética. O setor sucroalcooleiro nacional é referência para os demais países produtores. A cana-de-açúcar é produzida em quase todo o País, sendo 60% em São Paulo onde há instaladas aproximadamente duzentas usinas. As demais zonas produtoras são Paraná, Triângulo Mineiro e Zona da Mata Nordestina, as áreas de cultivo de cana-de-açúcar podem ser observadas na Figura 8 (MAPA, 2013).

Figura 8. Regiões de cultivo de cana-de-açúcar no território nacional



Fonte: UNICA, 2013.

Responsável por mais da metade do açúcar comercializado no mundo, o País deve alcançar taxa média de aumento da produção de 3,25%, até 2018/19, e colher 47,34 milhões de toneladas do produto, o que corresponde a um acréscimo de 14,6

milhões de toneladas em relação ao período 2007/2008. Para as exportações, o volume previsto para 2019 é de 32,6 milhões de toneladas. O etanol, produzido no Brasil, a partir da cana-de-açúcar, também conta com projeções positivas para os próximos anos, devidas principalmente, ao crescimento do consumo interno. A produção projetada para 2019 é de 58,8 bilhões de litros, mais que o dobro da registrada em 2008. O consumo interno está projetado em 50 bilhões de litros e as exportações em 8,8 bilhões (MAPA, 2013).

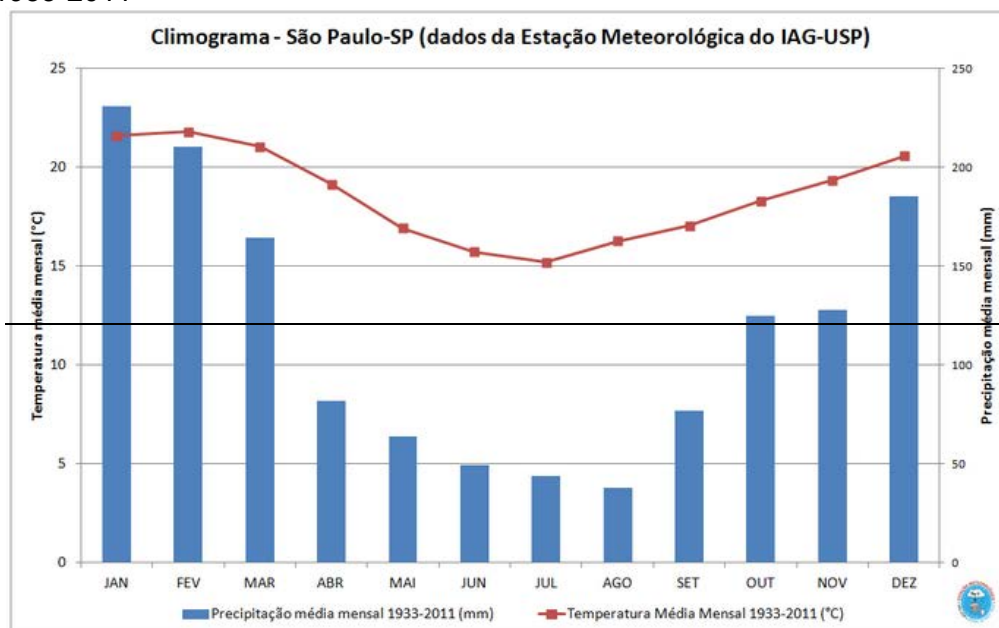
1.2.1. Corte da cana-de-açúcar

O corte de cana-de-açúcar é mecanizado em 25% da produção brasileira e em 40% da paulista; o restante é cortado manualmente e sofre queima pré-corte (RIBEIRO, 2008). Esta prática resulta em contaminação ambiental, pois as partículas de palha queimada (fuligem), que contém inúmeros compostos tóxicos, dentre os quais, destacam-se os HPA, são introduzidos na atmosfera (BETTIN e FRANCO, 2005; ANDRADE, et al, 2010) e conseqüentemente estarão disponíveis no ambiente adsorvidos ao material particulado onde através deste poderá atingir o solo, água e toda a vegetação, próximas ou distantes ao local de emissão.

A queima da cana-de-açúcar é utilizada para aumentar a concentração de sacarose por tonelada de cana devido à evaporação da água. A colheita também é facilitada, aumentando-se em cerca de 10 vezes o rendimento do corte manual, além de afastar animais peçonhentos que podem trazer riscos aos trabalhadores desta cultura (ZAMPERLINI, SILVA e VILEGAS, 1997).

Em São Paulo, a safra anual da cana-de-açúcar ocorre de maio a novembro, coincidindo com período de baixas precipitações pluviométricas e piores condições de dispersão dos poluentes atmosféricos como mostra a Figura 9 os dados históricos de temperatura e precipitação no Estado de São Paulo.

Figura 9. Temperatura e precipitação pluviométrica no Estado de São Paulo. Médias para o período 1933-2011



Fonte: IAG-USP

Dessa forma, há o aumento da probabilidade das queimadas terem impactos negativos sobre a qualidade do ar e sobre a saúde das pessoas que vivem nas regiões canavieiras (RIBEIRO, 2008).

1.3. Dispersão e remoção dos HPA na atmosfera

Os poluentes atmosféricos estão sujeitos a inúmeros processos de transporte e transformação que determinam a sua composição e níveis de concentração.

A atmosfera possui mecanismos de dispersão e remoção dos HPA por processos físicos e químicos que dependem de condições como: incidência de radiação solar; fatores climáticos como as chuvas, ventos e temperatura; presença de outros poluentes e reatividade química. A deposição seca e úmida são os principais processos físicos de remoção dos HPA da atmosfera, que se encontram na fase vapor (2-3 anéis aromáticos) ou associado a partículas (≥ 4 anéis aromáticos), sendo importante nesse processo as características físicas e o tamanho das partículas, que também influi

diretamente no transporte atmosférico. A deposição seca envolve a sedimentação e a impactação inercial induzida.

A velocidade de deposição seca na atmosfera é controlada pelo tamanho da partícula tendo uma relação direta, quanto maior o tamanho maior será esta deposição. O processo de deposição úmida interfere na remoção dos HPA em ambas as fases (gasosa e particulada), esta remoção está diretamente relacionada com a quantidade e intensidade das chuvas (LOPES e ANDRADE, 1996).

1.4. Legislação nacional queima de cana-de-açúcar.

Em 19 de setembro de 2002, o governo do Estado de São Paulo publicou a Lei nº 11.241 que dispõe sobre a eliminação do uso do fogo, como método despalhador e facilitador do corte de cana-de-açúcar. Esta lei foi regulamentada pelo decreto nº 47.700, de 11 de março de 2003, que apresenta em seu artigo 2º uma tabela de eliminação gradativa, com término para o ano de 2031. Entretanto, em junho de 2007, a União da Indústria de Cana-de-açúcar (UNICA) e a Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo assinaram um protocolo agroambiental que antecipa os prazos para extinção da queima da palha da cana nos canaviais paulistas (Secretaria do Meio Ambiente, 2007). Os prazos estabelecidos foram: 2014 para áreas mecanizáveis e 2017 para áreas não mecanizáveis, sendo que 85% das usinas do Estado de São Paulo aderiram ao protocolo. No mesmo sentido, em março de 2008, a Organização de Plantadores de Cana da Região Centro-Sul do Brasil (ORPLANA) também aderiu ao protocolo. Ao aderir ao protocolo, o Governo do Estado concede um certificado de Conformidade agroambiental aos produtores de cana.

1.5. Legislação em alimentos.

No Brasil os HPA estão legislados, em matrizes ambientais, apenas para água superficial. Para mananciais de água doce superficial, destinados a pesca e cultivo

intensivo de organismos para fins de consumo humano, são fixados valores para os HPA: BaP, BaA, BbF, BkF e o DahA com concentração máxima permitida de $0,018\mu\text{g L}^{-1}$. Já mananciais do mesmo tipo, porém utilizados na captação de água para consumo humano, a concentração máxima permitida para o BaP $0,7\mu\text{g L}^{-1}$ (CONAMA 2011). Na União Européia os valores máximos permitidos em água para consumo humano (água potável) são: $0,01\mu\text{g L}^{-1}$ para BaP e $0,1\mu\text{g L}^{-1}$ para ΣBbF , BkF, BghiP, Indeno (SINTESE DE LEGISLAÇÃO DA UNIÃO EUROPÉIA, 1998).

Em relação aos alimentos, acompanhando a legislação internacional, existem limites fixados na Comunidade Européia para níveis máximos de BaP em óleos e gorduras ($2,0\mu\text{g kg}^{-1}$), alimentos para lactantes e crianças ($1,0\mu\text{g kg}^{-1}$), carnes defumadas e produtos defumados à base de carne ($5,0\mu\text{g kg}^{-1}$), partes comestíveis de peixes defumados ($5,0\mu\text{g kg}^{-1}$), partes comestíveis de peixes ($2,0\mu\text{g kg}^{-1}$), moluscos bivalves ($10,0\mu\text{g kg}^{-1}$), crustáceos e cefalópodes ($5,0\mu\text{g kg}^{-1}$) (CARUSO, 2007).

No Brasil apesar dos vários estudos em diversificados produtos destinados a alimentação como: aguardente (BETTIN & FRANCO, 2005), café e chá mate (CAMARGO & TOLEDO, 2002a), guaraná em pó (CAMARGO et al., 2006), mel (LAMBERT et al., 2012), rapadura de cana-de-açúcar (SILVA, 2006), açúcar (CAMARGO & TOLEDO, 2002b), margarinas e maionese (CAMARGO & TOLEDO, 2000) dentre outros, apenas o aroma de fumaça para uso alimentar possui valores máximos estabelecidos para o benzo(a)pireno ($0,03\mu\text{g kg}^{-1}$) pela Resolução n. 104 do Ministério da Saúde de 14/05/1999 e $2\mu\text{g kg}^{-1}$ em azeite de caroço de azeitona ou óleo de bagaço e/ou caroço de oliva pela Resolução RDC n. 281, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária de 06 de outubro de 2003.

1.6. Análise de HPA em amostras vegetais

A análise de HPA em material vegetal vêm sendo extensamente empregada com o objetivo de utilizar plantas como biomonitoras do ambiente a que estes estão expostos (HOWSAN et al., 2001; JOURAEVA et al., 2002; LAMBERT et al., 2012; TOMASHUK et al., 2012; RODRIGUEZ et al., 2012; MURAKAMI et al., 2012). Somente

alguns dados reportados na literatura indicam uma maior preocupação no âmbito da exposição nutricional, como pode-se observar na Tabela 5.

1.7. Técnicas de extração

Algumas técnicas de extração sólido-líquido reportados na literatura, como o Soxhlet, demandam muito tempo e alto consumo de solvente sendo assim ambientalmente impactante e sua utilização deve ser evitada sempre que possível. Outros métodos utilizados necessitam de equipamentos sofisticados e de alto custo como ASE (Accelerated Solvent Extraction) e microondas restringindo assim a possibilidade de aplicação.

Por outro lado, a extração em banho de ultrassom é uma técnica considerada simples, rápida e com consumo moderado de solventes podendo ser aplicada em quase todos os laboratórios pois o equipamento de ultrassom não é específico sendo este utilizado também para limpeza de vidrarias, desgaseificação de solventes, dentre outros.

Tabela 5. Métodos de extração (M.E) e média aritmética das concentrações encontrados na literatura para HPA em vegetais e frutas. (*solo contaminado).

REFERÊNCIA	M.E	U.M	MATRIZ	Fe	Flu	Pi	BaA	Cri	BbF	BkF	BaP	DahA	BghiP	Ind	ΣHPA8
2001_PETERSEM et al. DINAMARCA	SOXWAVE	µg kg ⁻¹ p.u.	vegetais com casca	-	-	-	-	-	-	-	1,4	-	-	-	-
			frutas	-	-	-	-	-	-	-	0,045	-	-	-	-
2003_CAMARGO e TOLEDO BRASIL	REFLUXO	µg kg ⁻¹	repolho (estrada)	-	5,53	2,73	0,36	nd	0,47	0,21	0,12	nd	1,75	-	3,0
			repolho (rural)	-	1,75	nd	0,38	nd	0,14	0,06	<0,07	nd	1,19	-	0,66
			alface (estrada)	-	8,68	3,98	0,68	nd	0,41	0,28	0,08	0,22	2,42	-	4,09
			alface (rural)	-	5,36	2,47	0,42	nd	0,22	0,2	nd	nd	0,45	-	0,87
			tomate (estrada)	-	6,19	2,53	0,35	nd	0,14	0,26	0,12	0,29	3,45	-	4,61
			tomate (rural)	-	2,29	0,73	0,25	nd	0,07	0,07	<0,07	nd	0,90	-	1,36
			repolho (estrada)	-	2,29	0,73	0,25	nd	0,07	0,07	<0,07	nd	0,90	-	1,36
2006_ZOHAIR EGITO	SOXHLET	ppb p.u.	alface	1,38	4,23	1,60	0,52	0,11	0,24	0,20	0,61	0,55	0,20	0,28	2,71
			aipo	3,50	2,13	0,73	0,41	nd	0,01	nd	0,02	0,06	nd	nd	1,00
			cebolinha	1,00	5,26	nd	0,19	0,21	0,35	0,33	0,29	0,14	0,26	0,15	1,92
			espinafre	2,53	1,50	1,02	-	0,25	-	0,13	0,54	nd	nd	nd	0,92
			hortelã	0,79	3,00	0,20	0,03	0,12	0,15	0,33	0,13	0,04	0,03	0,07	0,90
			pepino	0,20	0,72	0,05	0,01	0,08	nd	nd	0,07	nd	nd	nd	0,16
			berinjela	2,17	0,43	0,09	0,10	0,12	nd	0,01	0,02	nd	nd	nd	0,41
			tomate	0,68	0,25	0,13	0,06	nd	nd	nd	0,01	nd	nd	nd	0,07
2006_BISHNOI, MEHTA e PANDIT ÍNDIA	ULTRASSOM	µg kg ⁻¹ de p.s.	fenacho	22,28	6,57	24,35	6,01	-	-	-	3,88	3,43	2,37	-	-
			espinafre	10,81	6,08	53,5	6,25	-	-	-	1,5	4,80	3,00	-	-
			couve flor	7,51	9,30	5,10	2,40	-	-	-	-	-	5,70	-	-
			batata	1,30	0,39	9,10	0,27	-	-	0,28	0,194	-	-	-	-
			inhame	0,31	1,1	0,20	0,20	-	-	0,46	-	-	5,4	-	-
rabanete	7,90	0,61	0,88	1,78	-	-	0,38	-	-	6,75	-	-			

Continuação Tabela 5

REFERÊNCIA	M.E	U.M	MATRIZ	Fe	Flu	Pi	BaA	Cri	BbF	BkF	BaP	DahA	BghiP	Ind	ΣHPA8
2010_WANG et al. CHINA	ASE	µg kg ⁻¹ de p.s.	rabanete	80,4	22,6	19,7	28,8	90,4	17,5	9,1	30,7	19,2	12,2	60,2	268,1
			couve-flor	33,7	17,1	17,3	27,5	37,7	nd	9,1	26,3	10,1	24,2	23,4	156,4
			repolho chinês	151,4	29,6	22,9	16,7	39,9	0,6	0,9	24,7	15,7	20,2	36,6	155,3
			nabo selvagem	60,9	22,8	36,4	19,8	30,7	nd	nd	28,7	35,9	12,3	80,3	207,7
			aipo n=7	47,9	39,9	37,4	31,9	49,9	nd	nd	32,9	20,6	23,5	43,6	202,4
			alface n=3	157,8	19,3	15,0	31,7	37	nd	nd	14,2	23,7	26	36,9	168,8
2011_TETUJA, ROUT e BISHNOI ÍNDIA	ULTRASSOM	µg kg ⁻¹ de p.s.	espinafre		4,50	2,50	0,25	2,5	nd	1,32	2,91	nd	0,7	nd	7,68
			cabaça branca	6,08	9,31	1,30	nd	3,6	nd	nd	0,38	4,8	0,05	nd	8,83
			fenacho	9,70	2,91	1,22	0,20	1,1	nd	nd	0,43	nd	nd	1,29	3,02
			pimenta	5,36	1,82	0,38	0,88	nd	nd	nd	2,0	nd	0,29	nd	3,17
			cabaça	2,33	4,57	1,55	3,45	0,53	nd	nd	2,83	1,91	nd	1,12	9,84
			couve flor	2,37	8,80	5,53	3,94	0,85	nd	nd	1,5	nd	0,12	0,9	7,31
2011_HOSSAIN et al. BANGLADESH	REFLUXO	µg kg ⁻¹ de p.s.	repolho (rodovia)	-	3,44	2,17	0,24	nd	-	-	0,89	1,4	-	-	-
			repolho (rural)	-	1,69	0,48	0,03	nd	-	-	0,09	0,65	-	-	-
			tomate (rodovia)	-	1,01	1,00	0,23	nd	-	-	0,21	0,88	-	-	-
			tomate (rural)	-	0,69	0,31	0,03	nd	-	-	nd	nd	-	-	-
			maçã (rodovia)	-	nd	nd	nd	nd	-	-	nd-1,20	nd-0,89	-	-	-
			maçã(rural)				nd	nd	-	-	nd	nd	-	-	-
2012_ASHRAF et al. ARÁBIA SAUDITA	SOXHLET	µg kg ⁻¹ de p.u.	batata (núcleo/ casca)	-	-	-	0,80/ 2,01	-	1,02/ 1,05	1,06/ 1,06	1,50/ 1,73	0,12/ 0,28	1,05/ 1,07	-	-
			espinafre	-	-	-	1,09	-	0,30	0,66	2,12	1,70	0,40	-	-
			nabo (núcleo/ casca)	-	-	-	2,21/ 1,30	-	0,90/ 1,34	0,50/ 0,73	1,01/ 1,90	1,16/ 0,13	0,29/ 0,19	-	-
			cenoura (núcleo/ casca)	-	-	-	2,02/ 2,49	-	1,33/ 2,09	0,95/ 2,05	2,50 / 3,14	0,98/ 1,98	0,59/ 1,19	-	-
			repolho	-	-	-	1,04	-	0,47	0,29	1,27	0,38	1,45	-	-

Continuação 5

REFERÊNCIA	M.E	U.M	MATRIZ	Fe	Flu	Pi	BaA	Cri	BbF	BkF	BaP	DahA	BghiP	Ind	ΣHPA8
2012_ASHRAF <i>et al.</i> ARÁBIA SAUDITA	SOXHLET	μg kg ⁻¹ de p.u.	tomate	-	-	-	1,66	-	0,16	0,22	0,19	0,38	0,74	-	-
			berinjela (núcleo/ casca)	-	-	-	1,90/	-	0,78/	1,02/	1,68/	0,76/	0,34/	-	-
			pepino (núcleo/ casca)	-	-	-	2,99	-	1,02	1,05	1,39	0,21	0,34	-	-
				-	-	-	1,37/	-	0,78/	0,87/	1,85/	0,33/	0,66/	-	-
							2,26	-	0,92	1,34	2,08	0,77	1,03	-	-
2013_VEYRAN <i>D et al.</i> FRANÇA	ASE	μg kg ⁻¹	vegetais	-	-	-	0,007	0,022	0,009	-	0,005	-	-	-	-
2013_ASHRAF <i>et al.</i> PAQUISTÃO	SOXHLET	μg kg ⁻¹ de p.u.	batata (núcleo/ casca)	-	-	-	1,18/	-	1,44/	1,12/	1,75/	0,32/	1,12/	-	-
				-	-	-	2,53	-	1,67	1,76	2,13	0,38	1,47	-	-
			espinafre	-	-	-	1,79	-	0,89	0,87	2,45	nd	0,57	-	-
			cenoura (núcleo/ casca)	-	-	-	2,87/	-	2,12/	1,15/	3,17/	nd	nd	-	-
				-	-	-	3,49	-	2,69	2,05	3,64	nd	nd	-	-
			repolho	-	-	-	1,14	-	0,57	0,49	1,87	nd	2,14	-	-
			tomate	-	-	-	1,86	-	0,15	0,17	0,11	nd	0,94	-	-
			berinjela (núcleo/ casca)	-	-	-	2,14/	-	0,87/	1,32/	1,98/	0,18/	nd	-	-
				-	-	-	3,40	-	1,22	1,65	1,99	0,21	nd	-	-
			pepino (núcleo/ casca)	-	-	-	1,87/	-	0,98/	0,97/	2,35/	0,33/	0,78/	-	-
	-	-	-	2,46	-	1,12	1,54	2,88	0,67	1,13	-	-			
cabaça amarga (núcleo/ casca)	-	-	-	0,76/	-	0,87/	0,67/	1,33/	0,85/	nd	-	-			
	-	-	-	0,84	-	1,33	0,71	2,11	1,17	nd	-	-			
nabo (núcleo/ casca)	-	-	-	3,44/	-	1,06/	0,65/	1,19/	nd/0,19	nd/nd	-	-			
	-	-	-	3,30	-	2,34	0,73	2,10	nd/0,19	nd/nd	-	-			

ME: método de extração

ASE: Accelerated Solvent Extraction

ΣHPA8: Somatória das concentrações BaA,

ps: peso seco

nd: não detectável

UM: unidade de medida

SOXWAVE: soxhlet+microwave

Cri, BbF, BkF, BaP, DahA, Ind e BghiP.

pu: peso úmido

- não analisado

1.8. Planejamento Experimental

Geralmente, a otimização de processos analíticos é realizada por meio de procedimentos que avaliam o efeito de uma variável por vez (univariado), apresentando desvantagens tais como o tempo gasto para otimização e a falta de avaliação acerca das interações entre as variáveis que afetam o processo em estudo. De acordo com BRASIL et al., (2007) estas desvantagens resultam numa otimização ineficiente, impedindo o rápido estabelecimento de ótimos verdadeiros, os quais são atingidos pelo emprego de sistemas multivariados.

Existem duas grandes áreas de atuação para a análise multivariada: o Planejamento de Experimentos (Design of Experiments-DOE) e a Análise Multivariada de Dados (Multivariate Analysis-MVA). O DOE parte do princípio de que um bom planejamento pode gerar resultados ótimos com tempo e custos reduzidos. No DOE há três objetivos principais: a) triagem de variáveis, ou seja, focar as atenções apenas na determinação dos fatores relevantes para se atingir o objetivo desejado, b) otimização de experimentos: obter um modelo que forneça as condições de trabalho a serem aplicadas para se obter as melhores respostas e c) robustez: consequência refletida nos resultados quando há pequenas oscilações no método otimizado.

Após a obtenção de bons resultados torna-se necessária uma ferramenta para entender e interpretar todos os dados obtidos experimentalmente. Neste sentido, o MVA tem como objetivo reconhecer as principais fontes de variação de dados complexos (muitas variáveis) e tornar as informações interpretáveis através de gráficos simples.

Há diversas estratégias que podem ser empregadas, e sua escolha deve se adequar a realidade de cada experimento e o objetivo a ser atingido. Dentre os diversos tipos de planejamento experimental, os sistemas de planejamento fatorial destacam-se, pois permitem avaliar simultaneamente o efeito de um grande número de variáveis a partir de um número reduzido de ensaios experimentais quando comparados aos processos univariados (PERALTA-ZAMORA, MORAIS e NAGATA, 2005).

O planejamento fatorial 2^k utiliza k fatores analisados em 2 níveis. Este tipo de planejamento é particularmente útil nos estágios iniciais de um trabalho experimental, quando se têm muitas variáveis a investigar. Esses fatores podem ser

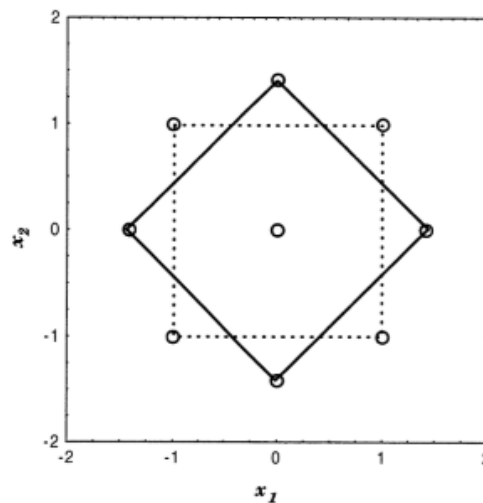
estudados em um planejamento fatorial completo ou fracionado. O planejamento fatorial fracionado pode ser do tipo 2^{k-1} ou 2^{k-2} e estão entre os tipos mais usados de planejamento para projetos de produtos industriais e para melhoria de processos (BRASIL et al., 2007).

O planejamento fracionado é utilizado principalmente para selecionar quais fatores exercem os maiores efeitos. Na etapa inicial de um planejamento com muitas variáveis independentes, as mais importantes são detectadas e um novo planejamento é feito considerando apenas as variáveis que apresentaram os principais efeitos.

1.8.1. Superfície de Resposta

A superfície de resposta (RSM: Response Surface Methodology) é uma técnica de otimização baseada em planejamentos fatoriais que possuem duas etapas distintas: modelagem e deslocamento. A modelagem é feita normalmente ajustando-se modelos simples (em geral lineares ou quadráticos) a respostas obtidas com planejamentos fatoriais. O deslocamento sempre ocorre ao longo do caminho de máxima inclinação de um determinado modelo, que é a trajetória na qual a resposta varia de forma mais pronunciada.

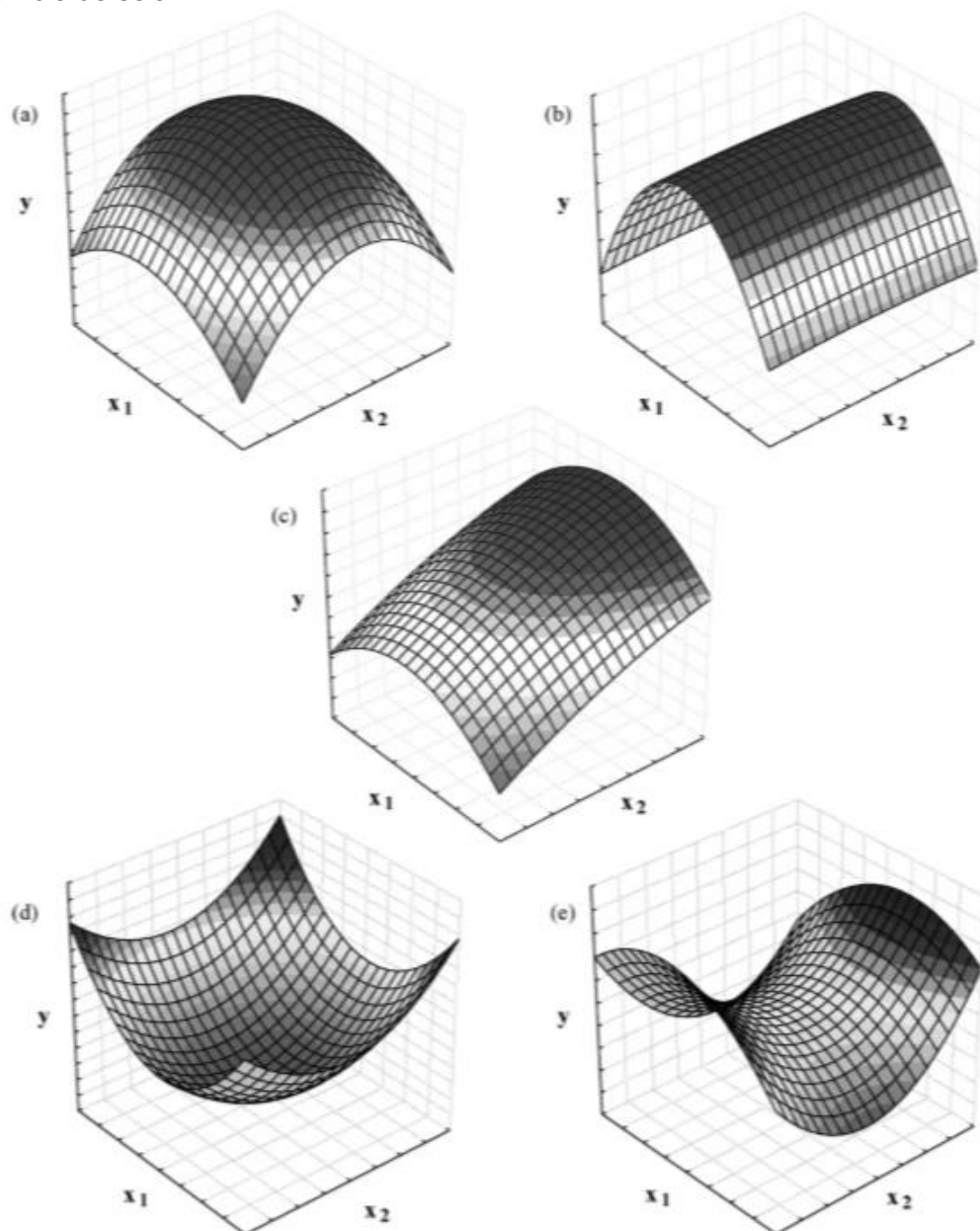
Para a localização do ponto ótimo pode-se utilizar o planejamento em estrela acrescentando ao modelo inicial um planejamento idêntico, porém girando de 45 graus em relação a posição de partida. O resultado é uma distribuição octogonal, como pode ser vista na Figura 10. Um argumento geométrico simples permite concluir que os novos pontos, assim como os primeiros, estão a uma distância de $\sqrt{2}$ unidades codificadas do ponto central. Todos eles estão, portanto, sobre uma circunferência de raio $\sqrt{2}$ (BARROS NETO, BRUNS e SCARMINIO, 2001).

Figura 10. Planejamento em estrela

Fonte: BARROS NETO, BRUNS e SCARMINIO, 2001.

Exemplos de superfícies de resposta na otimização de duas variáveis pode ser visto na Figura 11. Os tons escuros indicam os locais onde se encontram as condições experimentais que fornecem as melhores respostas. As Figuras **11 a** e **11 b** representam uma superfície onde o ponto máximo está localizado dentro da região experimental estudada; a Figura **11 c** demonstra o ponto máximo fora da região experimental estudada sendo necessário deslocar, se possível, as condições iniciais do planejamento. A Figura **11 d** apresenta o ponto mínimo, onde encontramos as respostas mínimas e pode ser visto na Figura **11 e** o ponto de sela como ponto crítico. O ponto de sela é uma inflexão entre os pontos de máximo relativo e mínimo relativo. É possível encontrar as regiões ótimas observando as superfícies de resposta (BEZERRA et al., 2008).

Figura 11. Superfícies de respostas geradas por modelos quadráticos na otimização de duas variáveis: (a) máximo; (b) platô; (c) máximo fora da região experimental; (d) mínimo e (e) superfície de sela.



Fonte: BEZERRA et al., 2008.

1.9. Validação Analítica

Segundo a ANVISA a validação analítica deve garantir, através de estudos experimentais que o método atenda as exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados (PORTAL ANVISA, 2010).

É essencial que os estudos de validação sejam representativos e conduzidos de modo que a variação da faixa de concentração e os tipos de amostras sejam adequados. Um método para um composto majoritário requer um critério de aceitação e uma abordagem diferente de um método desenvolvido para análise de traço. Os parâmetros analíticos normalmente encontrados para validação de método de separação são: seletividade; linearidade e faixa de aplicação; precisão; exatidão; limite de detecção; limite de quantificação e robustez.

Estes termos são conhecidos como parâmetros de desempenho analítico, características de desempenho e algumas vezes, como figuras analíticas de mérito e serão detalhados a seguir:

1.9.1. Seletividade de um método instrumental de separação é a capacidade de avaliar, de forma inequívoca, as substâncias em exame na presença de componentes que podem interferir na sua determinação em uma amostra complexa. A seletividade avalia o grau de interferência de espécies como outro ingrediente ativo, excipientes, impurezas e produtos de degradação, bem como outros compostos de propriedades similares que possam estar, porventura, presentes. A seletividade garante que o pico de resposta seja exclusivamente do composto de interesse. Se a seletividade não for assegurada, a linearidade, a exatidão e a precisão estarão seriamente comprometidas. Há dois tipos de seletividade (RIBANI et al, 2004):

- Seletividade específica: devido à presença de substâncias interferentes que apresentam características físico-químicas similares ao analito.
- Seletividade não específica: também conhecido como efeito matriz, devido à presença de interferentes inerentes à matriz.

1.9.1.1. Efeito Matriz

Efeito matriz é um estudo de seletividade que objetiva averiguar possíveis interferências causadas pelas substâncias que compõem a matriz amostral gerando fenômenos de diminuição ou ampliação do sinal instrumental ou resposta instrumental gerando assim resultados equivocados nas análises.

O efeito matriz é dependente das propriedades físico-químicas dos analitos e das características dos componentes endógenos da matriz (tamanho da moléculas,

polaridade, estabilidade térmica, pressão de vapor, etc). Para minimizar esta influência dos componentes da matriz podemos utilizar de procedimentos que promovem a compensação da ocorrência do efeito de matriz como a utilização de analitos protetores, adição de padrão e curva analítica preparada pela dissolução dos padrões em extratos da matriz. Neste último caso, as curvas são plotadas, no solvente e no extrato da matriz e seus coeficientes angulares comparados (razão entre coeficiente angulares da matriz/solvente) e assim podemos quantificar esta influência podendo esta ser positiva (razão >1) ou negativa (razão <1), dependendo das características do analito e da complexidade da matriz. (PINHO et al., 2010)

O cálculo para quantificar o efeito matriz pode ser realizado utilizando a equação 1 (ECONOMOU et al., 2009), sendo que resultados entre -10 e +10% , indicam que o efeito matriz não é significativo, podendo ser utilizadas curvas analíticas construídas no solvente. No entanto, resultados fora deste intervalo, indicam que há necessidade de construção da curva no extrato da matriz para resultados quantitativos confiáveis (TOLEDO-NETTO et al., 2012)

$$\text{Eq. 1: } \% \text{ efeito matriz} = \frac{X_2 - X_1}{X_2} \times 100$$

sendo:

- X_1 é a inclinação da curva obtida pela injeção das soluções padrão preparados na matriz;
- X_2 é a inclinação da curva obtida pela injeção das soluções padrão preparados no solvente.

1.9.2. Linearidade corresponde a capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais a concentração da substancia em exame, dentro de uma determinada faixa de aplicação, é a correlação entre sinal medido (área ou altura do pico) e a massa ou concentração da espécie a ser quantificada. Na maior parte dos casos, a relação matemática entre o sinal e a concentração ou massa da espécie de interesse deve ser determinada empiricamente, a partir de sinais medidos para massas ou concentrações conhecidas dessa espécie. Essa relação pode ser expressa como uma equação de reta chamada curva analítica.

- 1.9.3. Precisão** representa a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões sob condições definidas. A precisão é avaliada pelo desvio padrão absoluto que utiliza um número significativo de medidas, normalmente maior que 20. Na prática, em validação de método, o número de determinações é geralmente pequeno e o que se calcula é a estimativa do desvio padrão absoluto. A precisão também pode ser expressa através do intervalo de confiança da média, que é uma faixa de valores no qual existe uma determinada probabilidade de se encontrar um certo valor de uma variável. Outra expressão da precisão é através da estimativa do desvio padrão relativo, também conhecido como coeficiente de variação.
- 1.9.4. Exatidão** representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro. A exatidão é sempre considerada dentro de certos limites, a um dado nível de confiança (ou seja, aparece sempre associada a valores de precisão). Estes limites podem ser estreitos em níveis de concentração elevados e mais amplos em níveis de traços.
- 1.9.5. Limite de detecção** representa a menor concentração da substância em exame que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, utilizando procedimento experimental.
- 1.9.6. Limite de quantificação** representa a menor concentração da substância em exame que pode ser medida, quantificada utilizando um determinado procedimento experimental.
- 1.9.7. Robustez** de acordo com o INMETRO, mede a sensibilidade que o método apresenta frente a pequenas variações. Diz-se que um método é robusto quando ele não é afetado por uma modificação pequena e deliberada em seus parâmetros.

2. OBJETIVOS

- ➔ Otimizar e validar método para análise de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em hortaliças (alface crespa, rúcula e couve);

- ➔ Aplicar o método validado à amostras de hortaliças cultivadas em regiões próximas e distantes as áreas de cultivo de cana-de-açúcar;

- ➔ Inferir sobre as fontes de HPA para as hortaliças;

- ➔ Inferir sobre a exposição humana a HPA via consumo de hortaliças.

3. PARTE EXPERIMENTAL:

3.1. Materiais e Métodos

3.1.1. Materiais:

3.1.1.1. Solventes

- Acetonitrila (grau HPLC, JT Baker);
- Acetona (grau HPLC, JT Baker);
- n-hexano (grau HPLC, Mallinckrodt Chemicals);
- Diclorometano (grau HPLC, Mallinckrodt Chemicals);
- Água ultrapura obtida através do sistema Milli-Q (Millipore).

3.1.1.2. Padrões

- **Mix PAH Supelco** (9:1 acetonitrila:metanol) com concentrações individuais: Benz(a)antraceno 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$; Benzo(b)fluoranteno 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$; Benzo(k)fluoranteno 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$; Benzo(ghi)perileno 80 $\mu\text{g mL}^{-1}$; Benzo(a)pireno 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$; Criseno 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$; Dibenz(ah)antraceno 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$; Fluoranteno 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$; Indeno(123-cd)pireno 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$; Fenantreno 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$; Pireno 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

- **Padrões individuais (sólidos):**

- Fenantreno Supelco 48569 LB66636
- Fluoranteno Supelco R423080 LB36331
- Pireno Sigma Aldrich 99% de pureza 18551-5
- Benzo(a)antraceno Sigma Aldrich 99% de pureza B220-9
- Criseno Sigma Aldrich 98% de pureza 24518-9
- Benzo(b)fluoranteno Supelco 48490 LB69875
- Benzo(k)fluoranteno Sigma Aldrich 98% de pureza 524616-404
- Benzo(a)pireno Sigma Aldrich 97% de pureza B1,008-0
- Dibenz(a,h)antraceno Sigma Aldrich 97% de pureza D3,140-0
- Benzo(ghi)perileno Supelco 48491 LB47312
- Indeno (1,2,3-cd)pireno Supelco 48499 LB26917

3.1.1.3. Equipamentos

- Centrífuga REVAN ciclo C.I.;
- Liofilizador Liotop L101 (Liobras);
- Banho de ultrassom THORTON (40 kHz, 20 L);
- Cromatógrafo á líquido (Varian) LC920, equipado com autosampler, detector de fluorescência, sistema ternário, forno de coluna e coluna cromatográfica Supelco SUPELCOSIL LC PAH (250 mm x 4,6 mm x 5 µm).

3.1.2. Métodos

3.1.2.1. Preparo de soluções padrão

Para identificação dos compostos no padrão misto (Sigma Aldrich TCL HPA MIX 49156) preparou-se soluções padrão individuais a partir de padrões sólidos (pureza $\geq 97\%$) da Supelco (Bellefonte, PA, USA) e da Sigma Aldich (St. Louis, MO, USA) utilizando-se como solvente a acetonitrila em concentrações variadas.

Para o estudo foi utilizado padrão misto ACN:MeOH (Sigma Aldrich TCL HPA MIX 49156), preparou-se a solução estoque a partir do MIX e foram feitas diluições resultando em 22 soluções com diferentes concentrações (Tabela 6).

Tabela 6. Concentrações em ng mL⁻¹ dos padrões diluídos da mistura de HPA.

HPA	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
Fe	0,030	0,030	0,040	0,080	0,12	0,16	0,24	0,32	0,48	0,64	0,97	1,3	1,6	1,93	2,6	2,9	3,2	3,5	3,9	4,2	4,5	5,2
Flu	0,040	0,080	0,10	0,20	0,30	0,40	0,60	0,80	1,2	1,6	2,4	3,2	4,0	4,8	6,4	7,2	8,0	8,8	9,6	10	12	13
Pi	0,080	0,16	0,20	0,40	0,60	0,80	1,2	1,6	2,4	3,2	4,8	6,4	8,0	9,6	13	14	16	18	19	21	22	25
BaA	0,040	0,080	0,10	0,20	0,30	0,40	0,61	0,81	1,2	1,6	2,4	3,2	4,0	4,9	6,5	7,3	8,1	8,9	9,7	10	11	13
Cri	0,040	0,080	0,10	0,20	0,30	0,40	0,61	0,81	1,2	1,6	2,4	3,2	4,0	4,9	6,5	7,3	8,1	8,9	9,7	10	11	13
BbF	0,020	0,030	0,040	0,080	0,12	0,15	0,23	0,31	0,46	0,62	0,92	1,2	1,5	1,9	2,5	2,8	3,1	3,4	3,7	4,0	4,3	4,9
BkF	0,020	0,030	0,040	0,080	0,12	0,16	0,24	0,32	0,47	0,63	0,95	1,26	1,58	1,90	2,5	2,8	3,2	3,5	3,8	4,1	4,4	5,1
BaP	0,040	0,080	0,10	0,20	0,31	0,41	0,61	0,82	1,2	1,6	2,5	3,27	4,1	4,9	6,5	7,4	8,2	9,0	10	11	11	14
DahA	0,16	0,32	0,40	0,80	1,2	1,6	2,4	3,2	4,8	6,4	9,7	13	18	19	26	29	32	35	39	42	45	52
BghiP	0,060	0,13	0,16	0,32	0,48	0,64	0,96	1,3	1,9	2,6	3,8	5,1	6,4	7,7	10	12	13	14	15	17	18	20
Ind	0,040	0,080	0,10	0,20	0,30	0,40	0,60	0,80	1,2	1,6	2,4	3,1	3,2	4,7	6,3	7,1	7,8	8,6	9,4	10	11	13

3.1.2.2. Método cromatográfico

Os detalhes do método cromatográfico otimizado neste trabalho para análise de HPA em hortaliças podem ser vistos na Tabela 7.

Tabela 7. Condições de análise HPLC-FLU

Método otimizado	
Equipamento	Varian LC920
Coluna	Supelcosil LC PAH (250 mm x 4,6 mm x 5 mm) NOVA!
Tempo de análise	23 minutos
Vazão	1,5 mL min ⁻¹
Temperatura da coluna	25°C
Tempo de retorno à condição inicial (min)	5
Tempo de equilíbrio (min)	2
Gradiente ACN:H ₂ O	80%(5')—(10')—100%(8') ACN
Condições detector-Flu	0,0 → λ_{exc} 240 _ λ_{emi} 400 20,7 → λ_{exc} 300 _ λ_{emi} 498

3.1.2.3. Estratégia de Amostragem

Para que a meta proposta pelo trabalho fosse atingida estabeleceu-se uma estratégia de amostragem adequada ao objetivo do estudo, ou seja, que fosse representativa da influência da queimada de cana-de-açúcar na presença de HPA nas hortaliças estudadas que também deveriam ser escolhidas levando se em conta frequência de consumo. A questão logística é outro fator importante a considerar no estabelecimento da estratégia de amostragem.

Todas as hortaliças ao serem colhidas passaram por processo de remoção de terra manualmente, depois foram embrulhadas em papel alumínio e acondicionadas em caixa térmica e gelo.

Posteriormente no laboratório, as amostras foram lavadas em água corrente como se fosse para consumo, picadas e congeladas a -7°C em frascos de vidro transparente cobertos por alumínio e etiquetados. Após congeladas as amostras passaram por processo de liofilização de 5 a 10 dias dependendo da amostra e da quantidade em cada frasco. Após todas as amostras serem liofilizadas as partes pertencentes à mesma hortaliça, do mesmo ponto e época foram agrupadas em uma amostra composta.

3.1.2.4. Tratamento das Amostras

O método de extração utilizado nas amostras coletadas está sumarizado a seguir: As amostras liofilizadas foram maceradas em cadinho com pistilo e em seguida pesadas.

- Massa de amostra: 500 mg;
- Solvente de Extração: 85% n-hexano:Acetona;
- Volume de Solvente de Extração: 29 mL;
- Quantidades de Extrações por amostra: 2 vezes;
- Tempo de Centrifuga: 1 minuto;
- Tempo de Extração em banho de ultrassom: 5 minutos.
- Secagem em fluxo moderado de nitrogênio
- Ressuspensão em 1mL de acetonitrila

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O desenvolvimento deste trabalho iniciou-se pela escolha das hortaliças que foram consideradas no estudo pretendido e em seguida a estratégia de amostragem foi estabelecida, definindo os locais e os períodos de amostragem, a seguir o método de análise foi otimizado. Para a extração foram otimizados e validados dois métodos, primeiro de acordo com o planejamento experimental univariado onde objetivou-se o estudo de 8 HPA (BaA, Cri, BbF, BkF, BaP, DahA, BghiP e Ind) e em seguida pelo planejamento experimental multivariado proposto após o Exame Geral de Qualificação onde foram adicionados mais 3 HPA (Fen, Flu, Pi, BaA, Cri, BbF, BkF, BaP, DahA, BghiP e Ind) totalizando 11 HPA, obtendo assim dois métodos de extração. O desenvolvimento experimental será apresentado aqui nesta ordem.

4.1. Escolha das hortaliças

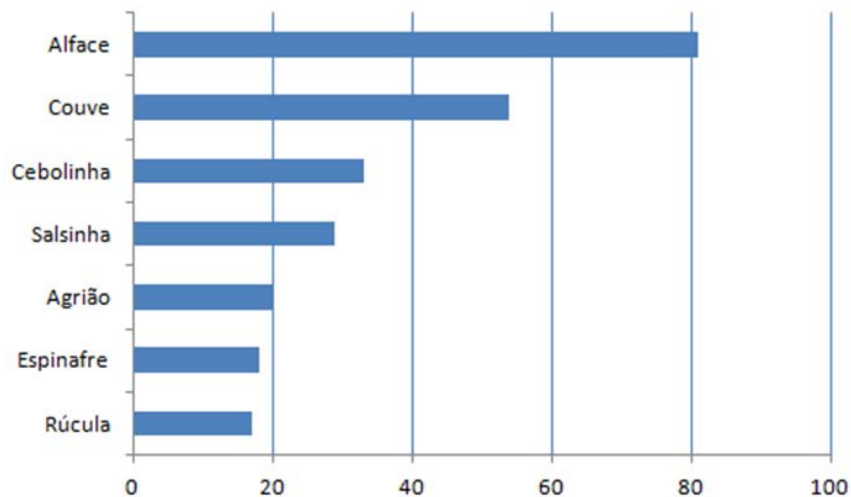
Para o estudo da análise da influência das queimadas sobre as hortaliças de consumo humano é de vital importância que a escolha destas hortaliças seja baseada na quantidade consumida, modo de consumo, sazonalidade e características destas plantas que possam influenciar na concentração dos HPA encontrados nestes vegetais.

As hortaliças possuem em sua superfície, uma cobertura de cera ou uma camada lipídica (cutícula) que possui as seguintes finalidades: a prevenção da perda de água pela desidratação das folhas num processo conhecido como evapotranspiração, a impermeabilização e para evitar a absorção excessiva de água (CUTLER et al, 1980).

Os HPA são moléculas hidrofóbicas e por isso apresentam grande afinidade pela cutícula das hortaliças, a concentração destes contaminantes na planta dependerá, principalmente da espessura da cutícula e da área diretamente exposta. Na Figura 12 são apresentados dados de uma pesquisa realizada entre fevereiro e abril de 2011, a pedido da Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil (CNA), para avaliar os hábitos alimentares da população brasileira na qual foram ouvidas 1.420 pessoas responsáveis pela alimentação de suas famílias, com diferentes níveis de

escolaridade, de todas as classes sociais e regiões do país. De acordo com esta pesquisa a alface é a hortaliça de maior consumo seguida pela couve e por isso foram escolhidas estas hortaliças para o estudo, são cultivadas o ano todo não havendo dificuldades em sua amostragem.

Figura 12. Preferência no consumo de hortaliças no Brasil, em porcentagem dos entrevistados (n = 1420).



Fonte: CNA 2011

As hortaliças foram selecionadas considerando-se a quantidade consumida e os aspectos físicos das folhas (rugosidade, espessura da cutícula, disposição das folhas), que podem favorecer a incorporação dos HPA provenientes do material particulado atmosférico ou por volatilização a partir do material depositado no solo. As espécies escolhidas são de duas famílias a couve manteiga (*Brassicaceae*) que possuem cutícula mais espessa e área de contato maior e mais disponível quando comparada a alface crespa (*Asteraceae*). A rúcula (*Brassicaceae*) também foi incluída neste estudo por possuir cutícula intermediária e área disponível menor.

As amostras foram coletadas seguindo o perfil das hortaliças comercializadas e consumidas, para a alface e rúcula o tempo de cultivo é em média 30 dias e para a couve é de acordo com o tamanho das folhas ou seja, não podemos estabelecer o tempo de exposição destas folhas.

4.2. Amostragem

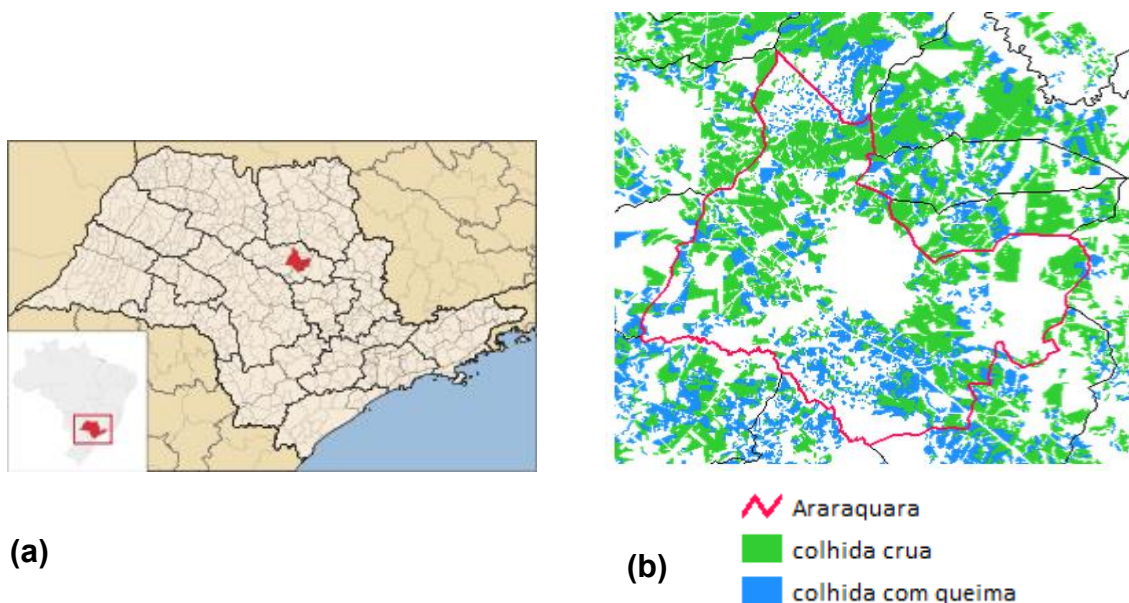
4.2.1. Locais de Amostragem

Considerando-se que a hipótese deste trabalho é a de que existe diferença entre hortaliças cultivadas em municípios sob a influência da queima de cana-de-açúcar e em municípios que não sofrem esta influência, a escolha dos municípios considerou a presença de cultivo ou não da cana-de-açúcar no seu entorno. A seguir será apresentada uma breve descrição dos municípios escolhidos quanto ao cultivo da cana-de-açúcar e quanto ao cultivo das hortaliças escolhidas neste estudo.

ARARAQUARA

O município de Araraquara está localizado no centro do estado de São Paulo (Figura 13a), escolhido por apresentar cultivo expressivo de cana-de-açúcar, correspondendo a mais de 44 mil hectares disponíveis para colheita em 2011 (INPE, 2013), onde a queimada ainda é bastante utilizada no manejo desta cultura (Figura 13b).

Figura 13. (a) localização do município de Araraquara e (b) área cultivada de cana-de-açúcar no município, detalhando as áreas com queimada.

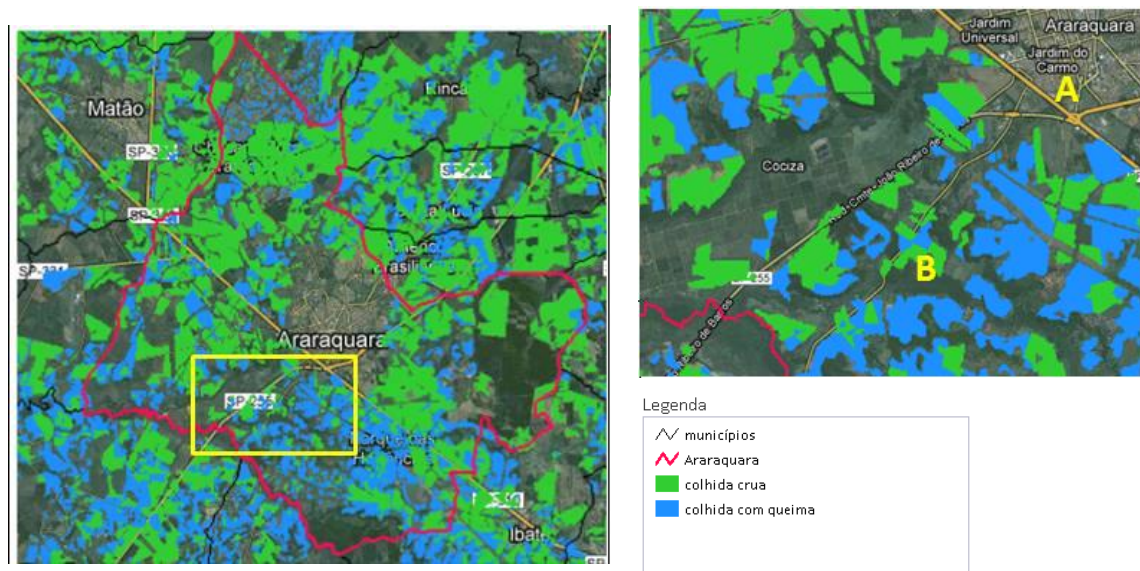


Fonte: INPE-CANASAT, 2013

Os locais escolhidos para efetuar as amostragens são plantações consideradas de pequeno a médio porte que atendem exclusivamente a população da cidade de Araraquara.

Dois locais de amostragem no município de Araraquara foram estabelecidos visando os diferentes tipos de influências, um na região rural ponto **B** do mapa da Figura 14 e um na região urbana ponto **A** do mapa Figura 14.

Figura 14. Mapa do município de Araraquara, locais de queima de cana-de-açúcar e pontos de amostragem (A e B).

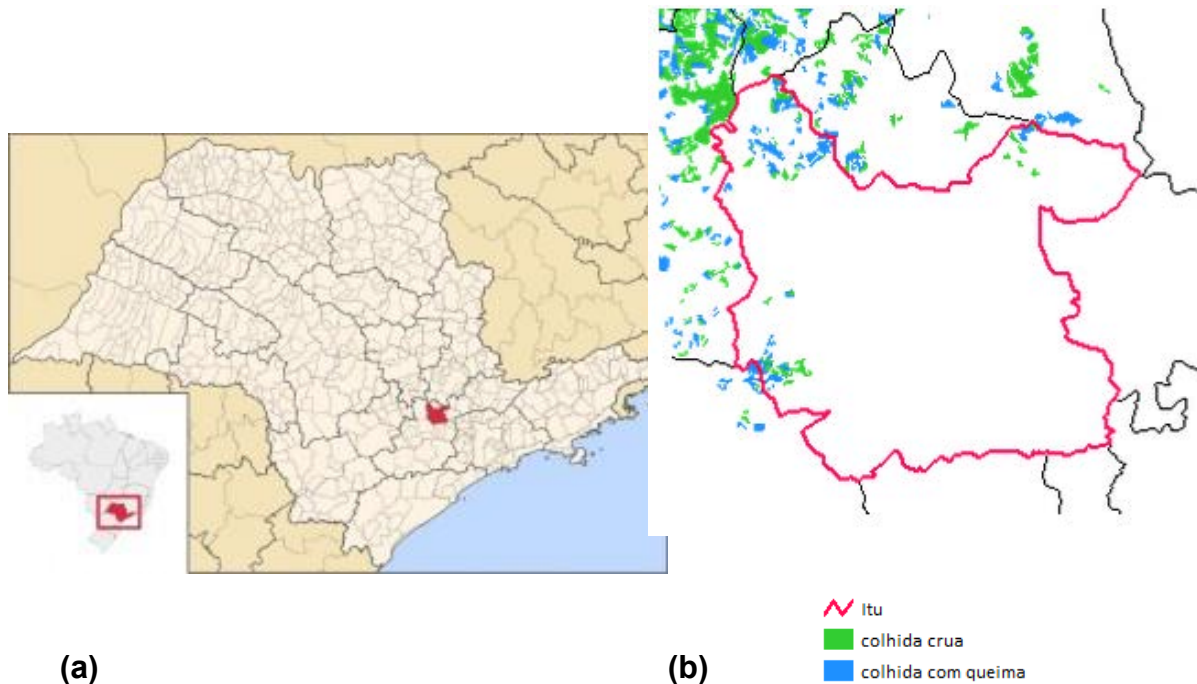


Fonte: INPE-CANASAT, 2013

ITU

O município de Itu localiza-se na região sudeste do estado de São Paulo (Figura 15), tendo sido escolhido para inclusão neste estudo por apresentar praticamente nenhum cultivo de cana-de-açúcar no município ou no seu entorno.

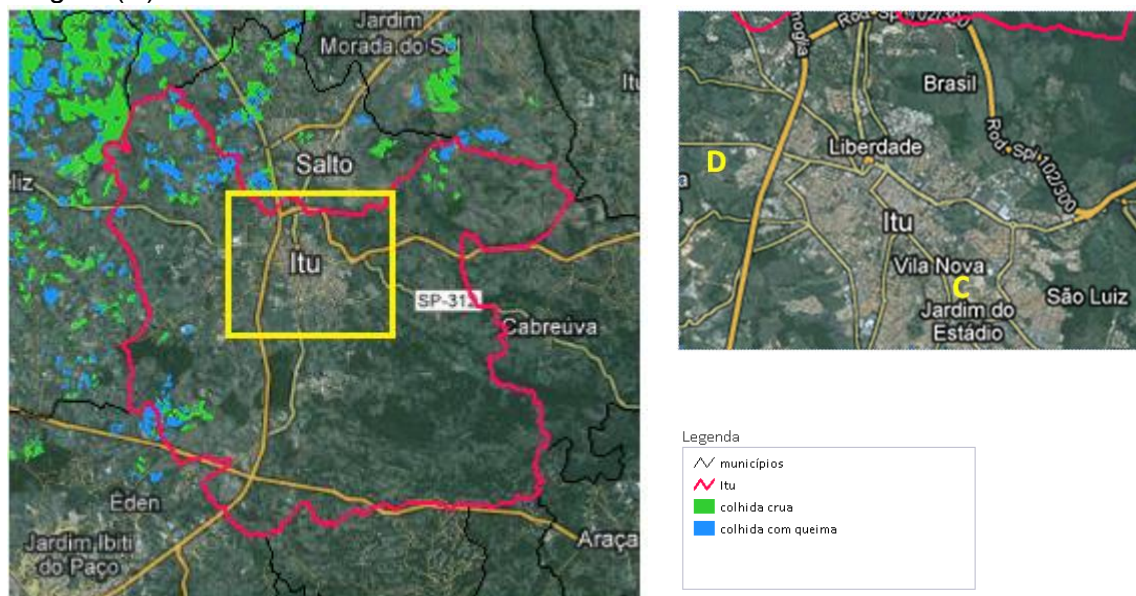
Figura 15. (a) localização do município de Itu e (b) área cultivada de cana-de-açúcar no município, com destaque para as áreas em que a queimada é praticada, dados safra de 2011.



Fonte: INPE-CANASAT, 2013

O primeiro local escolhido para amostragem da cidade de Itu está localizada em uma região onde há pequenas propriedades rurais, onde esperávamos encontrar plantações com perfis semelhantes aos pontos de amostragem definidos na cidade de Araraquara possibilitando assim futuras comparações. Por não encontrarmos plantações onde nos permitissem ter acesso para efetuar as coletas entramos em contato com a ETEC Martinho de Cielo (ponto **C** Figura 16) localizada próxima ao centro da cidade, porém ao visitarmos o local, no dia da coleta, averiguamos que não havia as hortaliças na quantidade informada impossibilitando assim a coleta. Assim se fez necessário nova procura com urgência de outro ponto de coleta, neste terceiro ponto verificamos grande semelhança com o ponto de coleta **A** de Araraquara, pequena propriedade (ponto **D** Figura 16) localizada no bairro Potiguara as margens de uma rodovia de grande circulação, rodovia Marechal Rondon (SP-300).

Figura 16. Mapa do município de Itu, locais de queima de cana-de-açúcar e ponto de amostragem (D).



Fonte: INPE-CANASAT, 2013.

4.2.2. Épocas de Amostragem

Muitos dos HPA possuem baixa volatilidade e alta tendência de se adsorver em partículas orgânicas. Na atmosfera os HPA contendo 5 ou mais anéis são encontrados predominantemente associados ao material particulado (<2,5 µm) como cinza e fuligem enquanto os menores, compostos por 4 anéis se encontram na fase intermediária entre a fase vapor e partícula (EDWARDS, 1983; NIELSEN et al, 1996). Com base nestas informações associados aos resultados de estudos efetuados neste grupo de pesquisa sobre a concentração de HPA em material particulado na cidade de Araraquara onde observou-se que alguns HPA na época da safra como o Benzo(k)fluoranteno, podem atingir concentrações 8 vezes maiores que na entressafra (Tabela 8) (SILVA et al, 2010), foram estabelecidas as épocas de amostragem para futuras comparações da influência da queima da cana-de-açúcar sobre a quantidade de HPA encontrado nas amostras de hortaliças e assim demonstrar a exposição da população nestas duas épocas distintas.

- ⤴ **SAFRA:** que equivale ao período de abril à outubro.
- ⤴ **ENTRESSAFRA:** que equivale ao período de novembro à março.

Tabela 8. Concentração média em ng m^{-3} dos HPA em material particulado $\text{MP}_{2,5}$ na cidade de Araraquara em 2009.

	ENTRESSAFRA (n=20)	SAFRA (n=170)
Benzo(a)antraceno	0,023	0,093
Criseno	0,090	0,34
Benzo(k)fluoranteno	0,023	0,18
Benzo(a)pireno	0,017	0,12
Dibenzo(a,h)antraceno	0,12	0,21
Benzo(g,h,i)perileno	0,13	0,14
Indeno(1,2,3,c,d)pireno	0,14	0,32

Fonte: SILVA et al., 2010.

Foram efetuadas as coletas das amostras da época da safra e entressafra as quais foram liofilizadas para que a água fosse totalmente retirada, armazenadas em freezer e analisadas.

No período da Safra as coletas foram efetuadas nos dias:

- Araraquara PONTO A: 20 de agosto de 2012;
- Araraquara PONTO B: 30 de agosto de 2012;
- Itu PONTO C: 03 de setembro de 2012;
- Itu PONTO D: 03 de setembro de 2012.

No período da Entressafra as coletas foram efetuadas nos dias:

- Araraquara PONTO A: 15 de março de 2013
- Araraquara PONTO B: 15 de março de 2013;
- Itu PONTO C: NÃO FOI COLETADO
- Itu PONTO D: 04 de março de 2013.

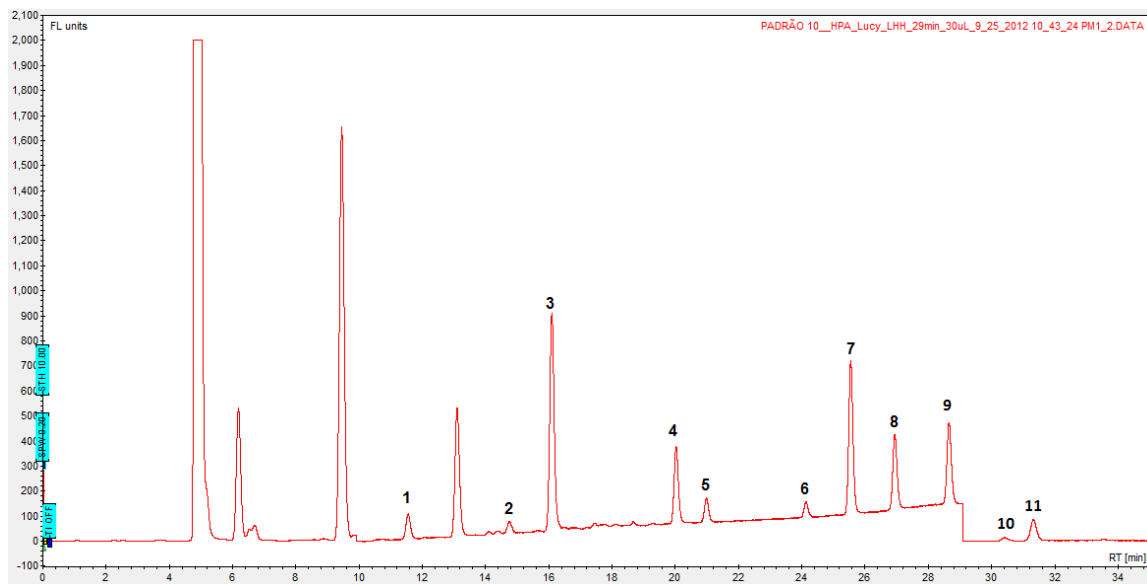
4.3. Otimização e validação do método analítico

4.3.1. Otimização das Condições Cromatográficas

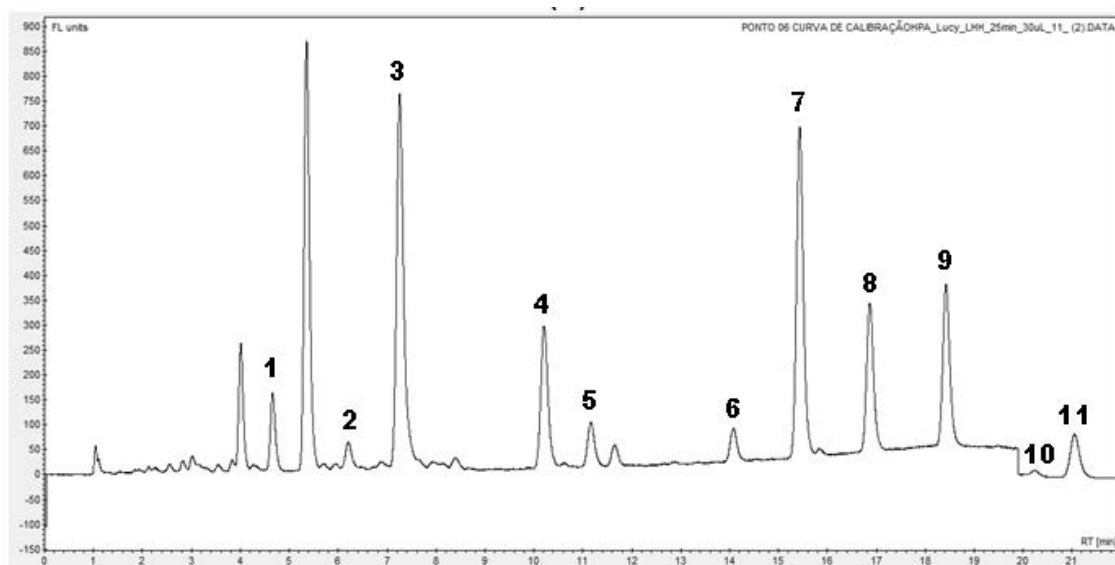
Na primeira parte do trabalho verificou-se a eficiência do sistema escolhido para a quantificação dos analitos onde o método otimizado por SILVA (2006) foi utilizado como base para o desenvolvimento do método de quantificação a ser desenvolvido. Esta otimização se fez necessária por dois motivos: o equipamento utilizado passou por vários reparos que podem alterar de maneira significativa a resposta do detector e por se tratar de objetivos de análises diferentes, o primeiro método objetivava a análise de 17 diferentes HPA necessitando de tempo de corrida mais prolongado quando comparado ao objetivo inicial deste trabalho que se refere a análise de 8 HPA e posterior modificação onde foram adicionados mais 3 HPA totalizando assim 11 analitos de interesse. As condições do método desenvolvido por Silva e do método modificado para o estudo podem ser observadas na Tabela 9. Na Figura 17 pode-se observar os cromatogramas do método original (Figura 5a) e do método já otimizado (Figura 17b).

Tabela 9. Condições de análise no HPLC-FLU.

	Silva, 2006	Método otimizado
Equipamento	Varian LC920	Varian LC920
Coluna	Supelcosil LC PAH (250mm x 4,6mm x 5mm)	Supelcosil LC PAH (250mm x 4,6mm x 5mm) NOVA!
Tempo de análise	35 minutos	23 minutos
Vazão	1,5 mL min ⁻¹	1,5 mL min ⁻¹
Temperatura da coluna	25°C	25°C
Tempo de retorno à condição inicial (min)	-	5
Tempo de equilíbrio (min)	-	2
Gradiente ACN:H₂O	60%(5')—(20')—100% ACN (10')	80%(5')—(10')—100%(8') ACN
Condições detector-Flu	0,0 → λ _{exc} 220 _ λ _{emi} 322 9,5 → λ _{exc} 210 _ λ _{emi} 398 25,5 → λ _{exc} 300 _ λ _{emi} 498	0,0 → λ _{exc} 240 _ λ _{emi} 400 20,7 → λ _{exc} 300 _ λ _{emi} 498

Figura 17. Cromatogramas (a) mistura padrão; (b) amostra testemunha (alface)

(a)



(b)

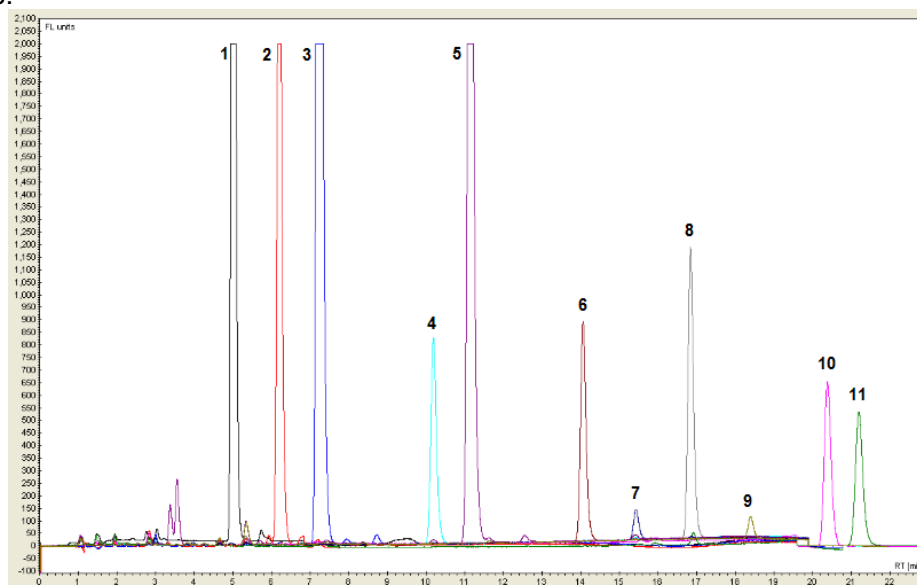
1: Fenantreno; **2:** Fluoranteno; **3:** Pireno; **4:** Benzo(a)antraceno **5:** Criseno; **6:** Benzo(b)fluoranteno; **7:** Benzo(k)fluoranteno; **8:** Benzo(a)pireno; **9:** Dibenzo(a,h)antraceno; **10:** Benzo(g,h,i)perileno; **11:** Indeno(1,2,3-cd)pireno.

4.3.1.1. Avaliação da resposta analítica nas condições de análise otimizadas

A linearidade do sistema se refere a capacidade do sistema em responder de forma linear as diferentes concentrações da substância em análise, dentro de uma faixa pré-estabelecida de concentrações chamada faixa de trabalho que deve ser previamente determinada e estudada. A linearidade do sistema pode ser verificada pela relação entre a concentração do analito conhecido (através do preparo de soluções padrões) e do sinal, no caso de HPLC-FLU, área do pico. Esta relação é expressa através de um gráfico onde podemos comprovar matematicamente pela regressão linear se esta relação existe ou não, ou seja se poderemos utilizar este sistema para quantificar nossos analito. Além dos coeficientes da regressão linear podemos obter também através de dados experimentais o coeficiente de determinação (R^2). Este parâmetro é uma medida de ajustamento de um modelo estatístico linear em relação aos valores obtidos. Indica em porcentagem o quanto o modelo explica os valores observados, onde valores próximos de 1,0 demonstram que quase 100% da variável dependente conseguem ser explicada pelos regressores presentes no modelo estudado (RIBANI et al., 2004).

Para verificar a linearidade foram feitas soluções padrões em diferentes concentrações a partir de uma solução mista de padrões em ACN:MeOH ((Sigma Aldrich TCL HPA MIX 49156). Para certificarmos a identidades das substâncias de interesse foi necessário a prévia identificação dos picos correspondentes aos onze analitos em estudo e para isso foram preparadas soluções padrão em acetonitrila com concentrações entre 0,006 a 0,24 $\mu\text{g mL}^{-1}$ dos analitos individuais a partir de padrões sólidos (pureza > 97%) da Supelco (Beellefonte,PA,USA). O cromatograma de identificação dos analitos se encontra na Figura 18.

Figura 18. Cromatogramas (HPLC/FLU) de cada padrão individual, nas condições otimizadas.

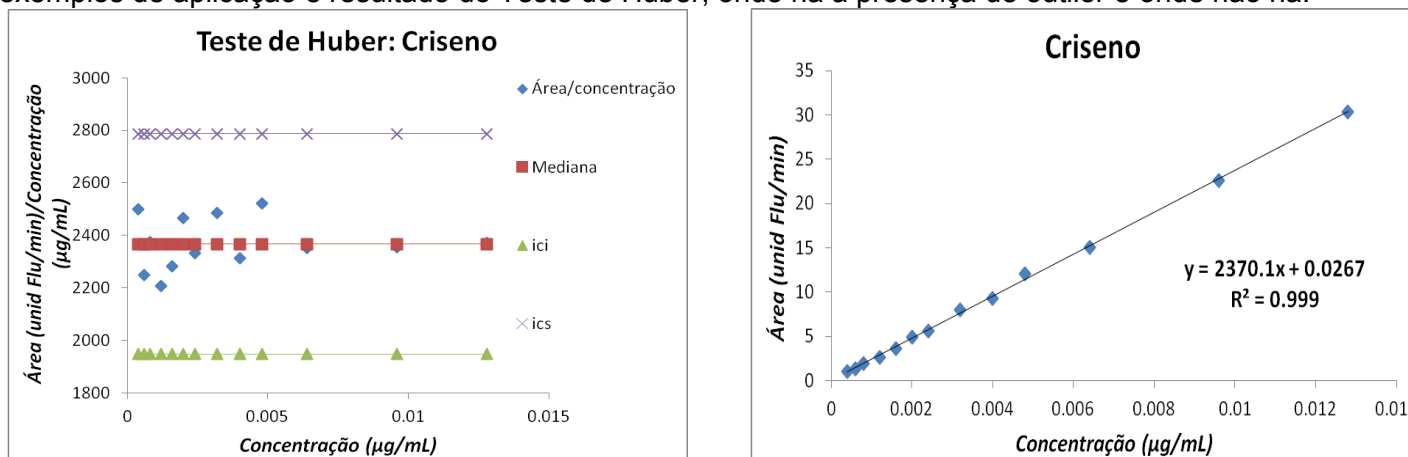


1: Fenantreno; 2: Fluoranteno; 3: Pireno; 4: Benzo(a)antraceno; 5: Criseno; 6: Benzo(b)fluoranteno; 7: Benzo(k)fluoranteno; 8: Benzo(a)pireno; 9: Dibenzo(a,h)antraceno; 10: Benzo(g,h,i)perileno; 11: Indeno(1,2,3-cd)pireno.

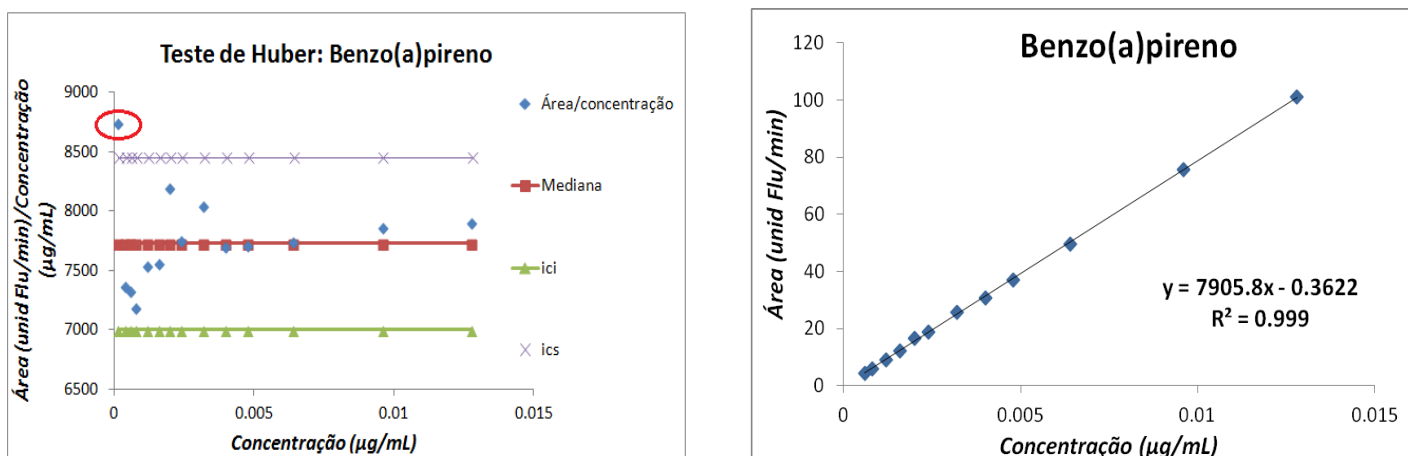
Após a identificação dos analitos através de seus respectivos tempos de retenção, foram preparadas 22 soluções padrão em acetonitrila a partir de um padrão misto em acetonitrila:metanol (1:1) (concentrações em $\mu\text{g mL}^{-1}$: 20 para o BbF e BkF, 40 para o Fe, 50 para o Flu, BaA, Cri, BaP e Ind, 80 para o BghiP, 100 para o Pi e 200 para o DahA da Supelco (Beellefonte,PA,USA) com concentrações entre 0,15 e 51,5 ng mL^{-1} , sendo que devido a diferença de resposta para cada HPA os intervalos de concentração incluídos neste estudo também variaram individualmente. Antes da construção da curva analítica, foi feito um estudo para eliminação de resultados anômalos ou discrepantes os chamados *outliers*, quando considerado um determinado intervalo de confiança de 95%. Para esse propósito, se estabelece um valor central, e à este valor é estabelecido intervalos de confiança acima e abaixo e os dados que não pertencerem a esse intervalo de confiança devem ser descartados (VALENTE; AUGUSTO; RIEDO, 2003).

Na Figura 19a são apresentados dois exemplos, o primeiro onde não há a presença de *outliers* (criseno) e outro caso onde há a presença deste (benzo(a)pireno). Em seguida na mesma figura pode-se verificar as curvas analíticas e seus respectivos coeficientes angulares e lineares bem como os coeficientes de determinação. Os testes de Huber dos demais analitos estudados se encontram no APÊNDICE 1.

Figura 19. Dois exemplos de aplicação e resultado do Teste de Huber, onde há a presença de outlier e onde não há.



Criseno: SEM PRESENÇA DE outliers



Benzo(a)pireno: COM PRESENÇA DE outliers

Os coeficientes de determinação (R^2) obtidos pelas curvas analíticas estão acima de 0,99 (Tabela 10) de acordo com a recomendação ANVISA e do INMETRO para a validação de métodos analíticos (RIBANI et al., 2004).

Tabela 10. Parâmetros das curvas analíticas para cada HPA e os intervalos lineares.

HPA	Intervalo Linear (ng mL ⁻¹)	R ²	Equação da reta
Fenantreno	0,480-10,2	0,999	$y = 2,319x + 0,3786$
Fluoranteno	1,12-12,8	0,999	$y = 1,164x + 0,3483$
Pireno	1,20-25,5	0,999	$y = 9,646x + 0,9006$
Benzo(a)antraceno	0,400 - 12,8	0,998	$y = 7,727x - 0,3865$
Criseno	0,400 - 12,8	0,999	$y = 2,370x + 0,0267$
Benzo(b)fluoranteno	0,240 - 5,12	0,999	$y = 4,175x - 0,2344$
Benzo(k)fluoranteno	0,160 - 5,12	0,999	$y = 40,74x - 0,2357$
Benzo(a)pireno	0,064 - 12,8	0,999	$y = 7,905x - 0,3622$
Dibenzo(a,h)antraceno	1,60 - 51,2	0,999	$y = 2,076x - 0,2891$
Benzo(g,h,i)perileno	0,640 - 20,5	0,999	$y = 1,392x - 0,3224$
Indeno(1,2,3-cd)pireno	0,400 - 12,8	0,999	$y = 2,942x - 0,2381$

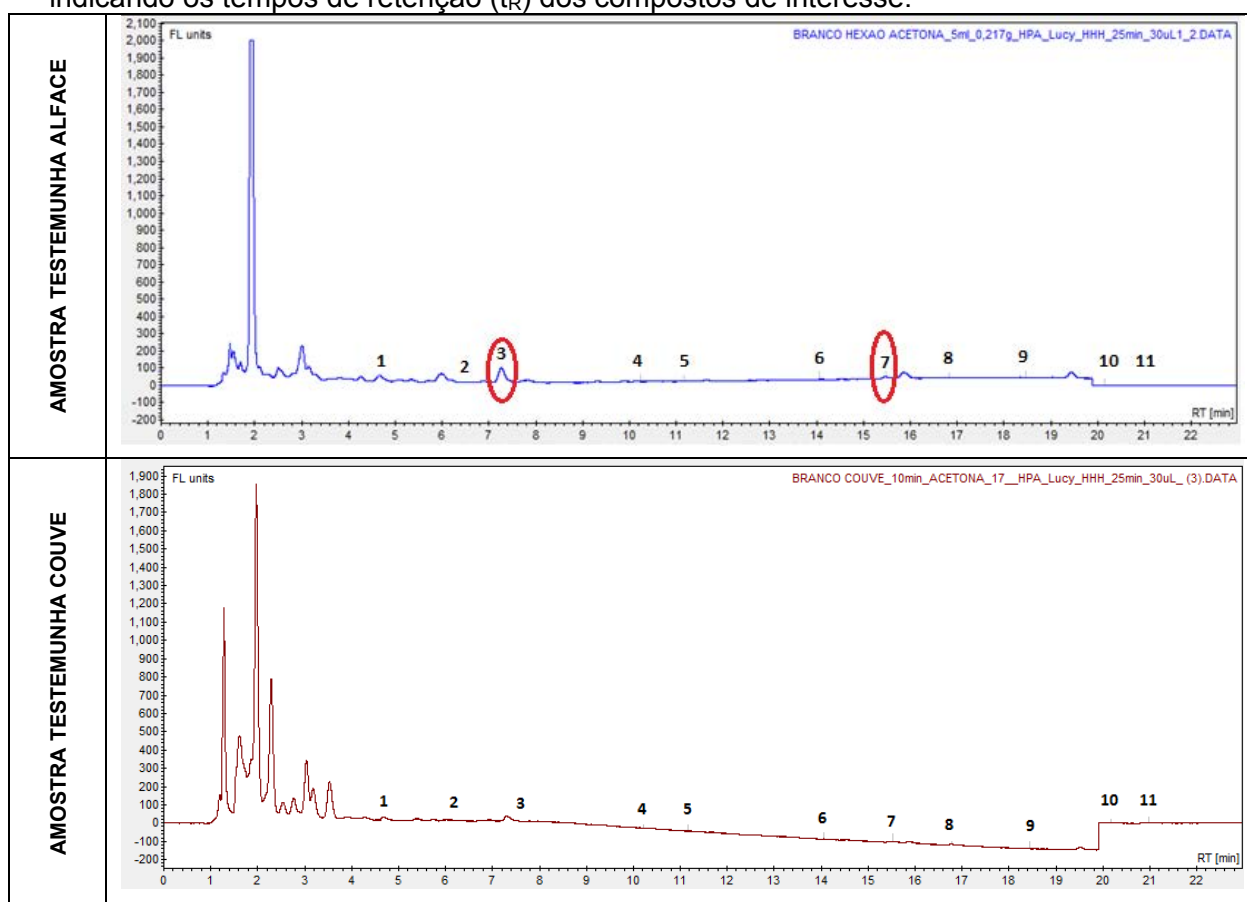
4.3.1.2. Seletividade do Método

A seletividade de um método instrumental de separação é a capacidade de avaliar, de forma inequívoca, as substâncias em exame (analito) na presença de componentes que podem interferir nas determinações destes analitos em uma amostra complexa. A seletividade garante que o pico de resposta seja exclusivamente do composto de interesse. Se a seletividade não for assegurada, a linearidade, a exatidão e a precisão estarão seriamente comprometidas (RIBANI et al., 2004).

A primeira maneira de se averiguar a seletividade do método instrumental é a comparação da matriz isenta das substâncias de interesse e a matriz adicionada com o padrão, sendo que, nesse caso, nenhum interferente deve eluir no tempo de

retenção da substância de interesse que deve estar bem separada dos outros componentes. A Figura 20 apresenta as amostras testemunha (alface e couve-manteiga) nos solventes de extração que serão testados. Para este estudo foram utilizadas hortaliças provenientes da cidade de Araraquara adquiridas em feira livre que foram liofilizadas e extraídas.

Figura 20. Cromatogramas das amostras testemunhas (extraídas com n-hexano:acetona) indicando os tempos de retenção (t_R) dos compostos de interesse.



1: t_R Fenantreno; 2: t_R Fluoranteno; 3: t_R Pireno; 4: t_R Benzo(a)antraceno; 5: t_R Criseno; 6: t_R Benzo(b)fluoranteno; 7: t_R Benzo(k)fluoranteno; 8: t_R Benzo(a)pireno; 9: t_R Dibenzo(a,h)antraceno; 10: t_R Benzo(g,h,i)perileno; 11: t_R Indeno(1,2,3-cd)pireno.

Pode-se observar que não há picos presentes nos tempos de retenção da maioria dos compostos analisados, com exceções do benzo(k)fluoranteno e do pireno, sendo identificado um pico no mesmo tempo de retenção na alface. Este fato pode ser explicado pois as matrizes em estudo não estão totalmente isentas das substâncias em análise levando a conclusão que os picos não são interferentes e sim os próprios analitos em estudo, no entanto a área destes picos referentes ao

benzo(k)fluoranteno e ao pireno são cerca de três e quatro vezes menores respectivamente que as do primeiro ponto da curva analítica (LQ), portanto não terão influência na quantificação destes HPA.

Avaliou-se também o efeito matriz, definido como a influência de componentes da matriz na resposta do sistema analítico, mesmo que não ocorram picos no mesmo tempo de retenção do analito. O efeito matriz pode ser avaliado comparando-se a sensibilidade (coeficientes angulares) das curvas analíticas construídas com soluções padrão preparadas em solvente (acetonitrila) e no extrato da matriz.

As curvas analíticas sobrepostas mostradas na Figura 21 e separadas na Figura 22 são referentes ao fluoranteno, que foi o caso mais acentuado de efeito matriz dentre os HPA estudados, com valor de % de efeito matriz igual a -9,1. Os valores do efeito matriz referentes aos demais analitos estudados podem ser vistos na Tabela 11. Ao observarmos estes valores pode-se concluir que não há efeito matriz significativo pois todos os valores se encontram fora dos limites preconizados de $\pm 10\%$. As curvas do solvente e na matriz para os demais HPA estudados se encontram no APÊNDICE 2.

Figura 21. Curva analítica do fluoranteno no solvente (azul), na alface (verde) e na couve (vermelho).

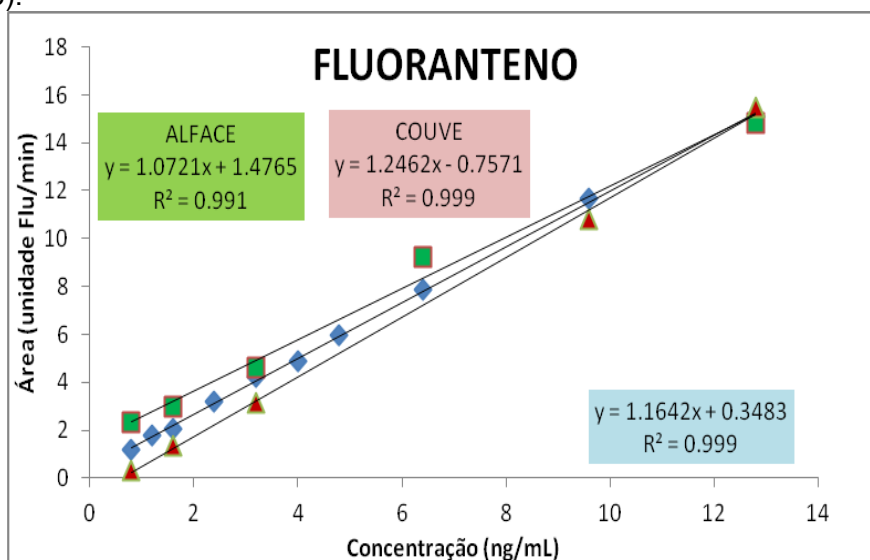


Figura 22. Curvas analíticas do benzo(g,h,i)perileno no solvente e nas matrizes (alface e couve-manteiga).

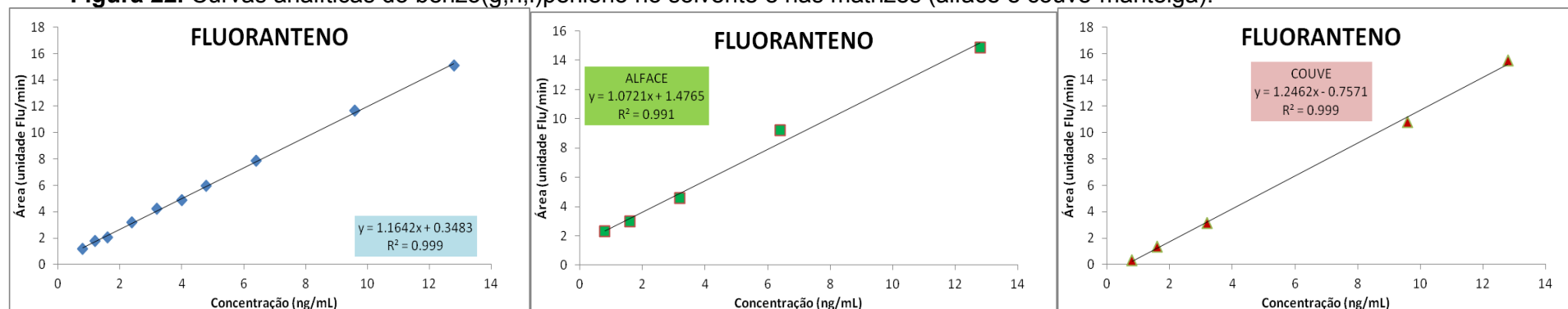


Tabela 11. Parâmetros das curvas analíticas construídas em solvente e nos extratos das matrizes (alface e couve-manteiga).

HPA	SOLVENTE		ALFACE		COUVE		Efeito matriz (%)	R ²	Equação da reta	Efeito matriz (%)
	Intervalo linear (ng mL ⁻¹)	R ²	Equação da reta	R ²	Equação da reta	Efeito matriz (%)				
Fen	0,95 - 10,2	0,999	y = 2,3249x+0,3786	0,992	y = 2,4973x+2,4768	-7,4	0,995	y = 2,4194x-3,5184	-4,1	
Flu	0,80 - 12,8	0,999	y = 1,164x+0,3483	0,991	y = 1,0721x+1,4762	+7,9	0,999	y = 1,2462x-0,7571	-9,1	
Pi	1,2 - 25,8	0,999	y = 9,6463x+0,9006	0,995	y = 10,207x-0,9088	-5,8	0,997	y = 0,1042x-4,6804	-8,0	
B(a)A	0,40 - 12,8	0,998	y = 7,7275x-0,3865	0,999	y = 8,086x+0,3099	-4,6	0,999	y = 8,0445x + 0,0869	-4,7	
Cri	0,40 - 12,8	0,999	y = 2,3701x+0,0267	1	y = 2,4993x+0,2741	-5,5	1	y = 2,5048x+0,0545	-5,7	
B(b)F	0,24 - 5,12	0,999	y = 4,1758x-0,2344	0,998	y = 4,1249x+0,6675	+1,2	0,999	y = 4,1341x+0,0858	+1,0	
B(k)F	0,16 - 5,12	0,999	y = 40,742x-0,2357	0,999	y = 41,794x+0,9032	-2,5	0,999	y = 41,498x+1,0684	-1,8	
B(a)P	0,064 - 2,8	0,999	y = 7,9058x-0,3622	0,999	y = 8,3355x-0,50211	-5,4	0,999	y = 8,3053x-0,3921	-5,1	
D(ah)A	1,60 - 51,2	0,999	y = 2,0764x-0,2891	0,999	y = 2,0933x-0,3801	-0,8	0,999	y = 2,1119x-0,2902	-1,7	
B(ghi)P	0,64 - 20,5	0,999	y = 1,3929x-0,3224	0,997	y = 1,2804x-0,3829	+8,1	0,999	y = 1,4107x-0,0703	-1,3	
Ind	0,40 - 12,8	0,999	y = 2,9427x-0,2381	0,999	y = 2,9496x-0,3674	-0,2	0,995	y = 2,8546x-0,0447	-0,2	

4.3.1.3. LD e LQ do Método Instrumental

A partir de gráficos de linearidade, anteriormente usado para excluir os valores anômalos (teste de Huber), também é possível estabelecer os limites de detecção e quantificação instrumentais. Sendo o LD a menor concentração para a qual a área pode ser considerada diferente da linha de base (RIBANI *et al.*, 2004), no gráfico da curva analítica este valor corresponde à menor concentração injetada, estando ou não no intervalo linear. Já o LQ é a menor concentração na qual existe confiabilidade analítica adequada para a quantificação (RIBANI *et al.*, 2004). No gráfico de linearidade corresponde à menor concentração pertencente ao intervalo linear. Os valores se encontram na Tabela 12.

Tabela 12. Valores de LD e LQ, instrumentais, em ng mL⁻¹ para todos os HPA estudados.

HPA	LD	LQ
Fenantreno	0,32	0,95
Fluoranteno	0,40	0,80
Pireno	0,80	1,2
Benzo(a)antraceno	0,16	0,40
Criseno	0,16	0,16
Benzo(b)fluoranteno	0,16	0,24
Benzo(k)fluoranteno	0,040	0,16
Benzo(a)pireno	0,16	0,16
Dibenzo(a,h)antraceno	0,060	1,6
Benzo(g,h,i)perileno	0,64	0,64
Indeno(1,2,3-cd)pireno	0,40	0,40

Uma vez que que o método instrumental de análise nas condições analíticas otimizadas, atende as exigências de linearidade e seletividade iniciou-se a otimização da extração.

4.3.2. Otimização do Método de Extração

Para a escolha e otimização do método de extração foi efetuado um levantamento bibliográfico para verificar os métodos mais utilizados na extração dos HPA de matrizes vegetais.

Como apresentado na Tabela 13, verifica-se que o método de ultrassom se destaca por ser mais simples e por utilizar menor volume de solvente quando comparado a outras técnicas como soxhlet, obtendo resultados satisfatórios reportados na literatura e por estes motivos foi o método escolhido para este estudo.

Tabela 13. Alguns métodos, selecionados da literatura, para extração de HPA a partir de matrizes vegetais

Referência	PAÍS	MATRIZ	EXTRAÇÃO	SOLVENTE	CLEAN UP	Determinação
PETERSEN et al. 2001	Dinamarca	Mistura de vegetais	Soxwave	n-hexano:acetona	SPE:NH ₂ -SAX	CG-MS
BISHNOI et al. 2006	Índia	Frutas e vegetais	Ultrassom	n-hexano	-	HPLC-UV
MARTORELL et al. 2010	Espanha	alface	ASE	-	-	CG-MS
HOSSAIN e HOQUE. 2011	Índia	repolho	Refluxo	-	Sílica+Na ₂ SO ₄	CG-MS
VIEIRA et al. 2012	Brasil	erva mate	Ultrassom	15 mL n-hexano:acetona (94:6)	Cartucho C ₁₈	HPLC-UV
KHILLARE et al. 2012	Índia	espinafre	Ultrassom		Sílica gel	HPLC-UV
ASHRAF e SALAM. 2012	Arábia Saudita	espinafre e repolho	Soxhlet	Ciclón-hexano:acetona por 8 horas	Sílica+Na ₂ SO ₄	HPLC-UV
TOMASHUK et al. 2012	USA	folhas de pinheiro	Ultrassom	n-hexano:diclorometano (1:1) 10 minutos (2 vezes)	Florisil+Na ₂ SO ₄	CG-MS
RODRIGUEZ et al. 2012	Argentina	folhas de eucalipto e pinheiro	Ultrassom	n-hexano:acetona (1:1) 2mL 30 segundos	-	HPLC-FLU
MURAKAMI et al. 2012	Japão	folhas de ginkgo	Ultrassom	n-hexano:diclorometano (1:1) 400 mL por 2 horas	Sílica+Na ₂ SO ₄	CG-MS
RATOLA et al. 2012	Portugal, Espanha e Grécia	folhas de pinheiro	Ultrassom	n-hexano:diclorometano (1:1) 30 mL por 10 minutos (3X)	SPE-Alumina	CG-MS
RINALDI et al. 2012	Brasil	folhas de azevém italiano (<i>Lolium multiflorum</i>)	Soxhlet	n-hexano:diclorometano (1:1) 50 mL por 24 horas	-	HPLC-FLU

- : não especificado

GC-MS: *Gas Chromatography-Mass Spectrometry*HPLC-FLU: *High Performance Liquid Chromatography-fluorometric detector*HPLC-UV: *High Performance Liquid Chromatography-ultraviolet detection*MS: *Mass Spectrometry*SPE: *Solid-Phase Extraction*ASE: *Accelerated solvent extraction*

Soxwave: soxhlet+ultrassom

Neste grupo de pesquisa o estudo de HPA em material particulado atmosférico (MPA) e em solo vem sendo desenvolvidos há algum tempo. Para a extração dos HPA de MPA a utilização de banho de ultrassom com n-hexano:acetona (1:1, v/v) tem dado bons resultados (CRISTALE, SILVA e MARCHI, 2008). Por outro lado, na literatura os solventes mais utilizados na extração de HPA de matrizes vegetais são n-hexano e n-hexano:DCM (Tabela 13) Assim sendo, estes três extratores foram avaliados neste trabalho.

A otimização do método de extração foi efetuado de duas diferentes maneiras, a primeira pelo método univariado onde foram estudados apenas 8 HPA (BaA, Cri, BbF, BkF, BaP, DahA, BghiP, e Ind) e a segunda pelo método multivariado onde foram estudados além dos oito HPA citados mais três (Fen, Flu e Pi) totalizando 11 HPA.

4.3.2.1. Método Univariado

Primeiramente o estabelecimento do volume de extrator e do tempo de extração foram efetuado utilizando-se apenas o n-hexano como extrator e depois os dois outros sistemas solvente foram avaliados, nas condições de melhor desempenho para o n-hexano. As amostras liofilizadas. Foram pesadas (20 mg) em vial âmbar de 40mL, fortificadas com solução padrão à uma concentração equivalente ao ponto médio da curva analítica, devido à resposta de cada HPA no sistema HPLC/FLU, a concentração dos padrões adicionados às amostras variou de 2,6 à 15,4 ng mL⁻¹ dependendo do HPA. Após a adição da solução padrão à amostra, adicionou-se 1 mL de acetonitrila e cada vial foi submetido a 1 minuto de agitação em vortex para melhor contato analito-matriz. As amostras foram secas em temperatura ambiente envolvidas em papel alumínio dentro da capela com fluxo de exaustão ligado por 5 horas e após secas foram acondicionadas em freezer a -18°C. As extrações foram realizadas após um mínimo de 12 horas do enriquecimento das amostras, foram efetuadas em triplicata e cada extrato foi analisado também em triplicada, perfazendo um total de 9 resultados por ensaio.

4.3.2.1.1. Otimização do Volume de Solvente de Extração

Sabendo que a extração ocorre pela solubilização do composto retido na cutícula das folhas que podem se encontrar tanto na superfície quanto no interior da cutícula dependendo assim de fenômenos de difusão para retirá-los das partes mais internas e que a renovação do solvente em contato com as substâncias a dissolver influencia na velocidade da difusão, optou-se em efetuar extrações múltiplas utilizando o menor volume possível em cada etapa, para garantir que a maior porcentagem de analitos fossem extraídos da matriz. Para as três etapas foram efetuadas testes utilizando 5 mL e 10 mL de n-hexano. A amostra foi submetida a três sequências de extração de 15 minutos com os volumes de solventes testados, os resultados de recuperação em porcentagem podem ser vistos na Tabela 14 com destaque para os maiores valores obtidos de recuperação.

Tabela 14. Resultados do estudo para escolha do volume de solvente na extração em banho de ultrassom (3 x volume estipulado) (n=9) por 15 minutos, 20 mg amostra liofilizada, n-hexano como solvente de extração.

HPA	Concentração (ng g ⁻¹)	5 mL		10 mL	
		REC	CV	REC	CV
BaA	320	81	2	86	3
Cri	320	90	2	89	2
BbF	128	89	4	88	3
BkF	128	90	1	92	1
BaP	320	91	2	95	2
DahA	1280	91	1	92	2
BghiP	512	97	6	93	2
Ind	320	96	2	92	4

Pôde-se constatar que não há grandes diferenças no valor de recuperação quando utilizadas porções de 5 ou 10 mL do solvente, assim sendo optou-se por utilizar o menor volume de solvente.

4.3.2.1.2. Otimização do Tempo de Extração

Nesta etapa do estudo optou-se por avaliar o desempenho de tempos de extração menores do que o empregado no item anterior, tendo sido avaliados tempos de 7 e 10 minutos. Os resultados de recuperação para todos os experimentos podem ser vistos na Tabela 15, com destaque para os maiores valores obtidos de recuperação.

Tabela 15. Resultados do estudo para escolha do tempo de extração em banho de ultrassom (3 x 5 mL) (n=9) 20 mg de amostra liofilizada, n-hexano como extrator.

HPA	Concentração (ng g ⁻¹)	7 minutos		10 minutos		15 minutos	
		REC	CV	REC	CV	REC	CV
BaA	320	78	1	82	1	81	2
Cri	320	86	4	89	2	90	2
BbF	128	85	5	87	2	89	4
BkF	128	87	1	93	0	90	1
BaP	320	89	1	95	1	91	2
DahA	1280	90	2	93	2	91	1
BghiP	512	94	6	93	2	97	6
Ind	320	93	3	96	4	95	2

Embora não apresente grandes diferenças nos valores de recuperação, quando são comparadas apenas as médias destas nota-se que o menor tempo de extração produz as piores recuperações. Para a escolha do solvente de extração decidiu-se efetuar testes de extrações de 10 e 15 minutos com todos os solventes avaliados para garantir que o procedimento com maior recuperação fosse adotado.

4.3.2.1.3. Escolha do Solvente de Extração

Nesta etapa foram utilizados 5 mL de solvente em cada sequência de extração de 10 e 15 minutos, totalizando 15 mL de extrato ao final das extrações. Os

resultados das extrações são vistos na Tabela 16 Para a alface e na Tabela 17 para a couve-manteiga, com destaque para os maiores valores obtidos de recuperação.

Tabela 16. Resultados do estudo para escolha do solvente(n=9), para alface, na extração em banho de ultrassom (3x 5 mL) 20 mg de amostra liofilizada.

HPA	CONC. (ng g ⁻¹)	n-hexano:diclorometano (1:1)				n-hexano:acetona(1:1)				n-hexano			
		10 minutos		15 minutos		10 minutos		15 minutos		10 minutos		15 minutos	
		REC	CV	REC	CV	REC	CV	REC	CV	REC	CV	REC	CV
BaA	320	83	1	86	1	82	1	87	1	82	1	81	2
Cri	320	90	2	93	1	85	3	104	8	89	2	90	2
BbF	128	93	2	101	3	90	11	92	2	87	2	89	4
BkF	128	90	1	92	2	89	1	96	2	93	0	90	1
BaP	320	91	1	94	2	89	1	98	2	95	1	91	2
DahA	1280	91	1	95	1	89	1	96	1	93	2	91	1
BghiP	512	116	13	105	5	86	2	97	3	93	2	97	6
Ind	320	93	1	97	1	89	2	96	5	96	4	95	2

Tabela 17. Resultados do estudo para escolha do solvente(n=9), para couve, na extração em banho de ultrassom (3x 5mL) 20 mg de amostra liofilizada.

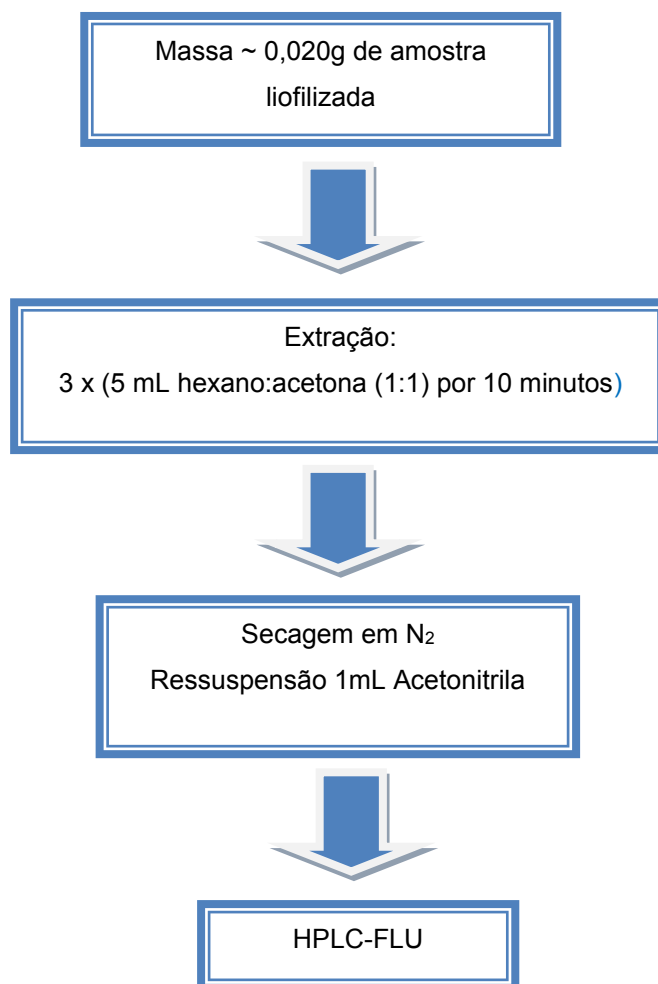
HPA	CONC. (ng g ⁻¹)	n-hexano:diclorometano (1:1)				n-hexano:acetona(1:1)				n-hexano			
		10 minutos		15 minutos		10 minutos		15 minutos		10 minutos		15 minutos	
		REC	CV	REC	CV	REC	CV	REC	CV	REC	CV	REC	CV
BaA	320	82	2	81	5	91	3	87	10	73	6	70	5
Cri	320	85	8	84	8	94	3	88	8	82	5	73	5
BbF	128	90	4	97	2	97	6	97	7	89	3	85	2
BkF	128	89	1	91	4	98	3	97	10	85	5	82	3
BaP	320	89	1	90	3	98	3	97	5	82	2	82	3
DahA	1280	89	1	92	5	102	3	99	9	86	6	83	2
BghiP	512	86	3	116	19	120	8	115	18	108	18	78	15
Ind	320	89	1	95	3	102	3	97	8	85	3	87	1

Segundo os resultados todos os solventes apresentam bom desempenho nos dois tempos de extração testados (10 e 15 minutos) estando seus resultados de recuperação dentro da faixa aceitável, porém a mistura de acetona: n-hexano se mostrou mais eficiente se compararmos todos os resultados levando em conta as

duas matrizes, além de ser ambientalmente amigável, uma vez que não emprega-se solvente clorado. Os resultados de melhor extractibilidade da mistura acetona:n-hexano podem ser explicados pelas interações solvente-analito. O n-hexano interage com os anéis aromáticos dos analitos em estudo por serem ambos apolares e a acetona interage através de seus elétrons π com a nuvem π dos HPA.

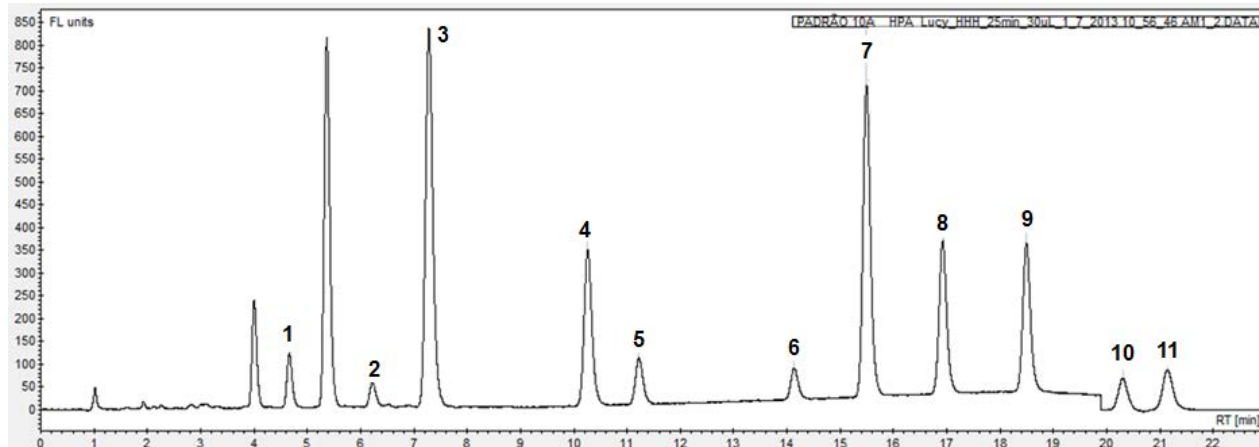
O fluxograma apresentado na Figura 23 sumariza o método otimizado para a extração dos HPA das matrizes vegetais em estudo.

Figura 23. Método para extração de HPA das matrizes de interesse neste trabalho.

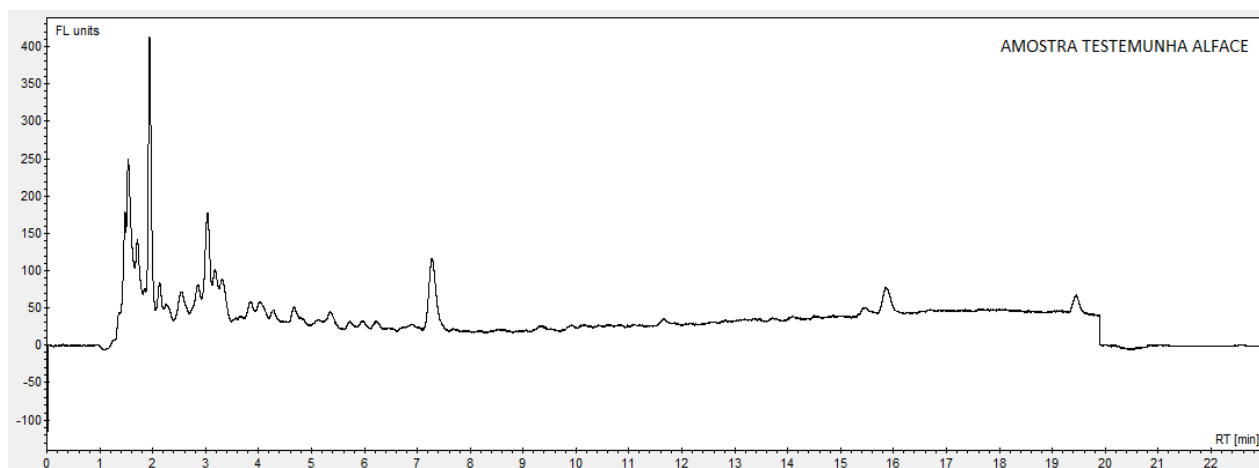


Os cromatogramas das amostras extraídas pelo método otimizado podem ser vistos na Figura 24.

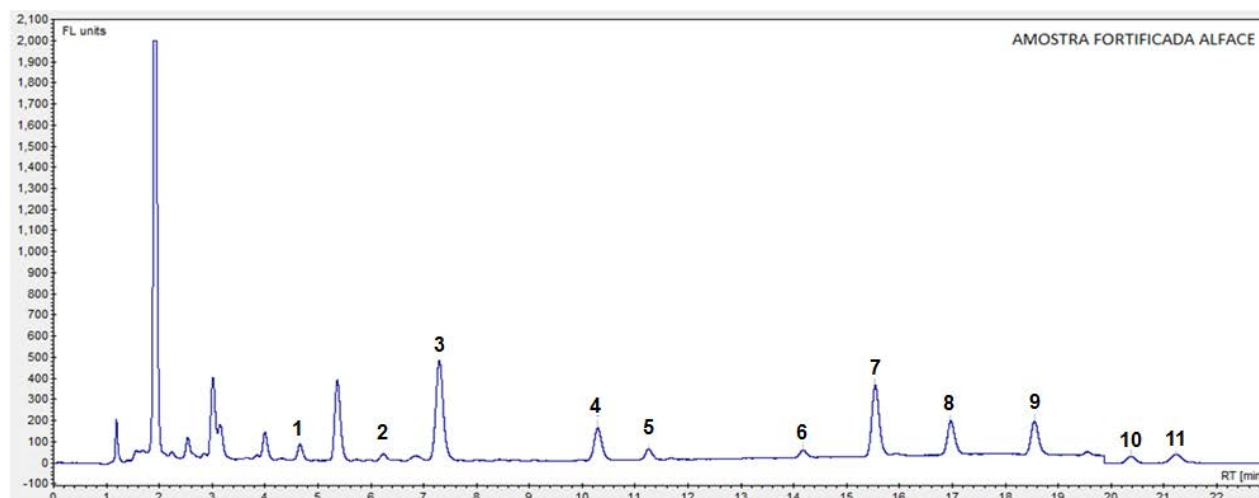
Figura 24. Cromatogramas HPLC/FLU (a) mistura padrão; (b) amostra testemunha (alface); (c) amostra de alface fortificada; (d) amostra testemunha (couve); (e) amostra de couve fortificada.



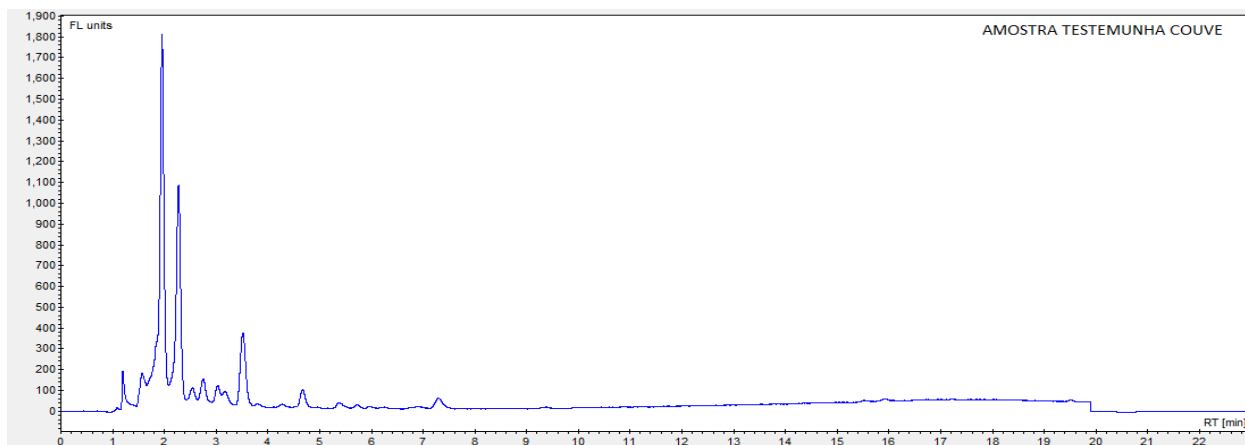
(a)



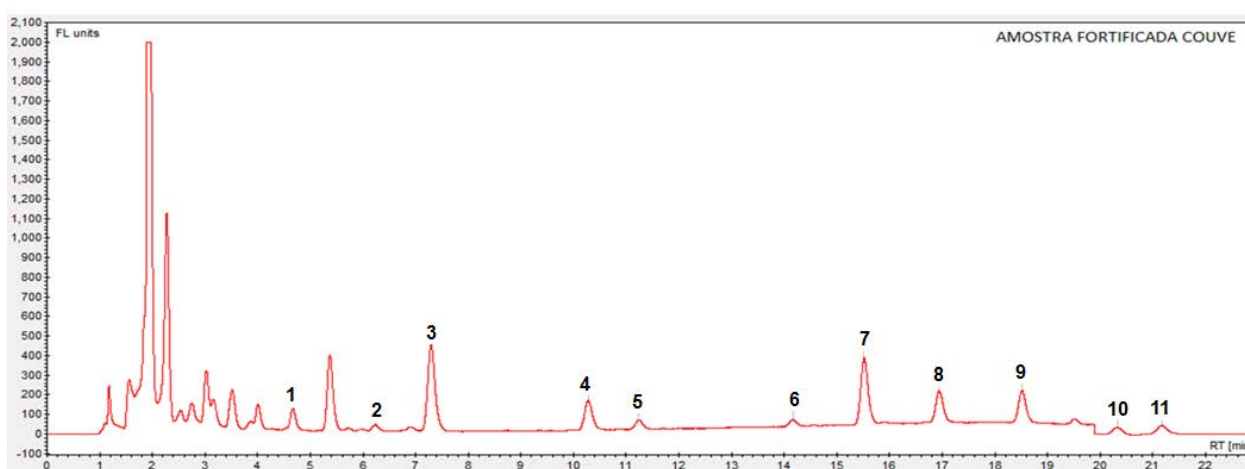
(b)



(c)



(d)



(e)

1: Fenantreno; 2: Pireno; 3: Pireno; 4: Benzo(a)antraceno; 5: Criseno; 6: Benzo(b)fluoranteno; 7: Benzo(k)fluoranteno;
8: Benzo(a)pireno; 9: Dibenzo(a,h)antraceno; 10: Benzo(g,h,i)perileno; 11: Indeno(1,2,3-cd)pireno

4.3.2.1.4. Validação do método

O ensaio de recuperação constitui o método mais utilizado para validação de processos analíticos, pois a recuperação está diretamente relacionada com a exatidão refletida pela quantidade do analito. Segundo a ICH (International Conference on Harmonization) os ensaios de recuperação devem envolver no mínimo nove determinações, por exemplo ensaios em triplicata em três níveis de concentração. Esta recomendação também é adotada pela ANVISA (RIBANI et al., 2004).

O ensaio de recuperação iniciou-se com a fortificação das amostras em seis diferentes concentrações (Tabela 18) dentro da faixa linear da resposta do sistema

HPLC/FLU, em três replicatas, da mesma maneira descrita anteriormente. A precisão foi avaliada pela repetibilidade dos ensaios de recuperação por meio dos cálculos dos coeficientes de variação (CV).

Tabela 18. Concentrações dos HPA nas amostras fortificadas em ng g⁻¹ de amostra liofilizada.

HPA ng g ⁻¹	02	03	04	05	06	07
Benzo(a)antraceno	23,00	30,00	40,00	160,0	320,0	640,0
Criseno	23,00	30,00	40,00	160,0	320,0	640,0
Benzo(b)fluoranteno	9,000	12,00	16,00	64,00	128,0	256,0
Benzo(k)fluoranteno	9,000	12,00	16,00	64,00	128,0	256,0
Benzo(a)pireno	22,50	30,00	40,00	160,0	320,0	640,0
Dibenzo(a,h)antraceno	90,00	120,0	160,0	640,0	1280	2560
Benzo(g,h,i)perileno	36,00	48,20	64,00	256,0	512,0	1024
Indeno(1,2,3-cd)pireno	22,50	30,00	40,00	160,0	320,0	640,0

No estudo de validação analítica para análise de microconstituintes em matrizes complexas, considera-se aceitável recuperações entre 70-120% com CV < 20% (THIER & ZEUMER, 1987). Os resultados de recuperações e coeficientes de variação obtidos podem ser vistos na Tabela 19. O teste da couve na concentração 04 foi impossibilitado de ser analisado por apresentarem resultados discrepantes dos esperados provavelmente devido a erros na fortificação das amostras testemunhas. Os valores de recuperação fora do intervalo de 70~120% e de coeficiente de variação maior que 20% se encontram em destaque.

A tabela 19 contém os resultados do estudo de recuperação nas matrizes alface e couve-manteiga onde foram efetuadas extrações com banho de ultrassom e cada resultado foi obtido a partir de três replicatas. Os números 02 a 07 referem-se as concentrações de fortificação apresentadas na Tabela 18.

Tabela 19. Resultados do estudo de recuperação nas matrizes alface e couve-manteiga

ALFACE CRESPA												
HPA	02		03		04		05		06		07	
	REC	CV	REC	CV	REC	CV	REC	CV	REC	CV	REC	CV
BaA	117	3,0	94	7,0	92	8,0	87	2,0	82	1,0	87	5,0
Cri	82	16	83	18	116	7,0	87	5,0	85	3,0	84	3,0
BbF	105	4,0	81	10	108	10	88	5,0	90	11	85	4,0
BkF	91	6,0	104	5,0	88	4,0	86	1,0	89	1,0	86	3,0
BaP	95	4,0	78	9,0	81	7,0	85	3,0	89	1,0	89	4,0
DahA	106	9,0	87	7,0	85	7,0	90	4,0	89	1,0	90	4,0
BghiP	80	12	74	13	105	17	81	3,0	86	2,0	91	5,0
Ind	109	5,0	76	19	91	6,0	91	4,0	89	2,0	87	3,0
COUVE-MANTEIGA												
HPA	02		03		05		06		07			
	REC	CV	REC	CV	REC	CV	REC	CV	REC	CV	REC	CV
BaA	87	10	82	10	80	2,0	91	3,0	76		76	2,0
Cri	64	6,0	72	14	75	4,0	94	3,0	72		72	5,0
BbF	186	38	92	14	87	9,0	97	6,0	78		78	2,0
BkF	128	29	90	2,0	81	1,0	98	3,0	77		77	2,0
BaP	85	21	79	6,0	80	2,0	98	3,0	78		78	3,0
DahA	69	9,0	84	5,7	85	2,0	102	3,0	79		79	2,0
BghiP	65	13	98	12	115	4,0	120	8,0	92		92	4,0
Ind	104	25	78	4,0	92	10	102	3,0	81		81	3,0

Os limites de detecção e quantificação do método são determinados de acordo com a proposta de Thier. Segundo Thier teoricamente, nenhum sinal deveria ser obtido para a amostra controle. Entretanto, sinais de “resíduos aparentes” podem ocorrer e são chamados sinais do branco. Estes sinais podem ser atribuídos a co-extrativos não removidos no tratamento da amostra; impurezas presentes nos solventes e reagentes utilizados na obtenção do extrato da amostra; ou, a ruídos do sistema cromatográfico (THIER & ZEUMER, 1987).

O LD pode ser estimado a partir dos resultados de um estudo de recuperação, utilizando as equações 2 e 3 apresentadas a seguir (THIER & ZEUMER, 1987)

$$\text{Eq.:2} \quad LD = \frac{2 \cdot t_{f,95} \times \sigma_{com}}{S}$$

$$\text{Eq.:3} \quad \sigma_{com} = \sqrt{\frac{(m-1)\sigma_A^2 + (n-1)\sigma_B^2}{m+n-2}}$$

sendo:

t – t de Student

σ_A - desvio padrão estimado a partir do estudo de recuperação com o menor nível de fortificação.

σ_B - desvio padrão obtido com a aplicação do método à amostra controle.

m - número de repetições da aplicação do método à amostra com menor nível de fortificação.

n - número de repetições da aplicação do método à amostra controle.

f - número de graus de liberdade, estimado por $m + n - 2$.

S - sensibilidade do aparelho.

Tabela 20. Valores de LD e LQ do método para as duas matrizes em ng g^{-1} de hortaliça liofilizada (peso seco).

HPA	ALFACE CRESPA		COUVE-MANTEIGA	
	LD	LQ	LD	LQ
Benzo(a)antraceno	3,00	23,0	8,00	23,0
Criseno	10,0	23,0	11,0	30,0
Benzo(b)fluoranteno	2,00	9,00	7,00	12,0
Benzo(k)fluoranteno	1,00	9,00	1,00	12,0
Benzo(a)pireno	6,00	23,0	6,00	30,0
Dibenzo(a,h)antraceno	24,0	90,0	18,0	120
Benzo(g,h,i)perileno	10,0	36,0	13,0	48,0
Indeno(1,2,3-cd)pireno	4,00	23,0	3,00	30,0

4.3.2.2. Método Multivariado

A otimização do método de extração pelo método multivariado inicia-se com o estabelecimento das variáveis consideradas com potencial relevância e que serão estudadas. Após este estabelecimento analisou-se o que há na literatura sobre os

valores máximo e mínimo utilizados em amostras iguais ou semelhantes em estudos com o mesmo objetivo.

Foram pesadas em vial âmbar de 40mL, fortificadas com solução padrão à uma concentração equivalente ao ponto médio da curva analítica, devido à resposta de cada HPA no sistema HPLC/FLU, a concentração dos padrões adicionados às amostras variou de 2,6 à 15,4 ng mL⁻¹ dependendo do HPA. Após a adição da solução padrão à amostra, adicionou-se 1 mL de acetonitrila e cada vial foi submetido a 1 minuto de agitação em vortex para melhor contato analito-matriz. As amostras foram secas em temperatura ambiente envolvidas em papel alumínio dentro da capela com fluxo de exaustão ligado por 5 horas e após secas foram acondicionadas em freezer a -18°C. As extrações foram realizadas após um mínimo de 12 horas do enriquecimento das amostras.

4.3.2.2.1. Variáveis significativas

As variáveis selecionadas como sendo significativas por possuírem variações na literatura podem ser vistas na Tabela 21 juntamente com os valores máximos e mínimos que serão estudados.

Tabela 21. Variáveis envolvidas no processo de extração por ultrassom.

VARIÁVEIS	Níveis Estudados		
	Baixo (-1)	Central (0)	Alto(+1)
Massa da amostra (mg)	200	350	500
Volume de solvente (mL)	10	15	20
% de n-hexano em acetona	50	72	94
Número de extrações	1	2	3
Tempo de extração (min)	5	15	25
Tempo de centrifugação (min)	sem	1	2

Para diminuir o número de experimentos nesta etapa de exclusão de fatores optamos por efetuar um planejamento fatorial fracionada 2^{k-2} onde k é o número de variáveis a serem estudadas, resultando em $2^{6-2} = 16$ experimentos com 5 replicatas

do ponto central. Os experimentos foram conduzidos de acordo com as informações da Tabela 22 em ordem aleatória para que a influência das variáveis não controláveis fossem minimizadas e finalizados no mesmo dia. Efetuou-se extrações de amostras sem fortificação (branco) para cada experimento descrito e aos valores encontrados nas amostras fortificadas descontou-se o valor do branco para cada um dos experimentos.

Tabela 22. Condições experimentais do planejamento fatorial fracionado.

Exp	% n-hexano em acetona	Massa da amostra (mg)	Tempo de extração (minutos)	Volume de solvente (mL)	Número de extrações	Tempo de centrifuga (minutos)
11	+1	-1	+1	-1	-1	+1
17	0	0	0	0	0	0
6	-1	+1	-1	+1	+1	-1
9	+1	-1	-1	-1	+1	-1
1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
10	+1	-1	-1	+1	+1	+1
13	+1	+1	-1	-1	-1	+1
18	0	0	0	0	0	0
5	-1	+1	-1	-1	+1	+1
8	-1	+1	+1	+1	-1	+1
16	+1	+1	+1	+1	+1	+1
2	-1	-1	-1	+1	-1	+1
7	-1	+1	+1	-1	-1	-1
15	+1	+1	+1	-1	+1	-1
3	-1	-1	+1	-1	+1	+1
14	+1	+1	-1	+1	-1	-1
19	0	0	0	0	0	0
12	+1	-1	+1	+1	-1	-1
4	-1	-1	+1	+1	+1	-1
11	+1	-1	+1	-1	-1	+1
17	0	0	0	0	0	0

Para obter um único resultado que refletisse a resposta de recuperação global, de todas as substâncias estudadas optou-se por calcular a soma das respostas normalizadas (R_n) das recuperações obtidas para cada um dos 21

experimentos do PFF (resultados mostrados na tabela 23). Para o cálculo foi empregada a equação 4 (GAUJAC *et al.*, 2008).

$$\text{Eq.:4} \quad R_n = \sum \frac{R_x}{R_{x(\max)}}$$

onde:

X = corresponde aos analitos

R_x = é a recuperação obtida para o composto x;

R_{x(max)} = corresponde a recuperação máxima, obtida para o composto x, de todos 21 experimentos do planejamento fracionário executado.

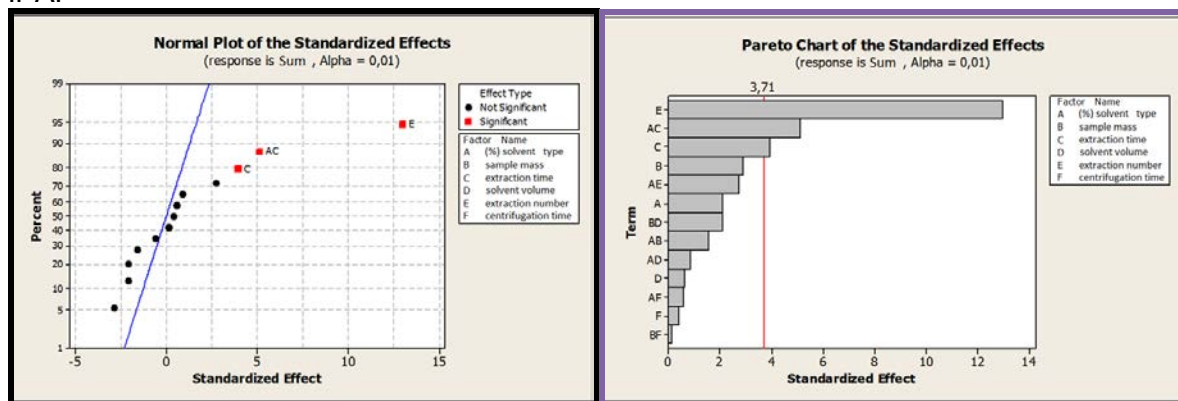
Tabela 23. Resultados em porcentagem de recuperação do planejamento fatorial fracionado (PFF) e resposta normalizada (Rn)

	Fen	Flu	Pi	BaA	Cri	BbF	BkF	BaP	DahA	BghiP	Ind	Rn
Exp 01	34	130	149	74	89	101	80	75	80	78	76	8.317
Exp 02	25	-4	14	90	67	108	85	82	83	84	79	6.886
Exp 03	-78	-17	-38	47	20	40	51	50	50	-10	39	2.386
Exp 04	132	72	100	93	89	118	85	82	81	72	80	8.485
Exp 05	269	138	168	69	89	106	68	71	70	64	64	8.793
Exp 06	99	142	90	92	117	129	88	92	92	38	82	8.552
Exp 07	31	50	37	50	58	70	52	54	55	46	60	5.097
Exp 08	38	100	110	76	88	91	71	73	78	66	75	7.596
Exp 09	10	33	13	87	63	86	81	79	87	74	75	6.673
Exp 10	10	13	19	87	76	88	82	86	86	69	83	6.831
Exp 11	-33	-13	-13	74	64	71	72	72	76	67	73	5.431
Exp 12	73	71	90	83	90	92	79	79	82	69	78	7.762
Exp 13	50	49	40	48	56	63	49	50	50	44	48	4.781
Exp 14	33	32	48	63	43	73	61	62	62	51	61	5.384
Exp 15	143	151	116	82	116	115	84	65	84	53	73	8.829
Exp 16	111	56	121	83	98	102	81	84	79	60	72	8.025
Exp 17	86	95	83	89	90	86	86	95	87	98	74	8.437
Exp 18	63	117	82	90	89	82	85	92	86	125	71	8.574
Exp 19	69	112	90	87	89	80	83	90	84	95	67	8.225
Exp 20	93	101	83	88	90	79	85	92	85	100	69	8.327
Exp 21	73	130	83	84	87	71	83	87	82	78	68	8.015

Após análises dos resultados do experimento do PFF através de gráficos de pareto individuais (APÊNDICE 3) e da soma normalizada (Figura 25) pode-se verificar que o fator E (número de extrações) apresentou significância para todos os HPA em estudo onde o maior nível (3) apresenta melhores resultados para todos os analitos, o fator A (% de solvente) isoladamente não apresentou significância porém combinado a outros fatores como C (tempo), D (volume) e E (número de extrações) o mesmo não ocorreu.

Baseado nos resultados da SOMA podemos concluir que os fatores significantes são % de n-hexano (A), tempo (C) e número de extrações (E). O volume de solvente apesar de não apresentar significância no experimentos foi otimizado uma vez que o aumento de massa de amostra proporciona a necessidade do aumento do volume de solvente para que toda a amostra fosse encoberta.

Figura 25. Gráfico de pareto da soma normalizada dos resultados de recuperação dos 11 HPA.



Alguns fatores foram fixados de acordo com os resultados prévios, o número de extração no valor central (2 vezes), massa máxima (500mg) e tempo de centrifuga central (1 minuto) para os demais fatores aproximou-se das regiões de melhores resultados no planejamento do composto central como mostra a Tabela 24.

4.3.2.2.2. Planejamento do Composto Central

Nesta etapa consideramos os fatores que apresentaram ser significantes como o solvente n-hexano% na mistura com acetona e o tempo de extração, juntamente com o fator adicional a ser estudado, o volume de solvente. Adicionou-se os pontos axiais (estes encontram-se localizados a uma distância $+\alpha$ e $-\alpha$ do ponto central do domínio escolhido), juntamente com os pontos experimentais do planejamento fatorial fracionário (-1, 0, +1) formarão um conjunto de 5 diferentes níveis a serem estudados (Tabela 24). O conjunto desses experimento com seus fatores e diferentes níveis estão expostos na Tabela 25.

As amostras para este experimentos foram fortificadas previamente de acordo com o descrito na página 87 item 4.3.2.2. e os brancos foram descontados dos resultados de cada um dos 19 experimentos.

Tabela 24. Fatores e níveis estudados no planejamento do composto central (PCC).

VARIÁVEIS	Níveis Estudados				
	$-\alpha$ (-1,682)	-1	0	1	$+\alpha$ (1,682)
% n-hexano:acetona	50	60	75	90	100
Tempo de extração (min)	5	10	18	25	30
Volume de solvente (mL)	10	15	23	30	35

Tabela 25. Parâmetros experimentais aplicados ao planejamento do composto central seus níveis.

Experimentos	% n-hexano	Tempo	Volume
4	1	1	-1
2	1	-1	-1
16	0	0	0
1	-1	-1	-1
11	0	- α	0
7	-1	1	1
13	0	0	- α
14	0	0	+ α
10	+ α	0	0
12	0	+ α	0
19	0	0	0
17	0	0	0
18	0	0	0
5	-1	-1	1
9	- α	0	0
3	-1	1	-1
6	1	-1	1
15	0	0	0
8	1	1	1

Os experimentos foram conduzidos no mesmo dia em ordem aleatória. Os brancos foram efetuados em dia diferente do experimento porém finalizados no mesmo dia de início. Os resultados em porcentagem de recuperação com o desconto do branco se encontram na Tabela 26 assim como o valor de soma normalizada (Rn).

Tabela 26. Resultados em porcentagem de recuperação do planejamento do composto central e resposta normalizada.

	Fen	Flu	Pi	BaA	Cri	BbF	BkF	BaP	DahA	BghiP	Ind	Rn
Exp 01	81	123	64	85	82	81	91	84	96	80	92	8,134
Exp 02	123	127	88	86	88	91	91	92	96	83	89	8,817
Exp 03	96	123	93	87	93	88	91	93	96	79	89	8,638
Exp 04	71	48	57	82	83	78	90	111	96	81	92	7,713
Exp 05	72	112	61	88	89	83	95	99	98	87	92	8,351
Exp 06	127	137	102	92	92	99	95	92	98	84	95	9,290
Exp 07	108	130	35	74	89	77	82	83	78	75	84	7,666
Exp 08	126	156	142	89	105	105	92	92	89	79	90	9,619
Exp 09	34	38	68	86	84	100	78	100	93	83	88	7,462
Exp 10	97	101	85	91	95	104	92	108	98	88	97	8,957
Exp 11	85	102	115	92	99	101	96	109	102	87	104	9,285
Exp 12	157	47	46	100	112	110	96	120	110	121	93	9,522
Exp 13	109	94	126	87	95	95	90	98	96	77	94	8,919
Exp 14	102	131	107	91	95	105	94	106	98	85	100	9,365
Exp 15	135	81	82	90	91	89	96	102	93	82	98	8,781
Exp 16	99	113	121	93	100	94	96	102	95	79	98	9,169
Exp 17	143	89	99	87	88	87	92	100	93	82	99	8,885
Exp 18	105	104	113	93	93	96	96	105	97	85	99	9,172
Exp 19	129	104	123	91	97	90	96	109	99	93	99	9,463

O modelo quadrático matemático que representa a soma da resposta normalizada (Rn) para os três fatores estudado, onde x_1 é a % de n-hexano, x_2 é o volume de solvente extrator e x_3 é o tempo de extração está representado a seguir:

$$\text{Eq. 5: } Rn = 0,571964 + 0,241130x_1 + 0,0173111x_2 - 0,174782x_3 - \\ 0,00174966x_1x_1 + 0,000504479x_2x_2 - 7,3954E-04 x_3x_3 - 6,59434E-04 x_1x_2 + \\ 0,00290355 x_1x_3 + 0,000452200 x_2x_3$$

Podemos observar na equação 5 em verde os efeitos lineares, em vermelho os quadráticos e em azul os efeitos de interação entre os fatores.

Os coeficientes positivos indicam que as melhores eficiências na extração são favorecidas pelos maiores valores da respectiva variável na faixa estudada, enquanto os coeficientes negativos indicam que os melhores valores de resposta são favorecidos pelos menores valores na faixa estudada, indicando assim que para a porcentagem de n-hexano e para o volume os melhores resultados são obtidos nos maiores níveis estudados destes fatores enquanto o tempo possui comportamento inverso, melhores resultados nos menores níveis.

Pelos valores obtidos de “p” observados no APÊNDICE 4 verificamos que nem todas os fatores foram significativos ($p < 0,05$), ou seja o volume e o tempo, porém as interações entre o tempo e a % de n-hexano se mostraram significativos. Sabendo quais fatores apresentaram significância podemos assim considerar apenas estes fatores na equação que representa a soma da resposta normalizada, gerando a seguinte equação final:

$$\text{Eq. 6: } R_n = 0,571964 + 0,241130x_1 - 0,00174966x_1x_1 + 0,00290355 x_1x_3$$

Após definido o melhor modelo, o próximo passo foi encontrar os valores das variáveis experimentais que maximizam a resposta levando em consideração as 11 substâncias a serem otimizadas ao mesmo tempo. Essa avaliação foi feita através da função de desejabilidade e proposta por Derringer e R. Suich em 1980, que é uma técnica de otimização simultânea que consiste em encontrar os valores dos fatores que otimizem uma ou mais respostas, no nosso estudo possuímos 11 respostas, uma de cada HPA que devem ter os três fatores otimizados simultaneamente, ou no mínimo manter em faixas desejáveis.

O processo de desejabilidade envolve 3 etapas:

- Predizer a resposta da variável dependente obtendo as respostas observadas utilizando uma equação baseada no nível da variável independente;
- Encontrar o nível da resposta individual que simultaneamente produza a maior resposta prevista desejada da variável dependente;
- Maximização da desejabilidade global no que diz respeito as variáveis controláveis (KHODADOUST e AHADJMOHAMMADI, 2011).

O tipo de equação da função de desejabilidade de uma dada resposta depende do objetivo do trabalho, se pretende maximizar ou minimizar a resposta. Para a otimização deste trabalho foi utilizado a Equação 7, que corresponde a uma função de desejabilidade para maximizar a resposta, onde o valor ótimo (**A**) é de 100% de recuperação, os limites inferiores (**LI**) de 70% e superiores (**LS**) 100% e **s** equivalente a 1, ou seja, todas as substâncias possuem o mesmo peso.

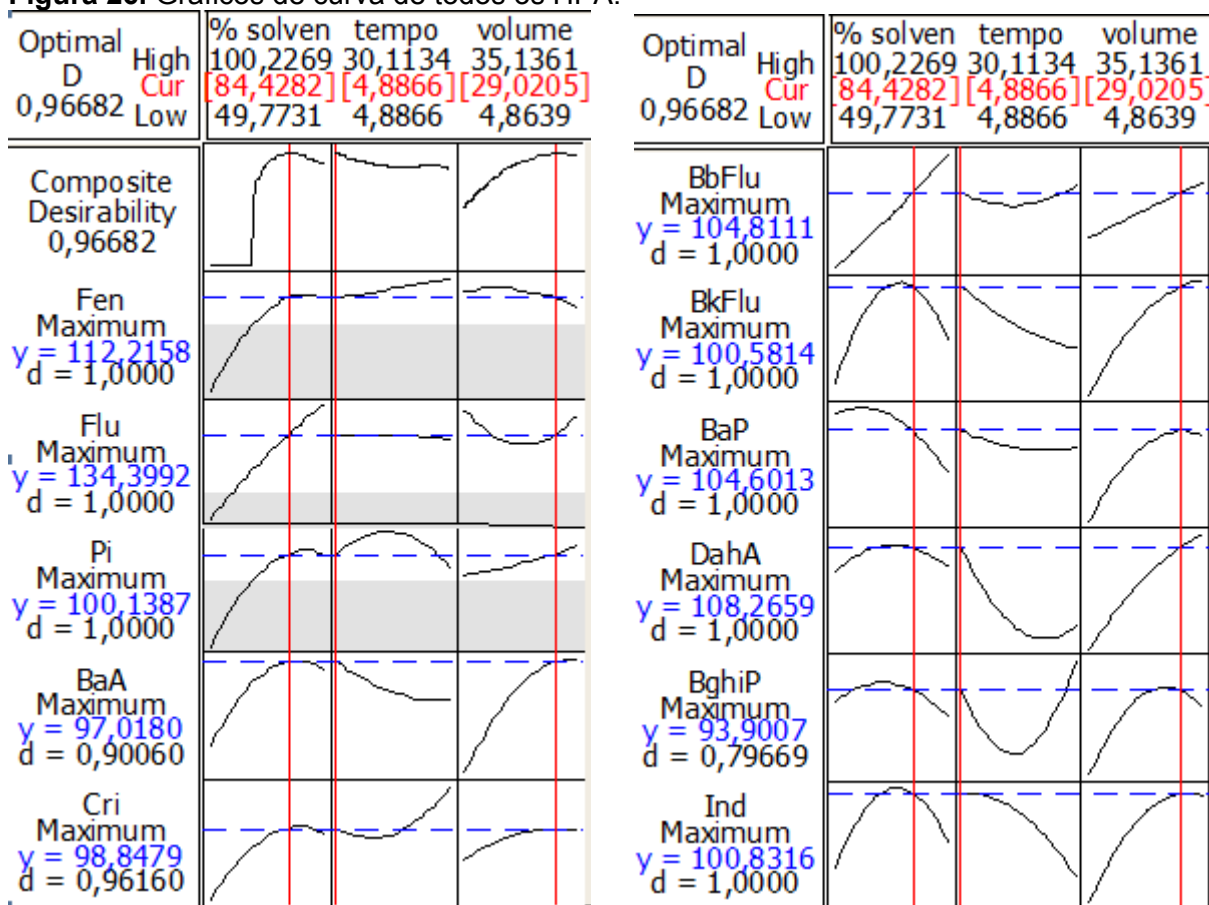
$$\text{Eq. 7: } d = \left(\frac{y - \text{LI}}{\text{A} - \text{LI}} \right)^s \quad \text{para } \text{LI} \leq y \leq \text{A}$$

Uma vez que a desejabilidade individual (**d**) tenha sido especificada para todas as respostas, devemos combiná-las numa desejabilidade global (**D**), normalmente dada pela média geométrica das desejabilidades individuais (**d**).

Desta forma a otimização simultânea das várias respostas se reduz a maximização de um único valor, a desejabilidade global para que se possa descobrir os níveis dos fatores que maximizem o valor **D**.

Outra vantagem desta definição é que o uso da média geométrica faz com que a desejabilidade global se anule sempre que uma das respostas possuir um valor inaceitável não importando quão satisfatório sejam os valores das outras respostas.

Os valores de desejabilidade individual (**d**) e recuperação (**y**) podem ser vistas nos gráficos de curvas na Figura 26 onde a linha vertical vermelho sinaliza a máxima desejabilidade global teórica calculada.

Figura 26. Gráficos de curva de todos os HPA.

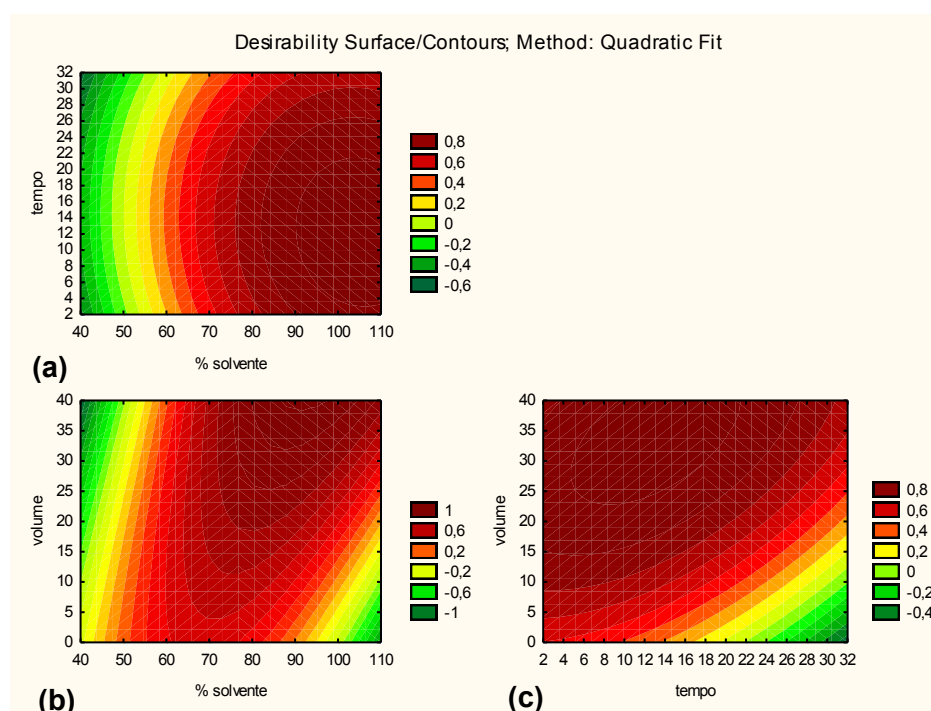
D: desejabilidade global
d: desejabilidade individual
y: recuperação teórica

Nos gráficos de contorno de D, na Figura 27 temos faixas de diferentes cores onde em cada faixa a resposta é constante, os tons de vermelho escuro correspondem as faixas de melhores respostas e os tons de amarelo a verde (de claro a escuro) correspondem as piores respostas em ordem crescente. Cada faixa corresponde a uma altura de cor correspondente na superfície de resposta da figura 28.

Na figura 27a podemos ver que a variável tempo na faixa estudada não possui influência da resposta obtida e que se levarmos em conta apenas este gráfico de contorno de tempo versus % de n-hexano podemos concluir que 100% seria a porcentagem ideal já que apresenta maior valor de desejabilidade (0,8), porém ao analisarmos o gráfico da figura 27b de volume versus % de n-hexano, podemos verificar que a faixa de 80 a 100% de n-hexano possui o melhor valor de desejabilidade (1,0) apenas quando utilizados 40mL de solvente extrator. Como o objetivo do trabalho também é minimizar o máximo possível o volume de solvente

utilizado podemos verificar neste mesmo gráfico que ao utilizarmos 85% de n-hexano o volume dentro da melhor resposta será próximo a 30 mL, reduzindo assim o volume de solvente de extração em 25%. Na figura 27c correspondente ao gráfico de volume versus o tempo podemos verificar que em volumes maiores, de 30 a 40 mL o tempo não é um fator determinante nos resultados já que observamos a máxima desejabilidade de 0,8, do valor mínimo tempo de extração estudado até 18 minutos sem que o valor de D se altere.

Figura 27. Gráficos de contorno dos fatores estudados e as máximas desejabilidades obtidas **(a)** tempo versus % n-hexano; **(b)** volume versus % n-hexano; **(c)** volume versus tempo.

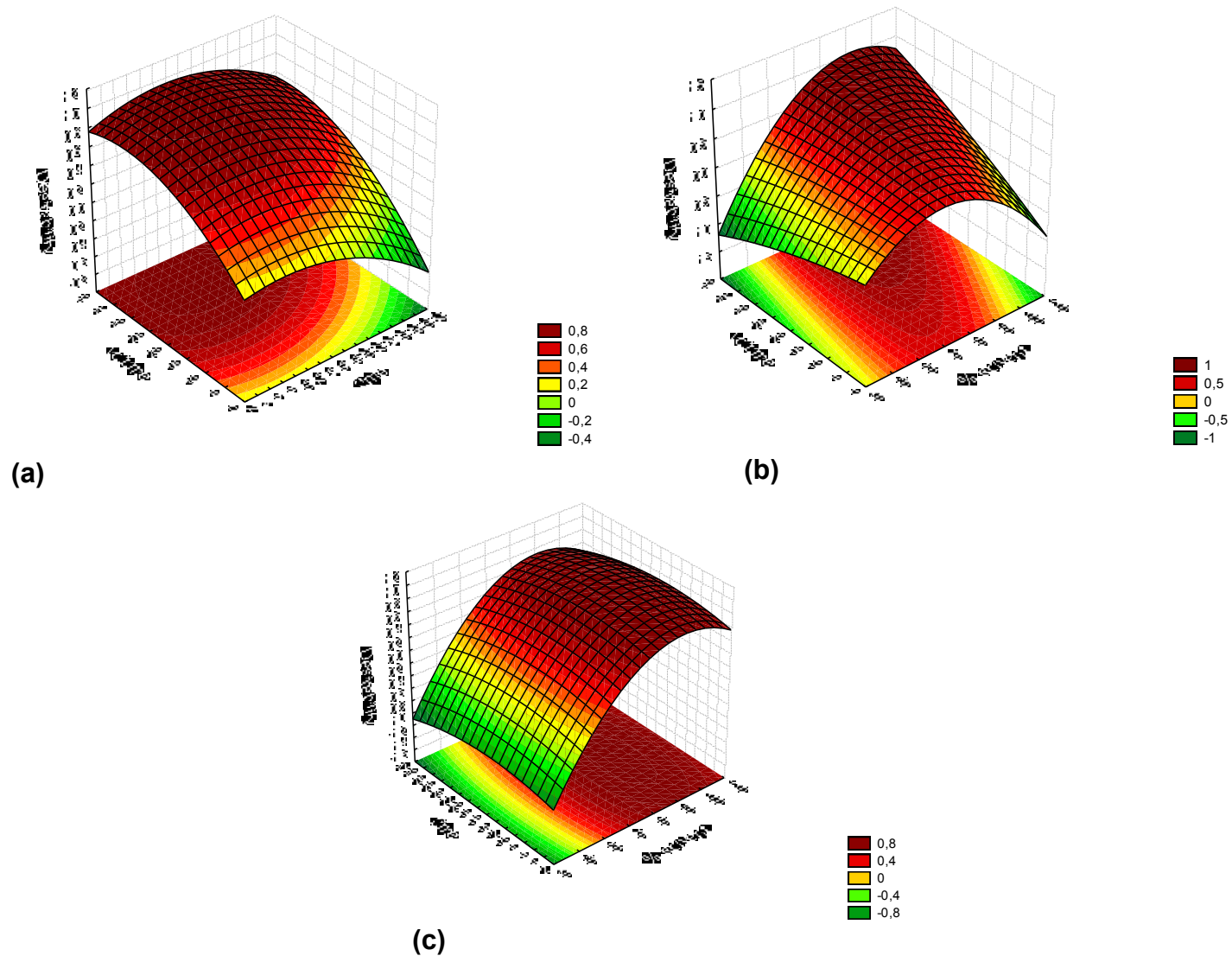


Observamos que foi possível a otimização dos fatores estudados para que a desejabilidade em níveis aceitáveis (maior que 0,8) fosse obtida para todos os HPA estudados, estas condições otimizadas se encontram na Tabela 27.

Tabela 27. Condições otimizadas através da função de desejabilidade global.

Condições Otimizada	
% solvente	85 % n-hexano
tempo	5 minutos
volume	29 mL

Figura 28. Superfície de resposta geradas através dos resultados do PCC (a) volume x tempo (b) % n-hexano x volume (c) % n-hexano x tempo.



4.3.2.2.3. Validação do método multivariado

Após o estabelecimentos das condições ótimas dentro da faixa estudada iniciou-se a validação do método utilizando amostras fortificadas em 11 diferentes níveis de concentração em duplicata que são expostas na tabela 28.

Tabela 28. Concentrações dos HPA nas amostras fortificadas em ng g^{-1} de amostra liofilizada.

HPA	NÍVEIS DE FORTIFICAÇÃO (ng g^{-1})										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Fe	0,96	1,27	1,91	2,54	5,09	7,63	11,5	14,0	15,3	19,1	20,4
Flu	1,20	1,60	2,40	3,20	6,39	9,59	14,4	17,6	19,2	24,0	25,6
Pi	2,39	3,18	4,78	6,37	12,7	19,1	28,7	35,0	38,2	47,8	50,9
BaA	1,20	1,60	2,40	3,19	6,39	9,58	14,4	17,6	19,2	14,0	25,6
Cri	1,21	1,62	2,42	3,23	6,46	9,69	14,5	17,8	19,4	24,2	25,9
BbF	0,46	0,62	0,92	1,23	2,47	3,70	5,55	6,78	7,40	9,25	9,87
BkF	0,48	0,63	0,95	1,26	2,53	3,79	5,69	6,95	7,58	9,48	10,1
BaP	1,23	1,63	2,45	3,27	6,54	9,81	14,7	17,0	19,6	24,5	26,2
DahA	4,84	6,44	9,65	12,7	25,7	38,6	57,9	70,8	77,2	96,5	103
BghiP	1,93	2,56	3,84	5,12	10,2	15,4	23,1	28,2	30,7	38,4	41,0
Ind	1,18	1,57	2,35	3,13	6,27	9,40	14,1	17,2	18,8	23,5	25,1

Os experimentos para a validação consistem em fortificação das amostras previamente pesadas e secas, após o mínimo de 12 horas foram efetuadas as extrações conforme as condições indicadas na Tabela 27.

Para que o método seja validado é necessário a obtenção de 70-120% de recuperação com $\text{CV} < 20\%$ na faixa de trabalho desejada (ANVISA).

Os resultados da validação podem ser observados na Tabela 29 onde estão indicados em vermelho os valores insatisfatórios de recuperação e CV para alguns HPA em determinadas concentrações diminuindo assim a faixa de trabalho porém sem comprometer as análises das amostras estudadas.

Tabela 29. Resultados do estudo de recuperação da alface utilizando o método validado pela análise multivariada.

NÍVEIS DE FORTIFICAÇÃO																							
HPA	1		2		3		4		5		6		7		8		9		10		11		
	REC	CV	REC	CV	REC	CV	REC	CV	REC	CV	REC	CV	REC	CV	REC	CV	REC	CV	REC	CV	REC	CV	
Fe	175	12	-	-	-	1,5	107	7,5	84	2,1	119	1,1	85	1,8	83	4,1	74	0,3	73	2,1	73	1,3	
Flu	-	4,5	53	0,4	102	4,0	-	-	110	1,5	85	4,3	113	2,2	109	1,8	109	0,4	98	11,6	86	1,9	
Pi	114	2,2	39	7,7	92	6,3	109	0,1	99	1,4	91	3,3	83	3,4	84	1,9	76	0,5	79	2,5	79	2,4	
BaA	33	4,0	74	2,2	71	9,2	70	3,1	73	1,2	79	4,2	79	3,6	82	4,3	76	0,1	78	2,2	77	3,1	
Cri	114	4,7	102	3,5	111	3,3	111	5,7	104	1,2	87	5,1	101	2,8	101	6,6	89	0,8	90	4,2	88	0,3	
BbF	-	-	113	1,7	84	3,5	93	12	105	2,5	91	1,0	90	4,5	93	6,2	92	2,3	85	0,4	70	3,5	
BkF	91	2,0	105	6,8	114	8,6	85	11	87	3,5	91	9,6	89	4,2	91	3,3	87	0,4	86	1,4	89	0,6	
BaP	114	5,4	73	3,4	93	9,6	89	1,9	90	1,8	92	9,2	89	3,9	95	4,2	89	0,2	86	2,0	90	2,2	
DahA	104	137	113	0,0	93	6,8	95	3,5	92	3,8	98	10	92	3,4	93	1,5	90	0,6	89	0,6	89	3,7	
BghiP	118	4,4	80	5,0	109	10	119	4,4	89	8,8	76	3,4	75	4,7	78	5,2	71	0,5	73	2,4	72	0,3	
Ind	175	14	53	0,4	110	6,6	105	5,4	92	5,1	97	4,5	90	5,0	96	3,3	89	0,3	90	2,0	82	2,5	

- não foi possível a quantificação.

4.3.3. Comparativo entre os métodos otimizados e validados

Após a otimização das condições e validação dos dois métodos de extração podemos comparar seus valores de limites de detecção e quantificação (Tabela 30) para selecionar qual método seria aplicado nas extrações das amostras de hortaliças coletadas.

Tabela 30. Comparativo entre os fatores otimizados pelo método univariado e multivariado.

FATORES	UNIVARIADO	MULTIVARIADO
Massa (mg)	20	500
Solvente (% n-hexano)	50	85
Volume (mL)	5	29
Número de extração	3	2
Tempo extração (min)	10	5
Tempo de centrifuga (min)	-	1

- não foi estudado

O segundo método otimizado (multivariado) apresentou menores valores de LD e LQ quando comparado ao primeiro método (univariado). A dificuldade observada nos trabalhos publicados em se obter resultados para alguns dos HPA por demonstrarem diversas lacunas onde não foram possíveis a quantificação ou detecção nos mostra a importância de se obter um método com baixos valores de LD e LQ para que as comparações de somatória de HPA (Σ HPA2, Σ HPA4 ou Σ HPA8) não sejam comprometidas ou indevidamente utilizadas. A União Européia estipulou o valor máximo aceitável de LD e LQ 0,3 e 0,9 $\mu\text{g kg}^{-1}$ respectivamente para análise de HPA em alimentos. Os valores obtidos para o segundo método se encontram abaixo dos valores máximos estipulados se mostrando assim apto a ser empregado segundo os critérios da União Européia.

Apesar do método multivariado ter sido otimizado apenas com amostras de uma das matrizes estudadas (alface) optou-se por aplicá-lo na quantificação dos 11 HPA nas três hortaliças propostas no estudo, esta decisão foi baseada no fato de que na primeira fase de estudo da otimização univariada onde estudou-se a couve e a alface não foram observadas diferenças nos resultados destas otimizações nas

diferentes matrizes resultando em um único método de extração para ambas as hortaliças estudadas.

Os limites foram calculados para futuras comparações em relação ao peso úmida que reflete a quantidade de HPA em relação ao peso de hortaliça in natura, modo em que é realmente consumida. Os valores de porcentagem de água para cada hortaliça são alface 96,1%, couve 90,9% e rúcula 94,8% de acordo com a TABELA BRASILEIRA DE COMPOSIÇÃO DE ALIMENTOS, 2011.

Tabela 31. Valores de LD e LQ em ng g^{-1} para os dois métodos otimizados para a alface.

HPA	UNIVARIADO				MULTIVARIADO			
	LD		LQ		LD		LQ	
	p.s.	p.u.	p.s.	p.u.	p.s.	p.u.	p.s.	p.u.
Fe	-	-	-	-	1,2	0,047	2,5	0,099
Flu	-	-	-	-	1,0	0,039	2,4	0,094
Pi	-	-	-	-	0,70	0,027	4,8	0,19
BaA	3,0	0,12	23	0,90	0,21	0,0080	1,6	0,062
Cri	10	0,39	23	0,90	0,74	0,029	1,2	0,047
BbF	2,0	0,080	9,0	0,35	0,42	0,016	0,62	0,024
BkF	1,0	0,040	9,0	0,35	0,030	0,0020	0,48	0,019
BaP	6,0	0,23	23	0,90	0,12	0,0050	1,2	0,048
DahA	24	0,94	90	3,5	0,41	0,016	4,8	0,19
BghiP	10	0,39	36	1,4	0,060	0,0020	1,9	0,075
Ind	4,0	0,16	23	0,90	0,12	0,0050	2,3	0,091

- não foram estudados; p.u. = peso úmido; p.s. = peso seco

4.4. Dados obtidos para as amostras de hortaliças e discussão ambiental

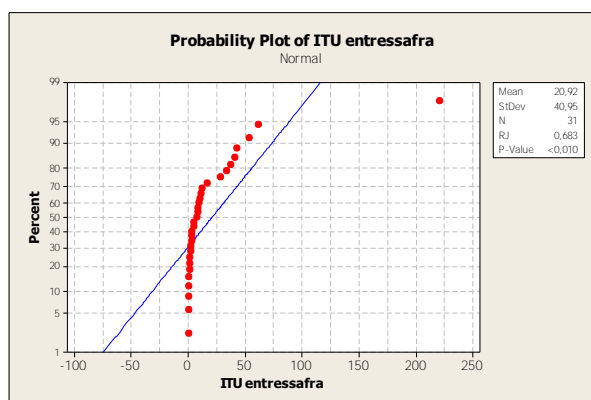
4.4.1. Resultados do teste de normalidade e significância

Inicialmente, verificou-se se a distribuição dos resultados obtidos era normal utilizando-se o teste de Ryan-Joiner, o qual faz uso do teste de hipóteses. Construiu-se um gráfico de probabilidade normal, que por simples inspeção pode-se visualizar se os dados plotados formam uma linha reta caso a amostra possua uma distribuição normal. Caso contrário, o gráfico apresentaria algum grau de curvatura

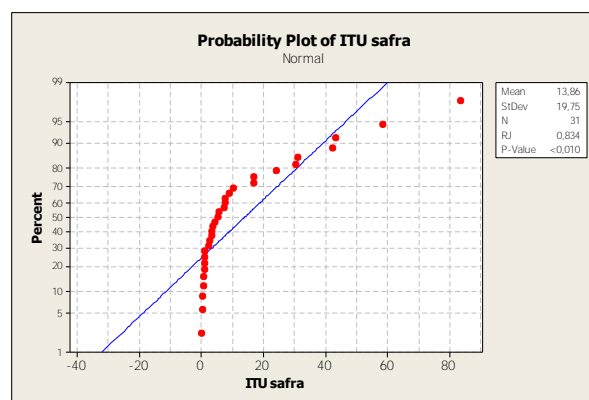
ou distribuição aleatória de dados, sendo os mesmos provenientes de outra distribuição de probabilidade. Podemos também observar o valor de p , valores maiores que 0,05 indicam uma distribuição normal, se não a distribuição é considerada não normal. A estatística do teste é o coeficiente de correlação de Ryan-Joiner (RJ).

Rejeita-se a hipótese nula quando os coeficientes RJ são inferiores aos valores críticos estabelecidos ($p < 0,05$). Observando-se os gráficos da Figura 29, nota-se que todos apresentaram aleatoriedade nos pontos, coeficientes RJ menores que 0,90 e valor de $p < 0,05$ indicando assim que as amostras não seguem uma distribuição normal.

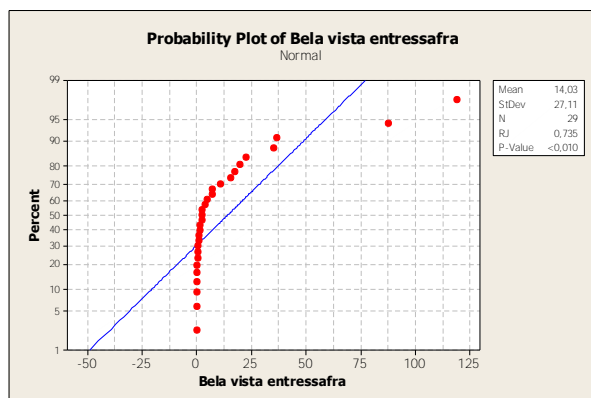
Figura 29. Gráficos de distribuição de Ryan-Joner para todas as amostras nos três pontos de coleta nas duas épocas amostradas: **(a)** ITU entressafra; **(b)** ITU safra; **(c)** BELA VISTA entressafra; **(d)** BELA VISTA safra; **(e)** QUITANDINHA entressafra; **(f)** QUITANDINHA safra



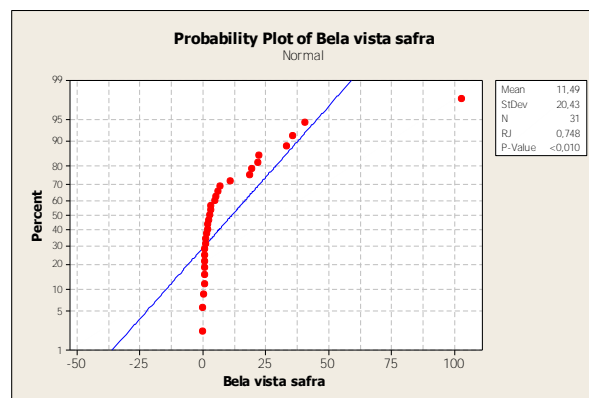
(a)



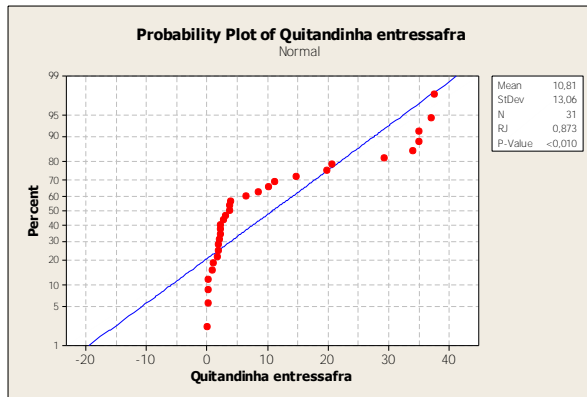
(b)



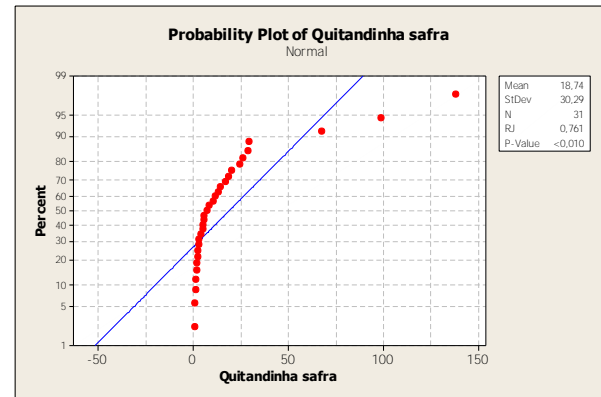
(c)



(d)



(e)



(f)

Para verificar se há diferenças significativas entre as amostras estudadas utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis que é um método não-paramétrico usado para testar três ou mais amostras. Quando o teste de Kruskal-Wallis conduz a resultados significativos, então pelo menos uma das amostras é diferente das demais.

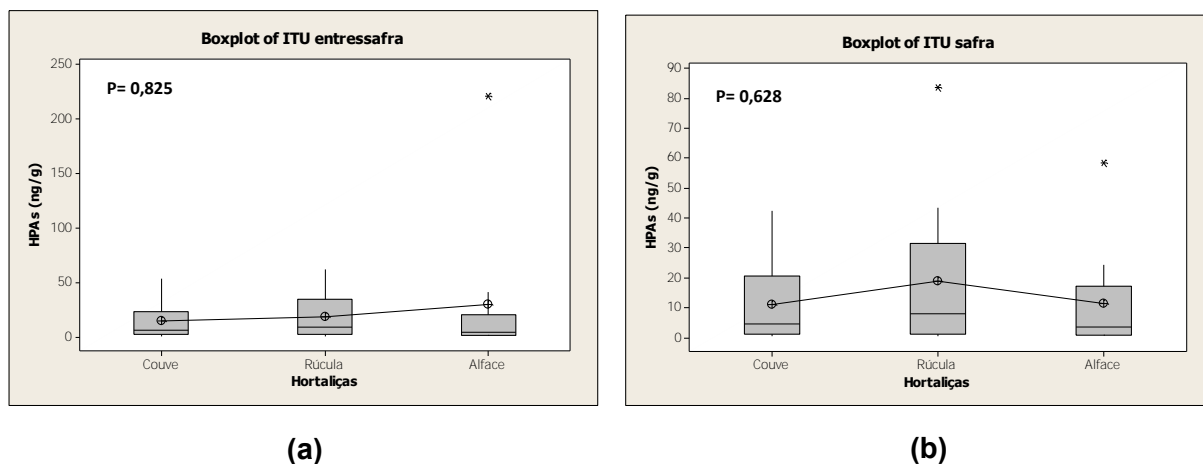
No gráfico de caixas ou boxplot pode-se observar a mediana dos valores obtidos, como sendo a linha central dentro das caixas, os limites da caixa superiores (Q3) e inferiores (Q1) são valores que representam 75% e 25% das observações abaixo dele, respectivamente. O círculo dentro de cada caixa é referente a média das medidas. A linha vertical acima e abaixo das caixas marcam os valores mínimo e máximo obtidos dentro dos valores considerados típicos, ou seja, corresponde a faixa de concentrações considerada dentro do aceitável sem levar em conta os valores discrepantes. Podemos também observar os valores discrepantes (*outliers*) representados por (*).

Nos gráficos de boxplot para todos os pontos nas duas épocas pode-se verificar visualmente que não há diferenças significativas nas amostras estudadas já que apesar das variações das concentrações das amostras serem diferentes os intervalos se encontram em faixas de concentração próximas, sendo os valores mínimos observados iguais ou semelhantes e os máximos observados diferentes entre as amostras. Para o intervalo das concentrações de cada amostra também podemos observar o valor de “*p*” onde os valores abaixo que 0,05 indicam que há diferença significativa das amostras e valores acima indicam que não há esta diferença.

Nas amostras de Itu pode-se observar (Figura 30), a existência de valores discrepantes acima do intervalo considerado para as amostras de alface nas duas

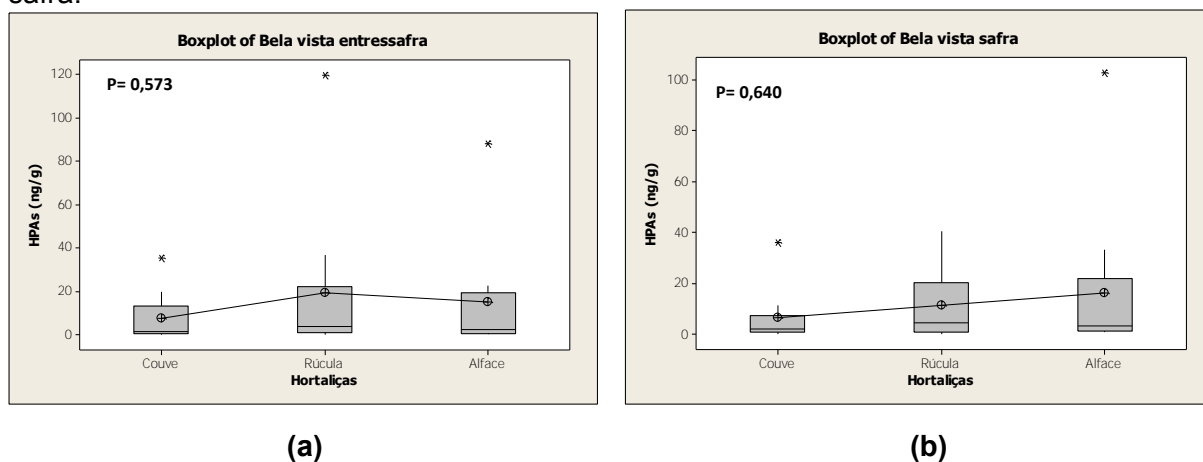
épocas e para a rúcula na safra. Para todas as amostras de Itu observou-se que há maior variação de concentração acima da mediana do que abaixo da mesma onde os valores possuem menores variações.

Figura 30. Gráficos Boxplot para amostras de Itu: (a) entressafra; (b) safra.



Para as amostras de Araraquara-Bela Vista(Figura 31) observou-se a existência de valores discrepantes acima do intervalo considerado típico para as amostras de alface e couve, nas duas épocas, e para a rúcula na entressafra. Assim como nas amostras de Itu pode-se observar a maior variação de concentração acima da mediana.

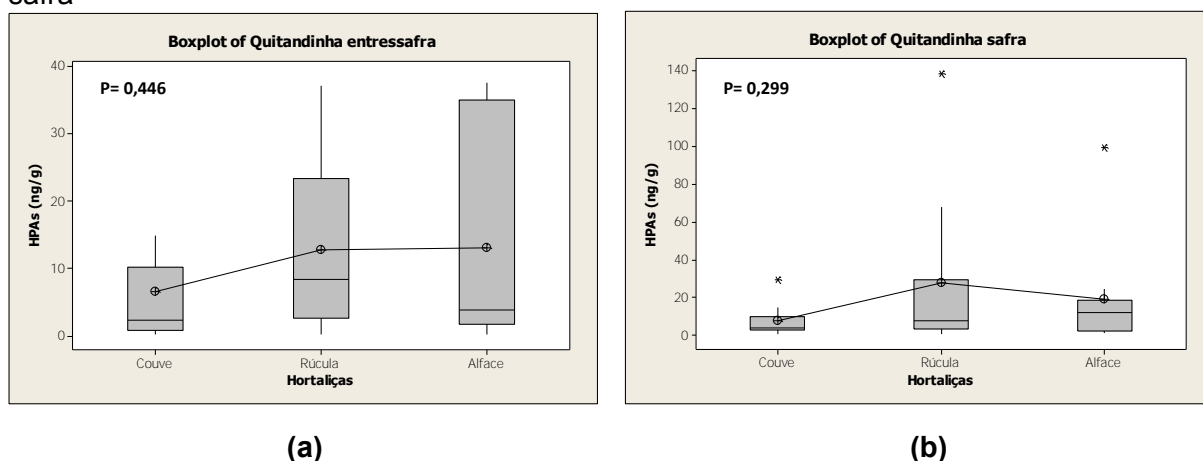
Figura 31. Gráficos Boxplot para amostras de Araraquara-Quitandinha: (a) entressafra; (b) safra.



Para as amostras de Araraquara-Quitandinha (Figura 32), nota-se a existência de valores discrepantes acima do intervalo considerado típico para as

amostras de couve e alface nas duas épocas e para a rúcula na entressafra. Assim como nas amostras anteriores observou-se maior variação de concentração acima da mediana com exceção da alface na safra que apresenta a mediana levemente deslocada para a metade superior.

Figura 32. Gráficos Boxplot para amostras de Araraquara-Bela Vista: **(a)** entressafra; **(b)** safra



4.4.2. Comparações Ambientais: HPA em folhas

Para que fosse possível uma comparação entre os resultados obtidos neste estudo, com os reportados na literatura, seria necessário que neste trabalho fossem abordados os 16 HPA considerados prioritários pela agência de proteção ambiental americana (USA EPA) (EPA, 1999), porém como este estudo abordou apenas 11 dos 16 HPA optamos por discutir as concentrações encontradas na literatura em folhas de diversos tipos quando somados os mesmos 11 HPA que aqui foram estudados, apenas para inferir sobre a exposição ambiental nas cidades de Araraquara e Itu nas duas épocas estudadas.

Alguns estudos de concentração não detalham como o processo de extração foi efetuado, assim como se houve ou não a lavagem das amostras antes das extrações. Desta maneira, assumiu-se que não houve lavagem das amostras nos estudos em que esta parte não está descrita explicitamente.

Na literatura são escassos os estudos que abordam a determinação de HPA em hortaliças de consumo humano, por isso aqui a comparação dos dados obtidos será efetuada com estudos em outro tipo de material vegetal.

DE NICOLA et al. (2005) determinaram HPA em folhas de carvalho, sendo que as amostras foram coletadas a cada 4 meses, durante um ano. As concentrações (soma dos 11HPA estudados, que será denominado como sendo Σ HPA11) encontradas em amostras da região central de Napoles (Itália) apresentaram concentrações de Σ HPA11 variando entre 1086 e 2372 ng g⁻¹ (p.s., sem lavagem prévia). Para as amostras controle, coletadas no Parque Nacional do Vesúvio (Napoles-Itália) as concentrações situaram-se entre 91 e 189 ng g⁻¹ (p.s., sem lavagem prévia). A maior concentração de HPA nesta dissertação foi obtida para amostra da época da safra de cana-de-açúcar em Araraquara, 320 ng g⁻¹ e houve uma variação entre 7 e 320 ng g⁻¹ (p.s., com lavagem prévia) quando consideramos todos os resultados obtidos neste estudo (Tabela 32). Assim sendo, estes valores podem ser considerados baixos, uma vez que são da mesma ordem de grandeza dos encontrados para amostras controle do estudo efetuado por NICOLA et al. (2005).

Segundo TERZAGHI et al. (2013) as partículas sobre as folhas que podem ser removidas com simples lavagem em água corrente podem corresponder em até 50% do total de partículas encontradas na folha. Desta maneira, estas concentrações encontradas nos vegetais cultivados na cidade de Araraquara poderiam ser bem maiores que as encontradas neste estudo podendo se chegar a 100% a mais dos valores calculados, atingindo valores de concentração próximos aos obtidos em amostras coletadas em regiões centrais descritos por NICOLA, et al. (2005). Caso o intuito do estudo fosse a exposição ambiental, sem levar em conta a via alimentar, estas amostras poderiam ter sido tratadas sem lavagem prévia que simula atividade de consumo pela via alimentar.

Na Tabela 32 são apresentados os resultados obtidos na determinação de HPA em hortaliças, neste trabalho sabendo que as amostras não seguem uma distribuição normal levou-se em consideração as medianas e os intervalos de concentração obtidos nas análises.

Tabela 32. Medianas e intervalo das concentrações individuais dos HPA, Σ HPA8 e Σ HPA11 em hortaliças nos municípios de Itu e Araraquara, em duas épocas, concentrações em ng g^{-1} p.s. e *p.u.

ITU												
COUVE n=9				RÚCULA n=9				ALFACE n=9				
Mar/2013		Ago/2012		Mar/2013		Ago/2012		Mar/2013		Ago/2012		
Mediana	Intervalo	Mediana	Intervalo	Mediana	Intervalo	Mediana	Intervalo	Mediana	Intervalo	Mediana	Intervalo	
Fen	15	14-22	31	28-33	36	30-36	43	41-46	39	31-48	24	17-32
Flu	49	12-100	41	39-47	58	52-81	78	74-107	210	25-249	59	36-68
Pi	nq	-	10	10-11	10	9-10	31	31-32	11	10-11	17	15-18
BaA	4	3,7-3,7	nq	-	nq	-	nq	-	2	3-5	3	3-4
Cri	3	2-4	4	4-5	9	8-10	9	9-9,3	14	11-14	7	7-9
BbF	3	3-4	1	1-1,5	5	5-6	4	3-4	6	4-6	2	2-3
BkF	0,5	0,5-0,6	nq	-	0,7	0,6-0,8	1	0,5-1	1,2	1-2	0,7	0,6-0,8
BaP	10/0,93*	9-14	4/0,4*	4-4,5	12/0,62*	11-13	8/0,4*	6-9	nq	-	nq	-
DahA	59	54-70	nq	-	23	12-58	nq	-	nq	-	nq	-
BghiP	9	7-11	5	4-8	38	29-45	17	15-18	5	4-5	6	5-8
Ind	n.d	-	nq	-	nd	-	nq	-	nq	-	nq	-
Σ HPA8	89/8,1*		14/1,3*		124/6,51*		39/2,4*		28/1,1*		19/0,75*	
Σ HPA11	153/14,7*		96/8,7*		228/12,4*		191/10,6*		288/11,2*		120/4,72*	

Continuação tabela 32

ARARAQUARA_BELA VISTA (PONTO B)												
	COUVE n=9				RÚCULA n=9				ALFACE n=9			
	Mar/2013		Ago/2012		Mar/2013		Ago/2012		Mar/2013		Ago/2012	
	Mediana	Intervalo	Mediana	Intervalo	Mediana	Intervalo	Mediana	Intervalo	Mediana	Intervalo	Mediana	Intervalo
Fen	19	19-21	11	10-13	18	13-21	19	18-20	20	20-26	31	26-42
Flu	36	28-42	36	35-37	153	35-171	41	40-42	66	66-121	78	59-172
Pi	11	10,5-11	nq	-	nq	-	nq	-	15	15-17	22	20-24
BaA	0,7	0,7-1	nq	-	nq	-	nq	-	3	3-4	5	4-58
Cri	1,5	1-2	nq	-	3	3-3,5	3	3-4	2	1-3	7	6-8
BbF	0,5	0,4-0,5	1	0,9-0,9	3	2-3	5	5-6	1,4	1,4-1,6	3	3-3,5
BkF	0,2	0,1-0,2	nq	-	nq	-	nq	-	0,5	0,5-0,5	0,7	0,6-0,7
BaP	1/0,1*	0,9-1	6/0,5*	6-7	7/0,4*	6-8	20/1,3*	19-20	nq	-	4/0,2*	3-4
DahA	nq	-	nq	-	nd	-	nd	-	nq	-	nq	-
BghiP	7	6,5-8	nq	-	44	30-44	22	22-23	nq	-	nq	-
Ind	nd	-	nd	-	nd	-	nd	-	nd	-	nq	-
ΣHPA8	10,9/1,00*		7//0,6*		57/3,0*		50/2,6		7/0,3*		20/0,80*	
ΣHPA11	76,9/7,11*		54/4,9*		228		110		108/4,20*		151//5,90*	

Continuação tabela 32

ARARAQUARA_QUITANDINHA (PONTO A)												
	COUVE n=9				RÚCULA n=9				ALFACE n=9			
	Mar/2013		Ago/2012		Mar/2013		Ago/2012		Mar/2013		Ago/2012	
	Mediana	Intervalo	Mediana	Intervalo	Mediana	Intervalo	Mediana	Intervalo	Mediana	Intervalo	Mediana	Intervalo
Fen	15	14-15	15	13-16	20	19-21	25	23-34	29	26-41	22	22-28
Flu	26	14-44	36	34-48	35	27-39	65	46-93	43	23-45	121	36-125
Pi	nq	-	nq	-	nq	-	nq	-	23	15-24	19	18-19
BaA	30	2,6-3,1	3	2-3	3	2,6-3	3	2-3	4	3-4	13	12-14
Cri	2,4	2,3-3	5	5-6	2	2-2,4	5	5-8	4	2-5	12	5-12
BbF	1	0,9-1,4	2,4	2,4-2,7	3	3-3,4	7	7-8	2	1,5-2	9	8-9
BkF	nq	-	0,7	0,6-0,7	nq	-	1	0,7-1	nq	-	1,4	1,3-1,4
BaP	2,3/0,20*	2-3	5/0,5*	5-6	10/0,50*	10-11	21/1,1*	18-22	nq	-	17/0,70*	14-19
DahA	nq	-	nq	-	15	15-16	165	45-178	nq	-	nq	-
BghiP	2	2-2,5	nq	-	38	35-38	28	27-34	nq	-	11	8-12
Ind	nd	-	nd	-	nd	-	nq	-	nd	-	nq	-
Σ HPA8	12/1,1*		16/1,5*		81/4,2*		230/12,0*		10/0,40*		63/2,5*	
Σ HPA11	52/4,7*		67/6,1*		136/7,10*		320/16,6*		105/4,10*		225/8,80*	

 Σ HPA8: soma das concentrações de BaA, Cri, BbF, BkF, BaP, DahA, BghiP e Ind.

nd: não detectável

 Σ HPA11: soma das concentrações de Fe, Pi, Flu, BaA, Cri, BbF, BkF, BaP, DahA, BghiP e Ind

nq: não quantificável

Na tabela 33 podemos observar semelhanças nos valores de concentração reportadas na literatura e as encontradas nas amostras deste estudo, podendo citar as concentrações observadas na Estados Unidos em área rural e urbana (27- e 220 ng g⁻¹ p.s.) e Grécia para diferentes espécies em área urbana (25-294 ng g⁻¹ p.s.) estes valores são comparáveis as concentrações encontradas em Araraquara no Quitandinha (52-320 ng g⁻¹ p.s.) e no Bela Vista (54-228 ng g⁻¹ p.s.) duas áreas distintas, a primeira urbana e a segunda rural e em Itu na área urbana (96-288 ng g⁻¹).

Alguns valores reportados neste estudo estão bem abaixo dos observados na literatura como por exemplo na Espanha em área urbana 2-4 ng g⁻¹ p.s. e no Reino Unido 4-72 ng g⁻¹ p.s. também em área urbana.

Os valores de soma de 11 HPA encontrados nas amostras estudadas são comparáveis e algumas vezes superiores as concentrações encontradas em folhas de diversas espécies em vários países, mesmo a quantidade de HPA somados nestes estudos serem superiores, de 16 a 23 HPA mostrando que a concentração de HPA em hortaliças apresenta números elevados se levarmos em conta o número reduzido de HPA estudados e a lavagem prévia efetuada.

Tabela 33. Concentrações encontradas para amostras de diversas espécies de folhas em diferentes países e nas hortaliças neste estudo.

País/Cidade	Espécie	Área	HPA estudados	Valores ng g ⁻¹ p.s.
Grécia/Salonica	<i>Allium porrum</i>	urbana	17	72,0-116
	<i>Brassica oleracea</i>			25,0-108
	<i>Chichorium endivia</i>			112-239
	<i>Daucus carota</i>			48,0-94,0
	<i>Lactuca sativa</i>			40,0-294
China/Província de Guangdong	<i>Brassica oleacera</i>	urbana	16	450
	<i>Colocasia suculenta</i>			199
	<i>Daucus carota</i>			412
	<i>Raphanus sativus</i>			264
Reino Unido	<i>Corylus avellana</i>	urbana	23	72,0±9,00
	<i>Quercus robur</i>			41,0±4,00
Inglaterra	<i>Festuca ovina</i>	rural	16	136-510
EUA	<i>Accer sacarum</i>	rural	18	220±52,0
	<i>Zea mays</i>	rural+urbano		27,0±2,00

Continuação tabela 33

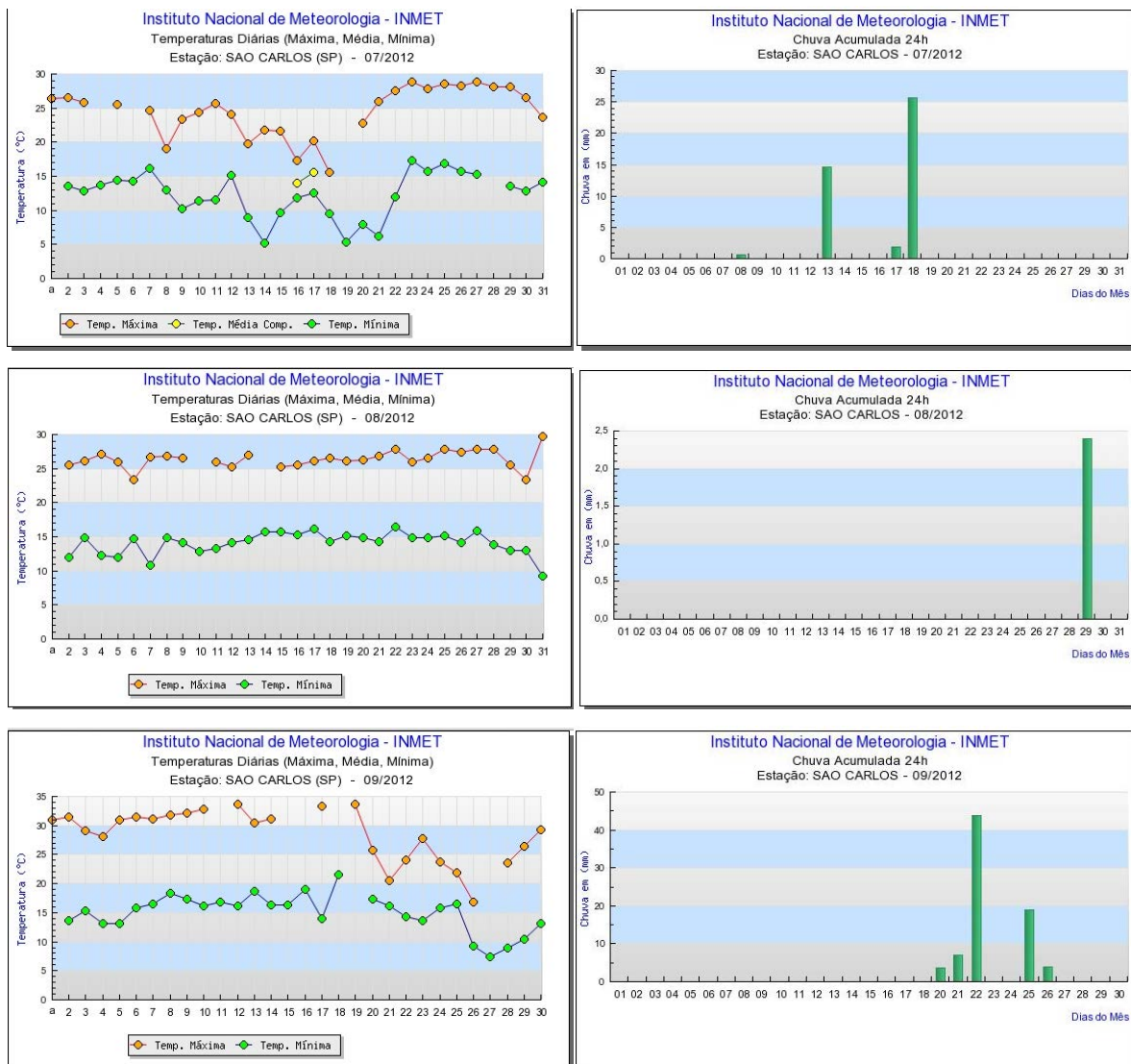
País/Cidade	Espécie	Área	HPA estudados	Valores ng g⁻¹ p.s.	
Espanha/Galícia	<i>Brassica oleracea</i>	urbana	11	4,00	
	<i>Zea mays</i>			2,00	
RESULTADOS DESTE ESTUDO				Ago/2012	Mar/2013
Araraquara - Quitandinha	<i>couve</i>	urbana	11	67,0	52,0
	<i>alface</i>			225	136
	<i>rúcula</i>			320	105
Araraquara - Bela Vista	<i>couve</i>	rural	11	54,0	77,0
	<i>alface</i>			151	108
	<i>rúcula</i>			110	228
Itu	<i>couve</i>	urbana	11	96,0	153
	<i>alface</i>			120	288
	<i>rúcula</i>			191	228

Fonte: DESALME, BINET e CHIAPUSIA, 2013

Os altos valores de concentração de HPA encontrados podem ser explicados pelas condições climáticas da região no período referente de exposição das hortaliças estudadas. Segundo dados fornecidos para a cidade de São Carlos, na época correspondente ao período de crescimento das hortaliças colhidas da época da safra, as temperaturas diárias se encontraram na faixa de 25-30°C em quase todo o período com poucas precipitações (Figura 33).

Os HPA de menores massas moleculares são mais voláteis e em altas temperaturas as concentrações destes na fase vapor é aumentada, em adição os baixos níveis pluviométricos contribuem para o aumento de partículas finas na atmosfera aumentando assim a quantidade de material particulado que contenha os HPA em contato com as folhas.

Figura 33. Dados do INMET para a região de Araraquara na época da safra da cana-de-açúcar (meses julho, agosto e setembro), temperaturas e níveis pluviométricos diários registrados.



Fonte: INMET

As discussões seriam mais significativas se obtivéssemos estes mesmos dados de temperatura e precipitação para a cidade de Araraquara em pontos próximos dos pontos de coleta pois sabemos que São Carlos é uma cidade que apesar da proximidade possui temperaturas menores quando comparadas a cidade de Araraquara para o mesmo período.

4.4.3. HPA em alface

Segundo a União Europeia os valores de concentração apenas do BaP não são suficientes para informar sobre os possíveis riscos de consumo dos alimentos que contém HPA, uma vez que outros HPA também considerados carcinogênicos se mostraram presentes em amostras que não continham o BaP. Para isso podemos utilizar a somatória das concentrações de 8 HPA, dentre os quais sete são considerados carcinogênicos (BaA, Cri, BbF, BkF, BaP, Ind e DahA) somado o BghiP.

Os valores de concentrações para Σ HPA8 encontrados para a alface (0,3-2,5 ng g⁻¹ p.u. ou 7-63 ng g⁻¹ p.s.) são comparáveis aos valores reportados por CAMARGO em amostras cultivadas próximas a rodovia e em áreas rurais 4,09 e 0,87 ng g⁻¹ p.u. respectivamente, porém bem abaixo do valor encontrado por WANG et al., 2010 (168,8 ng g⁻¹ p.s.) em amostras irrigadas com água residual e acima do valor reportado por MARTORELL et al., 2010 de 0,19 ng g⁻¹ p.u em amostras comerciais adquiridas em diversas cidade da Espanha.

O maior valor encontrado para Σ HPA8 foi em amostra proveniente da cidade de Araraquara_Quitandinha na época da safra 63 ng g⁻¹ p.s (2,5 ng g⁻¹ p.u.) e o menor valor 7 ng g⁻¹ p.s (0,3 ng g⁻¹ p.u.) em amostra de Araraquara_Bela Vista da época da entressafra.

No geral as amostras que apresentaram maiores valores foram a rúcula em Araraquara-Quitandinha-Safra (230 ng g⁻¹ p.s ou 12 ng g⁻¹ p.u.), seguida da couve cultivada em Itu na entressafra (89 ng g⁻¹ p.s ou 8 ng g⁻¹ p.u.) e a alface cultivada Araraquara-Quitandinha na época da safra (63 ng g⁻¹ p.s ou 2,5 ng g⁻¹ p.u.). Podemos observar que os maiores valores em Araraquara foram obtidos em amostras na época da safra, em Itu esta tendência não se manteve, sendo a couve cultivada na entressafra a amostra que obteve maior concentração.

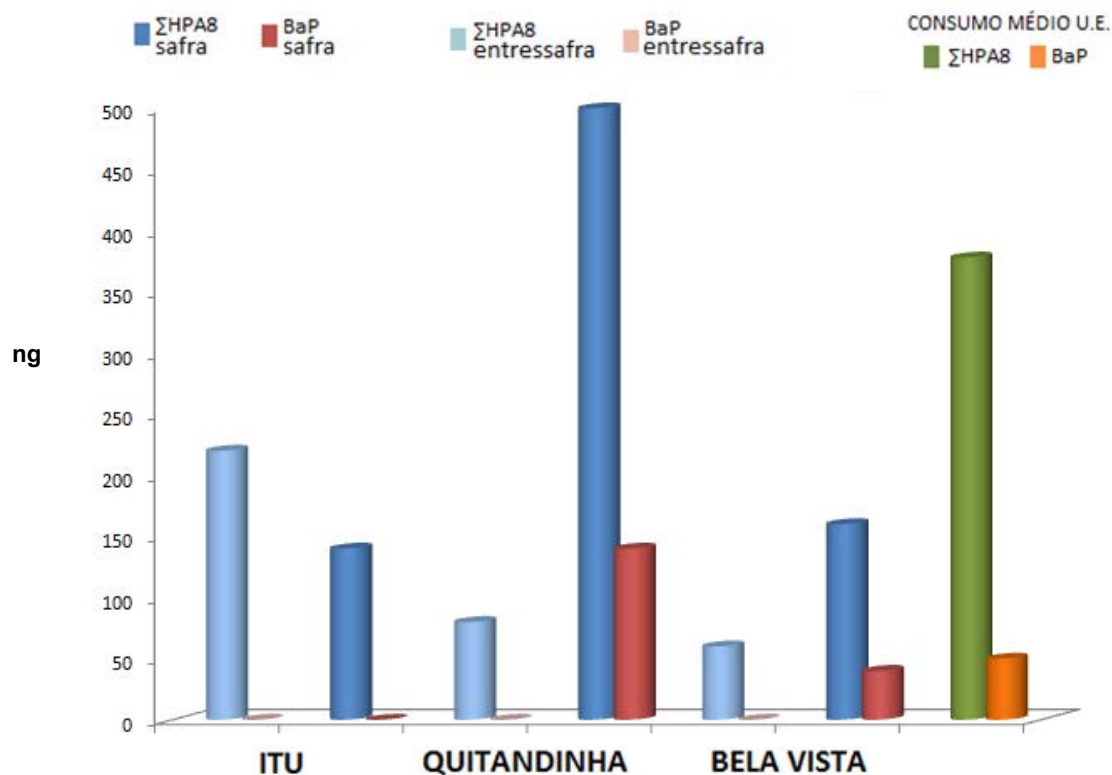
Sabendo que não há legislação específica para os vegetais no monitoramento das concentração dos HPA em alimentos optamos por utilizar os dados reportados pela União Europeia onde foram analisadas a dieta desta população, os alimentos que mais contribuem para a ingestão de HPA e a porcentagem de contribuição na absorção total para cada tipo de alimento especificado.

Dados sobre uma dieta de média exposição foram calculados neste estudo da União Europeia onde o consumo total de Σ HPA8 28,8 ng kg⁻¹ de peso corporal

por dia, ou seja uma pessoa de média exposição pesando 80 quilos consome por dia 2304 ng de Σ HPA8 dentre os quais 312 ng são referentes a ingestão de BaP, apenas pela via alimentar. Desta quantidade estima-se que 16% seja proveniente apenas da ingestão de vegetais+castanhas, 17% de cereais e produtos relacionados e 18,3% provenientes de frutos do mar. Apesar dos valores de porcentagem de contribuição dos alimentos citados serem próximos, apenas os dois últimos itens são considerados preocupantes pela U.E. e destes apenas os frutos do mar são legislados, estabelecendo valores máximos para peixes defumados ($5,0 \mu\text{g kg}^{-1}$), peixe fresco ($20 \mu\text{g kg}^{-1}$) e moluscos bivalentes ($10 \mu\text{g kg}^{-1}$).

Com base nestas informações calculou-se o consumo de 200g (metade do recomendadas pela OMS para consumo diário de vegetais) de alface cultivada nos três pontos de coleta nas duas épocas (safra e entressafra) e efetuou-se uma comparação com estes valores obtidos de BaP e de Σ HPA8 e os valores preconizadas pela União Européia para uma dieta de média exposição de castanhas+vegetais levando-se em conta uma pessoa de 80 quilos de peso corporal (Figura 34).

Figura 34. Comparativo entre as quantidades de BaP e Σ HPA8 para 200 g de alface e as quantidades reportadas na literatura para uma dieta de média exposição.



Pelo gráfico podemos verificar que a amostra de alface cultivada em Araraquara no Quitandinha na época da safra ultrapassa os valores de ingestão estimada pela União Europeia na população de média exposição comparando-se o consumo de vegetais+castanhas, demonstrando grande concentração de HPA neste tipo de hortaliça e inferindo que a exposição destes alimentos cultivados na cidade pode contribuir significativamente no aumento da ingestão diária de HPA. A amostra cultivada no Quitandinha na época da safra mostra elevada concentração de BaP, chegando a níveis duas vezes maiores que o valor apontado pela UE para uma dieta de média exposição. Devemos lembrar que os valores de quantidades de HPA nas hortaliças estudadas foram comparados com valores de SOMA de vegetais+castanhas fornecidos por estudos da UE. Sabendo que as castanhas são frutas oleaginosas, conseqüentemente possuem grande afinidade aos HPA e que muitas passam por processos de aquecimento devemos esperar que na soma estes alimentos contribuam em grande parte nos valores reportados de consumo médio diário nos mostrando que os vegetais são alimentos com grande potencial no aumento da absorção de HPA pela via alimentar.

4.4.4. Limites de Σ HPA8 e BaP em vegetais

O MOE (margin of exposure) é uma ferramenta usada por avaliadores de risco que consideram possíveis problemas de segurança alimentar decorrentes a presença de substâncias que sejam genotóxicas e carcinogênicas. O Comitê Científico da EFSA indicou que o MOE pode ser útil na avaliação da segurança de todas as impurezas genotóxicas e carcinogênicas presentes em níveis muito baixos em alimentos (EFSA, 2012). O uso do MOE pode, desta forma, ajudar a apoiar na definição de possíveis ações necessárias para manter a exposição a estas substâncias tão baixas quanto possível.

Os valores calculados de MOEs para dietas de média e alta exposição estimados foram efetuados considerando a ingestão total de HPA incluindo todos os alimentos identificados como contribuintes para esta ingestão. Os valores de MOE passam a ser preocupantes quando atingem valores menores que 10 000.

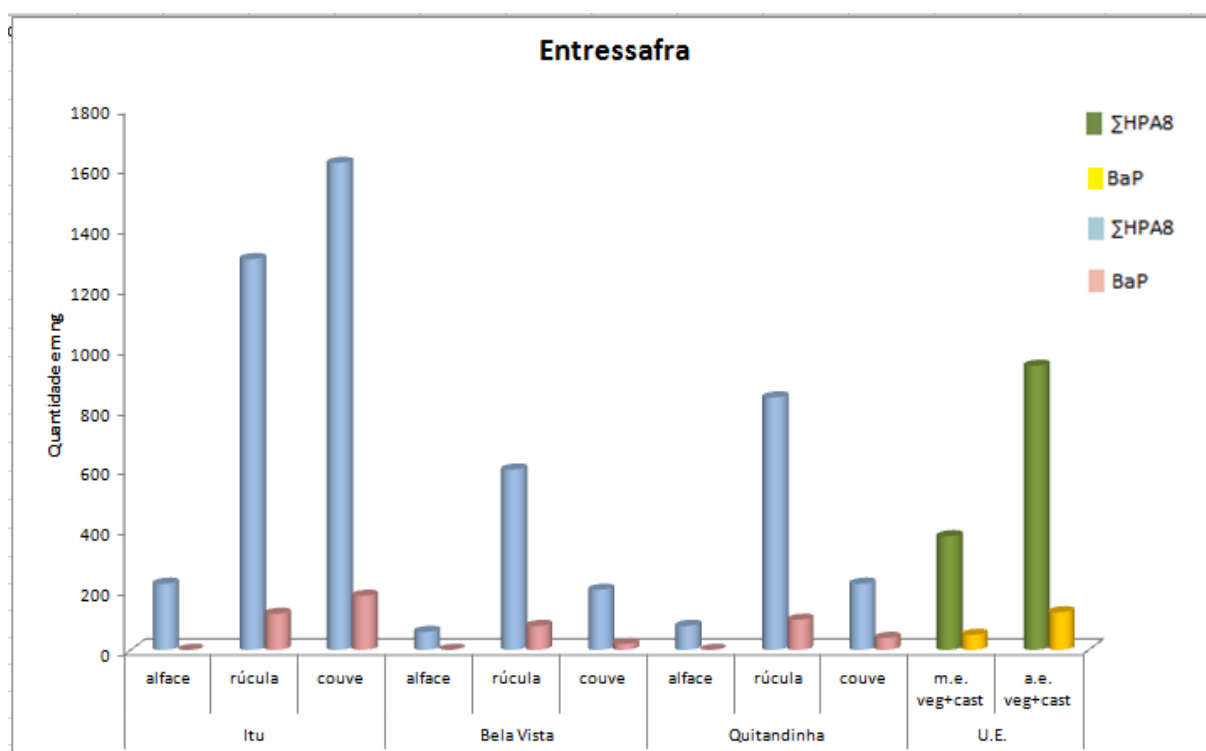
A UE afirma que a dieta de média exposição indica pouca preocupação a saúde, já que os valores de MOE estimados permaneceram em torno de 16000, em

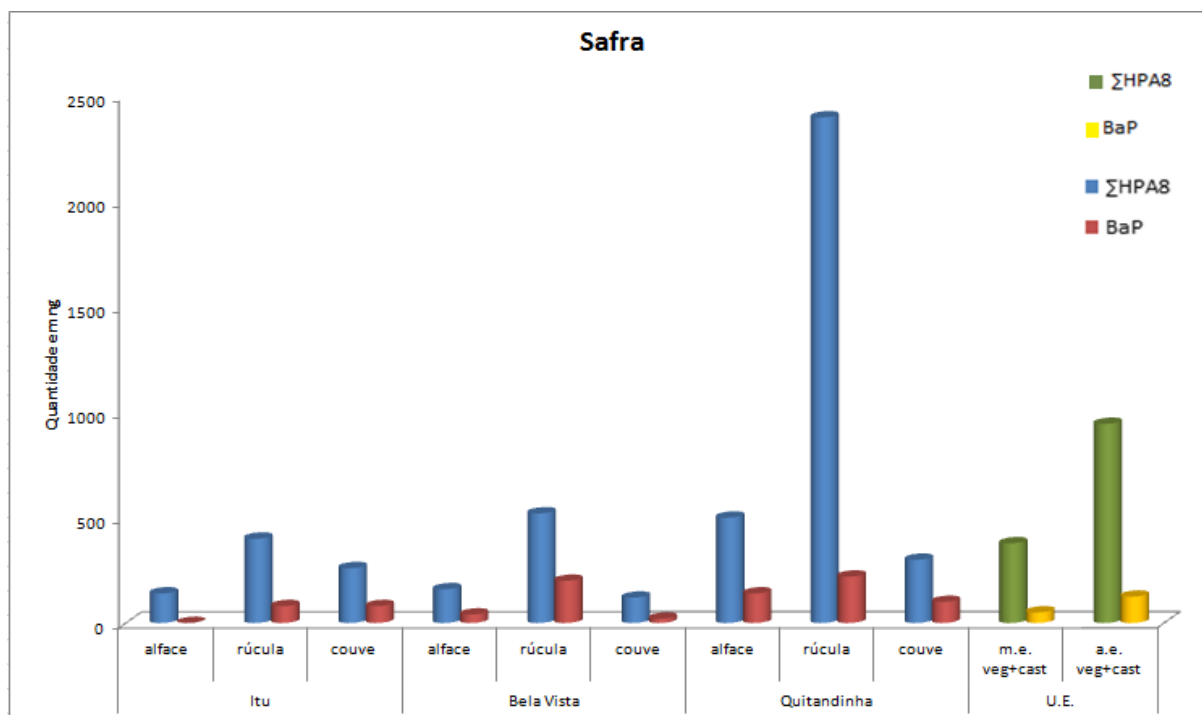
contrapartida uma dieta de alta exposição indica números preocupantes para a saúde do homem já que o valor de MOE se mostrou próximo ao limite mínimo estipulado chegando aos valores de 10800 e 9600, sendo respectivamente referentes ao BaP e Σ HPA8 (EFSA, 2008).

Sabendo-se que o consumo em uma dieta de alta exposição estimado é cerca de 2,5 vezes maior que as concentrações estabelecidas para a dieta de média exposição estimada (EFSA, 2008). Da mesma forma efetuada anteriormente, podemos calcular os valores de ingestão para uma pessoa de 80 quilos com alta exposição aos HPA, obtendo assim valores de ingestão de BaP 125 ng e de Σ HPA8 945 ng, obtidos apenas através da ingestão de vegetais+castanhas que correspondem a 16,4% do total ingerido.

Com estes valores pode-se comparar as quantidades reportadas de ingestão de HPA, supondo a ingestão de 200 g das hortaliças estudadas (metade do recomendado pela OMS), com os valores referentes a dietas de alta e média exposição estimada. Este comparativo pode ser visto na figura 35.

Figura 35. Comparativo de quantidades de HPA (Σ HPA8), ingeridas em 200 g de vegetais, nos locais e épocas inseridos neste trabalho com a estimativa de ingestão da União Européia, considerando vegetais + castanhas.





m.e.: média exposição;
a.e.: alta exposição

veg+cast: vegetais+castanhas;
U.E.: União Européia

Nota-se que a estimativa de média ingestão de HPA é ultrapassada em amostras coletadas nas duas campanhas de amostragem, tanto de Itu quanto de Araraquara. No período da entressafra as amostras de rúcula cultivadas nos três pontos de coleta, e couve cultivada em Itu apresentaram quantidades superiores ao estimado para uma dieta de média exposição, tanto para a Σ HPA8 quanto para o BaP. Na época da safra as amostras que ultrapassaram estes valores foram, rúcula dos três pontos de coleta, e alface cultivada no Quitandinha em Araraquara.

Para as duas épocas, quando comparamos as concentrações estimadas para a dieta de alta exposição, observa-se que existem amostras no limite e acima destes valores. Na entressafra a couve cultivada em Itu ultrapassa em 40% o limite estimado de Σ HPA8 e em 20% o limite estimado de BaP, enquanto a rúcula atinge níveis limite tanto para a Σ HPA8 quanto para o BaP. Na época da safra somente a rúcula cultivada em Araraquara-Quitandinha ultrapassa estes níveis tanto de Σ HPA8 quanto para o BaP, porém estes valores apresentam concentrações 2,5 maiores que o estimado na dieta de alta exposição para a Σ HPA8 e quase 2 vezes maior para o BaP.

Ao compararmos as hortaliças estudadas e a porcentagem de ingestão de Σ HPA8 e BaP levando se em conta o total de ingestão na dieta de máxima

exposição, atingiu-se valores máximos de 58% e 42% referentes a rúcula cultivada na entressafra em Araraquara_Quitandinha, em contrapartida amostras cultivadas no mesmo local na época da entressafra, a couve mostrou concentrações de 5% e 8% para o Σ HPA8 e BaP respectivamente, bem abaixo dos 16% estimada de contribuição dos vegetais+castanhas.

Devemos salientar que os hábitos alimentares são diferentes dependendo do país e cultura, assim influenciando diretamente na contribuição de diferentes alimentos na ingestão de HPA. Os valores fornecidos pela U.E. com certeza serão diferentes para o Brasil. Considerando-se o alto consumo das hortaliças estudadas, principalmente a alface, pelo seu baixo custo em contraponto com o baixo consumo de castanhas, que no Brasil além do alto custo não são habitualmente utilizadas na alimentação, pode-se inferir que o peso da contribuição das hortaliças para o consumo de HPA seja superior ao preconizado pela U.E. Adicionalmente, na estimativa da U.E. os peixes e derivados tem contribuição importante, enquanto que no Brasil sendo o consumo de peixe mais acanhado, em detrimento da carne vermelha, principalmente grelhada (churrasco) ou frita.

O Brasil é um país extenso e diversificado e acredita-se que não seria possível uma estimativa das porcentagens de ingestão de HPA em diferentes alimentos na “dieta do brasileiro”, precisando esta informação ser regionalizada para que fornecesse dados fidedignos e passíveis de comparação.

4.5. Fonte dos HPA

O perfil de emissão dos HPA para uma determinada fonte depende do processo de formação. Durante o processo de combustão em baixas temperaturas, como a queima de madeira, moléculas de baixa massa molar são usualmente formadas, enquanto que em processos em altas temperaturas como a queima de combustível fóssil dos motores a emissão as moléculas de HPA de massa molar mais elevada são formadas (MOSTERT et al, 2010). Uma das maneiras de identificar as fontes de emissão dos HPA são os chamados RATIOS que são calculados através da razão de dois HPA de mesma massa molar e propriedades físico-químicas similares, porém este método é questionável pois precisamos levar em conta as reações atmosféricas que estes compostos sofrem durante seu tempo

de permanência na mesma. Estudos demonstraram a inviabilidade de se utilizar o RATIO que emprega os valores de concentração do antraceno e do fenantreno pois comprovou-se que ambos possuem diferentes velocidades de fotodegradação, o antraceno adsorvido a partícula reage rapidamente com o NO₂ enquanto o fenantreno reage a uma menor velocidade com o radical ^{*}OH. A razão entre o fluoranteno e o pireno mostrou-se mais conservadora onde ambos reagem rapidamente, as fotoreações são esperadas porém mostraram pouca alteração nos valores de RATIO somente em altas concentrações destas substâncias (TOBISZEWSKI & NAMIESNIK, 2012). Esta razão será utilizada para fornecer uma idéia sobre a hipótese proposta de que os pontos de coleta na cidade de Araraquara devem apresentar influência de queima de gramínea principalmente na época da safra. As amostras de Itu podem também sofrer este tipo de influência já que foi possível observar várias ocorrências de queimada em todo o estado como pode ser visto no ANEXO B.

Os valores esperados desta relação diagnóstico são maiores que 0,5 que representam a queima de gramínea, madeira e carvão, para valores entre 0,4 e 0,5 indicam que os combustíveis fósseis são a fonte mais importante, enquanto que valores menores que 0,4 indicam fontes petrogênicas (DE LA TORRE-ROCHE, et al., 2009). Os dados apresentados na Tabela 34 mostram que todos os valores de razão estão dentro do esperado mostrando a forte tendência dos HPA nas amostras estudadas serem provenientes de queima de gramínea, madeira ou carvão, inclusive aquelas coletadas na cidade de Itu.

Tabela 34. Valores de relações diagnóstico para Flu/(Flu+Pi).

AMOSTRAS	ARARAQUARA					
	ITU		Ponto A		Ponto B	
	Entre	safra	entre	safra	entre	safra
couve	-	0,80	-	-	0,76	-
rúcula	0,89	0,73	-	-	-	-
alface	0,96	0,77	0,65	0,83	0,85	0,82

Ponto A – quitandinha: zona urbana, próximo Rod Washington Luis - pireno não foi quantificado

Ponto B – BELA VISTA: zona rural

4.6. Principais vias de incorporação dos HPA

Observou-se as vias de incorporação dos HPA por folhas em estudos recentes e dentre as mais prováveis apontadas foram as de que para os HPA com $\text{Log } K_{\text{OA}} < 8,5$ a principal via de incorporação seria a deposição gasosa; para aqueles com $\text{Log } K_{\text{OA}}$ entre 8,50 e 11 seria a deposição gasosa com limitação cinética juntamente com a deposição de partículas e para aqueles com $\text{Log } K_{\text{OA}} > 11$ a deposição de partículas seria a via mais expressiva de incorporação, sabendo-se destas afirmações podemos supor que o Flu e Pi possuem como via principal de incorporação a deposição gasosa, os HPA de quatro anéis aromáticos (Pi, BaA, Cri, BbF e BkF) possuem ambas as vias e os HPA com mais de quatro anéis aromáticos BaP, DahA, BghiP e Ind possuem como via principal de incorporação a deposição de partículas. (COLLINS, FRYER e GROSSO 2006; DESALME, BINET e CHIAPUSIA, 2013)

4.6.1. Incorporação entre as amostras

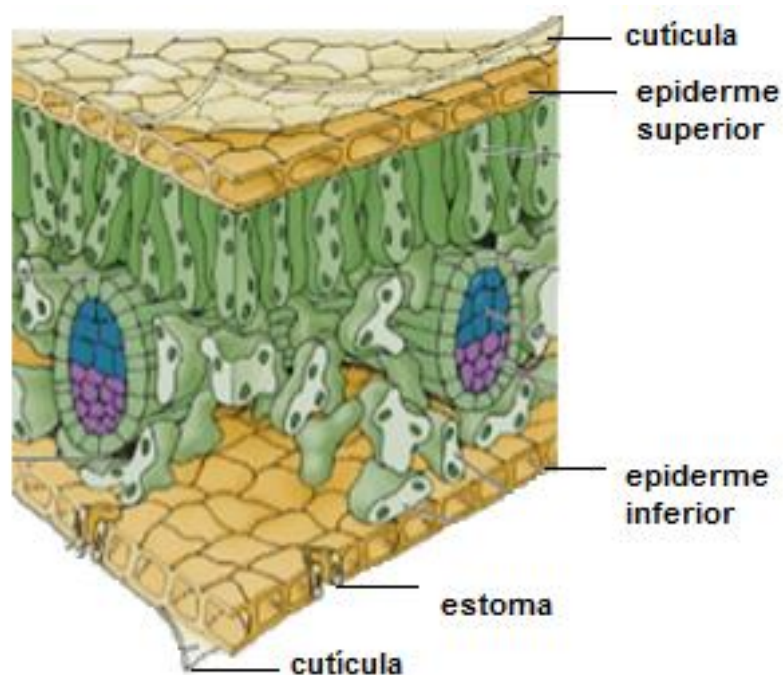
Os fatores que podem ser determinantes para a incorporação dos HPA pelas folhas segundo TERZAGHI et al., 2013 são listados a seguir:

- características das folhas (rugosidade, suavidade, presença de pêlos, comprimento do pecíolo que é a haste das folhas e rigidez)
- composição química da cutícula (variações dos componentes individuais da cera responsáveis pela hidrofobicidade da cutícula)
- estrutura da cutícula (espessura, morfologia, alteração da estrutura com a idade, presença de cristais de cera epicuticular) em combinação com as células epidérmicas papilósicas que proporcionam propriedades de auto limpeza das folhas na determinação de acúmulo de partículas.

Além destes também deve-se considerar a localização das folhas em relação ao solo assim como as propriedades físico-químicas dos HPA.

As partículas contendo os HPA também podem ser imobilizadas na cutícula, quanto mais volátil o composto mais facilmente ele penetrará nas partes mais internas da folha. Esta afirmação foi confirmada por PRECIADO et al., 2013 em folhas de alface irrigadas com água fortificada com contaminantes orgânicos, TERZAGHI et al., 2013 em folhas de árvore de bordo, cornel e pinheiro colhidas em áreas próximas a rodovia. Dos HPA que foram encontrados nas folhas de milho descobriu-se que, 20% se encontram na superfície, 60% estavam localizados na cera e 20% nas camadas mais internas das folhas (KAUPP, BLUMENSTOCK e McLACHLAN, 2000), o que induz a conclusão de que a absorção estomática não ocorre em grande proporção, já que os HPA incorporados por esta via penetram diretamente para as áreas mais internas das folhas (Figura 36) .

Figura 36. Estrutura das folhas.

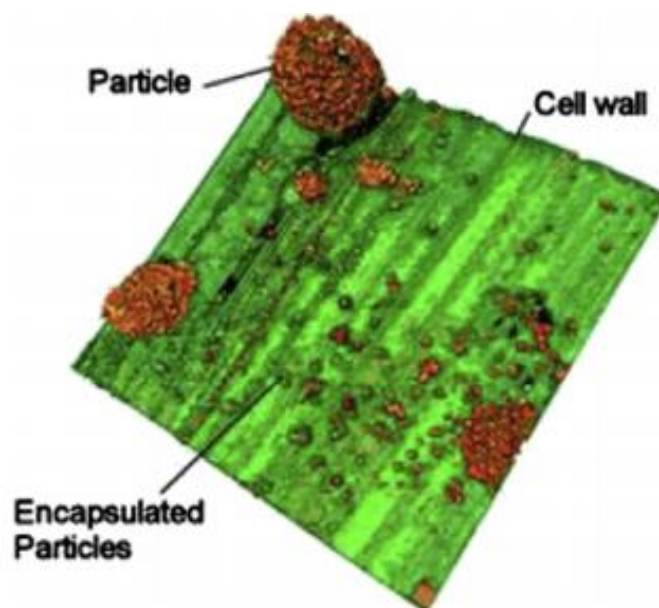


Fonte: adaptado de google imagem

Quanto maior for o tempo de contato entre a partícula e a folha maior será a probabilidade desta ser imobilizada na cutícula e maior será a incorporação de HPA pelas folhas já que após o material particulado ser encapsulado (Figura 37) a água não é capaz de remover estas partículas aprisionadas. Estes fatores explicam as

maiores concentrações de HPA na época da safra na cidade de Araraquara pois além do aumento da exposição pelas quei/madas de palha de cana-de-açúcar houve pouca precipitação neste, período prolongando o tempo de contato da partícula com a folha.

Figura 37. Partículas na parede celular e partículas encapsuladas.



Fonte: TERZAGHI et al., 2013

5. CONCLUSÕES

O método analítico, otimizado empregando-se ferramentas quimiométricas, permitiu a obtenção de valores de LD e LQ abaixo dos níveis máximos aceitáveis pela União Europeia para determinação de HPA em alimentos, 0,3 e 0,9 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente. Apresentando exatidão (70~119% de recuperação) e precisão ($\text{CV} < 11,6\%$), adequados para este tipo de análise.

Na avaliação da presença de HPA em hortaliças, os dados obtidos permitiram concluir que não há diferença significativa entre as amostras de Araraquara e Itu, onde o valor máximo atinge 50% a mais quando comparado o máximo valor encontrado em Itu na época da safra, em termos da soma dos HPA. Para esta época, os dados indicam que a fonte mais importante é a queima de gramíneas, confirmando a hipótese inicial de que a queimada de cana-de-açúcar seria uma fonte importante de HPA na contaminação de hortaliças. Na época da safra, as faixas de concentrações em Araraquara e Itu são respectivamente, 7~320 e 96~191 ng g^{-1} . Na época da entressafra em Araraquara os valores se encontram na faixa de 7~228 ng g^{-1} e em Itu para a mesma época 153~288 ng g^{-1} . Demonstrando que em Itu as maiores concentrações foram obtidas na época da entressafra inferindo que há nesta época outro evento que contribui para o aumento da exposição aos HPA nesta cidade, já que atinge limites comparáveis aos encontrados em Araraquara na época da safra.

Considerando-se a ingestão de 200g/dia das hortaliças incluídas neste trabalho, o que equivale a metade do preconizado pela OMS como ingestão recomendada de frutas, verduras e legumes, e utilizando-se o MOE (Margin of Exposure), de acordo com a União Europeia, infere-se que a quantidade de HPA ingerida por esta via corresponde a valores bem mais elevados do que os reportados para uma dieta de alta exposição ($\text{MOE} < 10\ 000$), podendo atingir ao invés dos 16% estimados de contribuição, 32%, 40% e 58% do total de HPA ingeridos. Estes valores são referentes as seguintes amostras: rúcula e couve (Itu_entressafra), rúcula (Quitandinha_safra).

REFERÊNCIAS

- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RDC n. 281, de 06 de outubro de 2003. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 8 out. 2003. Disponível em:
<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/6fd5e4004b07646e9264bfa337abae9d/Resolucao_RDC_n_281_de_06_de_outubro_de_2003.pdf?MOD=AJPERES>
Acesso em: 15 jul. 2013.
- ANDRADE, S. J. et al. Contribution of sugar-cane harvesting season to atmospheric contamination by polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in Araraquara city, Southeast Brazil. **Atmospheric Environment**, v. 44, p. 2913-2919, 2010.
- ASHRAF, M. W.; SALAM, A. PAH in vegetables and fruits produced in Saudi Arabia. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 4, p. 543-547, 2012.
- BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimento**. 2. ed. Campinas: Ed. UNICAMP, 2001. p. 251-296.
- BETTIN, A. M.; FRANCO, D. W. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em aguardente. **Ciência e Tecnologia Alimentos**, v. 25, n. 2, p. 234-238, 2005.
- BEZERRA, M. A. et al. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. **Talanta**, n. 76, p. 965-977, 2008.
- BISHNOI, N. R.; MEHTA, U.; PANDIT, G. G. Quantification of polycyclic aromatic hydrocarbons in fruits and vegetables using high performance liquid chromatography. **Indian Journal of Chemical Technology**, v. 13, p. 30-35, 2006.
- BRASIL, J. T. et al. Planejamento estatístico de experimentos como uma ferramenta para otimização das condições de biossorção de Cu(II) em batelada utilizando-se casaca de nozes pecã como biossorvente. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 548-553, 2007.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Instituto Nacional de Câncer (INCA)**. INCA e Ministério da Saúde apresentam estimativas de câncer para 2014. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/0129ba0041fbbc01aa4fee936e134226/Apresentacao+Estimativa+2014_final+corrigido+tireoide.pdf?MOD=AJPERES&CACHEID=0129ba0041fbbc01aa4fee936e134226>. Acesso em: 10 dez. 2013.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Vigitel Brasil 2009**: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/vigitel2009_220610.pdf>. Acesso em: 12 dez. 2012.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Cultura de cana-de-açúcar**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/cana-de-acucar/saiba-mais>>. Acesso em: 21 fev. 2013a.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instituto Nacional de Meteorologia. **Gráficos**. Disponível em: <http://www.inmet.gov.br/sim/gera_graficos.php>. Acesso em: 10 nov. 2013b.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação; Ministério do Meio Ambiente. **Queimadas**: monitoramento de focos. Disponível em: <<http://www.dpi.inpe.br/proarco/bdqueimadas/>>. Acesso em: 20 out. 2013c.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente. **Resolução Conama 1984-2012**. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/processos/61AA3835/LivroConama.pdf>>. Acesso em: 06 mar. 2013.

BROOKES, P. E.; LAWLEY, P. D. Evidence for the binding of polynuclear aromatic hydrocarbons to the nucleic acids of mouse skin: relation between carcinogenic power of hydrocarbons and their binding to deoxyribonucleic acid. **Nature**, v. 202, p. 781-783, 1964.

CAMARGO, M. C. R. Determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) em guaraná em pó (*Paullinia cupana*). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 1, p. 49-53, 2006.

CAMARGO, M. C. R.; TOLEDO, M. C. F. HPA em margarina, creme vegetal e maionese. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 20, p. 51-55, 2000.

CAMARGO, M. C. R.; TOLEDO, M. C. F. Uma revisão. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 36, n. 1, p. 69-78, 2002a.

CAMARGO, M. C. R.; TOLEDO, M. C. F. Avaliação da contaminação de diferentes grupos alimentares por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 22, n. 1, p. 49-53, 2002b.

CAMARGO, M. C. R.; TOLEDO, M. C. F. Polycyclic aromatic hydrocarbons in Brazilian vegetables and fruits. **Food Control**, v. 14, p. 49-53, 2003.

CARUSO, M. S. F. **Otimização de metodologia para determinação de Benzo(a)pireno em cachaças por CLAE com detecção de fluorescência e avaliação de sua ocorrência**. 2007. 119 f. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

CHUNG, J. Y. et al. Benz(a)pyrene reduces testosterone production in rat leydig cells via a direct disturbance of testicular steroidogenic machinery. **Environmental Health Perspectives**, n. 119, v. 11, p. 1569-1574, 2011.

COLLINS, C.; FRYER, M.; GROSSO, A. Plant uptake of non-ionic chemicals. **Environmental Science and Technology**, v. 40, n. 1, p. 45-52, 2006.

CONFEDERAÇÃO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA DO BRASIL. Canal do Produtor. **Estudo do CNA aponta que faltam frutas e hortaliças no prato dos brasileiros**. Disponível em:

<www.canaldoprodutor.com.br/comunicacao/noticias/estudo-da-cna-aponta-que-faltam-frutas-e-hortalicas-no-prato-do-brasileiro>. Acesso em: 25 jul. 2012.

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

CUTLER, D. F.; ALVIN, K. L.; PRICE, C. E. **The plant cuticle**. London: Academic Press for the Linnean Society, 1980. p. 341-361.

DE LA TORRE-ROCHE, R. J.; LEE, W. Y.; CAMPOS-DIAZ, S. I. Soil-borne polycyclic aromatic hydrocarbons in El Paso, Texas: analysis of potential problem in the United States/Mexico border region. **Journal of Hazardous Materials**, v. 163, p. 946-958, 2009.

DE NICOLA, F. et al. Temporal variations in PAH concentrations in Quercus ilex L. (holm oak) leaves in an urban area. **Chemosphere**, v. 61, p. 432-440, 2013.

DESALME, D.; BINET, P.; CHIAPUSIA, G. Challenges in tracing the fate and effect of atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbon deposition in vascular plants. **Environmental Science & Technology**, v. 47, p. 3967-3981, 2013.

ECONOMOU, A. et al. Determination of multi-class pesticides in wines by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 5856-5867, 2009.

EDWARDS, N.T. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the terrestrial environment-A review. **Journal of Environmental Quality**, v. 12, p. 427-441, 1983.

EMPRESA BRASILEIRA EM PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Recomendações tecnológicas**. Disponível em:

<<http://www.preveqmd.cnpem.embrapa.br/cartilha.htm>>. Acesso em: 2 fev. 2013.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Hazardous waste: test methods**.

Disponível em: <http://www.epa.gov/epaoswer/hazwaste/test/main.htm>. Acesso em: 29 out. 2011.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **EPA method 8310**. Disponível em:

<<http://www.caslab.com/EPA-Method-8310>>. Acesso em: 20 fev. 2013.

EUROPEAN UNION. Contam Scientific Committee on Food 2002. **Opinion of the Scientific Committee on Food on the risks to human health of polycyclic aromatic hydrocarbons in food**. Disponível em:

<http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out153_en.pdf>. Acesso em: 04 dez. 2012.

- EUROPEAN UNION. The EFSA Journal 2005. **Opinion of the Scientific Committee on a request from EFSA elated to a harmonised approach for risk assessment of substances which are both genotoxic and carcinogenic.** Disponível em: <<http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/282.pdf>>. Acesso em: 06 dez. 2013.
- EUROPEAN UNION. The EFSA Journal 2008. **Polycyclic aromatic hydrocarbons in food scientific opinion of the panel on contaminants in the food chain.** Disponível em: <<http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/724.pdf>>. Acesso em: 21 jun. 2011.
- GAUJAC, A. et al. Multivariate optimization of a solid phase microextraction-headspace procedure for the determination of benzene, toluene, ethylbenzene and xylenes in effluent samples from a waste treatment plant. **Journal of Chromatography A**, v. 1203, p. 99-104, 2008.
- GHISELLI, G.; JARDIM, W. F. Interferentes endócrinos no ambiente. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 695-706, 2007.
- HOJO, E. T. S. Efeitos mutagênicos de substâncias químicas presentes no meio ambiente. **Revista de Ensino em Ciências**, n. 4, p. 16-18. 1981.
- HOSSAIN, M. A.; HOQUE, M. Z. Polycyclic aromatic hydrocarbons in Bangladesh vegetables and fruits. **Food and Chemical Toxicology**, v. 59, p. 244-247, 2011.
- HOWSAM, M.; JONES, K. C.; INESON, P. PAHs associated with the leaves of three deciduous tree species. II: uptake during a growing season. **Chemosphere**, v. 44, p. 155-164, 2001.
- INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **Some non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons and some related exposures.** Lyon, 2010. (IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans; v. 92). Disponível em: <<http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol92/mono92.pdf>>. Acesso em: 22 fev. 2013.
- INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **A review of human carcinogens.** Part F: chemical agents and related occupations. Lyon, 2009. (IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans; v. 100F). Disponível em: <<http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol100F/mono100F.pdf>>. Acesso em: 22 fev.2013.
- INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS ESPACIAIS. **Monitoramento da cana-de-açúcar.** Disponível em: <<http://www.dsr.inpe.br/laf/canasat/colheita.html>>. Acesso em: 15 fev. 2013.

- JERINA, D. M.; SAYER, J. M.; THAKKER, D. R. Carcinogenicity of polycyclic aromatic hydrocarbons: the bay-region theory. In: PULLMAN, B.; Ts' O, P.O.P, GELBOIN, H. **Carcinogenesis**: fundamental mechanisms and environmental effects. Dordrecht: Reidel Publishing, 1980. p. 1-12.
- JOURAEVA, V. A. et al. Differences in accumulation of PAHs and metals on the leaves of *Tilia x echlora* and *Pyrus calleryana*. **Environmental Pollution**, v. 120, p. 331-338, 2002.
- KAMEDA, T. et al. Mutagenicities and endocrine-disrupting activities of 1-hydroxy-2-nitropyrene and 1-hydroxy-5-nitropyrene. **Journal of Health Science**, v. 57, n. 4, p. 372-377, 2011.
- KATIYAR, K.; AGARWAL, R.; MUKHTAR, H. Introduction: sources, occurrence, nomenclature and carcinogenicity of polycyclic aromatic hydrocarbons. In: SHERMA J. **Handbook of chromatography**: liquid chromatography of polycyclic aromatic hydrocarbons. Boca Raton: CRC Press, 1993. Cap. 1, p. 1-17.
- KAUPP, H.; BLUMENSTOCK, M.; McLACHLAN, M. S. Retention and mobility of atmospheric particle-associated organic pollutant PCDD/Fs and PAHs in maize leaves. **New Phytology**, v. 148, p. 478-480, 2000.
- KHILLARE, P. S.; JYETHI, D. S.; SARKAR, S. Health risk assessment of PAH and heavy metals via dietary intake of vegetables grown in the vicinity of thermal power plants. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, p. 1642-1652, 2012.
- KHODADOUST, S.; AHADJMOHAMMADI, M. Determination of N-methylcarbamate insecticides in water samples using dispersive liquid-liquid microextraction and HPLC with the aid of experimental design and desirability function. **Analytica Chimica Acta**, v. 699, p. 113-119, 2011.
- KOLATTUKUDY, P. E.; TEVINI, M.; LICHTENTHALER, H. K. **Biosynthesis and degradation of lipid polymers**: in lipids and lipid polymers in higher plants. Berlin: Springer-Verlag, 1977. 306 p.
- LAKSHMAN, M. K.; SAYER, J. M.; JERINA, D. M. Chemical synthesis of bay-region polycyclic aromatic hydrocarbon tetrahydroepoxide-deoxyadenosine adduct and its site-specific incorporation into a DNA oligomer. **Journal American Chemical Society**, v. 113, p. 6589-6594, 1991.
- LAMBERT, O. et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons: bees, honey and pollen as sentinels for environmental chemical contaminants. **Chemosphere**, v. 86, p. 98-104, 2012.
- LEE, M.; NOVOTNY, M. V.; BARTLE, K. D. **Analytical chemistry of polycyclic aromatic compounds**. New York: Academic Press, 1981. 461 p.
- LERDA, D. **Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) factsheet**. Disponível em: <http://irmm.jrc.ec.europa.eu/EURLs/EURL_PAHs/about_pahs/Documents/JRC%2060146_Factsheet%20PAH_3rd%20edition.pdf>. Acesso em: 21 fev. 2013.

- LOPES, W. A.; 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.
- MARTORELL, I. et al. PAH in food and estimated PAH intake by the population of Catalonia, Spain: temporal trend. **Environment International**, v. 36, p. 424-432, 2010.
- MOSTERT, M. M. R.; AYOKO, G. S.; KOKOT, S. Application os chemometrics to analysis of soil pollutants. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 29, p. 430-435, 2010.
- MURAKAMI, M. et al. Evaluation of ginkgo as a biomonitor of airborne polycyclic aromatic hydrocarbons. **Atmospheric Environment**, v. 54, p. 9-17, 2012.
- NAKAJIMA, D. et al. Seasonal changes in the concentration of polycyclic aromatic hydrocarbons in azalea leaves and relationship to atmospheric concentration. **Chemosphere**, v. 30, n. 3, p. 409-418, 1995.
- NIELSEN, T. et al. City air pollution of polycyclic aromatic hydrocarbons and other mutagens: occurrence, sources and health effects. **Science of the Total Environment**, v.189/190, p. 41-49, 1996.
- NÚCLEO DE ESTUDOS E PESQUISA EM ALIMENTAÇÃO; UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS. Tabela brasileira de composição de alimentos. 4 ed. rev. e ampl. Campinas, 2011. Disponível em:
<http://www.unicamp.br/nepa/taco/contar/taco_4_edicao_ampliada_e_revisada>
Acesso em: 06-06-2012.
- PERALTA-ZAMORA, P.; MORAIS, J. L.; NAGATA, N. Por que otimização multivariada. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 10, n. 2, p. 106-110, 2005.
- PETERSEN, L. S. et al. Uptake of trace elements and PAHs by fruit an vegetables from contaminated soils. **Environmental Science & Technology**, v. 36, n. 14, 2002.
- PINHO, G. P. et al. Efeito de matriz na quantificação de agrotóxicos por cromatografia gasosa. **Química Nova**. v. 32, n. 4, p. 987-995, 2009.
- PRECIADO, D. C. et al. Foliar sorption of emerging and priority contaminants under controlled conditions. **Journal of Hazardous Materials**, v. 260, p. 176-782, 2013.
- RATOLA, N. at al. Comparison of PAH levels and sources in pine needles from Portugal, Spain, and Greece. **Analytical Letters**, v. 45, p. 508-525, 2012.
- RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, p. 771-780, 2004.
- RIBEIRO, H. Queimadas de cana-de-açúcar no Brasil: efeitos à saúde respiratória. **Revista de Saúde Pública**, v. 42, p. 370-376, 2008.

RINALDI, M. C. S. et al. Leaves of *Lolium multiflorum* 'Lema' and tropical tree species as biomonitors of polycyclic aromatic hydrocarbons. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 79, p. 139-147, 2012.

RODRIGUEZ, J. H. et al. Accumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons and heavy metals in the tree foliage of *Eucalyptus rostrata*, *Pinus radiata* and *Populus hybridus* in the vicinity of large aluminium smelter in Argentina. **Atmospheric Environment**, v. 55, p. 35-42, 2012.

SANTODONATO, J. Review of the estrogenic and antropogenic activity of PAH relationship to carcinogenicity. **Chemosphere**, v. 34, p. 835-848, 1997.

SILVA, F. S. **Otimização e validação de método para análise de HPA em rapadura**. 2006. 105 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2006.

SILVA, F. S. et al. PM_{2.5} and PM₁₀: the influence of sugarcane burning on potential cancer risk. **Atmospheric Environment**, v. 44, p. 5133-5138. 2010.

SIMONICH, S. L.; HITES, R. A. Vegetation-atmosphere partitioning of polycyclic aromatic hydrocarbons. **Environmental Science and Technology**, v. 28, n. 5, p. 939-943, 1994.

TERZAGHI, E. et al. Forest filter effect: role of leaves in capturing/releasing air particulate matter and its associated PAHs. **Atmospheric Environment**, v. 74, p. 378-384, 2013.

THIER, H. P.; ZEUMER, H. **Manual of pesticide residue analysis**. New York: Verlag Chemie, 1987. 433 p.

TOBISZEWSKI, M.; NAMESNIK, J. PAH diagnostic ratios for the identification of pollution emission sources. **Environmental Pollution**, v. 162, p. 110-119, 2012.

TOLEDO NETTO, P. et al. A rapid, environmentally friendly, and reliable method for pesticide analysis in high-fat samples. **Talanta**, v. 101, p. 322-329, 2012.

TOMASHUK, T. A. et al. Atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbon profiles and sources in pine needles and particulate matter in Dayton, Ohio, USA. **Atmospheric Environment**, v. 62, p. 301-313, 2012.

TREMOLADA, P. et al. Spatial distribution of PAHs in the U.K. atmosphere using pine needles. **Environmental Science Technologies**. v. 30, p. 3570-3577, 1996.

TUTEJA, G.; ROUT, C.; BISHNOI, N. R. Quantification of polycyclic aromatic hydrocarbons in leafy and underground vegetables: a case study around Panicut City, Haryana, India. **Journal of Environmental Science and Technology**, v. 4, n. 6, p. 611-620, 2011.

UNIÃO DAS INDÚSTRIAS DE CANA-DE-AÇÚCAR. Setor sucroenergético. **Mapa da produção**. Disponível em: <<http://www.unica.com.br/mapa-da-producao/>>. Acesso em: 05 dez. 2013.

UNIÃO EUROPÉIA. Síntese de legislação da União Européia. **Hidrocarbonetos nos alimentos**. Disponível em: <<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2011:215:0004:0008:PT:PDF>>. Acesso em: 02 jun. 2012.

VALENTE, L. P. V.; AUGUSTO, F.; RIEDO, C. R. F. **Análise quantitativa por cromatografia**. 10 p. Disponível em: <<http://chemkeys.com/br/wp-content/themes/chemkeysbr/article1.php?u=YW5hbGlzZS1xdWFudGI0YXRpdmEtcG9yLWNyb21hdG9ncmFmaWE=>>>. Acesso em: 25 jun. 2011.

VEYRAND, B. et al. Human dietary exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: results of the second French total diet study. **Environment International**, v. 54, p. 11-1, 2013.

VIEIRA, M. A. et al. Occurance of polycyclic aromatic hydrocarbons throughout the processing stages of erva-mate (*Ilex paraguariensis*). **Food Additives & Contaminants: Part A: Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment**, v. 27, p. 776-782, 2010.

WANG, Y. C. et al. Comparison os polycyclis aromatic hydrocarbon uptake pathways and risk assessment of vegetables from waste-water irrigated areas in northern China. **Journal of Environmental Monitoring**, v. 13, p. 433-439, 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Selected non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons**. Geneva, 1998. 883 p. (Environmental Health Criteria, 201).

YEATS, T. H. et al. The fruit cuticles of wild tomato species exhibit architectural and chemical diversity, providing a new model for studying the evolution of cuticle function. **Journal of Plant**, v. 69, p. 655-666, 2012.

ZAMPERLINI, G. C. M.; SILVA, M. R. S.; VILEGAS, W. Identification of polycyclic aromatic hydrocarbons in sugar cane soot by gas chromatography mass spectrometry. **Chromatographia**, v. 46, p. 655-663, 1997.

ZOHAIR, A. Levels of polyaromatic hydrocarbons in Egyptian vegetables and their behavior during soaking in oxidizing agent solutions. **World Journal of Agricultural Sciences**, v. 2, p. 90-94, 2006.

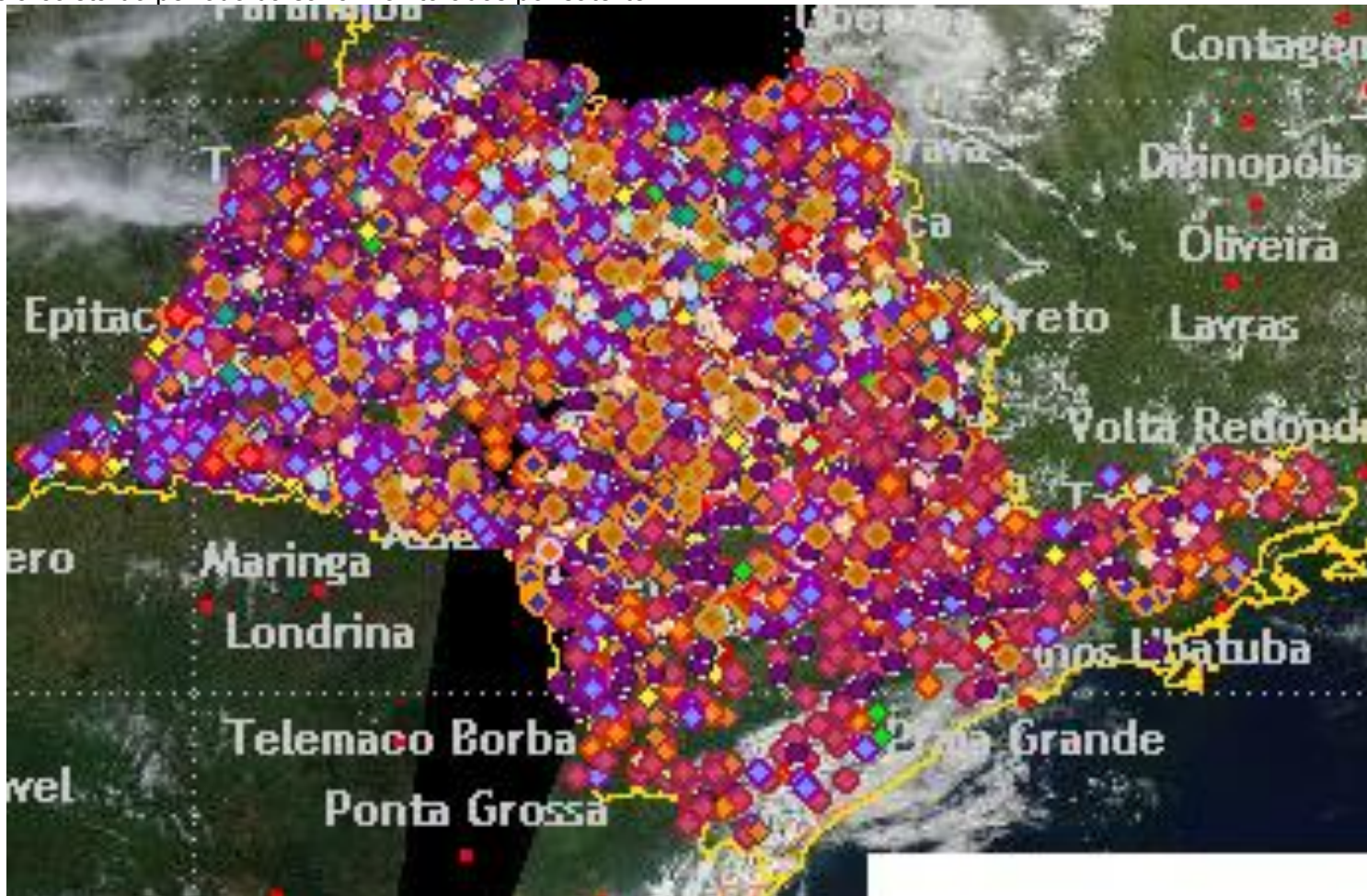
ANEXO A : Número de focos de queimada (933 focos) no estado de São Paulo no período de 24 de janeiro de 2013 a 15 de março de 2013 referente a coleta do período da entressafra monitorados por satélite.



- = NOAA-15; ◆ = NOAA-15D; ● = NOAA-12; ● = NOAA-12D; ◆ = NOAA-14; ● = NOAA-16; ● = NOAA-16N; ◆ = NOAA-17; ◆ = NOAA-18D; ◆ = NOAA-18;
- = NOAA-19D; ◆ = NOAA-19; ◆ = GOES-08; ◆ = GOES-10; ◆ = GOES-12; ◆ = GOES-13; ◆ = AQUA-T; ◆ = AQUA-M; ◆ = TERRA-T; ◆ = TERRA-M;
- ◆ = METEOSAT-02; ◆ = AQUA_M-M; ◆ = AQUA_M-T; ◆ = TERRA_M-M; ◆ = TERRA_M-T; ◆ = AQUA-MEX; ◆ = TERRA-MEX; ◆ = ATSR; ◆ = TRMM; ◆ = NPP;

FONTE: Ministério da Ciência e Tecnologia e Inovação e Ministério do Meio Ambiente _Queimadas: monitoramento de focos.

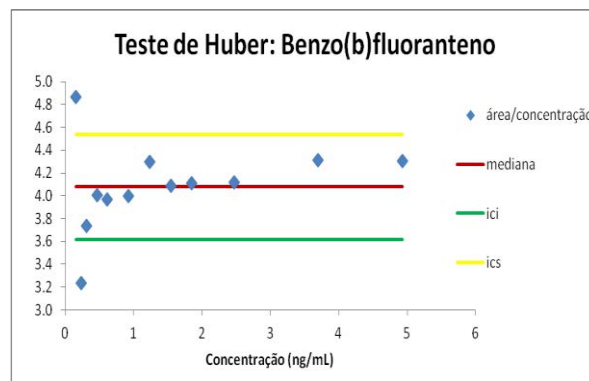
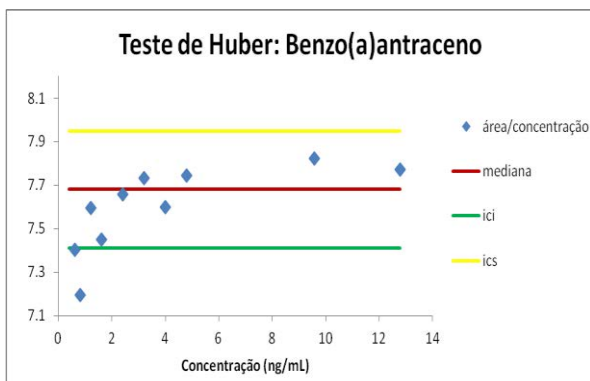
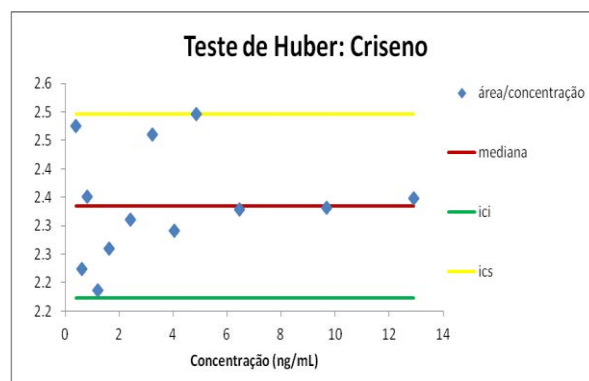
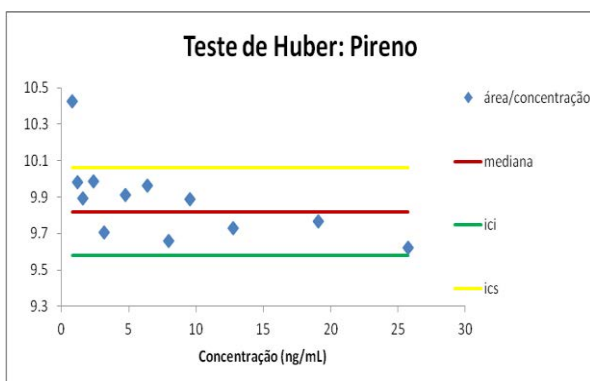
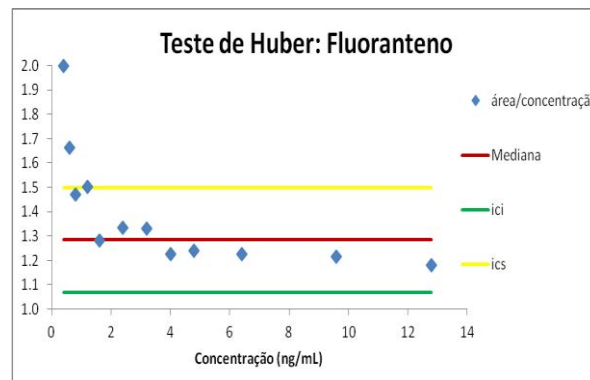
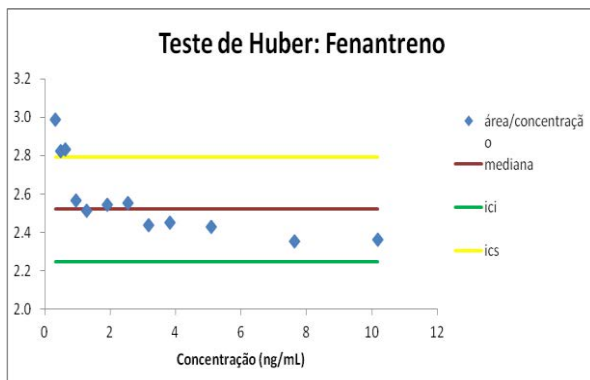
ANEXO B: Número de focos de queimada (25.787 focos) no estado de São Paulo no período de 20 de julho de 2012 a 03 de setembro de 2012 referente a coleta do período da safra monitorados por satélite.

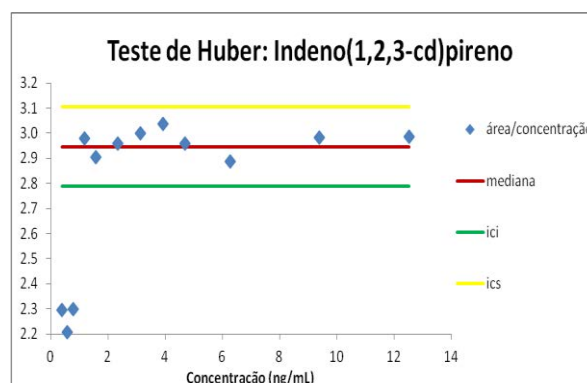
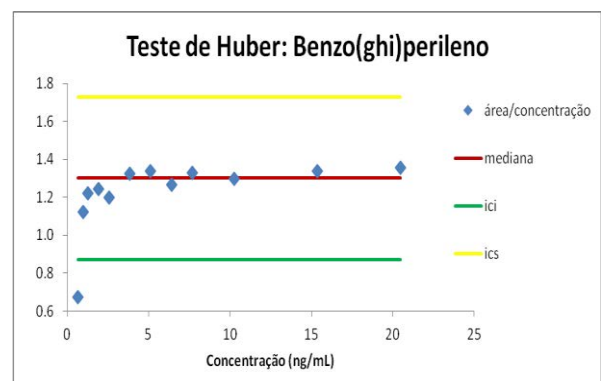
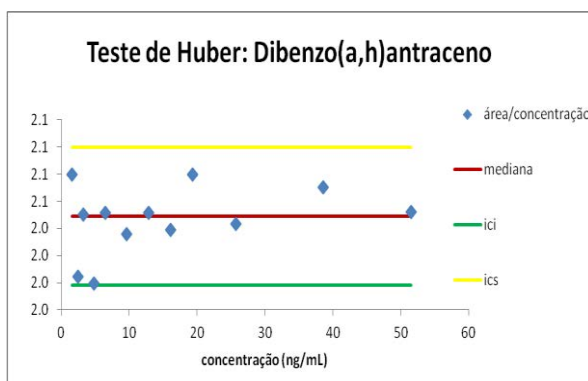
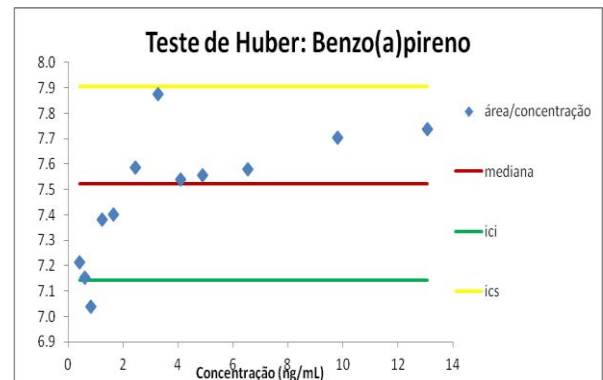
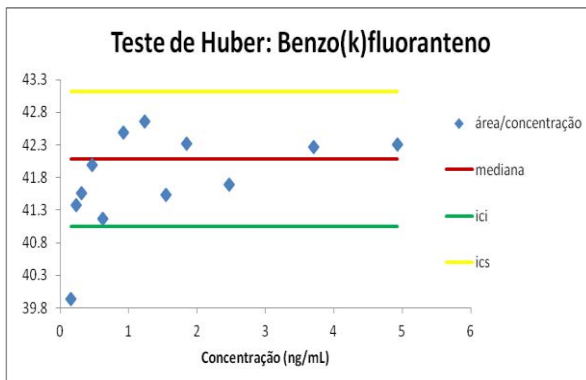


- ◆ = NOAA-15; ◆ = NOAA-15D; ◆ = NOAA-12; ◆ = NOAA-12D; ◆ = NOAA-14; ◆ = NOAA-16; ◆ = NOAA-16N; ◆ = NOAA-17; ◆ = NOAA-18D; ◆ = NOAA-18;
- ◆ = NOAA-19D; ◆ = NOAA-19; ◆ = GOES-08; ◆ = GOES-10; ◆ = GOES-12; ◆ = GOES-13; ◆ = AQUA-T; ◆ = AQUA-M; ◆ = TERRA-T; ◆ = TERRA-M;
- ◆ = METEOSAT-02; ◆ = AQUA_M-M; ◆ = AQUA_M-T; ◆ = TERRA_M-M; ◆ = TERRA_M-T; ◆ = AQUA-MEX; ◆ = TERRA-MEX; ◆ = ATSR; ◆ = TRMM; ◆ = NPP;

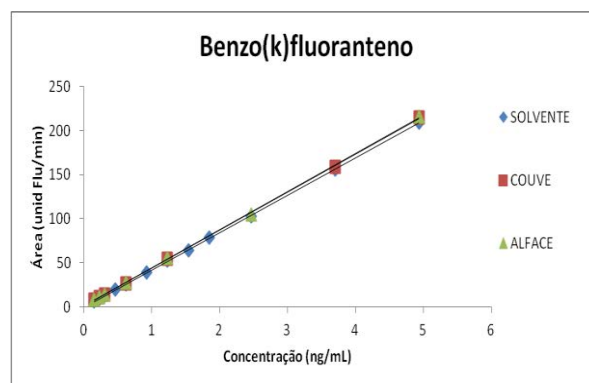
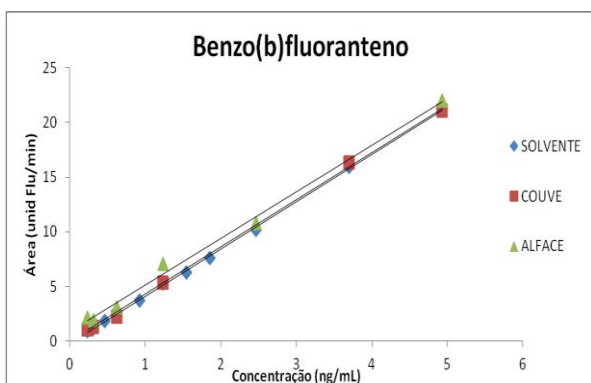
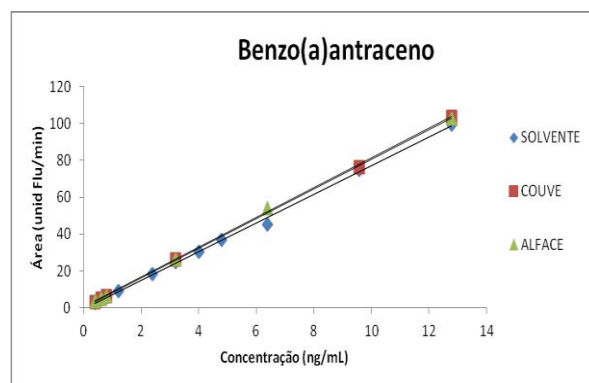
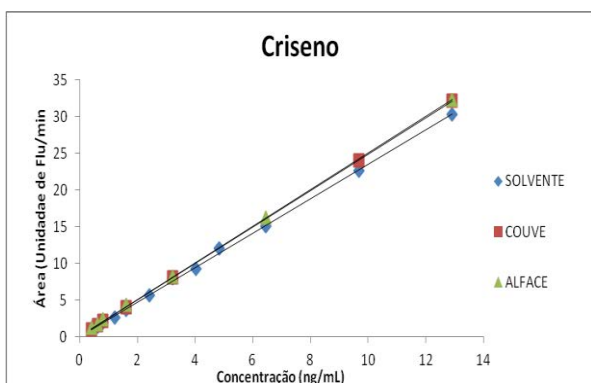
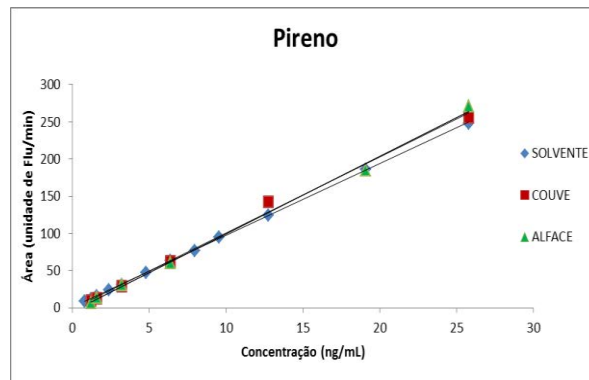
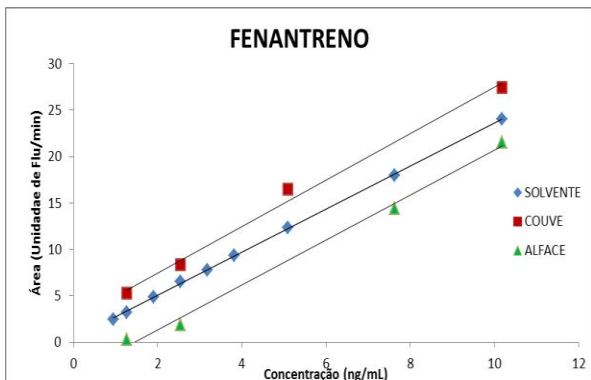
FONTE: Ministério da Ciência e Tecnologia e Inovação e Ministério do Meio Ambiente _Queimadas: monitoramento de focos.

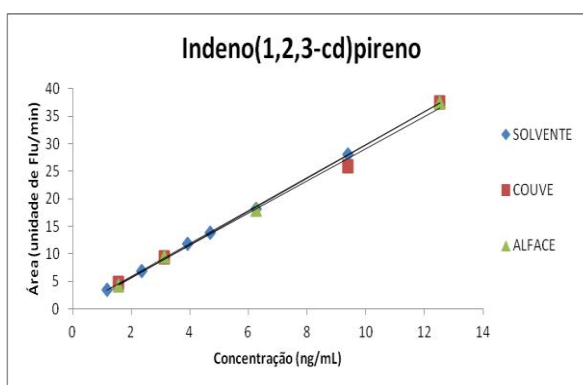
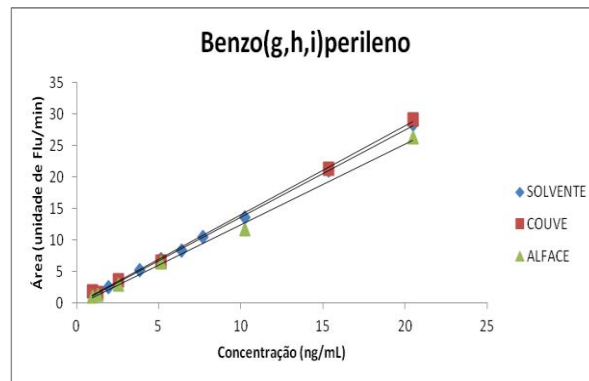
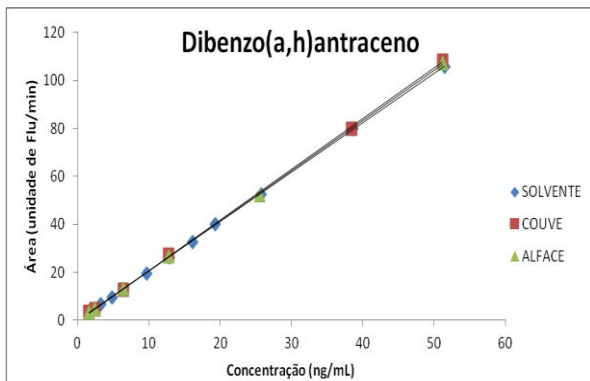
APÊNDICE 1. Teste de Huber





APÊNDICE 2. Curvas analíticas solvente, alface e couve.





APÊNDICE 3. Gráficos de pareto para todos os HPA.

