

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
INSTITUTO DE QUÍMICA DE ARARAQUARA**

**OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE
MÉTODO PARA A ANÁLISE DE HPAs
EM RAPADURA**

FLÁVIO SOARES SILVA

ORIENTADORA: PROF^a DR^a. MARY ROSA RODRIGUES DE MARCHI

**Dissertação apresentada ao Instituto
de Química da UNESP para obtenção
do título de Mestre em Química.**

Araraquara –SP

2006

DADOS CURRICULARES

FLÁVIO SOARES SILVA

1. DADOS PESSOAIS

Nascimento: 08/04/1981

Nacionalidade: Brasileira

Naturalidade: Guapé – MG

Estado civil: Solteiro

Filiação: José Fernandes Silva

Elza Aparecida Soares Silva

RG: MG-10.047.651

CPF: 012.259.616-10

Endereço: Rua Padre Fraissat, 410 Centro – Guapé - MG

2. FORMAÇÃO ACADÊMICA

2.1 Bacharelado em Química

Concluído em Dezembro de 2004 no Instituto de Química de Araraquara – UNESP. Monografia apresentada ao Instituto de Química/CAR intitulada “Otimização e validação de método para análise de amitraz em mel utilizando GC-TSD”, processo FAPESP: 03/13906-6.

2.2 Mestrado em Química

Concluído em Dezembro de 2006 no Instituto de Química de Araraquara – UNESP. Dissertação apresentada ao Instituto de Química/CAR intitulada “Otimização e validação de método para análise de HPAs em rapadura.”

2.3 Submissão de artigo científico

“Otimização e validação de método para análise de amitraz em mel utilizando GC-TSD” para a revista: PESTICIDAS: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente em 28/10/2006.

2.4 Resumos publicados em anais de congressos

1. SILVA, F. S. ; MARCHI, M. R. R. . Otimização de método cromatográfico para a determinação de HPAs por HPLC/Fluorescência. In: SIMCRO II - SIMPÓSIO DE CROMATOGRAFIA, 2006, São Pedro - SP. Otimização de método cromatográfico para a determinação de HPAs por HPLC/Fluorescência, 2006.

2. SILVA, F. S. ; REZENDE, M O O ; VAZ, J. S. . Determinação de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (PAHs) por cromatografia gasosa com detector de ionização em chama (GC-FID).. In: IX Congresso Nacional de Ecotoxicologia, 2006, São Pedro - SP. Determinação de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (PAHs) por cromatografia gasosa com detector de

ionização em chama (GC-FID)., 2006.

3. SILVA, F. S. ; REZENDE, M O O ; VAZ, J. S. . Determinação de n-Nitrosaminas por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS).. In: IX Congresso Nacional de Ecotoxicologia, 2006, São Pedro - SP. Determinação de n-Nitrosaminas por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS)., 2006.

4. CALIRI, C. M. ; PERON, M. C. C. ; SANTOS, A. G. ; OLIVEIRA, A. M. ; GIOCONDO, M. P. ; CAVALHEIRO, A. J. ; BOLZANI, V. S. ; SILVA, D. H. S. ; MARCHI, M. R. R. ; SILVA, F. S. ; SALDIVA, P. H. N. ; ARBEX, M. A. ; SOARES, C. P. . Proteção ao efeito genotóxico da biomassa oriunda da queima de cana-de-açúcar com o extrato etanólico de *Casearia sylvestris*, utilizando o teste de micronúcleo em *Tradescantia pallida*. In: IX CONGRESSO BRASILEIRO DE ECOTOXICOLOGIA, 2006, São Pedro-SP.

5. SILVA, F. S. ; MARCHI, M. R. R. . Otimização e validação de método para a análise de amitraz em mel.. In: Congresso de Iniciação Científica da Unesp., 2004, Ilha Solteira - SP. Otimização e validação de método para análise de amitraz em mel utilizando GC-TSD, 2004.

DEDICATÓRIA

À Prof^a Dr^a Mary, pelo enorme aprendizado;
À minha mamãe que amo muito: Elza;
Ao meu irmão, Fábio (*in memoriam*);
A toda minha querida família;
A minha namorada, Claudinha;
E a todos amigos do laboratório em especial
ao Potiguar José Antônio.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a DEUS, pois é o meu caminho, minha verdade e vida.

Agradeço aos meus pais, Elza Aparecida Soares, José Fernandes Silva, e mano Fábio Henrique Silva (sempre vivo em meu coração) pelo apoio, amor e amizade.

À minha namorada Claudia Cristina Ramos e família, pelo carinho e respeito que temos entre nós.

Gostaria de agradecer à Prof^a. Dr^a. Mary Rosa pela orientação segura, pela liberdade que sempre deu aos seus alunos para conduzirem suas pesquisas, pela amizade, ensinamentos, convivência e grande lição de vida.

A todos os professores que tive durante a pós-graduação, principalmente aos amigos que convivo no Instituto de Química-Unesp-Araraquara-SP e claro as grandes amizades feitas na cidade de São Carlos, onde aprendi e cresci muito.

Aos meus colegas: Ana Paula Inocentini, Ana Paula Sacco, Allynson Fujita, Andréia, Aristides, Bahia (UEBA) Carolina L., Carlos (IQSC), Claudia Fujita, Claudinha, Clóvis, Cuia (IQSC), Diógenes, Elke (IQSC), Diva (IQSC), Evaneide, Fabrício (Fruta), Felipe, Fernanda, Georgia, Gildo, Guilherme, Janaina, Jim, João Batista, Jão, Joel (IQSC), Joyce, Jorjão, José Antônio (que trouxe mais alegria ao laboratório Gresco), Josiane, Kellrye, Laudicéia, Marcelo, Marilei, Marisa Crespi, Max, Molíria, Raquel (IQSC), Merlin, Stephane, Tanaran e etc... pelo apoio e amizade.

A comissão dos Ex-Alunos Unesp Araraquara pelo aprendizado e amizades.

Aos funcionários do Instituto de Química – UNESP.

À CNPq e FAPESP pelo apoio financeiro.

A todos os professores que contribuíram para minha formação.

A todos que passaram pela minha vida.

Mestre não é aquele que ensina;
Mestre não é aquele que aprende;
Mestre é aquele que convive.
(Sabedoria zen-budista)

“ Todas as coisas têm seu tempo, e todas elas passam debaixo do céu
Segundo o termo que a cada uma foi prescrito. Há tempo de nascer e
tempo de morrer. Há tempo de plantar e tempo de arrancar o que se plantou. Há
tempo de matar e tempo de sarar. Há tempo de destruir e tempo de edificar. Há
tempo de chorar e tempo de rir. Há tempo de se afligir e tempo de saltar de
gosto. Há tempo de espalhar pedras e tempo de as juntar. Há tempo de dar
abraços e tempo de se pôr longe deles. Há tempo de adquirir e tempo de perder.
Há tempo de amor e tempo de ódio. Há tempo de guerra e tempo de paz. O que
foi feito, isso mesmo permanece. As coisas que não de ser, já foram: e Deus
renova aquilo que passou”. (Eclesiaste, cap. 3, v. 1 a 8,15)

“ Nossa exploração não deve nunca cessar
e o final de toda nossa exploração
será voltarmos ao ponto de partida
e o conhecer pela primeira vez.” (T.S. Eliot)

SILVA, F. S. **Otimização e validação de método para a análise de HPAs em rapadura**. Araraquara, 2006. 82 p. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química de Araraquara – UNESP.

RESUMO

Este trabalho objetivou otimizar e validar método para determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) em rapadura. Foram estudados os 17 HPAs considerados como contaminantes prioritários pela agência americana *NIOSH* (National Institute of Occupational Safety and Health). As figuras de mérito estudadas na otimização da resposta do sistema cromatográfico foram: fator de retenção (k'), seletividade (α) e número de pratos teóricos (N) através de variáveis como: composição da fase móvel, tipo de fase móvel e estacionária e vazão da fase móvel. O sistema de detecção fluorescente foi otimizado para a melhor resposta dos analitos de interesse.

As condições otimizadas para o sistema de HPLC-Fluorescência incluem: coluna Supelcosil LC PAH (250 mm x 4,6 mm x 5 μ m), sistema eluente acetonitrila/água, gradiente de 60% (5min) a 100% acetonitrila em 20 minutos (15 min), e 60% de acetonitrila (2 min). Os comprimentos de onda de excitação e de emissão utilizados foram : 220/320nm (0-10 min), 240/398 nm (10,01-32,5 min) e 300/498 (32,51 – 35 min). No preparo da amostra de rapadura foram otimizados diversos parâmetros como: razão massa/volume, tempo e número de extrações no sistema de ultra-som e melhor solvente extrator. Utilizando-se as condições analíticas otimizadas, foram determinados os limites de detecção e quantificação do método cromatográfico, de acordo com a IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry).

O método otimizado e validado foi aplicado a amostras de rapadura

comercializadas em Araraquara(SP) e Natal (RN). Não foi encontrado benzo(a)pireno em nenhuma das amostras, sendo possível quantificar pireno, fenantreno e fluoranteno em todas as amostras. O total de HPAs variou entre 0,97 e 1,56 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$.

Palavras-chave: HPAs, Rapadura, Validação, HPLC-Fluorescência, GC-MS, GC-MS-MS.

ABSTRACT

This work aimed to optimize and validate an analytical method for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) quantification in *rapadura* (sugar cane candy) and applied the method to rapadura samples marked in Araraquara (SP) and Natal (RN). It was investigated seventeen PAHs considered priority contaminants by American institutions on *NIOSH* (National Institute of Occupational Safety and Health).

In the optimization of the chromatographic response was studied: factor of retention (k'), selectivity (α) and theoretical plate number (N). Variables as composition of the mobile phase, type of mobile and stationary phase and flow of the mobile phase was optimized. The fluorescent detection system was optimized for the best detection of the compounds of interest. Optimized chromatographic conditions (HPLC/Flu) include: column Supelcosil LC PAH (250 mm x 4,6 mm x 5 μ m), elution with acetonitrile/water, gradient of 60% (5min) the 100% acetonitrile in 20 minutes (15 min), and 60% of acetonitrile (2 min). The wave lengths of used excitation and emission were: 220/320nm (0-10 min), 240/398 nm (10, 01-32, 5 min) and 300/498 (32.51 - 35 min). In the treatment of the sample several parameters were optimized as: ratio mass/volume, time and number of extractions in ultrasonic bath and better solvent extractor.

Using the optimized analytical conditions, it can be determined the limits of quantification and detection of the chromatographic method, in accordance with the IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry).

Rapadura samples from Araraquara(SP) and Natal(RN) were analysed. Benzo(a)pyrene was not found in none sample. It as possible quantify pyrene, phenantrene and fluoranthene in all samples. The total PAHs ranged from 0,97 to 1,56 μ g Kg⁻¹.

Keywords: PAHs, Rapadura, Validation, HPLC-Fluorescence, GC-MS, GC-MS-MS.

ÍNDICE

| | |
|--|-----|
| LISTA DE FIGURAS..... | xv |
| LISTA DE TABELAS | xix |
| LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS..... | xx |
| 1 Introdução..... | 1 |
| 1.1 Alimentos e a rapadura..... | 1 |
| 1.2 Produção de rapadura..... | 4 |
| 1.3 Fontes de contaminação | 5 |
| 1.4 HPAs | 6 |
| 1.4.1 Origem..... | 6 |
| 1.4.2 Propriedades físico-químicas..... | 7 |
| 1.4.3 Características carcinogênicas e mutagênicas dos HPAs..... | 7 |
| 1.5 Análise de HPAs em alimentos e outras matrizes sólidas | 11 |
| 1.6 Cromatografia líquida de alta eficiência..... | 13 |
| 1.6.1 Seleção do solvente em HPLC | 15 |
| 1.6.2 Detecção por Fluorescência..... | 17 |
| 1.7 Cromatografia a gás..... | 19 |
| 1.7.1 Detector de Espectrometria de massas | 20 |
| 1.8 Parâmetros Cromatográficos..... | 21 |
| 1.9 Solvente de extração da amostra..... | 24 |
| 1.10 Validação analítica | 26 |
| 1.11 Limites de detecção e de quantificação do método | 28 |
| 2 Objetivos | 29 |
| 3 Experimental | 30 |
| 3.1 Materiais | 30 |
| 3.1.1 Reagentes, Solventes e Padrões..... | 30 |
| 3.1.2 Vidraria e equipamentos | 30 |

| | | |
|--------|--|----|
| 3.2 | Parte Experimental..... | 31 |
| 3.2.1 | Limpeza da vidraria | 31 |
| 3.2.2 | Preparação da mistura padrão | 31 |
| 3.2.3 | Fluorescência | 32 |
| 3.2.4 | Amostragem laboratorial | 32 |
| 3.2.5 | Preparo da amostra..... | 33 |
| 3.2.6 | Estudo de recuperação..... | 33 |
| 3.2.7 | Análise cromatográfica..... | 34 |
| 3.2.8 | Teste t (Student) | 34 |
| 3.3 | Resultados e discussões..... | 35 |
| 3.3.1 | Limpeza da vidraria | 35 |
| 3.3.2 | Otimização das condições de separação..... | 35 |
| 3.3.3 | Otimização da resposta do detector de fluorescência | 40 |
| 3.3.4 | Otimização da repetibilidade do tempo de retenção | 42 |
| 3.3.5 | Linearidade da resposta do sistema HPLC-Flu | 44 |
| 3.3.6 | Limites de detecção e quantificação do sistema cromatográfico..... | 45 |
| 3.3.7 | Otimização da análise de HPAs por GC-MS | 46 |
| 3.3.8 | Tratamento das amostras..... | 53 |
| 3.3.9 | Otimização do solvente de extração..... | 56 |
| 3.3.10 | Estudos de recuperação | 59 |
| 3.3.11 | Limites de detecção e quantificação da metodologia analítica..... | 60 |
| 3.3.12 | Análise de amostras de rapadura | 61 |
| 4 | Conclusões e perspectivas futuras | 64 |
| 5 | Destinação dos Resíduos Químicos | 65 |

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Nova Pirâmide alimentar baseada em grupos funcionais, onde 1 – Carne Vermelha, Manteiga; 2- Arroz branco, Pão, Batata, Massas, Doces; 3 – Suplemento de Cálcio; 4 – Peixes, Aves, Ovos; 5 – Legumes, Oleaginosas ; 6 – Vegetais; 7 – Frutas; 8 – Alimentos Integrais; 9 – Óleos Vegetais e 10- Exercícios Diários. (Fonte: Rebuilding the food pyramid²). .. 1
- Figura 2: Processo produtivo da rapadura⁴ 4
- Figura 3: Produção artesanal de rapadura..... 5
- Figura 4: Proposta hipotética de síntese do Benzo[a]pireno. A espécie 1 é o acetileno, a 2 é 1,3-butadieno, a espécie 3 é o estireno ou etilbenzeno¹⁶. .. 6
- Figura 5- Formação do metabólito mais importante do benzo[a]pireno que se liga a guanina do DNA. 9
- Figura 6: Estruturas químicas dos 17 HPAs (Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos) considerados prioritários pela NIOSH⁹⁰. 10
- Figura 7: Componentes de Cromatógrafo Líquido de Alta Performace⁷²..... 15
- Figura 8: Detector de fluorescência utilizado para detecção no HPLC⁷⁹ 18
- Figura 9: Diagrama esquemático de um cromatógrafo a gás⁷². 19
- Figura 10: Diagrama esquemático de analisador de íons, tipo íon-trap, utilizado em alguns espectrômetros de massas⁸¹ 20
- Figura 11: Cromatograma com as medidas relacionadas à determinação de parâmetros cromatográficos⁷². 21
- Figura 12: Assimetria de picos (a) cauda frontal e (b) cauda..... 24
- Figura 13: Triângulo de seletividade para solventes⁷⁷. 25
- Figura 14: Cromatograma referente à limpeza da vidraria. 35
- Figura 15: Gradiente utilizado para a determinação dos HPAs por HPLC-Flu, 60%(5 min)-----20min-----100%(15 min). 37
- Figura 16: Nomograma de força de Acetonitrila-Água e Metanol-Água⁷⁶..... 37
- Figura 17: Variação da resolução cromatográfica para o par Fenantreno/Antraceno em função da vazão da fase móvel (mL min⁻¹). 38
- Figura 18: Cromatogramas dos HPAs por HPLC-Fluorêscencia: **A-**) Método oficial 8310 da agência norte-americana EPA, utilizando-se de coluna HC – ODS Sil – X e vazão de 0,5 mL/min (Fonte: www.epa.gov/sw-846/pdfs/8310.pdf)⁷⁰, **B-**) Método otimizado neste trabalho. 39
- Figura 19: Fluorescência tridimensional do (a)Fenantreno, (b) Benzo(k)fluoranteno e (c)Indeno (1,2,3-cd)pireno. 40

| | |
|---|----|
| Figura 20: Espectros de excitação e emissão molecular dos padrões: Naftaleno, Acenaftileno, Acenafteno e Fluoreno. | 41 |
| Figura 21: Espectros de excitação e emissão do indeno(1,2,3-cd)pireno. | 42 |
| Figura 22: Coluna cromatográfica protegida contra variações da temperatura utilizando Isopor TM | 43 |
| Figura 23: Estudo da repetibilidade do tempo de retenção antes e depois da adição de isopor na coluna cromatográfica..... | 43 |
| Figura 24: Curva de linearidade do Fluoranteno no HPLC-Flu..... | 44 |
| Figura 25: Otimização do modo de injeção no GC-MS para a determinação dos HPAs..... | 47 |
| Figura 26: Comparação de modos de injeção por split e splitless..... | 47 |
| Figura 27: Influência da temperatura do injetor na detecção dos HPAs..... | 48 |
| Figura 28: Otimização da vazão do gás de arraste (He) na determinação de HPAs..... | 49 |
| Figura 29: Diferença na sensibilidade na resposta do detector de espectrometria de massas na determinação de HPAs em diversas vazões de fase móvel (Pico 5 – 1 mL min ⁻¹ ; 4 – 1,5 mL min ⁻¹ ; 3 – 2 mL min ⁻¹ ; 2 – 2,5 mL min ⁻¹ ; 1 – 3 mL min ⁻¹). | 49 |
| Figura 30: Otimização do tempo de scan na resposta do espectrômetro de massas para os HPAs. | 50 |
| Figura 31: Otimização da voltagem da eletromultiplicadora na resposta do espectrômetro de massas para os HPAs..... | 50 |
| Figura 32: Otimização da corrente de emissão na resposta do espectrômetro de massas para os HPAs. | 51 |
| Figura 33: Fragmentograma do naftaleno no modo MS, o íon de maior intensidade m/z (128) foi selecionado para fazer o método MS-MS. | 52 |
| Figura 34: Extração do benzo(a)antraceno da rapadura com diclorometano..... | 54 |
| Figura 35: Superfície de resposta para determinação das condições ótimas de extração utilizando diclorometano como solvente..... | 55 |
| Figura 36: Posição das amostras extraídas no banho ultrassônico (coordenadas: z (profundidade)= 5 cm, x = 25 cm e y= 4,5; 15,5 e 26 cm). | 56 |
| Figura 37: Gráfico do estudo da eficiência de extração dos 12 HPAs, com diferentes proporções de solventes..... | 57 |
| Figura 38: Cromatogramas referentes à amostra testemunha e a amostra fortificada, indicando que não houve interferentes durante o processo de extração. Níveis de fortificação na Tabela 14. | 58 |

| | |
|--|----|
| Figura 39: Fluxograma para o tratamento da amostra, os solventes utilizados estão indicados na Figura 37. | 58 |
| Figura 40: Cromatogramas das rapaduras comercializadas em Natal-RN (A e B) e em Araraquara-SP (C)..... | 61 |
| Figura 41: Fragmentogramas encontrados nas análises de rapadura por GC-MS-MS..... | 62 |
| Figura 42: Fragmentogramas das moléculas encontradas na rapadura por análise em GC-MS. | 63 |
| Figura 43: Curvas analíticas dos HPAs estudados..... | 1 |
| Figura 44: Recuperação média dos HPAs (triplicata) na rapadura com diclorometano, utilizada para a otimização de massa/volume de extração, concentração de cada HPA apresentada na Tabela 14. | 2 |
| Figura 45: Fragmentograma do acenafteno no modo MS, o íon de maior intensidade m/z (153) foi selecionado para fazer o método MS-MS. | 3 |
| Figura 46: Fragmentograma do acenaftileno no modo MS, o íon de maior intensidade m/z (152) foi selecionado para fazer o método MS-MS. | 3 |
| Figura 47: Fragmentograma do fluoreno no modo MS, o íon de maior intensidade m/z (166) foi selecionado para fazer o método MS-MS..... | 4 |
| Figura 48: Fragmentograma do fenantreno no modo MS, o íon de maior intensidade m/z (178) foi selecionado para fazer o método MS-MS. | 4 |
| Figura 49: Fragmentograma do antraceno no modo MS, o íon de maior intensidade m/z (178) foi selecionado para fazer o método MS-MS. | 5 |
| Figura 50: Fragmentograma do fluoranteno no modo MS, o íon de maior intensidade m/z (202) foi selecionado para fazer o método MS-MS. | 5 |
| Figura 51: Fragmentograma do pireno no modo MS, o íon de maior intensidade m/z (202) foi selecionado para fazer o método MS-MS..... | 6 |
| Figura 52: Fragmentograma do benzo[a]antraceno no modo MS, o íon de maior intensidade m/z (228) foi selecionado para fazer o método MS-MS. | 6 |
| Figura 53: Fragmentograma do criseno no modo MS, o íon de maior intensidade m/z (228) foi selecionado para fazer o método MS-MS..... | 7 |
| Figura 54: Fragmentograma do benzo[e]pireno no modo MS, o íon de maior intensidade m/z (252) foi selecionado para fazer o método MS-MS. | 7 |
| Figura 55: Fragmentograma do benzo[e]acenantrileno no modo MS, o íon de maior intensidade m/z (252) foi selecionado para fazer o método MS-MS. . | 8 |
| Figura 56: Fragmentograma do benzo[k]fluoranteno no modo MS, o íon de maior intensidade m/z (252) foi selecionado para fazer o método MS-MS. | 8 |

- Figura 57: Fragmentograma do benzo[a]pireno no modo MS, o íon de maior intensidade m/z (252) foi selecionado para fazer o método MS-MS. 9
- Figura 58: Fragmentograma do dibenzo[a,h]antraceno no modo MS, o íon de maior intensidade m/z (278) foi selecionado para fazer o método MS-MS. . 9
- Figura 59: Fragmentograma do benzo[g,h,i]perileno no modo MS, o íon de maior intensidade m/z (276) foi selecionado para fazer o método MS-MS. 10
- Figura 60: Fragmentograma do indeno(1,2,3-cd)pireno no modo MS, o íon de maior intensidade m/z (276) foi selecionado para fazer o método MS-MS. 10

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1: Informação nutricional em uma porção de 25 g de rapadura. | 3 |
| Tabela 2: Características físico-químicas dos HPAs | 7 |
| Tabela 3: Características mutagênicas e carcinogênicas dos HPAs..... | 8 |
| Tabela 4: Solventes orgânicos e seus efeitos tóxicos ⁷⁸ | 17 |
| Tabela 5: Parâmetro de polarizabilidade P' de alguns solventes ⁷⁷ | 25 |
| Tabela 6: Concentrações de cada HPA na solução estoque em acetonitrila..... | 32 |
| Tabela 7: Solução mista dos HPAs..... | 36 |
| Tabela 8: Resolução obtida com a otimização de α | 37 |
| Tabela 9: Comprimentos de ondas utilizados na literatura para a determinação de HPAs e número de substâncias detectadas. | 41 |
| Tabela 10: Comprimentos de onda escolhidos para detecção dos HPAs..... | 42 |
| Tabela 11: Linearidade, equações das curvas de calibração e coeficiente de correlação (R^2) para os 16 HPAs estudados. | 45 |
| Tabela 12: Limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) do equipamento (HPLC-Flu) para os contaminantes estudados. | 46 |
| Tabela 13: Íons pais selecionados de cada HPA, através dos fragmentogramas no modo MS. | 52 |
| Tabela 14: Concentração de cada HPA fortificado na rapadura, utilizado na otimização de extração. (correspondendo ao nível médio da curva de calibração). | 53 |
| Tabela 15: Planejamento de experimentos para a otimização da extração de HPAs em rapadura (n=3)..... | 55 |
| Tabela 16: Níveis de fortificação, porcentagens de recuperação e coeficiente de variação (triplicatas) para os HPAs utilizando-se de método descrito na Figura 39..... | 59 |
| Tabela 17: Recuperação do analito em função da concentração..... | 60 |
| Tabela 18: Limites de detecção e quantificação do método segundo Thier (descrito na seção 1.11). | 60 |
| Tabela 19: Resultados das análises das rapaduras comercializadas em Natal-RN (A e B) e em Araraquara-SP (C). | 62 |
| Tabela 20: Relação de substâncias encontradas na rapadura por GC-MS. | 63 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ACN = Acetonitrila

CAS Nº= Registro no Chemical Abstracts

CPA(s) = Composto(s) Policíclico(s) Aromático(s)

CV = Coeficiente de variação

DCM = Diclorometano

FLU= Fluorescência

FM = Fórmula Molecular

g = Grama

GC= Cromatografia gasosa

HPA(s) = Hidrocarboneto(s) Policíclico(s) Aromático(s)

HPLC = Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

IR = Índice de Retenção

L = Litro

LD = Limite de detecção

LQ = Limite de quantificação

MeOH = Metanol

min = Minuto

MS = Espectrometria de massas

MS/MS = Espectrometria de massas/ Espectrometria de massas

N = Número de pratos teóricos

NIOSH = National Institute of Occupational Safety and Health (Orgão norte-americano de saúde e segurança ocupacional)

PE = Ponto de Ebulição

PF = Ponto de Fusão

PM = Peso Molecular

R² = Coeficiente de correlação

SCAN = Varredura total de íons

SD = Desvio Padrão

tr = Tempo de retenção

λ_{em} = Comprimento de onda de emissão

λ_{ex} = Comprimento de onda de excitação

μg = Micrograma (10⁻⁶ g)

°C = Graus Celsius

k' = Fator de Separação

α = Seletividade

1 Introdução

1.1 Alimentos e a rapadura

Conseqüências adversas podem resultar do consumo de alimentos que incluam constituintes prejudiciais à saúde, como microorganismos patogênicos, toxinas, parasitas viáveis, agentes alérgicos e inúmeros contaminantes químicos, oriundos de atividades ligadas ou não à produção de alimentos¹.

Os carboidratos constituem a principal fonte de energia dos alimentos e estão disponíveis em formas simples como glicose, frutose e sacarose e formas complexas como batata, milho, feijão, arroz e etc. Deve-se consumir uma percentagem relativamente alta de calorias diárias provenientes de carboidratos, pois eles são importantes para as contrações musculares e não são estocados em grandes quantidades².

Willett e Stampfer propuseram uma nova pirâmide alimentar baseada em alimentos funcionais. (Figura 1)².

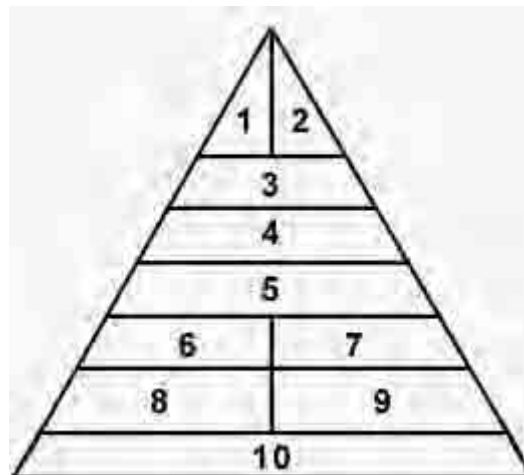


Figura 1: Nova Pirâmide alimentar baseada em grupos funcionais, onde 1 – Carne Vermelha, Manteiga; 2- Arroz branco, Pão, Batata, Massas, Doces; 3 – Suplemento de Cálcio; 4 – Peixes, Aves, Ovos; 5 – Legumes, Oleaginosas ; 6 – Vegetais; 7 – Frutas; 8 – Alimentos Integrais; 9 – Óleos Vegetais e 10- Exercícios Diários. (Fonte: Rebuilding the food pyramid²).

O Programa Nacional de Alimentação Escolar (PNAE) é o maior programa de alimentação em atividade no Brasil, sendo que diariamente mais de 37 milhões de refeições são servidas nas escolas públicas do País. A merenda escolar é considerada a principal refeição do dia para 50% dos alunos da região Nordeste e 56% para a região Norte³.

Uma merenda saudável e nutritiva é, nesse sentido, base para o crescimento das gerações que construirão o futuro deste País³. Um aspecto fundamental é que cada refeição deve ter, pelo menos, um alimento de cada grupo alimentar: construtores (proteínas), energéticos (carboidratos e gorduras) e reguladores (vitaminas e minerais). A refeição deve conter uma proporção de: 45 a 65% de carboidratos, 10 a 30% de proteína e 25 a 35% de gordura. A rapadura é considerada alimento básico para o Programa Nacional de Alimentação Escolar do Governo Federal³.

A rapadura é um produto sólido, de sabor doce, rica em vitaminas e ferro (Tabela 1), possui alto teor energético, é obtida pela concentração a quente do caldo da cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*), geralmente é comercializada na própria unidade de produção e em cidades próximas, é muito consumida pela população do Nordeste do Brasil, especialmente no sertão, formado por camadas sociais de baixo poder aquisitivo e, ao mesmo tempo, reduzidas exigências em qualidade⁴.

Tabela 1: Informação nutricional em uma porção de 25 g de rapadura.

| | |
|-----------------|---------|
| Carboidratos | 22 g |
| Proteínas | 0 g |
| Gorduras Totais | 0 g |
| Cálcio | 43,5 mg |
| Ferro | 1,0 mg |
| Sódio | 30,0 mg |
| Valor Calórico | 80 Kcal |

A rapadura vem sendo introduzida na merenda escolar de vários municípios e nas cestas básicas distribuídas às famílias pobres pelo Governo⁵. O consumo da rapadura no Brasil é de 1 kg por habitante/ano. O maior consumidor mundial é a Colômbia, com a marca de 25 kg por habitante/ano, além de ser também primeiro país produtor de rapadura na América e o segundo do mundo depois da Índia⁵. No Brasil, o consumo da rapadura manteve-se principalmente no Nordeste, mesmo tendo que enfrentar a concorrência do açúcar e de outros adoçantes, principalmente nas regiões semi-áridas. Nas cidades de grande porte da região a rapadura é comercializada, principalmente, nas feiras livres e em menor escala em grandes cadeias de supermercados. São Paulo tornou-se também um consumidor que merece destaque, devido aos migrantes nordestinos⁵.

Na Colômbia, um dos poucos países que possuem estatísticas oficiais deste setor, registra-se uma produção anual de rapadura que oscila entre 700.000 e 900.000 toneladas por ano. No Brasil, estima-se em 40.000 o número de unidades de produção⁶.

1.2 Produção de rapadura

A produção de rapadura tem como insumo básico a cana-de-açúcar, que deve ser cultivada sem defensivos agrícolas tóxicos ou adubos químicos, colhida manualmente, sem o recurso da queimada (utilizada normalmente para facilitar a colheita) e colocada nos caminhões transportadores sem mecanização. Estas condições, nem sempre satisfeitas no processo real de produção, são necessárias para assegurar a qualidade adequada do produto natural compatível com as exigências do mercado⁴.

O processo de produção da rapadura consiste em: lavagem e desfibramento da cana, moagem e filtração, concentração e cozimento do caldo, apuração do ponto do melado; batida do melado, enformamento da massa; secagem, desenformamento e embalagem, representado na Figura 2⁴.

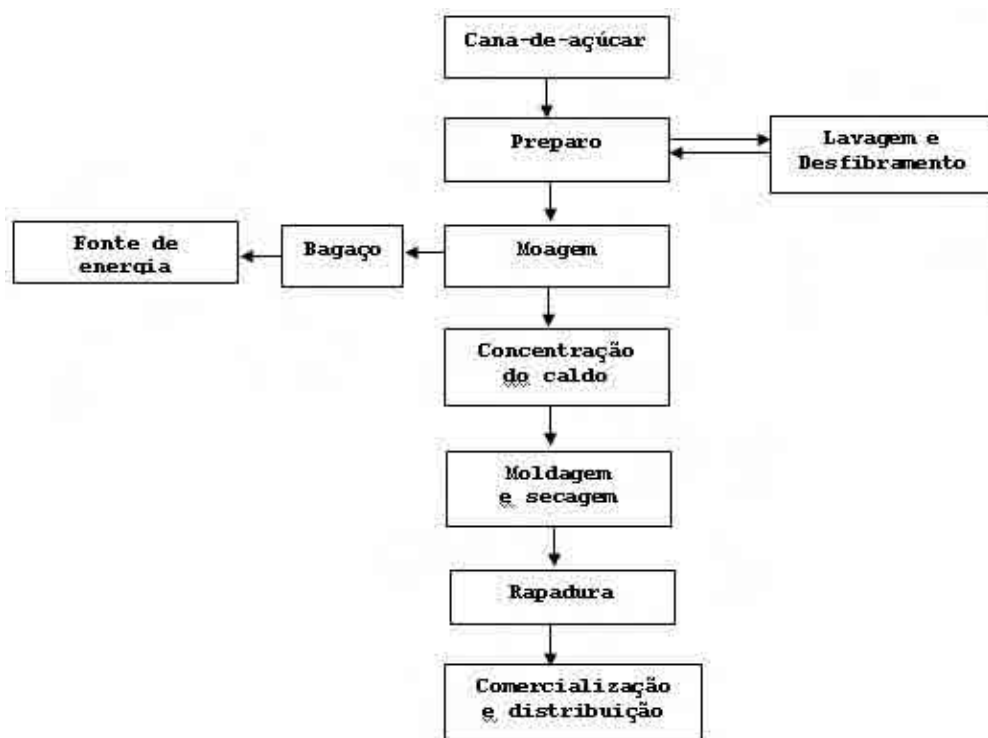


Figura 2: Processo produtivo da rapadura⁴.

1.3 Fontes de contaminação

A combustão de biomassa, como madeira, a palha e o bagaço de cana, podem originar inúmeros compostos provenientes da queima incompleta, dentre os quais se encontram: álcoois, aldeídos, cetonas, ésteres, benzóis, fenóis e compostos aromáticos como HPAs (Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos¹), considerados como potencialmente carcinogênicos/ mutagênicos^{1,7,8}.

Se a combustão da madeira for realizada a temperaturas superiores a 350^o C, a decomposição da matéria orgânica produz substâncias mutagênicas e/ou cancerígenas e entre elas encontram-se os HPAs. Para evitar o aparecimento destes compostos, a temperatura de produção da fumaça deverá ser sempre inferior a 350^o C, visto que a esta temperatura, a produção destes compostos considerados cancerígenos é muito baixa (0,179 a 0,095) $\mu\text{g Kg}^{-1}$, muito aquém do limite de 1,0 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ em alimentos, estabelecido como limite máximo, por legislações existentes em alguns países¹.

Cinco possíveis fontes podem inserir os HPAs na rapadura: 1) A cana-de-açúcar (insumo básico para a rapadura), colhida com o recurso da queimada⁹; 2) Mecanização, devido aos caminhões transportadores¹⁰; 3) No processo de moagem da cana que poderá ser contaminada por óleos/graxas¹¹; 4) Ambiente com formação de muita fumaça¹² (Figura 3), devido à queima do bagaço de cana utilizado como fonte de aquecimento do caldo e 5) de materiais de embalagem¹³.



Figura 3: Produção artesanal de rapadura.¹⁴

Estudos na Holanda demonstraram que a ingestão de açúcar puro e produtos açucarados são fontes importantes de HPAs na dieta da população. As análises destes produtos apresentaram teores de criseno de até $36 \mu\text{g}/\text{kg}^{15}$. As análises de amostras de açúcares comerciais brasileiros indicaram a presença de HPAs em concentrações que variam de $0,25$ a $0,83 \mu\text{g}/\text{kg}^{12}$.

1.4 HPAs

Os HPAs são uma grande classe de compostos contendo dois ou mais anéis aromáticos fundidos, constituídos somente por átomos de H e C e são uma subclasse dos compostos policíclicos aromáticos (CPAs).

1.4.1 Origem

A origem dos HPAs está na combustão incompleta de qualquer material orgânico, envolvendo dois processos principais que são¹⁶.

Pirólise: quebra parcial de compostos orgânicos em moléculas menores instáveis em altas temperaturas.

Pirrossíntese: os fragmentos formados na pirólise, na maioria radicais, recombina-se para formar hidrocarbonetos aromáticos relativamente estáveis.

A Figura 4 ilustra a síntese hipotética proposta para o benzo[a]pireno.

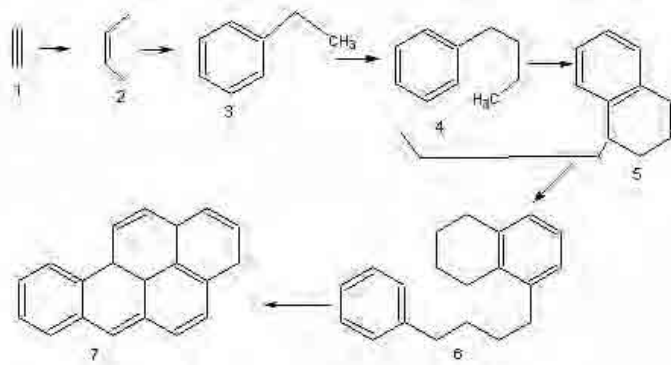


Figura 4: Proposta hipotética de síntese do Benzo[a]pireno. A espécie 1 é o acetileno, a 2 é 1,3-butadieno, a espécie 3 é o estireno ou etilbenzeno¹⁶.

1.4.2 Propriedades físico-químicas

Na Tabela 2, estão apresentadas algumas das propriedades físicas dos HPAs estudados.

Tabela 2: Características físico-químicas dos HPAs¹⁷

| HPA | FM | MM | CAS Nº | PF/°C | PE/°C | Sinônimos |
|-------------------------|---------------------------------|--------|----------|-------|-------|---|
| Naftaleno | C ₁₀ H ₈ | 128,17 | 91-20-3 | 80,2 | 218 | nafteno |
| Acenaftileno | C ₁₂ H ₈ | 152,20 | 208-96-8 | 92,5 | 280 | Acenaftaleno |
| Acenafteno | C ₁₂ H ₁₀ | 154,21 | 83-32-9 | 93,4 | 279 | |
| Fluoreno | C ₁₃ H ₁₀ | 166,22 | 86-73-7 | 115 | 295 | |
| Fenantreno | C ₁₄ H ₁₀ | 178,23 | 85-01-8 | 99,2 | 340 | |
| Antraceno | C ₁₄ H ₁₀ | 178,23 | 120-12-7 | 215 | 340 | |
| Fluoranteno | C ₁₆ H ₁₀ | 202,26 | 206-44-0 | 108 | 384 | Benzo[j,k]fluoreno |
| Pireno | C ₁₆ H ₁₀ | 202,26 | 129-00-0 | 151 | 404 | Benzo[d,e,f]fenantreno |
| Benzo(a)antraceno | C ₁₈ H ₁₂ | 228,29 | 56-55-3 | 167 | 435 | 1,2-benzantraceno; benzo[b]fenantreno; 2,3-benzofenantreno; tetrafenno |
| Criseno | C ₁₈ H ₁₂ | 228,29 | 218-01-9 | 258 | 448 | 1,2-benzofenantreno; benzo[a]fenantreno |
| Benzo(e)acefenantrileno | C ₂₀ H ₁₂ | 252,32 | 205-99-2 | 168 | - | Benzo[b]fluoranteno; 3,4-benzofluoranteno; 2,3-benzofluoranteno |
| Benzo(k)fluoranteno | C ₂₀ H ₁₂ | 252,32 | 207-08-9 | 217 | 480 | 11,12-benzofluoranteno |
| Benzo(a)pireno | C ₂₀ H ₁₂ | 252,32 | 50-32-8 | 177 | 495 | 3,4-benzopireno; 6,7-benzopireno |
| Dibenzo(a,h)antraceno | C ₂₂ H ₁₄ | 278,35 | 53-70-3 | 270 | 524 | 1,2,5,6-dibenzantraceno |
| Benzo(g,h,i)perileno | C ₂₂ H ₁₂ | 276,34 | 191-24-2 | 278 | - | 1,12-benzoperileno |
| Indeno(1,2,3-cd)pireno | C ₂₂ H ₁₂ | 276,34 | 193-39-5 | 164 | - | 2,3-fenilenopireno |

FM- Fórmula Molecular; MM- Massa Molar (g/mol); CAS- Chemical Abstracts Service; PE- Ponto de Ebulição; PF - Ponto de Fusão.

Os HPAs são solúveis em solventes de baixa polaridade como: diclorometano, *n*-hexano, benzeno e outros¹⁷. A decomposição dos HPAs é função da natureza do oxidante ao qual o HPA está exposto, do substrato sobre o qual ele está adsorvido, da temperatura ambiente, da presença ou ausência de luz e da umidade relativa¹⁸.

1.4.3 Características carcinogênicas e mutagênicas dos HPAs

A monitorização de HPAs em alimentos é de grande importância, por serem compostos considerados carcinogênicos e/ou mutagênicos,

principalmente os de dois a seis anéis. A atividade carcinogênica de um composto particular é dependente de diversos fatores estruturais da molécula como forma, tamanho, fatores estéricos e potencial de ionização¹⁶. A Tabela 3 apresenta as características mutagênicas e carcinogênicas dos HPAs estudados.

Tabela 3: Características mutagênicas e carcinogênicas dos HPAs¹⁹

| HPAs | Mutagenicidade | Carcinogenicidade |
|-------------------------|----------------|-------------------|
| Acenafteno | ? | ? |
| Acenaftileno | ? | Não estudado |
| Benzo[a]antraceno | + | + |
| Benzo[e]acefenantrileno | + | + |
| Benzo[k]fluoranteno | + | + |
| Benzo[a]pireno | + | + |
| Dibenzo[a,h]antraceno | + | + |
| Fluoranteno | + | + |
| Naftaleno | - | ? |
| Fluoreno | - | - |
| Fenatreno | ? | ? |
| Antraceno | - | - |
| Pireno | ? | ? |
| Criseno | + | + |
| Benzo[e]pireno | + | - |
| Benzo[g,h,i]perileno | + | - |
| Indeno[1,2,3-cd]pireno | + | + |

+ positivo, - negativo, ? questionável
 Fonte: World Health Organization¹⁹

Sabe-se que os HPAs são metabolizados pelo sistema oxidase microsomal de função mista. A primeira etapa da via metabólica é catalisada pelo citocromo P₄₅₀, introduzindo grupos epóxidos nos anéis aromáticos. Uma segunda enzima, a epóxido-hidrolase (EH), converte os epóxidos em dihidrodíóis que podem ser

novamente oxidados pelo mesmo sistema oxidase e formar os dióis epóxidos²⁰. Os epóxidos e dióis epóxidos são os metabólitos mutagênicos resultantes dos HPAs. Estes compostos ligam-se ao DNA, por meio de uma ligação covalente entre o carbono benzílico do grupo epóxido e os sítios nucleófilos básicos do DNA (nitrogênio das bases pirimidícas dos ácidos nucleicos). Presume ser este o início do evento carcinogênico²¹.

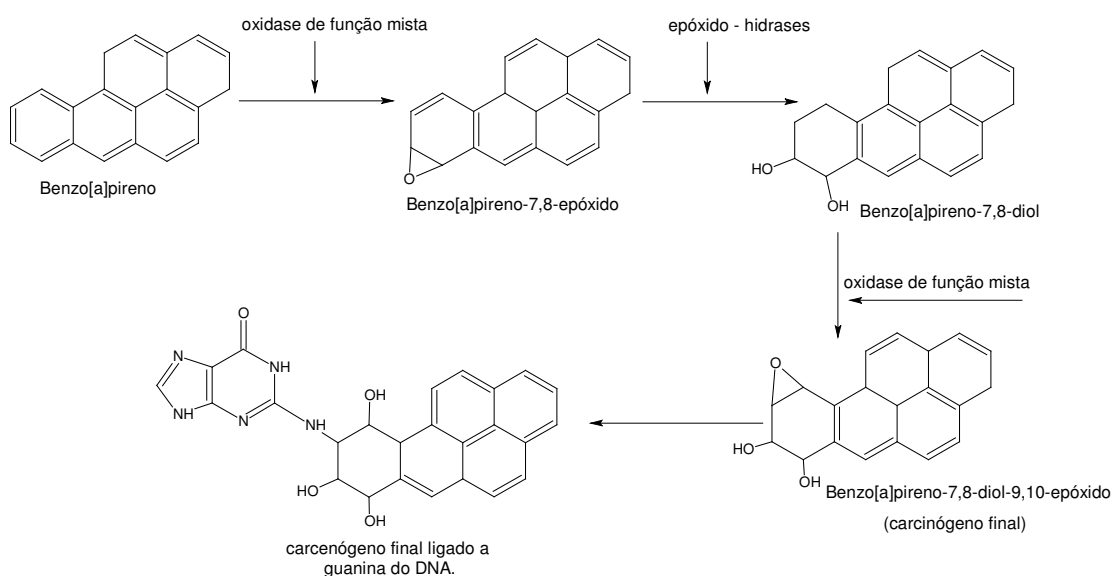


Figura 5- Formação do metabólito mais importante do benzo[a]pireno que se liga a guanina do DNA²².

Na Figura 6, estão representados os 17 HPAs considerados prioritários pelo NIOSH, *National Institute for Occupational and Safety Health*, devido a sua mutagenicidade/carcinogenicidade⁹⁰.

No Brasil a legislação²³ menciona o benzo[a]pireno como contaminante prioritário a ser monitorado em água para consumo humano com limite de $0,7 \mu\text{g L}^{-1}$ e $2 \mu\text{g kg}^{-1}$ em azeite de caroço de azeitona ou óleo de bagaço e/ou caroço de oliva²⁴. Agências européias²⁵ possuem legislação para benzo[a]pireno em azeite de oliva ($2 \mu\text{g Kg}^{-1}$) e para outros HPAs ($5 \mu\text{g Kg}^{-1}$). A associação alemã "The German Society for Fat Science"²⁶ fixou para o teor total de HPAs em

alimentos o limite de 25 µg L-1.

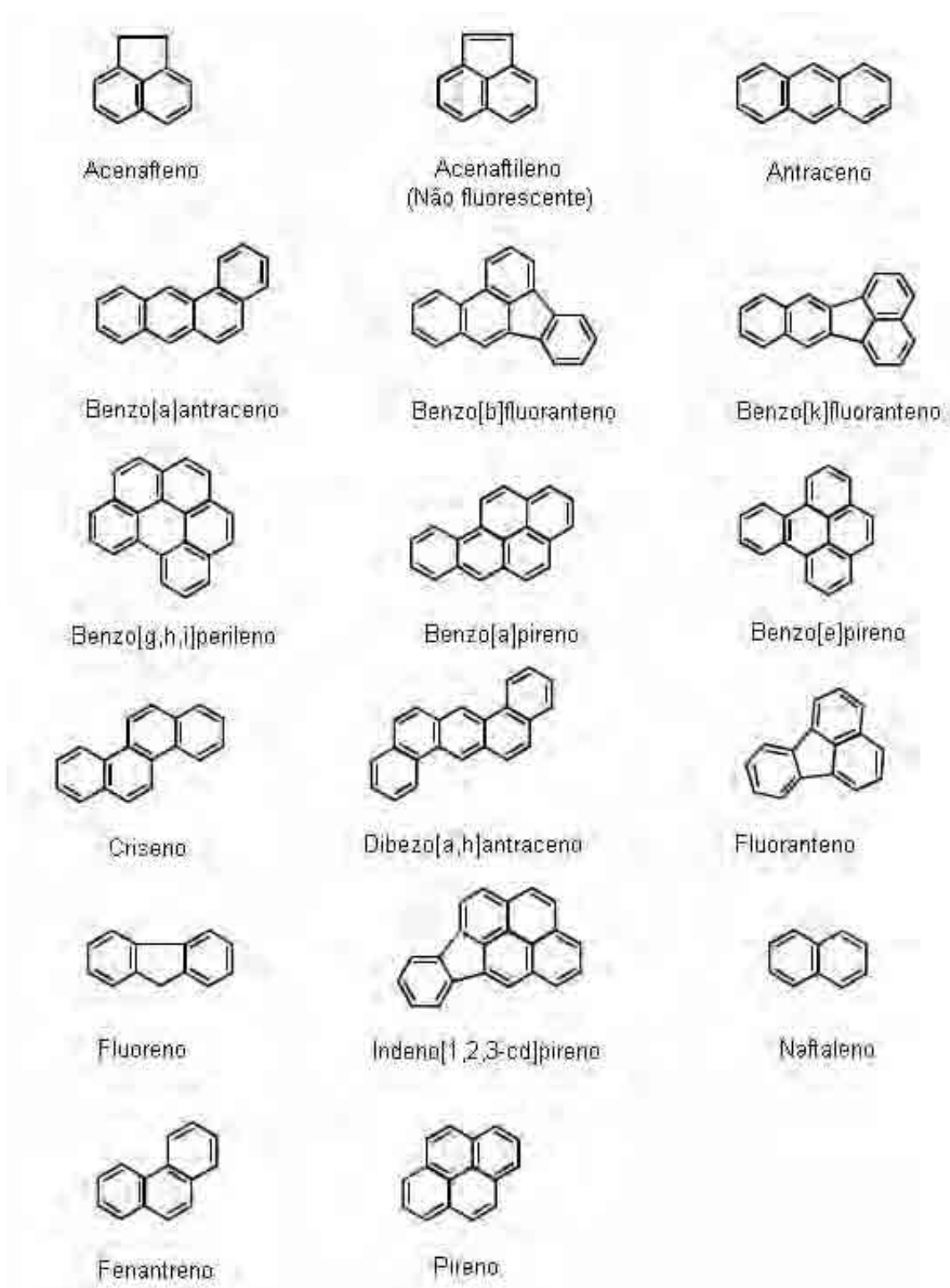


Figura 6: Estruturas químicas dos 17 HPAs (Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos) considerados prioritários pela NIOSH90.

1.5 Análise de HPAs em alimentos e outras matrizes sólidas

Dentre os alimentos, a presença de HPAs tem sido investigada principalmente em alimentos de origem animal (carnes, embutidos, defumados, etc.)^{27,28,29} e outros alimentos gordurosos (óleos vegetais, margarinas, etc.)^{26,30,31}.

Nenhum trabalho na literatura trata de determinação de HPAs em rapadura, por isso aqui também são relatados trabalhos que tratam de determinação de HPAs em matrizes sólidas. Métodos cromatográficos para a determinação de HPAs incluem cromatografia gasosa com detecção por ionização em chama ou espectrometria de massas^{32,33,34,35} e cromatografia líquida de alta eficiência com detectores espectrofotométricos ou fluorimétricos^{33,34,35,36,37,38,39,40,41}. Devido à alta resolução⁴², seletividade e sensibilidade⁴³ destes compostos em HPLC-Fluorêscencia, esta técnica tornou-se muito utilizada para a determinação destes contaminantes.

Dentre as várias etapas envolvidas no preparo de amostras, destacam-se a extração do analito da matriz com solvente adequado, que tenha uma alta interação com os analitos presentes na matriz, *clean up* (remoção de interferentes), a pré-concentração e ajuste do volume com solvente adequado, para a injeção no sistema cromatográfico. Para amostras sólidas, existem várias técnicas descritas na literatura: extração com fluido pressurizado, fluido supercrítico, com solventes utilizando equipamento Soxhlet, por microondas e ultrassonicação.

Para extração dos HPAs em amostras sólidas, são utilizadas diversas técnicas como: soxhlet^{44,45,46}, ultrassonicação^{44,46}, extração com fluido

supercrítico^{47,48,49} e por microondas^{50,51}. Vários adsorventes são usados para *clean-up* da amostra, como: sílica gel⁵², alumina⁵³, sílica aminopropil⁵⁵, sílica cianopropil⁵⁵, florissil⁵⁴, carbono grafitilizado⁵⁵ e mistura de sílica gel com alumina (3:1)⁵⁵. Os principais solventes utilizados para a extração dos HPAs são: Acetonitrila (ACN)^{56,57}, acetona⁵⁸, diclorometano (DCM)⁵⁹ além de mistura de solventes, *n*-hexano:acetona (1:1)⁶⁰, DCM:acetona (1:1)⁶¹, éter de petróleo:acetona (1:1)⁶², DCM:*n*-hexano (1:1)⁶³ acetona:ciclohexano (1:1)⁶⁴ com boas recuperações dos analitos (60-120%)^{59,63}.

Os solventes mais utilizados como fase móvel no HPLC são principalmente acetonitrila:água^{65,66,67} e metanol:água⁶⁸. Os valores de comprimentos de onda utilizados, variam muito entre os trabalhos científicos^{38,39,69}, sendo que a agência norte-americana, NIOSH recomenda como comprimento de onda de excitação 340 nm e 425 nm de emissão⁹⁰, utilizando-se de coluna C-18 250mm x 4,6 mm x 5 µm, os limites de detecção encontraram-se entre 0,0010 e 0,20 µg. A EPA (*Environmental Protection Agency*)⁷⁰ preconiza 280 nm para excitação e 389 nm para emissão com detecção por fluorescência, sendo que o limite de detecção situa-se entre 5 e 50 pg µL⁻¹.

Escrivá e colaboradores⁷¹ estudaram a determinação de HPAs em material particulado atmosférico utilizando HPLC/UV, HPLC/Fluorescência, GC-FID e GC-MS. O comprimento de onda utilizado no UV foi 250 nm enquanto no detector de fluorescência foram, respectivamente 290 e 385 nm para excitação e emissão. Os limites de detecção do método para HPLC/Fluorescência se mostraram muito menores que no HPLC/UV, sendo que em fluorescência ficou entre 0,01 e 2 ng e em UV entre 2 e 23 ng.

1.6 Cromatografia líquida de alta eficiência

O processo cromatográfico consiste na passagem de uma fase móvel (FM) sobre uma fase estacionária (FE), em que ocorre a distribuição dos componentes da mistura entre as duas fases, de tal forma que cada componente é seletivamente retido pela fase estacionária. A fase móvel é bombeada sob alta pressão e a uma vazão controlada. Uma pequena quantidade de amostra é introduzida através de uma válvula de injeção, sendo arrastada pela fase móvel através da coluna até o detector⁷².

As separações em CLAE dependem fundamentalmente da composição das fases móvel e estacionária. A fase estacionária, devido às suas propriedades de superfície, exerce papel decisivo nos mecanismos de separação de substâncias químicas, além de que uma força eluotrópica também é essencial para que ocorra uma melhor resolução química⁷³.

Os mecanismos de retenção em cromatografia líquida consistem de repetidas etapas de sorção e dessorção ou de partição, que acontecem ao longo da coluna cromatográfica. A separação ocorre graças à diferença entre os coeficientes de distribuição de componentes distintos entre fase estacionária e fase móvel. Os processos físicos de sorção e dessorção são baseados principalmente em atrações eletrostáticas ou dipolares (forças de Van Der Waals), incluindo a formação de pontes de hidrogênio, e os de partição baseiam-se na diferença de solubilidade dos componentes da amostra na fase estacionária e na fase móvel⁷³.

As fases estacionárias mais utilizadas em HPLC, atualmente, são as do tipo fase reversa (HPLC-RP), onde a fase estacionária apresenta polaridade menor que a fase móvel. Estima-se que mais de 95% dos laboratórios usuários

de HPLC empregam fases estacionárias tipo reversa⁷⁴. A HPLC-RP usa, quase que exclusivamente, colunas recheadas com partículas de um suporte cromatográfico ao qual se encontram, quimicamente ligadas, cadeias moleculares orgânicas simples ou complexas. As fases reversas apresentam vantagens como o uso de fases móveis de menor custo (Água, Metanol e Acetonitrila); rápido equilíbrio da coluna após a troca da fase móvel, facilidade em se empregar eluição por gradiente; maior rapidez nas análises com maior reprodutibilidade de tempo de retenção⁷⁴.

Mais de 90% das separações com colunas de fase reversa em HPLC utilizam fases móveis feitas com misturas de metanol:água ou acetonitrila:água. Outras misturas do tipo orgânico:água, tais como acetona:água, etanol:água e isopropanol:água foram testadas há mais de 20 anos, mas foram consideradas menos satisfatórias. Vários problemas foram observados com estas fases, tais como a dificuldade de purificá-las, resultando na alta absorção na região UV-VIS, ou a necessidade de pressões mais elevadas para empurrar a fase móvel através da coluna, devido a maior viscosidade destes solventes⁷⁵. A Figura 7, ilustra os principais componentes de um Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência: Fases móveis (solventes A,B), bomba, injetor, coluna cromatográfica, detector e sistema de aquisição de dados⁷².

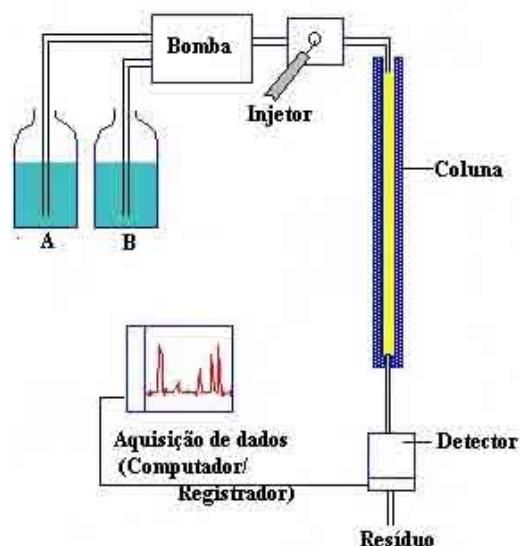


Figura 7: Componentes de Cromatógrafo Líquido de Alta Performance⁷².

1.6.1 Seleção do solvente em HPLC

Uma das mais importantes etapas na cromatografia líquida é a seleção da fase móvel. Para obter os melhores resultados a escolha deve considerar as propriedades químicas e físicas, além da pureza dos solventes⁷⁵. Vários fatores devem ser observados para a escolha do solvente a ser usado para o desenvolvimento cromatográfico. Os critérios de escolha começam pelas características físico-químicas adequadas ao tipo de análise a ser realizada. As propriedades mais importantes citadas, entre outras, pelos autores são: compatibilidade com o detector; viscosidade e ponto de ebulição, miscibilidade dos componentes da fase móvel, compatibilidade com a fase estacionária, dissolução da amostra, pureza e toxicidade do solvente⁷⁶.

1.6.1.1 Compatibilidade com o detector

A escolha do solvente para o desenvolvimento cromatográfico é feita em função dos componentes da amostra a ser separada, já que o solvente não deve absorver na mesma região do analito⁷⁶.

1.6.1.2 Viscosidade e Ponto de Ebulição

A viscosidade da fase móvel é uma das propriedades físico-químicas mais importantes, já que pode influenciar consideravelmente na separação cromatográfica. O equilíbrio na troca de massa do soluto entre fase móvel e a fase estacionária pode ser mais lento quando fases móveis mais viscosas são utilizadas, obtendo picos mais largos e assimétricos. Uma maior viscosidade resulta numa pressão maior, comprometendo a vida útil da coluna⁷⁷.

1.6.1.3 Miscibilidade

Um outro fator muito importante é a miscibilidade dos solventes escolhidos para a composição da fase móvel. Dois componentes que são misturados em qualquer proporção, sem que haja a formação de duas fases separadas, são considerados completamente miscíveis⁷⁵. É imprescindível que esta condição seja satisfeita, para que não haja formação de emulsão dentro do sistema cromatográfico.

1.6.1.4 Compatibilidade com a fase estacionária

Outro aspecto bastante importante e que deve ser avaliado antes de qualquer corrida cromatográfica é a compatibilidade da fase móvel com a fase estacionária, pois caso este pré-requisito não seja atendido a fase móvel pode dissolver a fase estacionária⁷³. Em cromatografia de fase reversa utiliza-se solventes com alta polaridade como metanol, acetonitrila e tetrahidrofurano⁷³.

1.6.1.5 Compatibilidade com os componentes da amostra

A amostra a ser separada deve, de preferência, ser dissolvida na própria fase móvel que será utilizada no processo de eluição, ou em um de seus componentes, para que não ocorra precipitação no HPLC, causando

entupimento de sistema de válvulas e aumento considerável da pressão⁷².

1.6.1.6 Toxicidade

Deve-se considerar ainda, na escolha da fase móvel, o aspecto de toxicidade e a inflamabilidade do solvente orgânico. Na Tabela 4 estão apresentados os solventes utilizados como fases móveis neste trabalho e seus efeitos tóxicos⁷⁸.

Tabela 4: Solventes orgânicos e seus efeitos tóxicos⁷⁸.

| Solvente | Efeito tóxico |
|--------------|--|
| Acetonitrila | A inalação do vapor pode causar fadiga, náusea, diarreia e dor abdominal; em casos severos podem ocorrer delírio, convulsões, paralisia e coma |
| Metanol | Causa vertigens, distúrbios digestivos, paralisia de certos músculos, náusea, vômito, dor de cabeça e irritação das mucosas. |

1.6.2 Detecção por Fluorescência

Em condições normais a maior parte das moléculas se encontra no nível energético mais baixo do estado eletrônico (estado fundamental). A absorção de um *quantum* de luz promove a passagem dos elétrons a níveis superiores de energia (estado excitado). Durante o retorno ao estado fundamental, uma parte da energia absorvida é reemitida, sendo este fenômeno conhecido como

luminescência. Se a energia é reemitida a partir do primeiro estado singlete excitado, o fenômeno corresponde à fluorescência. A fluorescência corresponde em princípio, ao processo inverso do fenômeno da absorção, uma vez que se produz sempre pela emissão de energia a partir do nível mais baixo do primeiro estado singlete excitado⁷⁹.

A fluorescência de um composto depende de sua estrutura molecular e está quase sempre associada ao sistema eletrônico π . Os elétrons envolvidos numa ligação σ estão, geralmente, fortemente ligados à molécula sendo necessário fornecer mais energia para levar estes elétrons a ocupar um orbital molecular vazio. Assim os espectros eletrônicos produzidos por transições $\sigma \rightarrow \sigma^*$ se situam nas zonas de comprimento de ondas mais curtos do espectro eletromagnético. Os elétrons π , ao contrário, estão mais livres que os elétrons σ . O espectro de emissão correspondente se situa na região de comprimentos de onda mais longos. Entre os fatores externos passíveis de influenciar a emissão de fluorescência, estão a temperatura, os efeitos dos substituintes e o solvente. A Figura 8 ilustra a instrumentação utilizada para medidas de fluorescência⁷⁹.

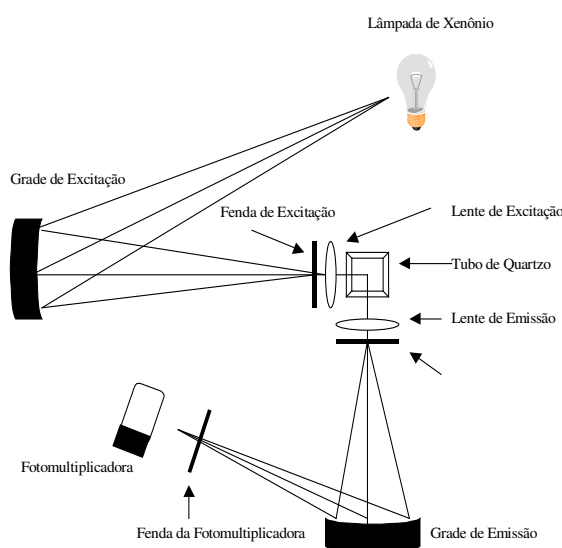


Figura 8: Detector de fluorescência utilizado para detecção no HPLC⁷⁹.

Para os HPAs, este detector se mostra muito mais adequado que os demais detectores. devido sua alta sensibilidade e seletividade^{13,16,28}.

1.7 Cromatografia a gás

Na cromatografia gasosa (GC), a amostra é vaporizada e injetada no topo de uma coluna cromatográfica. A eluição é feita por fluxo de um gás inerte que atua como fase móvel. Ao contrário da maioria dos outros tipos de cromatografia, a fase móvel não interage com as moléculas do analito, sendo sua única função o transporte do analito através da coluna⁸⁰. Na cromatografia gasosa por partição, a fase estacionária é um líquido não-volátil cobrindo a parte interna da coluna ou um fino suporte sólido. Um diagrama esquemático de uma cromatografia gasosa está mostrado na Figura 9⁸¹.

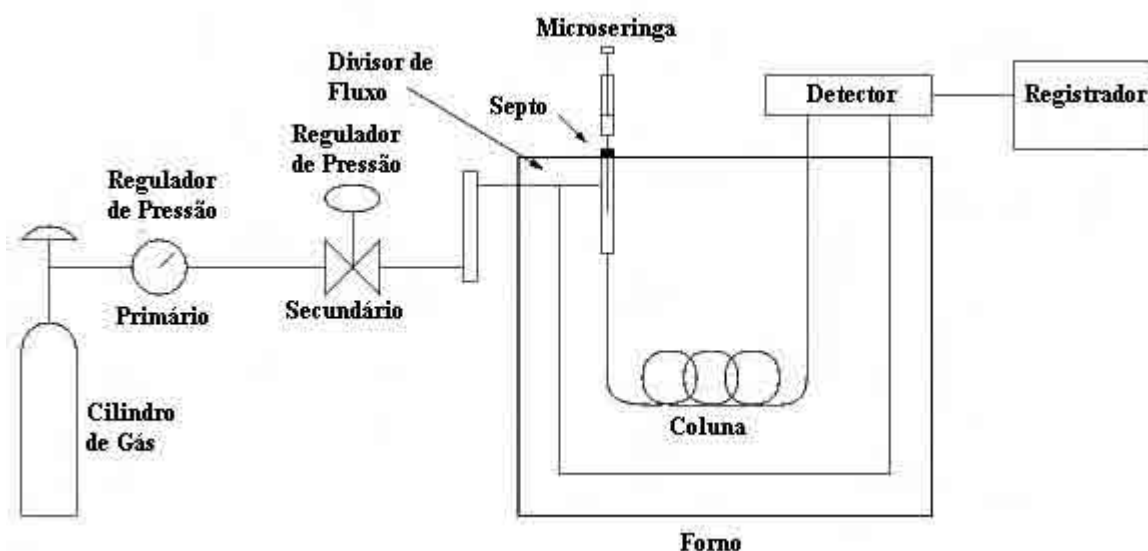


Figura 9: Diagrama esquemático de um cromatógrafo a gás⁷².

Uma amostra líquida volátil é injetada por um septo dentro de uma câmara aquecida, na qual ela se evapora rapidamente. O vapor é arrastado na coluna pelo gás de arraste He, N₂, ou H₂, e os constituintes separados fluem pelo detector, cuja resposta é mostrada num computador ou registrador⁸¹.

1.7.1 Detector de Espectrometria de massas

Um espectrômetro de massas é detector potente para as análises qualitativas e quantitativas em cromatografia gasosa. Na espectrometria de massa, as moléculas gasosas são ionizadas (geralmente para formarem cátions), aceleradas por um campo elétrico, e então separadas de acordo com sua massa. O processo de ionização geralmente confere energia suficiente para quebrar a molécula em uma variedade de fragmentos⁸¹. O eluato do cromatógrafo passa diretamente dentro do espectrômetro de massas, que registra a corrente total de todos os íons de todas as massas numa ampla faixa selecionada. Na Figura 10, está representado um diagrama esquemático de um analisador de íons (íon trap)⁸¹, utilizado em alguns espectrômetros de massa.

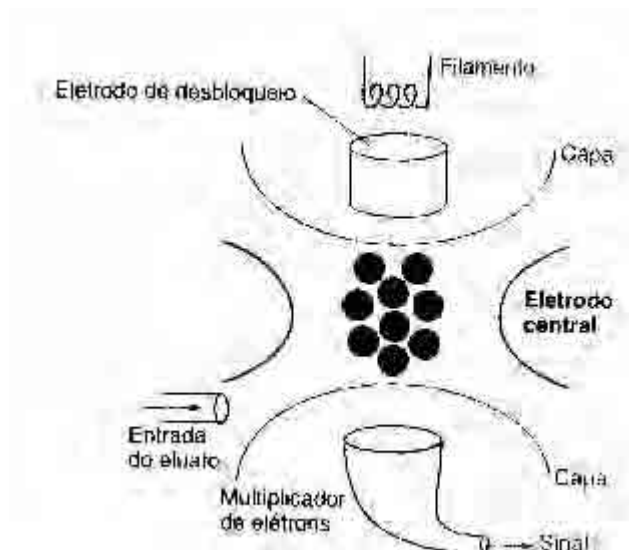


Figura 10: Diagrama esquemático de analisador de íons, tipo íon-trap, utilizado em alguns espectrômetros de massas⁸¹.

1.8 Parâmetros Cromatográficos

São três os parâmetros a serem otimizados no desenvolvimento de um método cromatográfico por HPLC (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência): fator de capacidade (κ') seletividade (α), e número de pratos teóricos (N)⁷⁷.

É conveniente considerar κ' , α e N independentes entre si, então a mudança deverá ser feita em uma variável sem afetar as outras⁷⁷, κ' e α são determinados pelas condições que afetam a retenção ou distribuição da amostra entre a fase estacionária e a fase móvel como: composição da fase móvel e a composição da fase estacionária, enquanto que N pode ser variado pela razão de fluxo, tamanho de partícula da fase estacionária e tamanho da coluna cromatográfica. No desenvolvimento/otimização de um método por HPLC é melhor otimizar na seguinte ordem: κ' , α e por último N ⁷⁷.

Os parâmetros cromatográficos são utilizados para comprovar a eficiência de uma separação. Vários parâmetros podem ser obtidos a partir de um cromatograma (Figura 11) e são, geralmente, calculados para os picos mais retidos⁷².

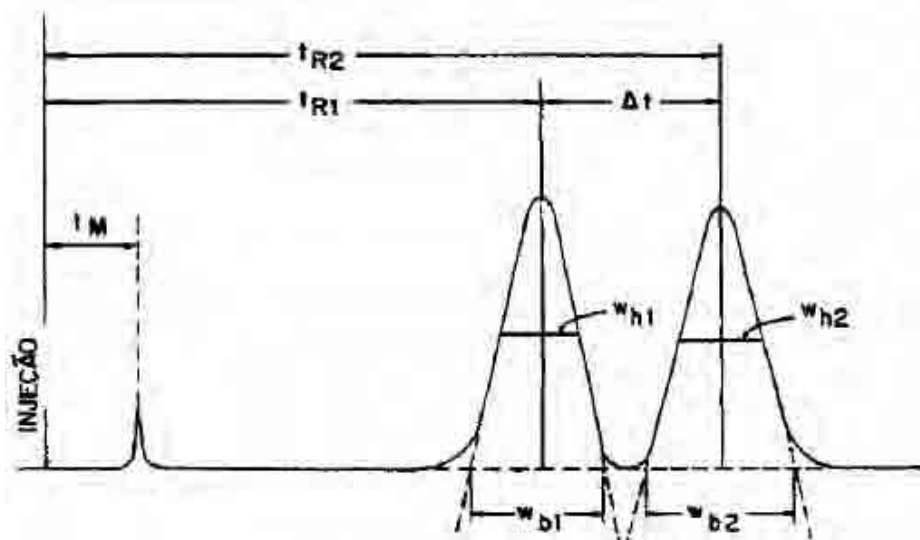


Figura 11: Cromatograma com as medidas relacionadas à determinação de parâmetros cromatográficos⁷².

Na otimização do método, sempre deve ser considerada a resolução cromatográfica (R_s), dada pela equação 1, que se refere à separação entre dois picos adjacentes⁸⁰.

$$R_s = 1,177 \frac{(tr_2 - tr_1)}{(wh_2 + wh_1)} \quad (\text{Equação 1})$$

Onde tr_2 e tr_1 são tempos de retenção dos picos adjacentes e wh_2 e wh_1 são larguras destes picos a meia altura⁷⁷.

O fator de retenção (κ') descreve a habilidade da fase estacionária em reter os componentes de uma mistura. Este parâmetro é importante para avaliar o tempo de retenção de um composto não retido no processo cromatográfico (t_m) (Equação 3). Valores de k baixos indicam que o soluto é pouco retido na fase estacionária. Na otimização de κ' (calculado pela Equação 2), otimizou-se a força de eluição do solvente de forma a alcançar o valor desejado ($0,5 < \kappa' < 20$)⁷⁷.

$$\kappa' = \frac{(tr - t_m)}{t_m} \quad (\text{Equação 2})$$

Onde tr = tempo de retenção do primeiro (Naftaleno) / último (Indeno (1,2,3,4)pireno) pico eluido da coluna cromatográfica, t_m = tempo morto, calculado pela equação 3.

$$t_m = \frac{0,5Ldc^2}{F} \quad (\text{Equação 3})$$

Onde L = comprimento da coluna (cm), dc = diâmetro interno da coluna (cm) e F = vazão (mL min^{-1}).

Outro parâmetro muito importante é o fator de separação (ou seletividade) (α) entre dois componentes A e B que depende da retenção de cada componente na fase estacionária (Equação 4). Para dois componentes A e B, o

fator de separação depende do tipo de fase estacionária utilizada, da fase móvel e da temperatura da coluna. Para que haja separação, o valor do fator de separação deve ser maior do que 1⁷⁷.

$$\alpha = \frac{tr' B}{tr' A} \quad (\text{Equação 4})$$

Onde $tr'B$ = tempo de retenção ajustado para o componente B e $tr'A$ = tempo de retenção ajustado para o componente A.

A eficiência de uma coluna é medida em função do número de pratos teóricos (N), ou seja, as etapas de equilíbrio do soluto entre a fase móvel e a fase estacionária^{72,81,77}. Geralmente é calculada a partir da largura do pico a meia altura (Figura 11).

$$N = 5,545 \left(\frac{tr}{wh} \right)^2 \quad (\text{Equação 5})$$

Onde tr é o tempo de retenção do componente e wh (largura do pico a meia altura).

A eficiência de uma coluna é influenciada pelo comprimento da coluna, tamanho da partícula e vazão da fase móvel. A altura de um prato teórico (H) pode ser calculada a partir da equação 6⁷⁷.

$$H = \frac{N}{L} \quad (\text{Equação 6})$$

Onde N é o número de pratos teóricos e L o comprimento da coluna cromatográfica.

A dispersão dos componentes da amostra no sistema cromatográfico é representada por uma curva Gaussiana. Entretanto, algumas moléculas do soluto são mais fortemente retidas na fase estacionária, formando uma cauda no

pico (Figura 12). Caudas frontais ocorrem quando a retenção do soluto na fase estacionária é menor do que se esperava, ou seja, há uma preferência das moléculas do soluto pela fase móvel⁷².

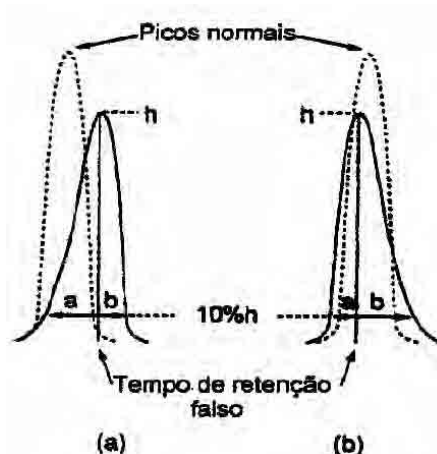


Figura 12: Assimetria de picos (a) cauda frontal e (b) cauda.

Boas colunas produzem picos com assimetria de 0,9 a 1,2, mas valores em torno de 1,5 são aceitáveis desde que os picos não sejam tão largos. Picos com simetria pobre podem resultar em: (a) análises quantitativas imprecisas; (b) menor resolução e bandas menores não detectadas na cauda de outro pico e (c) problemas com reprodutibilidade na retenção⁸².

1.9 Solvente de extração da amostra

Para estabelecer uma relação entre as diferentes seletividades dos solventes de extração criou-se o conceito de *parâmetro de polaridade* P' , que é a medida do poder de solvatação de um solvente. O parâmetro é baseado em três espécies de solventes com diferentes características⁷⁷:

Xe – Parâmetro de basicidade (receptor de prótons): medida da tendência de formação de pontes de hidrogênio;

Xd – Parâmetro de acidez (doador de prótons): medida da tendência de

formação de pontes de hidrogênio;

X_n – Parâmetro de dipolo: medida da grandeza do dipolo.

Baseado nestes três parâmetros, os solventes podem ser classificados de acordo com suas características em um triângulo⁷⁷ de seletividade (Figura 13).

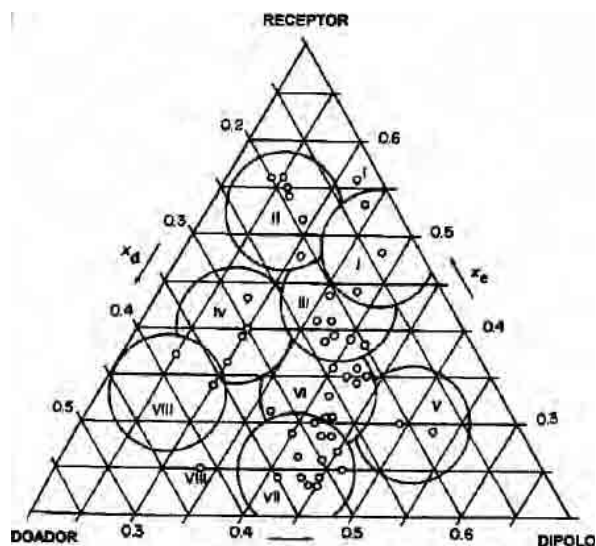


Figura 13: Triângulo de seletividade para solventes⁷⁷.

As polaribilidades de alguns solventes está apresentada na Tabela 5.

Tabela 5: Parâmetro de polaribilidade P' de alguns solventes⁷⁷.

| Solvente | P' | x_e | x_d | x_n | Grupo |
|----------------|------|-------|-------|-------|-------|
| Benzeno | 2,7 | 0,23 | 0,32 | 0,45 | VII |
| Éter Dietílico | 2,8 | 0,53 | 0,13 | 0,34 | I |
| Diclorometano | 3,1 | 0,29 | 0,18 | 0,53 | V |
| Clorofórmio | 4,1 | 0,25 | 0,41 | 0,33 | VIII |
| Etanol | 4,3 | 0,52 | 0,19 | 0,29 | II |
| Metanol | 5,1 | 0,48 | 0,22 | 0,31 | II |
| Acetonitrila | 5,8 | 0,31 | 0,27 | 0,42 | VI |
| Ácido Acético | 6,0 | 0,39 | 0,31 | 0,30 | IV |
| Água | 10,2 | 0,37 | 0,37 | 0,25 | VIII |

Para qualquer solvente da Tabela 5, o somatório de X_e , X_d e X_n é sempre igual a 1⁷⁷. Os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) são melhor extraídos quando se utiliza solventes com alto X_n , devido às interações π destes analitos com a nuvem eletrônica das moléculas do solvente.

1.10 Validação analítica

No desenvolvimento de um método analítico, a validação é uma etapa de importância fundamental, para garantir que o mesmo seja confiável. Os parâmetros de desempenho analítico do método mais utilizados são: linearidade, exatidão (recuperação), precisão, limites de detecção e quantificação, sensibilidade, especificidade e robustez.

Diversos critérios para se realizar a validação de um método são discutidos na literatura^{83,84,85}. Os principais critérios são definidos a seguir:

- Especificidade/Seletividade: seletividade é a capacidade de o método detectar o analito de interesse na presença de outros componentes da matriz.

- Linearidade: é a capacidade de um método gerar resultados proporcionais à concentração do analito dentro de uma faixa específica de concentrações.

- Intervalo de trabalho: é a faixa do menor ao maior valor de concentração que possa ser determinado com precisão e exatidão usando a linearidade do método.

- Sensibilidade: é a capacidade de um método distinguir, com determinado nível de confiança, duas concentrações próximas. A sensibilidade é definida como o coeficiente angular da curva analítica.

- Exatidão: é a concordância entre o valor real do analito na amostra e o estimado pelo processo analítico.

- Precisão: é o parâmetro que avalia a proximidade entre várias medidas

efetuadas em uma mesma amostra. A precisão de um procedimento analítico é usualmente expressa como o desvio padrão ou coeficiente de variação de uma série de medidas.

Estudos de recuperação são utilizados para avaliar a exatidão e precisão de um método. Neste estudo podem ser empregados materiais de referência certificados, ou estudo de recuperação dos analitos de interesse⁸⁶.

- Limite de detecção (L.D.): é a menor concentração do analito que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, sob as condições experimentais estabelecidas. O L.D. pode ser calculado de três maneiras diferentes: método visual, método relação sinal/ruído (normalmente três vezes) e o método baseado em parâmetros da curva analítica.

- Limite de quantificação (L.Q.): é a menor concentração do analito, em uma amostra que pode ser quantificada com exatidão e precisão aceitável, sob as condições experimentais estabelecidas. O L.Q. pode ser calculado de três maneiras diferentes: método visual, método relação sinal/ruído (normalmente dez vezes) e o método baseado em parâmetros da curva analítica

Entre os critérios descritos acima, a exatidão e a precisão são os considerados de maior importância para o propósito da validação de um método analítico.

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) do equipamento para os HPAs foram determinados seguindo método recomendado pela IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry)⁸⁷,

$$\mathbf{LD = 3 \times Sd/b}$$

$$\mathbf{LQ = 3 \times LD}$$

sendo “b” o coeficiente angular da curva analítica de cada analito estudado

e “Sd” o desvio padrão da curva analítica.

1.11 Limites de detecção e de quantificação do método

Os limites de detecção e quantificação do método são determinados de acordo com a proposta de Thier⁸⁸. 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. Eles podem ser devido a algumas causas que podem simular a presença dos resíduos como por exemplo⁸⁸:

- Co-extrativos não removidos;
- Impurezas de solventes ou reagentes ou
- Ruídos do instrumento.

O LD pode ser estimado a partir dos resultados de um estudo de recuperação, utilizando as equações apresentadas abaixo⁸⁸:

$$LD = \frac{2 \times t_{f,95} \times \sigma_{com}}{S} \quad \sigma_{com} = \sqrt{\frac{(m-1)\sigma_A^2 + (n-1)\sigma_B^2}{m+n-2}}$$

sendo: 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.

O limite de quantificação do método é o menor nível de fortificação estudado.

2 Objetivos

Tendo em vista que a rapadura é um alimento de alto consumo, no Brasil, pela população de mais baixa renda, em especial nas regiões Norte e Nordeste, além disso um dos elementos integrantes da merenda escolar nestas regiões, e produzida em condições que possibilitam a contaminação por HPAs, este trabalho teve como objetivo:

- ❖ Otimizar e validar método para determinação de HPAs em rapadura;
- ❖ Aplicar o método para avaliação da presença de HPAs em rapaduras comercializadas.

3 Experimental

3.1 Materiais

3.1.1 Reagentes, Solventes e Padrões

- Padrões sólidos individuais de HPAs (Pureza > 98%), com exceção do acenaftileno que contém 70% de pureza e 25% de acenafteno obtidos do laboratório Dr. EHRENSTORFER GMBH (Augsburg, Alemanha) com exceção do Benzo(k)fluoranteno e Benzo(g,h,i)perileno (Pureza > 99%) que foram fornecidos pela SIGMA-ALDRICH BRASIL Ltda;

- Detergente alcalino Extran (MERCK);
- Acetonitrila (grau HPLC, MALLINCKRODT CHEMICALS);
- Metanol (grau HPLC, MALLINCKRODT CHEMICALS);
- Diclorometano (grau HPLC, MALLINCKRODT CHEMICALS);
- *n*-Hexano (grau HPLC, MALLINCKRODT CHEMICALS);
- Acetona (grau HPLC, MALLINCKRODT CHEMICALS);
- Água deionizada obtida do sistema Milli-Q plus (MILLIPORE).

3.1.2 Vidraria e equipamentos

Vidraria de uso comum em laboratório (Béquer, erlenmeyer, pipeta, balão volumétrico), coluna C-18 (SUPELCOSIL LC PAH) (250 mm x 4,6 mm x 5 µm) - SUPELCO, coluna Gemini C18 (250 mm x 4,6 mm e 5 µm – PHENOMENEX), Coluna capilar FACTOR FOUR™ VF-5-MS (5% fenil 95% polisiloxano) 30m x 0,25 mm x 0,25 µm e materiais diversos como suporte, garra e outros.

Os equipamentos utilizados foram:

- Balança METTLER TOLEDO AG245;
- Banho de Ultra-som THORNTON – 40KHz;
- Espectrofotômetro UV/VIS PERKIN ELMER LAMBA 14 P;
- Espectrofluorímetro HITASHI F-4500;
- HPLC Pro Star Autosampler 4000 e detector de fluorescência 360 VARIAN.
- GC 3800 MS Saturn 2000 com autosampler 8200 VARIAN.

3.2 Parte Experimental

3.2.1 Limpeza da vidraria

O material não volumétrico utilizado foi imerso em solução de Extran 5% (MA-01-alkalino, Merck) e ultrassonificado por uma hora, foi enxaguado exaustivamente com água corrente, água destilada, água deionizada e acetona destilada (proveniente do Laboratório de Apoio Técnico do IQ/UNESP). A secagem da vidraria e de outros materiais foi realizada em estufa à temperatura de aproximadamente 90°C durante a noite, sendo o material volumétrico seco à temperatura ambiente protegido da poeira.

Para avaliação da limpeza da vidraria, foi utilizado o mesmo procedimento de extração da amostra, descrito na Figura 39 no item 3.3.9, porém sem adição de amostra.

3.2.2 Preparação da mistura padrão

A solução-padrão estoque foi preparada considerando-se a diferença de fator de resposta dos HPAs nas condições cromatográficas utilizadas e que já haviam sido determinadas neste grupo de pesquisa por Andrade⁹¹. As

concentrações de cada analito nesta solução estoque estão apresentadas na Tabela 6.

Tabela 6: Concentrações de cada HPA na solução estoque em acetonitrila

| Padrão | HPA | Concentração na solução estoque (ng mL⁻¹) |
|---------------|-------------------------|---|
| P1 | Naftaleno | 1018 |
| P2 | Acenafteno | 916 |
| P3 | Fluoreno | 1078 |
| P4 | Fenantreno | 1100 |
| P5 | Antraceno | 32 |
| P6 | Fluoranteno | 2960 |
| P7 | Pireno | 262 |
| P8 | Benzo[a]antraceno | 190 |
| P9 | Criseno | 780 |
| P10 | Benzo[e]pireno | 532 |
| P11 | Benzo[e]acenanftrileno | 322 |
| P12 | Benzo[k]fluoranteno | 48 |
| P13 | Benzo[a]pireno | 234 |
| P14 | Dibenzo[a,h]antraceno | 3952 |
| P15 | Benzo[g,h,i]perileno | 3945 |
| P16 | Indeno (1,2,3-cd)pireno | 3644 |

Com a diluição de vinte vezes desta solução padrão, os analitos apresentaram respostas semelhantes no detector de fluorescência.

3.2.3 Fluorescência

A primeira etapa do trabalho consistiu em verificar os espectros de fluorescência tridimensionais dos padrões de HPAs, para conhecer os comprimentos de onda de máximo de excitação e emissão de cada substância, para conseguir melhor resposta no detector de fluorescência.

3.2.4 Amostragem laboratorial

A amostragem se refere à coleta e estocagem das amostras. Na análise de HPAs em alimentos esta etapa é importantíssima e a amostra deve ser representativa do alimento em questão. As amostras de rapadura foram obtidas

no comércio de Araraquara (SP) e Natal (RN), foram cuidadosamente trituradas, homogeneizadas e estocadas em frasco coberto por papel alumínio para proteção da luz, e armazenadas em freezer a -15°C.

3.2.5 Preparo da amostra

Escolheu-se o método envolvendo a extração com solventes em banho de ultra-som, por ser mais rápido utilizar menor volume de solvente que o Soxhlet, e custo mais baixo que as demais técnicas, sendo também bastante empregado na extração de HPAs de alimentos^{44,46}. Os parâmetros otimizados na extração foram: relação massa de amostra/volume de solvente, tipo de solvente, tempo e número de extrações.

3.2.6 Estudo de recuperação

Como para HPAs em rapadura não existe material de referência certificado, no presente trabalho foram utilizadas amostras de rapadura enriquecidas com os analitos (HPAs) de interesse, sendo que a adição foi efetuada na faixa apropriada do analito (início, meio e final da faixa de resposta linear do detector). Estudos iniciais foram feitos com amostras enriquecidas em um único nível de concentração, que forneceu extratos com concentrações próximas ao meio da faixa de resposta linear para cada HPA.

Os analitos foram adicionados à matriz e então deixados em contato por 12 (doze) horas antes da aplicação do método analítico otimizado neste trabalho. Isso permitiu que a interação analito-matriz ocorresse o mais naturalmente possível.

3.2.7 Análise cromatográfica

Os analitos de interesse presentes nas soluções mistas dos HPAs e nas amostras (estudo de otimização) foram identificados segundo os respectivos tempos de retenção. Para maior confiabilidade na identificação os padrões foram injetados diversas vezes para estabelecimento do t_r médio e o desvio.

A quantificação dos HPAs foi realizada empregando o método do padrão externo. Curvas analíticas (área analito vs concentração analito) foram construídas separadamente para cada analito de interesse presente na mistura, respeitando a linearidade da resposta do detector, sendo que o intervalo de linearidade foi obtido pelo estudo da curva de linearidade (Área/Concentração vs concentração). As injeções dos extratos da amostra testemunha (não fortificada com os HPAs) e da amostra fortificada foram intercaladas com injeções das soluções dos padrões e de solvente (acetonitrila), tomando sempre o cuidado de evitar o efeito de memória, para evitar contaminação de uma injeção para outra.

3.2.8 Teste t (Student)⁸⁹

Para comparação entre duas médias foi utilizado o teste de hipóteses, mais especificamente o teste *t-Student*. Trata-se de uma situação em que se comparam duas amostras de distribuições normais, mas em duas situações diferentes, como por exemplo, avaliar se a recuperação dos HPAs da rapadura usando diclorometano:*n*-hexano (1:1) é significativamente diferente da extração usando somente *n*-hexano, com 90% confiabilidade. Portanto utilizou-se a equação

$$(\mu_A - \mu_B) = (\bar{x}_A - \bar{x}_B) \pm t_w s \sqrt{\frac{1}{N_A} + \frac{1}{N_B}} \quad \text{onde} \quad s^2 = \frac{(N_A - 1)s_A^2 + (N_B - 1)s_B^2}{(N_A - 1) + (N_B - 1)}$$

onde μ_A e μ_B = médias amostrais da amostra A e B, x_A e x_B = diferença média entre os conjuntos de dados A e B, t_v - valor tabelado de acordo com o grau de liberdade e a confiabilidade desejada na tabela de *t-student*, s = desvio padrão, N_A e N_B = número de observações em A e B, s^2_A e s^2_B , variância de A e de B.

3.3 Resultados e discussões

3.3.1 Limpeza da vidraria

O cromatograma da Figura 14 mostra que o procedimento de lavagem da vidraria foi adequado, uma vez que não apresenta picos interferentes nos mesmos tempos de retenção dos analitos.

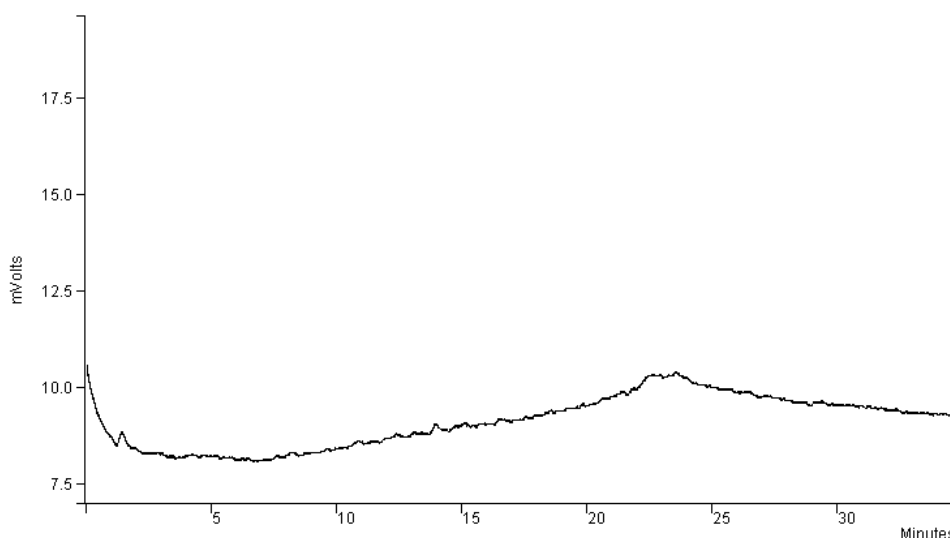


Figura 14: Cromatograma referente à limpeza da vidraria.

3.3.2 Otimização das condições de separação

A otimização das condições cromatográficas de análise foi baseada na proposta de Snyder⁷⁷ para desenvolvimento de métodos cromatográficos por HPLC⁷⁷.

A concentração de cada analito foi estabelecida de acordo com a

sensibilidade diferenciada para cada HPA. A solução mista otimizada (solução de trabalho) está representada na Tabela 7.

$$\alpha = \frac{(Trf - Tm)}{(Ta - Tm)}$$

Tabela 7: Solução mista dos HPAs

| HPA | Concentração na solução de trabalho (ng mL ⁻¹) |
|-------------------------|--|
| Naftaleno | 50,91 |
| Acenafteno | 45,82 |
| Fluoreno | 53,90 |
| Fenantreno | 52,38 |
| Antraceno | 1,54 |
| Fluoranteno | 140,95 |
| Pireno | 12,49 |
| Benzo[a]antraceno | 9,05 |
| Criseno | 37,14 |
| Benzo[e]pireno | 25,33 |
| Benzo[e]acenanftrileno | 15,33 |
| Benzo[k]fluoranteno | 2,29 |
| Benzo[a]pireno | 11,14 |
| Dibenzo[a,h]antraceno | 188,19 |
| Benzo[g,h,i]perileno | 187,86 |
| Indeno (1,2,3-cd)pireno | 182,23 |

Na otimização de κ' , a força de eluição do solvente (Acetonitrila – ACN), foi ajustada de modo que κ' variou de 1,82 (Naftaleno) a 13,9 (Indeno(1,2,3-cd)pireno) para os 16 HPAs, calculado através dos dados experimentais e pelas equações do item 1.8. O fator de capacidade foi considerado adequado uma vez que κ' maior que 0,5 para o primeiro pico eluido evita problemas de distúrbio e sobreposição no 1^o pico e κ' menor que 20 evita que a corrida seja demasiadamente longa⁷⁷. Na Figura 15, estão representadas as condições de gradiente da fase móvel (ACN:Água) utilizada na determinação dos HPAs, cuja vazão foi de 1,2 mL.min⁻¹.

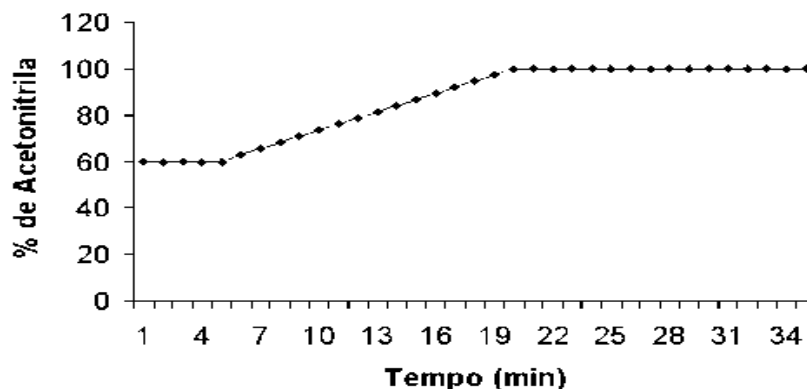


Figura 15: Gradiente utilizado para a determinação dos HPAs por HPLC-Flu, 60%(5 min)-----20min-----100%(15 min).

Na otimização da seletividade (α), Tabela 8, foi observado como a resolução cromatográfica se alterava para o par Fenantreno/Antraceno, com a mudança de fase móvel e fase estacionária.

Este experimento também teve como objetivo verificar a robustez do método. As condições de gradiente (mantendo fluxo de $1,3 \text{ mL min}^{-1}$) foram: Metanol: 70%(5 min)-----20min-----100%(15 min) e Acetonitrila: 60%(5 min)-----20min-----100%(15 min). A porcentagem inicial de metanol foi maior que a de acetoneitrila devido à menor força eluotrópica do metanol frente à acetoneitrila⁷⁶, de acordo com o nomograma apresentado na Figura 16.

Tabela 8: Resolução obtida com a otimização de α .

| Resolução | Fase Móvel | |
|--|-------------------|--------------|
| | Metanol | Acetonitrila |
| Fase Estacionária | | |
| PHENOMENEX C ₁₈ (250 mm x 4,6mm x 5 μm) | - | 1,8 |
| SUPELCOSIL C ₁₈ LC PAH (250mm x 4,6mm x 5 μm) | 3,3 | 4,3 |

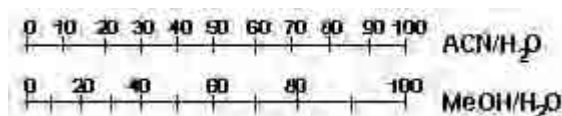


Figura 16: Nomograma de força de Acetonitrila-Água e Metanol-Água⁷⁶.

Verifica-se que os parâmetros de fase móvel e estacionária são muito importantes para a resolução cromatográfica dos HPAs. Amostras contendo 10 ou mais componentes são mais difíceis de separar, portanto a resolução deve ser maior que $1(\mu\text{m})^{77}$, condição atingida com a coluna específica para os HPAs e com o solvente acetonitrila.

E o último parâmetro (N – número de pratos teóricos) a ser otimizado está diretamente relacionado à vazão da fase móvel, já que os parâmetros α e k' já haviam sido otimizados, fixando a utilização da coluna SUPELCOSIL C₁₈ LC PAH (250 x 4,6mm x 5 μm) e fase móvel: Acetonitrila:Água com a seguinte força eluotrópica: 60%(5 min)-----20min-----100%(15 min). N foi otimizado pela variação da vazão da fase móvel, obtendo-se os melhores resultados para o par Fenantreno/Antraceno, com a vazão de $1,5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. A Figura 17 ilustra o comportamento da resolução, calculada utilizando-se a Equação 1, para o par de HPAs em relação à vazão de fase móvel utilizada.

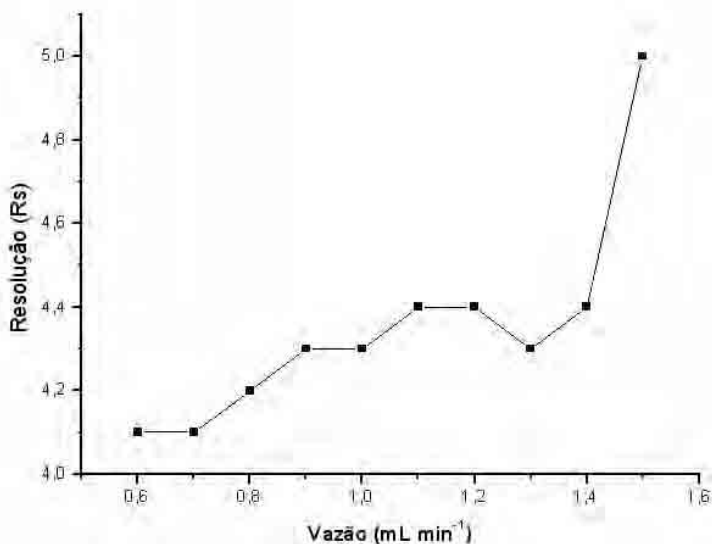


Figura 17: Variação da resolução cromatográfica para o par Fenantreno/Antraceno em função da vazão da fase móvel ($\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$).

A Figura 18-B, apresenta o cromatograma dos HPAs obtido sob as condições cromatográficas otimizadas e com comprimentos de onda descritos

no item 3.3.3, enquanto que a Figura 18-A apresenta o cromatograma para HPAs apresentado pela Agência Ambiental Norte Americana EPA⁷⁰.

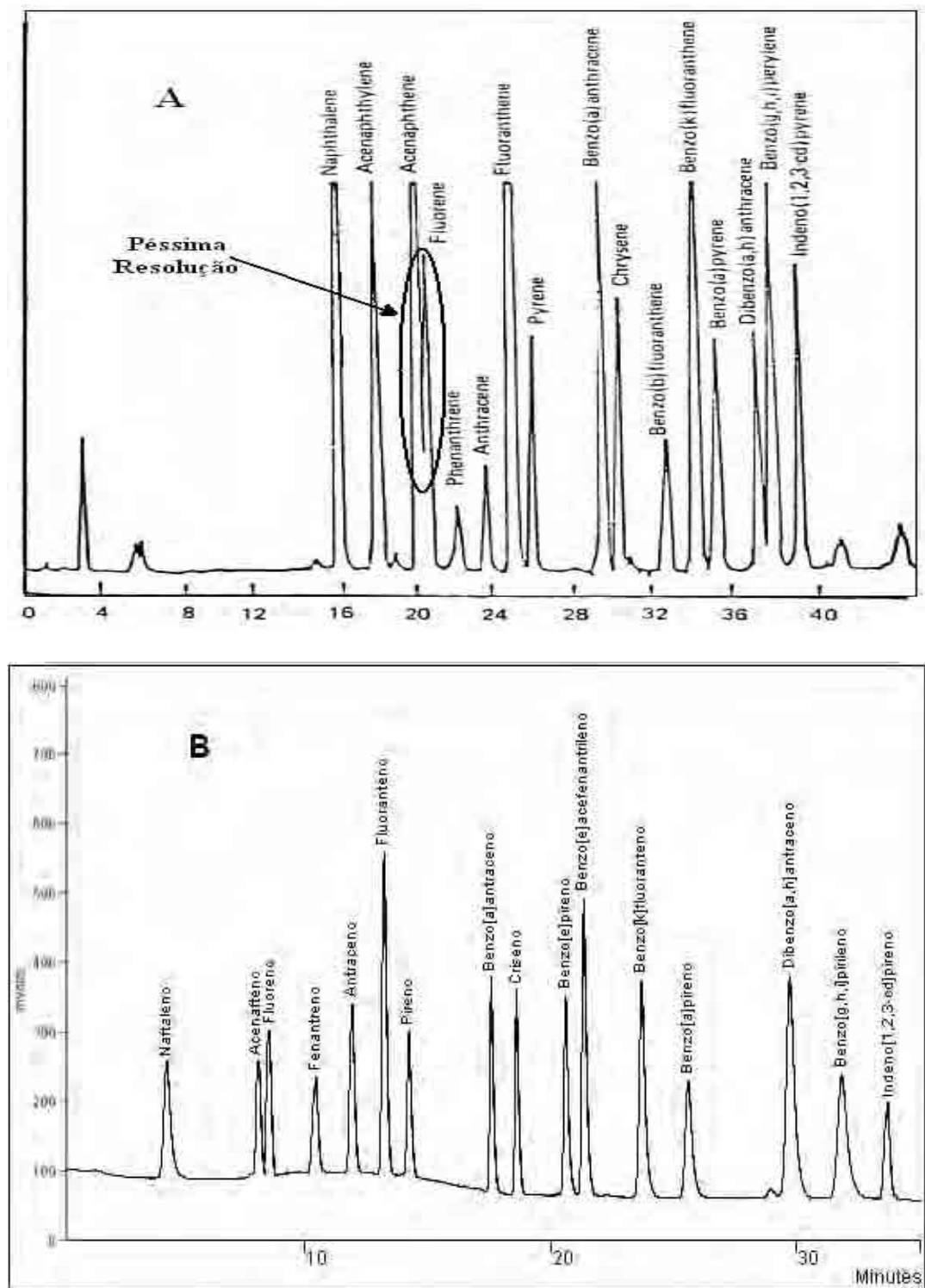


Figura 18: Cromatogramas dos HPAs por HPLC-Fluorêscencia: **A-**) Método oficial 8310 da agência norte-americana EPA, utilizando-se de coluna HC – ODS Sil – X e vazão de 0,5 mL/min (Fonte: www.epa.gov/sw-846/pdfs/8310.pdf)⁷⁰, **B-**) Método otimizado neste trabalho.

3.3.3 Otimização da resposta do detector de fluorescência

Após a otimização cromatográfica, foi determinado o par de comprimento de onda (excitação/emissão) no espectrofluorímetro 3D, utilizando-se de padrões individuais de HPAs na concentração de $0,60 \mu\text{g L}^{-1}$, para conhecer os comprimentos de onda de máxima resposta no detector de fluorescência. Na Figura 19 estão representadas as curvas de nível de três HPAs, para exemplificação.

Cada substância apresenta um comprimento de excitação/emissão muito específico, e para as análises cromatográficas necessitou-se trabalhar com intervalos de comprimentos de onda, devido às proximidades no tempo de retenção dos HPAs.

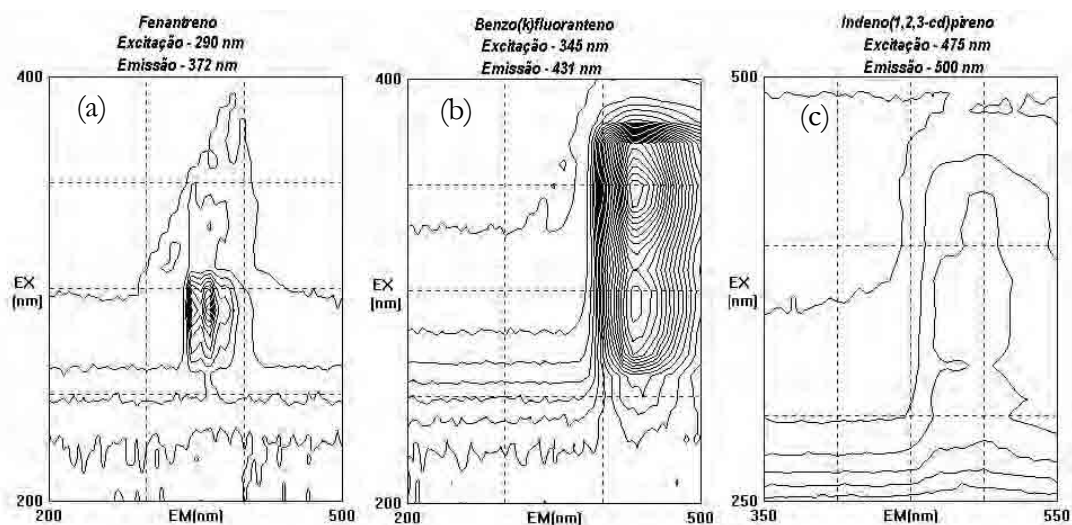


Figura 19: Fluorescência tridimensional do (a)Fenantreno, (b) Benzo(k)fluoranteno e (c)Indeno (1,2,3-cd)pireno.

A Tabela 9 apresenta os comprimentos de onda (excitação e emissão) utilizados em trabalhos encontrados na literatura para análise de HPAs por HPLC/Flu.

Tabela 9: Comprimentos de ondas utilizados na literatura para a determinação de HPAs e número de substâncias detectadas.

| Referência | λ excitação | λ emissão | Número de HPAs |
|------------------------|--|--|----------------|
| EPA ⁷⁰ | 280 | 389 | 10 |
| NIOSH ⁹⁰ | 340 | 425 | 6 |
| Andrade ⁹¹ | 240 | 398 | 12 |
| Camargo ⁹² | 290 | 430 | 8 |
| Escrivá ⁷¹ | 290 | 385 | 10 |
| Stolyhwo ⁹³ | 270 | 440 | 7 |
| Stolyhwo ⁹³ | 260 | 520 | 1 |
| Este trabalho | 220 (P1, P2 e P3) 240 (P4 a P15) 300 (P16) | 322 (P1, P2 e P3) 398 (P4 a P15) 498 (P16) | 16 |

Utilizou-se os comprimentos de onda de excitação (λ_{ex}) 220 nm e de emissão (λ_{em}) 320 nm para os três primeiros HPAs eluidos (Naftaleno, Acenafteno e Fluoreno), de acordo com os espectros de absorção e emissão bidimensionais representados na Figura 20. A molécula de acenaftileno não é fluorescente⁹¹ e portanto não foi analisada.

Para o indeno(1,2,3-cd)pireno, os comprimentos de onda de excitação - λ_{exc} foi 300 nm e o comprimento de emissão (λ_{em}) foi de 498 nm.

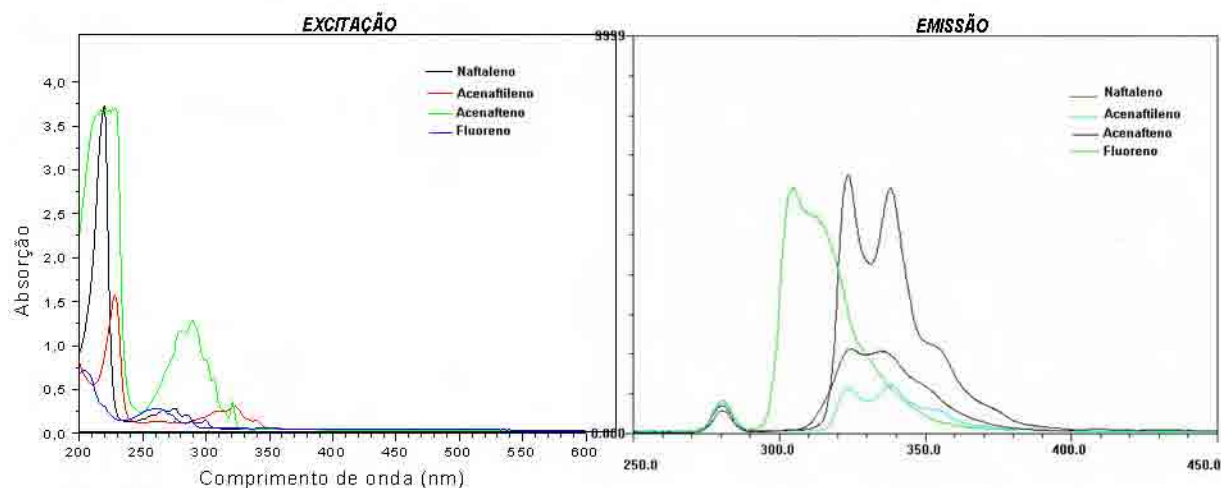


Figura 20: Espectros de excitação e emissão molecular dos padrões: Naftaleno, Acenaftileno, Acenafteno e Fluoreno.

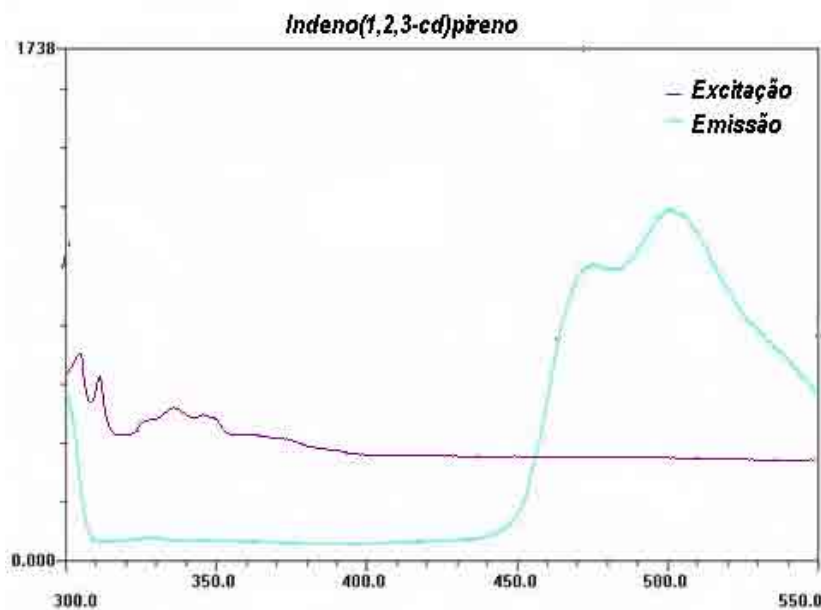


Figura 21: Espectros de excitação e emissão do indeno(1,2,3-cd)pireno.

Os comprimentos de onda escolhidos para detecção dos HPAs no HPLC-Flu estão representados na Tabela 10.

Tabela 10: Comprimentos de onda escolhidos para detecção dos HPAs.

| HPAs | λ_{exc} | λ_{em} |
|------------------------------------|-----------------|----------------|
| Naftaleno, Acenafteno e Fluoreno | 220 | 322 |
| Fenantreno ao Benzo[g,h,i]perileno | 240 | 398 |
| Indeno(1,2,3-cd)pireno | 300 | 498 |

3.3.4 Otimização da repetibilidade do tempo de retenção

Os tempos de retenção dos analitos variaram com a temperatura ambiente, possuindo um coeficiente de variação médio (7 injeções) de 1%. Para melhorar a repetibilidade a coluna cromatográfica foi protegida com isopor (Figura 22) e, nestas condições, o coeficiente de variação médio foi de 0,6% havendo uma melhora de 40% (Figura 23).



Figura 22: Coluna cromatográfica protegida contra variações da temperatura utilizando Isopor™.

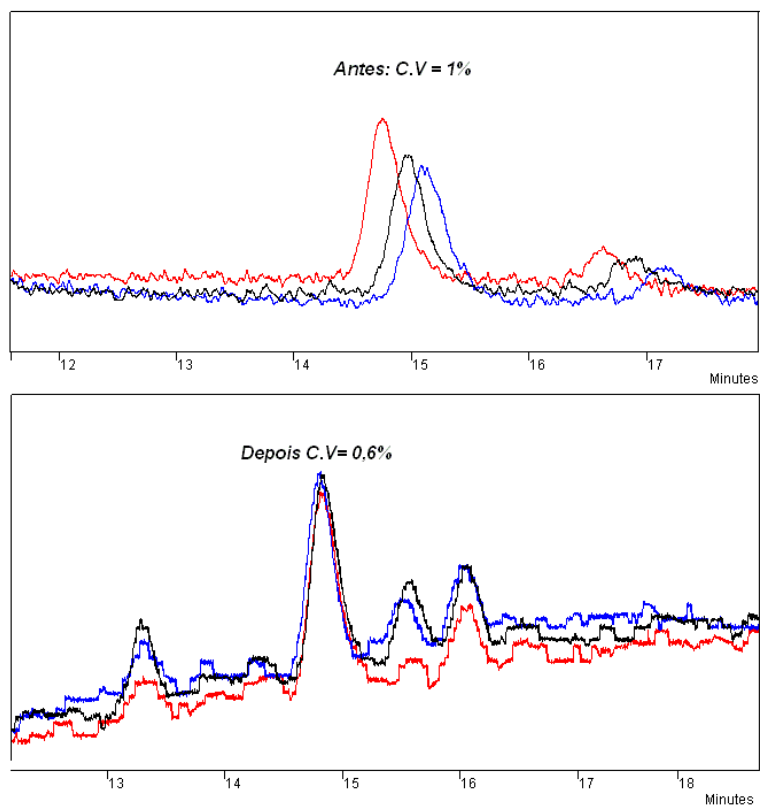


Figura 23: Estudo da repetibilidade do tempo de retenção antes e depois da adição de isopor na coluna cromatográfica.

3.3.5 Linearidade da resposta do sistema HPLC-Flu

Partindo-se da solução padrão estoque, foram preparadas soluções padrão de trabalho, contendo todos os HPAs em estudo, em concentrações na faixa de 0,003 a 2200 $\mu\text{g.L}^{-1}$, perfazendo o mínimo de 10 concentrações para cada HPA. Todas as soluções foram injetadas em triplicata, utilizando-se as condições cromatográficas previamente otimizadas. Com os dados obtidos foram construídas as curvas de linearidade, plotando-se o fator de resposta (área média/concentração) vs concentração.

As áreas médias/concentração foram ordenadas e a mediana (independente dos valores anômalos) foi determinada com 10% de variação superior e inferior. Considerou-se como faixa linear a região representada na Figura 24.

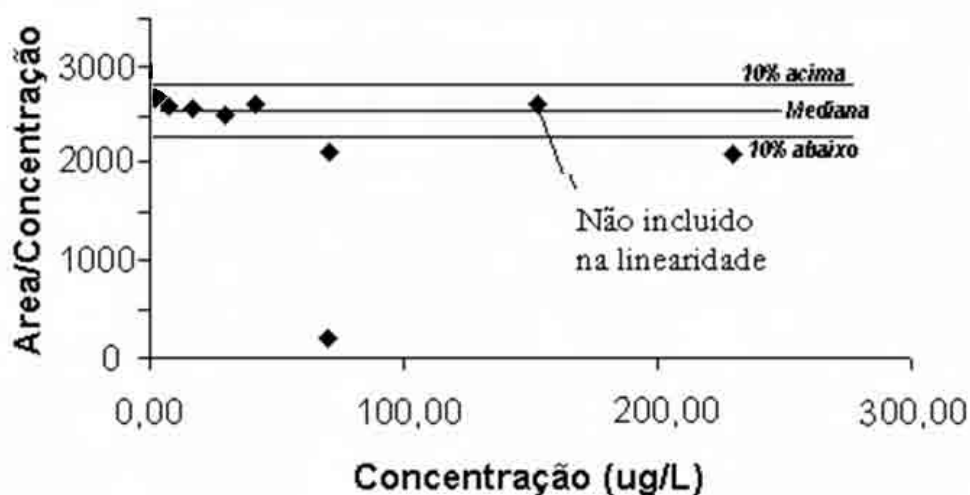


Figura 24: Curva de linearidade do Fluoranteno no HPLC-Flu.

As curvas analíticas foram obtidas plotando-se a área média dos picos (injeções em triplicata) em função da concentração de cada HPA (Figura 43), tendo cada curva 5 pontos. O intervalo de linearidade, equações das curvas e coeficiente de correlação são apresentados na Tabela 11.

Tabela 11: Linearidade, equações das curvas de calibração e coeficiente de correlação (R^2) para os 16 HPAs estudados.

| HPA | Faixa Linear ($\mu\text{g L}^{-1}$) | Equação da curva | R^2 | Fator de resposta médio | CV (%) |
|--------------------------|---------------------------------------|--------------------|--------|-------------------------|--------|
| Naftaleno | 5 – 102 | $y=12481,2x+616,8$ | 0,9923 | 12545,9 | 8 |
| Acenafteno | 5 - 92 | $y=404,4x+108,2$ | 0,9967 | 415,9 | 11 |
| Fluoreno | 5 - 108 | $y=12382,2x+187,4$ | 0,9957 | 12924 | 13 |
| Fenantreno | 11 - 183 | $y= 651,2x+312,2$ | 0,9901 | 647,26 | 9 |
| Antraceno | 0,3 - 5 | $y=36859,7x+73,9$ | 0,9952 | 36744,2 | 14 |
| Fluoranteno | 3 – 72 | $y=2623,7x+1,2$ | 0,9911 | 2622,15 | 7 |
| Pireno | 1 – 24 | $y=7871,1x+1,3$ | 0,9891 | 7870,56 | 12 |
| Benzo[a]antraceno | 2 - 32 | $y=2302,1x+112,03$ | 0,9912 | 2345,28 | 11 |
| Criseno | 8 - 130 | $y=276,0x+108,4$ | 0,9879 | 585,61 | 5 |
| Benzo[e]pireno | 2 - 48 | $y=532,5x+70,0$ | 0,9893 | 550,72 | 9 |
| Benzo[e]acefenanftrileno | 3 - 54 | $y=910,9x+219,2$ | 0,9964 | 949,5 | 15 |
| Benzo[k]fluoranteno | 0,2 - 4 | $y=34316,3x+81,9$ | 0,9967 | 34564,2 | 9 |
| Benzo[a]pireno | 1 - 21 | $y=3546,6x+54,6$ | 0,9975 | 3589,13 | 12 |
| Dibenzo[a,h]antraceno | 9 – 188 | $y=8113,1x+1217,7$ | 0,9906 | 8183,94 | 7 |
| Benzo[g,h,i]perileno | 9 - 188 | $y=2096,5x+654,5$ | 0,9967 | 2146,29 | 9 |
| Indeno[1,2,3-cd]pireno | 12 - 59 | $y=5275,3x+1218,7$ | 0,9946 | 5389,31 | 5 |

Os coeficientes de correlação obtidos para todos os HPAs estudados ($>0,98$) situaram-se acima do preconizado ($>0,9$) como adequado na validação de métodos pelo INMETRO e EURACHEM⁹⁴. A linearidade também é atestada pelo CV do fator de resposta, que variou entre 5 e 15%. Utilizando-se os parâmetros da curva analítica, foram determinados os limites de detecção e quantificação do equipamento.

3.3.6 Limites de detecção e quantificação do sistema cromatográfico

Os procedimentos para a determinação do limite de detecção ($LD = (3 \times Sd)/b$) e do limite de quantificação ($LQ = 3 \times LD$) foram descritos no item 1.10.

A Tabela 12 apresenta o limite de detecção e de quantificação do equipamento (HPLC-Flu) para os HPAs estudados utilizando os dados das

curvas analíticas obtidas pelo método do padrão externo. O limite de detecção observado (LD_{obs}), é o menor valor de concentração do analito detectado no HPLC-Flu. Nem sempre os limites de detecção calculado e observado são comparáveis pois no caso do analito Naftaleno, o LD_{obs} é cerca de 22 vezes menor que o calculado, já com o analito Fenantreno o LD_{obs} é 10 vezes maior que o calculado.

Tabela 12: Limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) do equipamento (HPLC-Flu) para os contaminantes estudados.

| HPA | ($\mu\text{g L}^{-1}$) | | | HPA | ($\mu\text{g L}^{-1}$) | | |
|-------------------|--------------------------|------------|------|------------------------------|--------------------------|------------|------|
| | LD | LD_{obs} | LQ | | LD | LD_{obs} | LQ |
| Naftaleno | 0,90 | 0,04 | 2,70 | Criseno | 1,07 | 1,77 | 3,21 |
| Acenafteno | 1,01 | 0,36 | 3,03 | Benzo[e]pireno | 0,45 | 1,21 | 1,35 |
| Fluoreno | 0,59 | 0,04 | 1,76 | Benzo[e]acefenantri- leno | 0,82 | 0,73 | 2,45 |
| Fenantreno | 0,50 | 4,76 | 1,51 | Benzo[k]fluoranteno | 0,20 | 0,022 | 0,60 |
| Antraceno | 0,57 | 0,07 | 1,72 | Benzo[a]pireno | 0,79 | 0,53 | 2,37 |
| Fluoranteno | 0,94 | 1,40 | 2,81 | Dibenzo[a,h]antraceno | 1,19 | 1,86 | 3,57 |
| Pireno | 0,27 | 0,026 | 0,81 | Benzo[g,h,i]perileno | 0,42 | 0,39 | 1,26 |
| Benzo[a]antraceno | 1,71 | 0,43 | 5,14 | Indeno[1,2,3- cd]pireno | 0,56 | 0,08 | 1,67 |

3.3.7 Otimização da análise de HPAs por GC-MS

No desenvolvimento de método para a determinação dos HPAs por GC-MS, otimizou-se primeiramente o modo de injeção no cromatógrafo. A Figura 25, apresenta uma comparação entre injeções de Grob e com split 1:20.

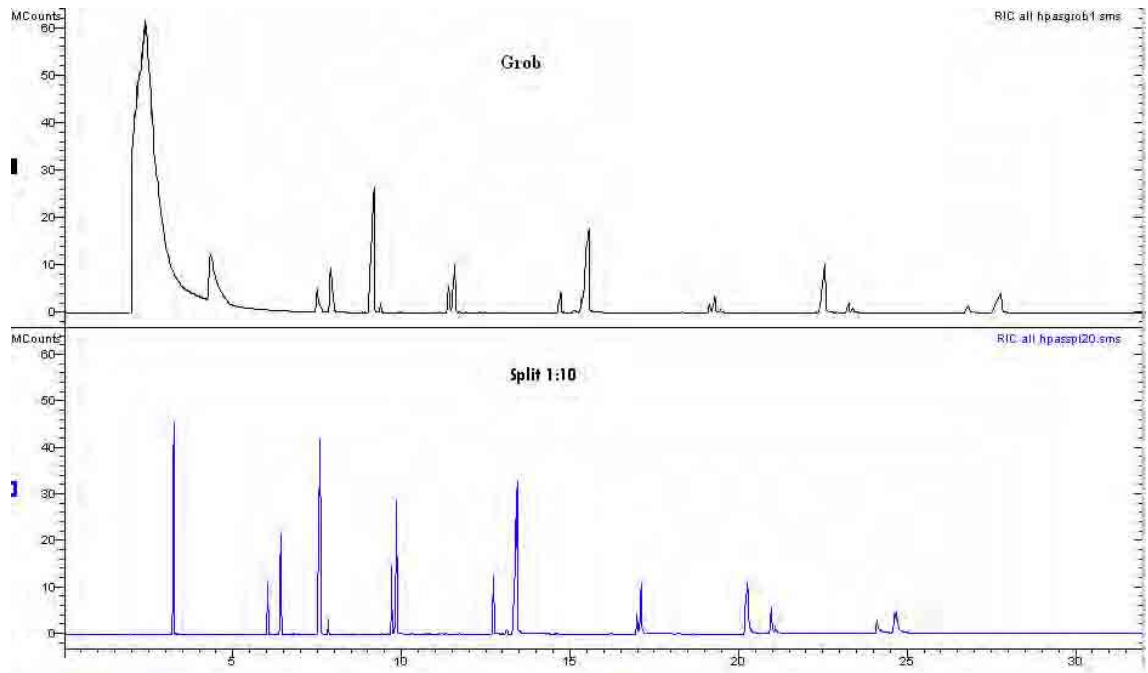


Figura 25: Otimização do modo de injeção no GC-MS para a determinação dos HPAs.

A injeção com split apresentou-se com picos simétricos e com alta resolução cromatográfica. Na Figura 26 estão representados vários modos de injeção de split (20:1, 10:1, 5:1) comparado ao modo de splitless (sem divisão da amostra).

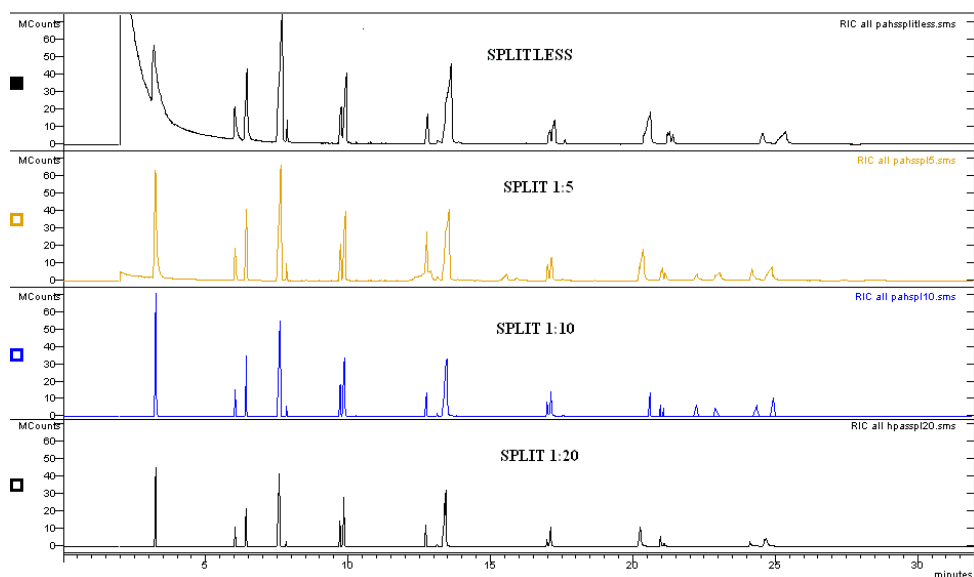


Figura 26: Comparação de modos de injeção por split e splitless.

Observou-se picos com uma maior área na injeção em splitless, resultando em picos assimétricos. Portanto adotou-se o modo de injeção de split (1:10) devido a maior simetria (entre 0,9 a 1,3) dos picos cromatográficos.

A câmara de injeção deverá estar suficientemente quente para vaporizar rapidamente os analitos, evitando perda da eficiência devido à injeção, mas de tal forma a evitar que haja decomposição da térmica ou rearranjos na amostra. A Figura 27 mostra o injetor em várias temperaturas. A 100° C a temperatura não foi suficiente para vaporizar os analitos de maior massa molecular, ficando portanto presos no *liner*. A temperatura adotada neste trabalho para o injetor foi de 300° C, pois foi suficiente para volatilizar todos os analitos de interesse.

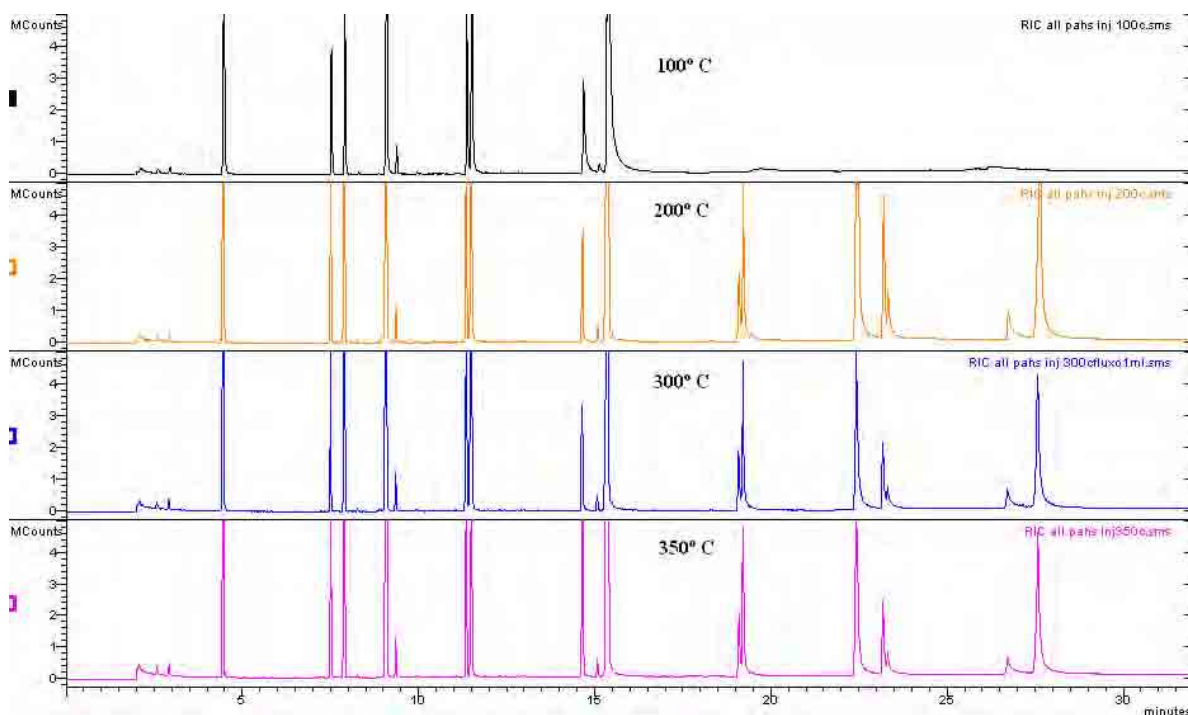


Figura 27: Influência da temperatura do injetor na detecção dos HPAs.

Na otimização da vazão do gás de arraste (He), utilizou-se diversas vazões (0,5 a 3 mL/min). Os cromatogramas estão apresentados na Figura 28 Optou-se pela utilização da vazão de 2,5 mL/min devido a maior resposta do detector (Figura 29).

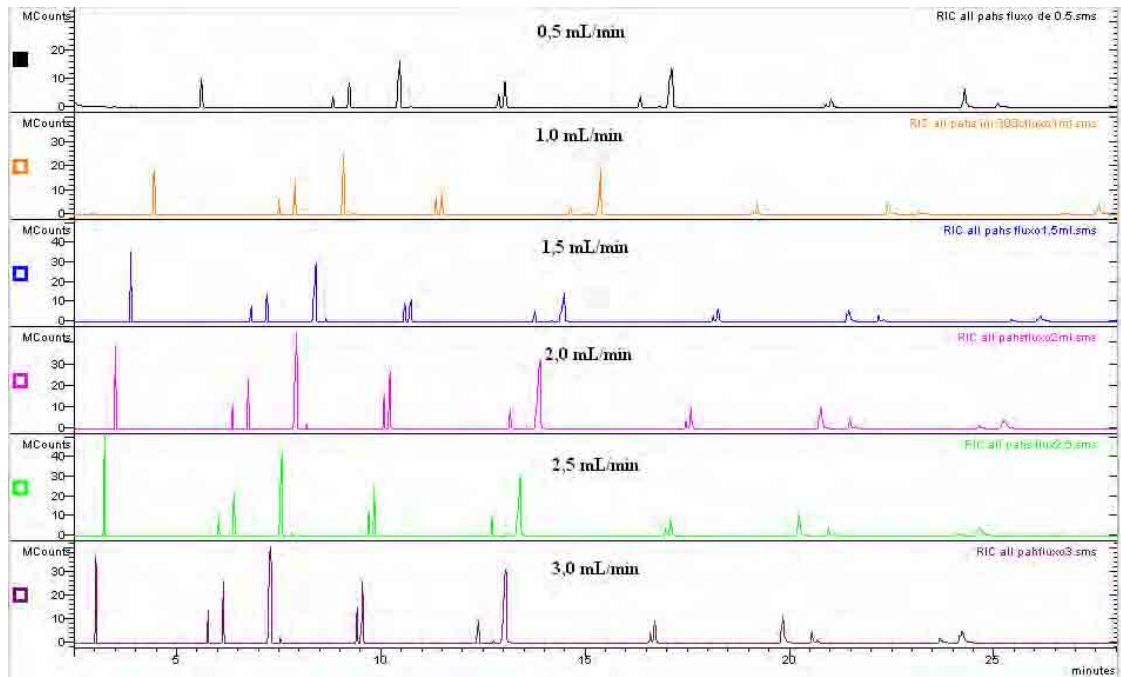


Figura 28: Otimização da vazão do gás de arraste (He) na determinação de HPAs.

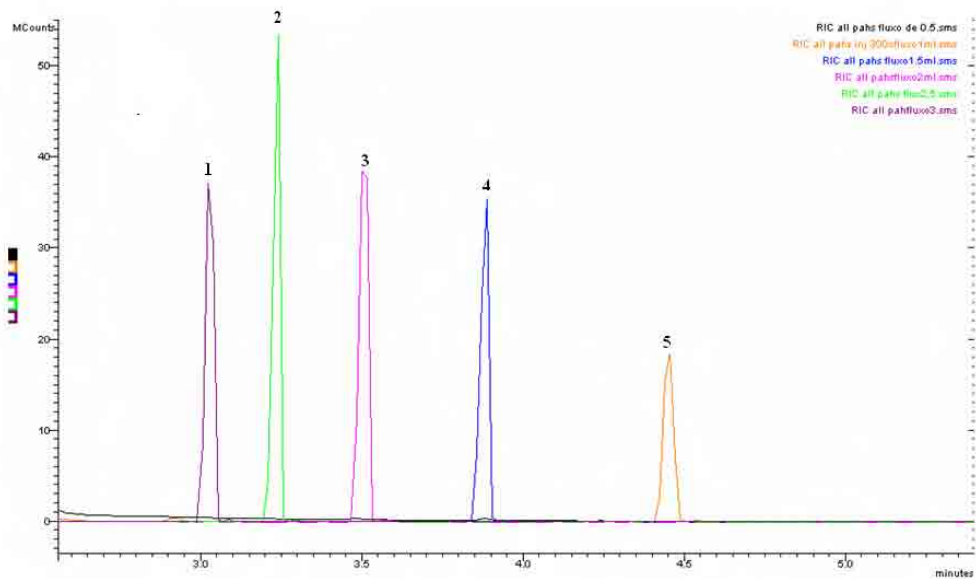


Figura 29: Diferença na sensibilidade na resposta do detector de espectrometria de massas na determinação de HPAs em diversas vazões de fase móvel (**Pico 5** – 1 mL min⁻¹; **4** – 1,5 mL min⁻¹; **3** – 2 mL min⁻¹; **2** – 2,5 mL min⁻¹; **1** – 3 mL min⁻¹).

Na otimização dos parâmetros de detecção do espectrômetro de massas (tempo de scan, voltagem da eletromultiplicadora e corrente de emissão) observou-se que as melhores condições de sensibilidade eram alcançadas quando se utilizava o máximo de cada parâmetro (Figura 30, Figura 31 e Figura 32).

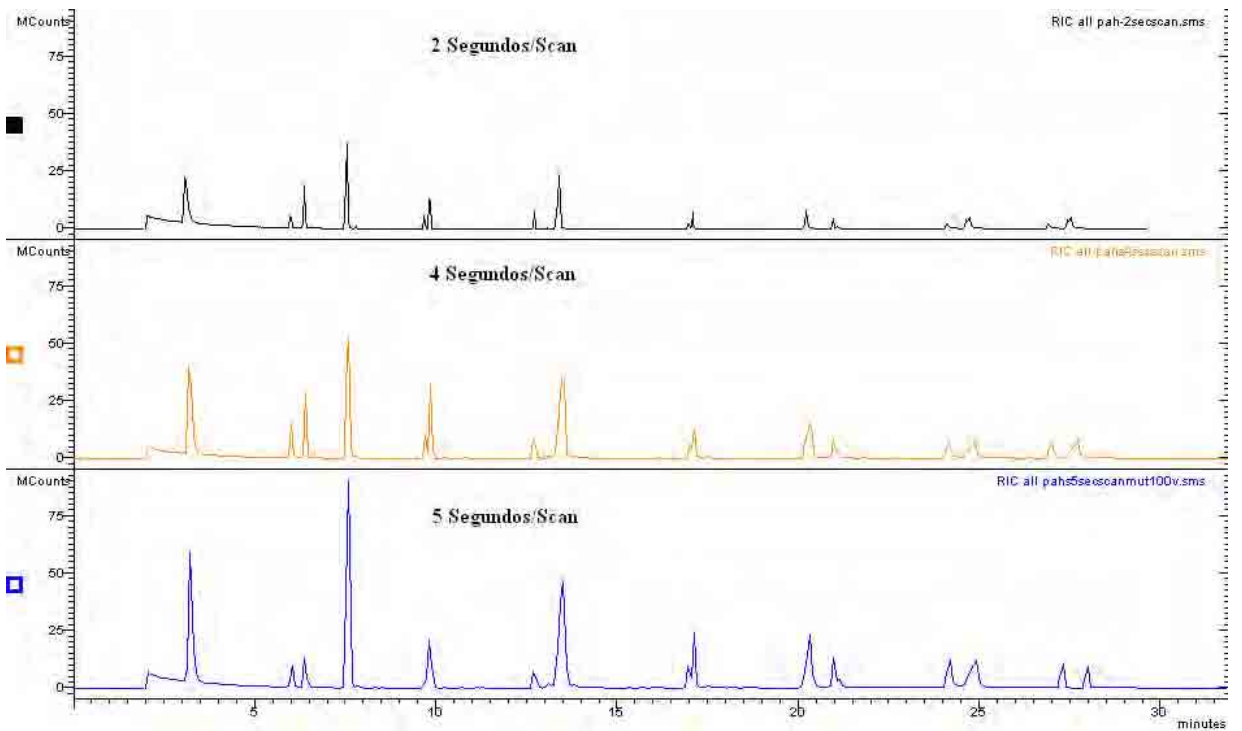


Figura 30: Otimização do tempo de scan na resposta do espectrômetro de massas para os HPAs.

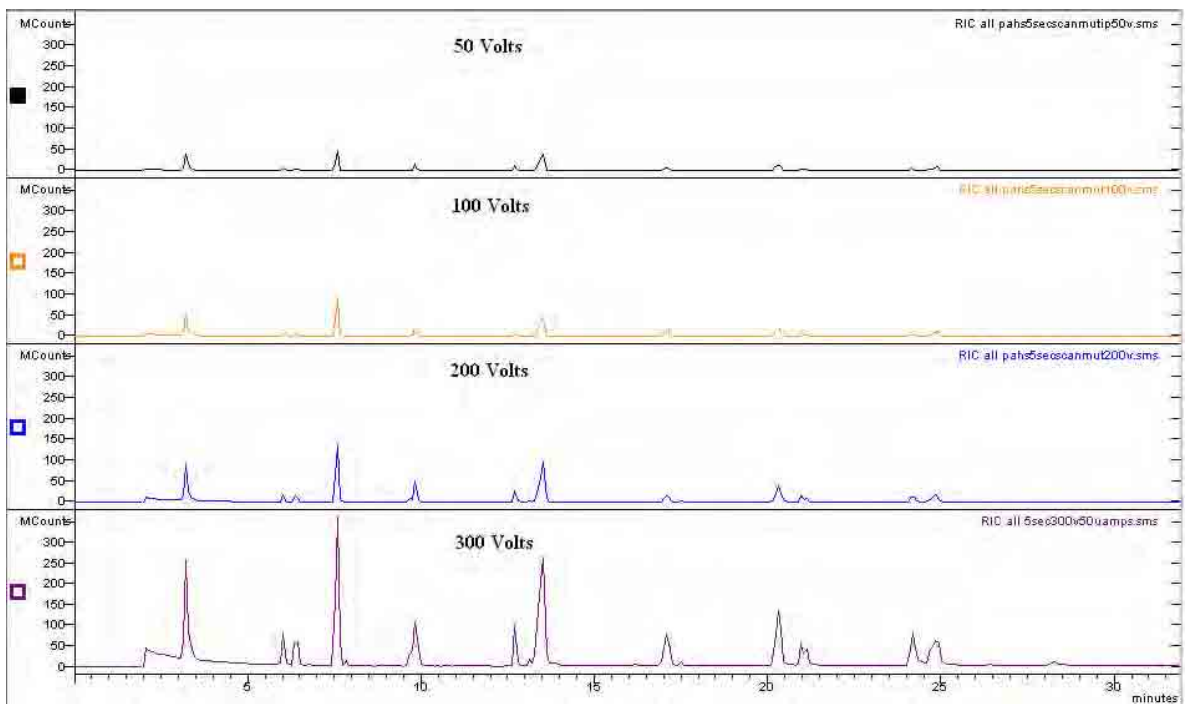


Figura 31: Otimização da voltagem da eletromultiplicadora na resposta do espectrômetro de massas para os HPAs.

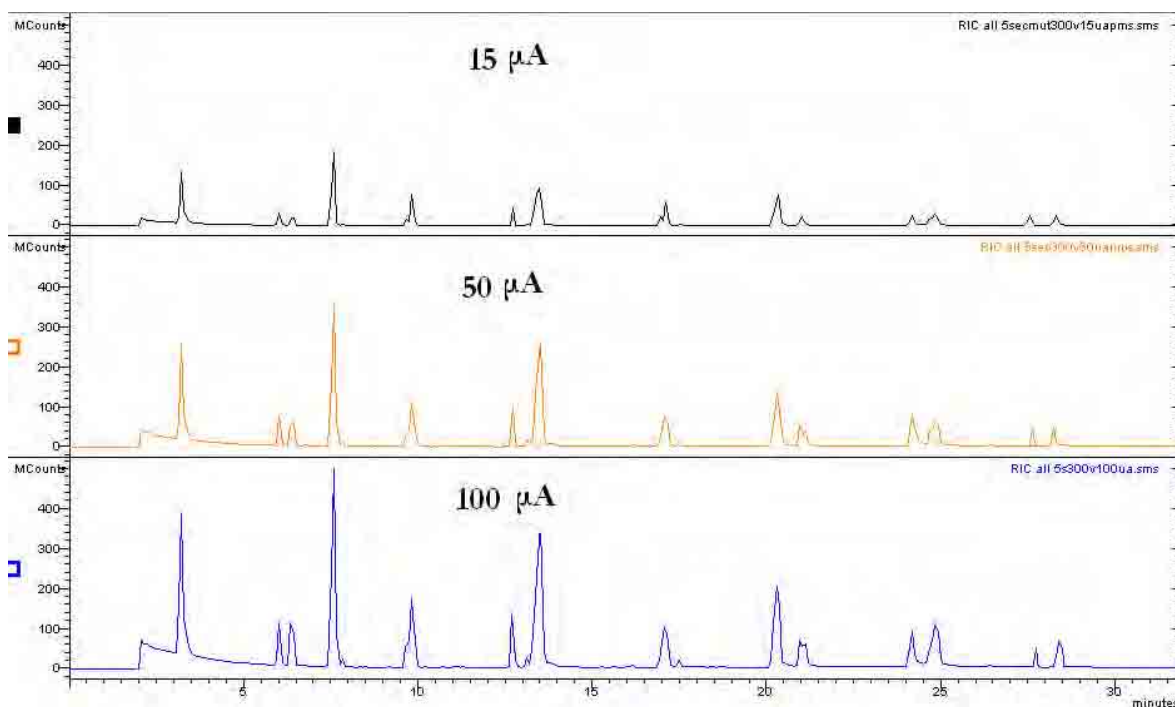


Figura 32: Otimização da corrente de emissão na resposta do espectrômetro de massas para os HPAs.

Não foram utilizados os máximos destes parâmetros para garantia de maior vida útil dos componentes do espectrômetro de massa como o filamento e a fotomultiplicadora. As condições otimizadas no modo de detecção, MS, utilizadas para detecção foram: tempo de scan: 2 seg/scan, voltagem da eletromultiplicadora: 200 V e corrente de emissão de 50 μA .

Para o desenvolvimento do método MS/MS utilizou-se o manual do equipamento para ajuste do método, a partir do cromatograma no modo *Full Scan* do padrão.

As condições otimizadas no modo MS/MS são: tempo de scan: 0,5 segundos/scan, eletromultiplicadora: 200V e corrente de emissão: 20 μA . A Tabela 13, mostra os íons pais selecionados (íon de maior intensidade no modo MS) de acordo com os fragmentogramas de cada HPA obtidos no modo MS para cada analito de interesse. O fragmentograma do naftaleno está representado na Figura 33 e os demais estão no anexo (Figura 45 a Figura 60).

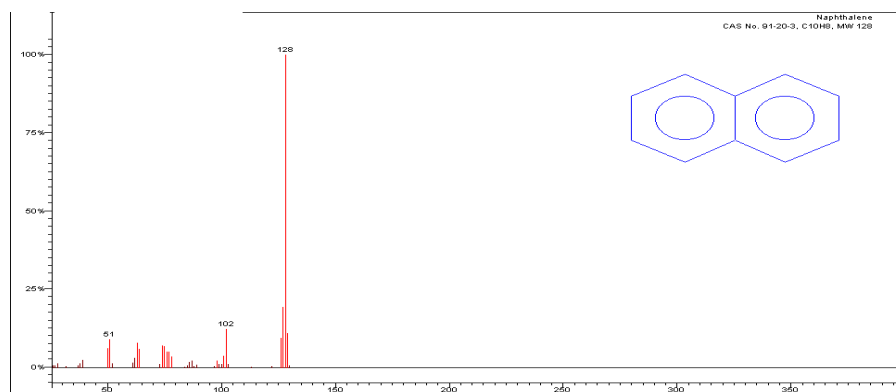


Figura 33: Fragmentograma do naftaleno no modo MS, o íon de maior intensidade m/z (128) foi selecionado para fazer o método MS-MS.

Tabela 13: Íons pais selecionados de cada HPA, através dos fragmentogramas no modo MS.

| Substância | Íon Pai (íon com maior intensidade no modo MS) |
|-------------------------|---|
| Naftaleno | 128 |
| Acenafteno | 153 |
| Acenaftileno | 152 |
| Fluoreno | 166 |
| Fenantreno | 178 |
| Antraceno | 178 |
| Fluoranteno | 202 |
| Pireno | 202 |
| Benzo[a]antraceno | 228 |
| Criseno | 228 |
| Benzo[e]pireno | 252 |
| Benzo[e]acefenantrileno | 252 |
| Benzo[k]fluoranteno | 252 |
| Benzo[a]pireno | 252 |
| Dibenzo[a,h]antraceno | 278 |
| Benzo[g,h,i]perileno | 276 |
| Indeno[1,2,3-cd]pireno | 276 |

3.3.8 Tratamento das amostras

3.3.8.1 Extração por ultrassonicação

Utilizando-se de 1 g de rapadura previamente triturado e homogeneizado, foi fortificada com 12 HPAs, homogeneizado com agitação manual do béquer de 150 mL (protegido com papel alumínio), deixado em contato por 12 horas (*overnight*) a -15° C no freezer. Foi estudada a relação massa de rapadura/volume de diclorometano para a extração dos HPAs nos níveis intermediários das linearidades dos HPAs (Tabela 14). A Figura 34, ilustra a recuperação benzo(a)antraceno (fortificação a $10,87 \mu\text{g Kg}^{-1}$), como exemplo, de acordo com as razões massa/volume de diclorometano, utilizada para a otimização da massa/volume de extração. Os dados para os demais HPAs encontram-se no anexo na Figura 44.

Tabela 14: Concentração de cada HPA fortificado na rapadura, utilizado na otimização de extração. (correspondendo ao nível médio da curva de calibração).

| HPA | Concentração de fortificação (ng g^{-1}) |
|------------------------|---|
| Fenantreno | 52,4 |
| Antraceno | 1,5 |
| Fluoranteno | 12,8 |
| Pireno | 6,4 |
| Benzo[a]antraceno | 11 |
| Criseno | 37 |
| Benzo[e]pireno | 13 |
| Benzo[e]acenanftrileno | 15 |
| Benzo[k]fluoranteno | 1,2 |
| Benzo[a]pireno | 5,7 |
| Dibenzo[a,h]antraceno | 39,1 |
| Benzo[g,h,i]perileno | 39,1 |

As recuperações do analito nas relações de massa/volume de 0,05 e 0,10 g/mL, apresentaram-se muito semelhantes conforme Figura 34, com coeficiente

de variação (triplicata) menor que 12%, e através do teste de hipóteses, descrito no item 3.2.8, verificou-se que a relação 0,05 é igual a 0,10 com 90% de intervalo de confiança para os seguintes analitos (Fenatreto, Criseno, Benzo[a]antraceno, Benzo[e]pireno, Pireno, Fenantreno, Benzo[e]acenanfrileno, Benzo[k]fluoranteno, Benzo[a]pireno e Dibenzo[a,h]antraceno). Portanto escolheu-se a relação 0,10 g/mL, devido ao menor gasto de solvente.



Figura 34: Extração do benzo(a)antraceno da rapadura com diclorometano.

Em seguida, efetuou-se um estudo para avaliar a influência do número de extrações e do tempo de extração na recuperação do analito, utilizando-se 10g de amostra, uma vez que é a quantidade mais usual em estudos enfocando a determinação de HPAs em alimentos⁹⁵, para 100 mL de solvente (mantendo a proporção 0,10 g/mL anteriormente otimizada), dividido em 2 a 4 extrações consecutivas.

Na otimização do tempo de extração e número de extrações, utilizou-se a superfície de resposta como ferramenta utilizando o software Minitab⁹⁶ para planejamento dos experimentos, de acordo com a Tabela 15. A melhor condição encontrada e que foi utilizada no estudo de recuperação foi três extrações por 15 minutos cada, utilizando em cada uma 33 mL de solvente, de acordo com a Figura 35.

Tabela 15: Planejamento de experimentos para a otimização da extração de HPAs em rapadura (n=3).

| Ordem dos Experimentos | Tempo de extração (min) | Número de extrações (volume solvente) | Recuperação média do Benzo[a]antraceno | C.V % |
|------------------------|-------------------------|---------------------------------------|--|-----------|
| 7 | 5 | 2 (50 mL) | 62,31 | 9 |
| 2 | 5 | 3 (33 mL) | 67,26 | 11 |
| 1 | 5 | 4 (25 mL) | 73,13 | 7 |
| 8 | 15 | 2 (50 mL) | 82,34 | 10 |
| 5 | 15 | 3 (33 mL) | 89,49 | 10 |
| 6 | 15 | 4 (25 mL) | 88,16 | 13 |
| 3 | 30 | 2 (50 mL) | 79,21 | 16 |
| 4 | 30 | 3 (33 mL) | 82,28 | 7 |
| 9 | 30 | 4 (25 mL) | 87,52 | 12 |

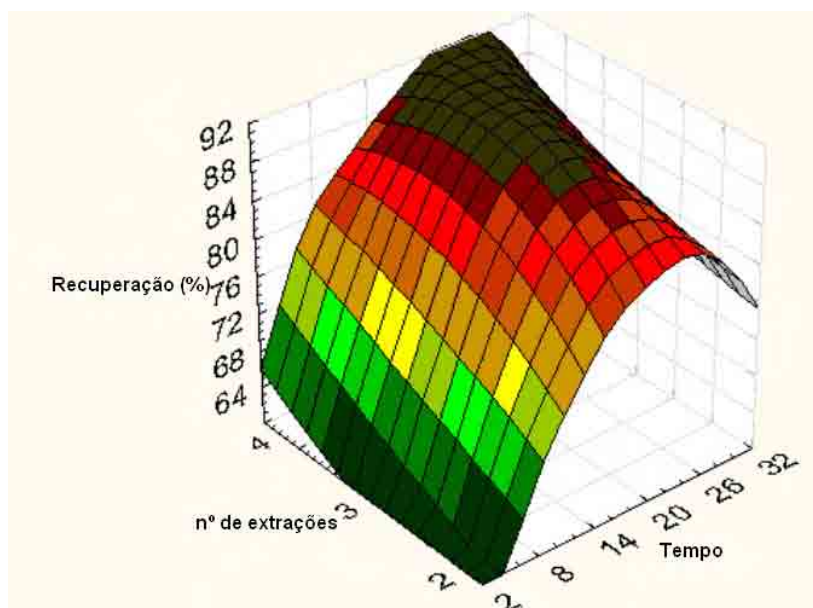


Figura 35: Superfície de resposta para determinação das condições ótimas de extração utilizando diclorometano como solvente.

A otimização da extração por ultra-som foi realizada na posição central do

banho, não havendo diferença significativa (intervalo de confiança de 90% - descrito no item 3.2.8) entre as posições 1, 2 e 3 (Figura 36).



Figura 36: Posição das amostras extraídas no banho ultrassônico (coordenadas: z (profundidade)= 5 cm, x = 25 cm e y= 4,5; 15,5 e 26 cm).

3.3.9 Otimização do solvente de extração

A escolha do solvente para extração foi baseada em estudos relatados na literatura, sendo que um solvente muito utilizado para a extração de HPAs em matrizes ambientais é o diclorometano^{59,61,63}. No sentido de minimizar o uso de solventes clorados, estudou-se a mistura de solventes (diclorometano/*n*-hexano - Figura 37) na extração de 12 HPAs (em nível de concentração médio da curva de calibração) de acordo com a Tabela 14. O solvente escolhido para a extração dos HPAs em rapadura para a próxima etapa do trabalho, foi *n*-hexano, por apresentar-se com menor toxicidade do que a mistura com diclorometano e com recuperações semelhantes (>70%) (Figura 37) para os seguintes HPAs: Pireno,

Benzo[a]antraceno, Criseno, Benzo[e]pireno, Benzo[e]acenanftrileno, Benzo[k]fluoranteno, Dibenzo[a,h]antraceno e Benzo[g,h,i]perileno, com coeficientes de variação menor que 12,7%.

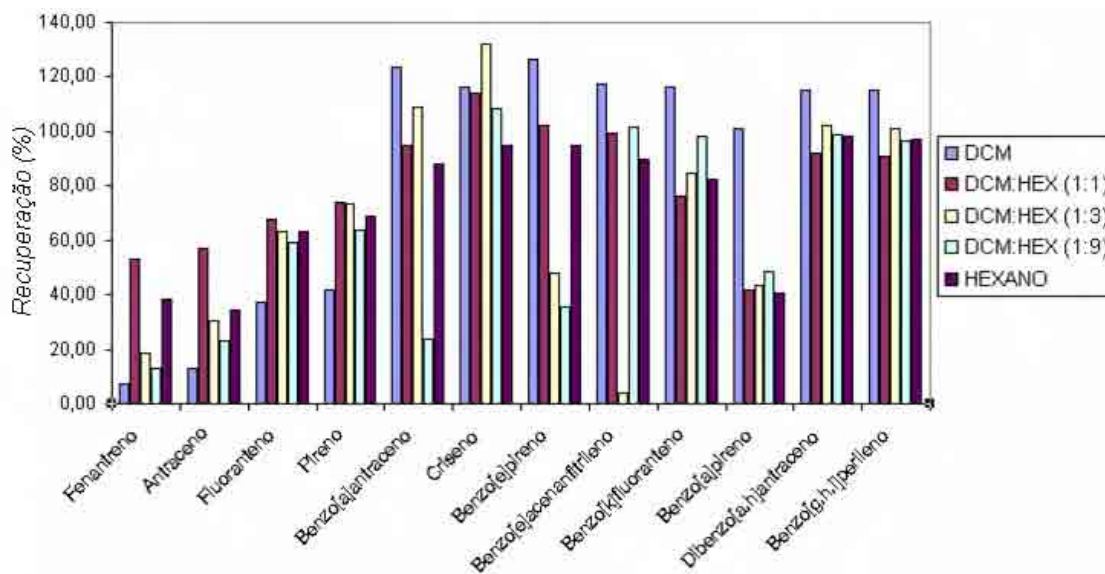


Figura 37: Gráfico do estudo da eficiência de extração dos 12 HPAs, com diferentes proporções de solventes.

A injeção no HPLC-Flu foi de 30 μ L, pois a injeção de maior volume de amostra é apropriada para análises traço⁹⁷. A análise de três amostras testemunha (sem adição dos analitos), não apresentou interferentes para a análise dos HPAs e portanto, não utilizou-se *clean-up* (limpeza) da amostra, de acordo a Figura 38.

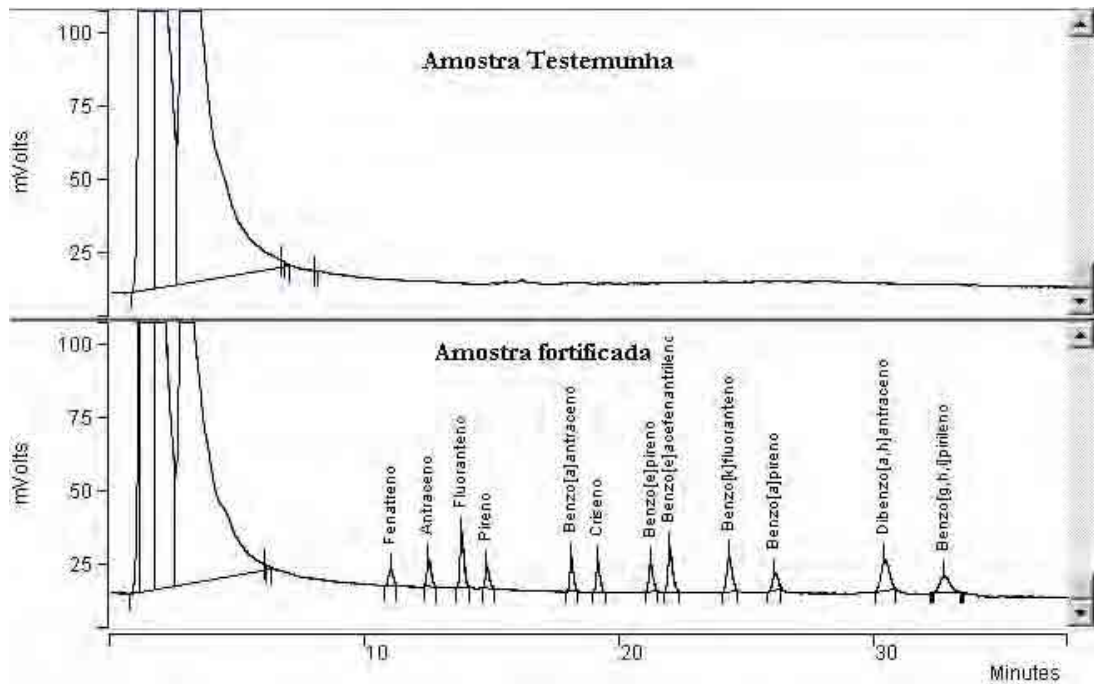


Figura 38: Cromatogramas referentes à amostra testemunha e a amostra fortificada, indicando que não houve interferentes durante o processo de extração. Níveis de fortificação na Tabela 14.

O método otimizado para extração de HPAs está apresentado no fluxograma da Figura 39.

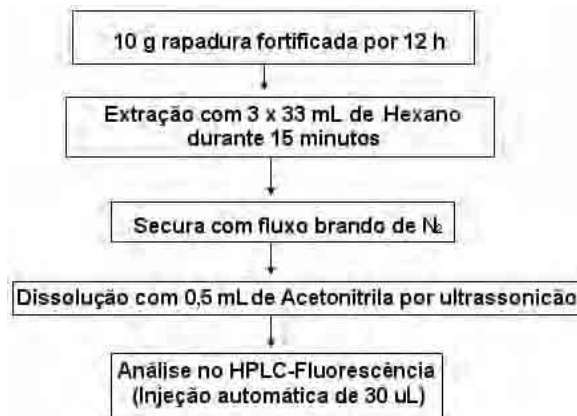


Figura 39: Fluxograma para o tratamento da amostra, os solventes utilizados estão indicados na Figura 37.

3.3.10 Estudos de recuperação

Triturou-se a rapadura de modo a aumentar a superfície de contato entre a amostra e o solvente extrator (hexano), então dividiu-se a rapadura em duas partes: uma controle (sem fortificar) e outra fortificada com os HPAs. Fortificou-se 10g de rapadura em três níveis: inferior, médio e superior, nas proximidades dos valores máximo, médio e mínimo, respectivamente, da curva de calibração de cada HPA. A fortificação foi feita utilizando-se solução dos HPAs em acetoneitrila, utilizando-se adição de volume adequado com microseringas. A mistura foi agitada manualmente por cinco minutos. A Tabela 16 mostra a concentração de cada HPA nos três níveis de fortificação.

Tabela 16: Níveis de fortificação, porcentagens de recuperação e coeficiente de variação (triplicatas) para os HPAs utilizando-se de método descrito na Figura 39.

| HPA | Nível de fortificação Inferior | | | Nível de fortificação Intermediário | | | Nível de fortificação Superior | | |
|------------------|---------------------------------|-------|------|-------------------------------------|-------|------|---------------------------------|-------|------|
| | Conc. ($\mu\text{g Kg}^{-1}$) | Rec % | CV % | Conc. ($\mu\text{g Kg}^{-1}$) | Rec % | CV % | Conc. ($\mu\text{g Kg}^{-1}$) | Rec % | CV % |
| Fenantreno | 0,55 | 40 | 13 | 4,5 | 45 | 11 | 9,15 | 61 | 8 |
| Antraceno | 0,015 | 39 | 13 | 0,11 | 42 | 10 | 0,25 | 59 | 8 |
| Fluoranteno | 0,15 | 54 | 12 | 1,75 | 65 | 10 | 3,6 | 79 | 10 |
| Pireno | 0,05 | 62 | 10 | 0,6 | 70 | 8 | 1,2 | 81 | 5 |
| Benzo[a]antr. | 0,1 | 71 | 10 | 0,8 | 81 | 9 | 1,6 | 91 | 6 |
| Criseno | 0,4 | 75 | 12 | 3,25 | 83 | 9 | 6,5 | 93 | 7 |
| Benzo[e]pireno | 0,1 | 72 | 8 | 1,2 | 81 | 9 | 2,4 | 92 | 9 |
| Benzo[e]acef. | 0,15 | 69 | 12 | 1,35 | 78 | 11 | 2,7 | 89 | 10 |
| Benzo[k]fluor.o | 0,01 | 74 | 13 | 0,05 | 81 | 11 | 0,2 | 88 | 10 |
| Benzo[a]pireno | 0,05 | 42 | 13 | 0,5 | 49 | 11 | 1,05 | 64 | 10 |
| Dibenzo[a,h] | 0,45 | 73 | 7 | 4,5 | 87 | 6 | 9,4 | 95 | 7 |
| Benzo[g,h,i] | 0,45 | 76 | 6 | 4,5 | 85 | 8 | 9,4 | 95 | 9 |
| Indeno[1,2,3-cd] | 0,60 | 73 | 11 | 1,5 | 80 | 10 | 2,95 | 94 | 11 |

A recuperação dos analitos se mostrou adequada dentro da faixa de 40 a 120% preconizada pela literatura para concentrações menores que 0,0000001%⁸⁴ como repretado na Tabela 17.

Tabela 17: Recuperação do analito em função da concentração.

| Concentração do analito (%) | Intervalo de Recuperação Aceito |
|-----------------------------|---------------------------------|
| > 10 | 98-102 |
| > 1 | 97-103 |
| > 0,1 | 95-105 |
| > 0,01 | 90-107 |
| > 0,001 - > 0,00001 | 80-110 |
| > 0,000001 | 60-115 |
| > 0,0000001 | 40-120 |

Fonte: BRITO, 2003⁸⁴.

3.3.11 Limites de detecção e quantificação da metodologia analítica

Os limites de detecção e quantificação do método foram determinados de acordo com a proposta de Thier⁸⁸, descrito na seção 1.11. A Tabela 18 mostra os valores de limite de detecção e quantificação para cada HPA estudado.

Tabela 18: Limites de detecção e quantificação do método segundo Thier (descrito na seção 1.11).

| HPA | LD ($\mu\text{g Kg}^{-1}$) | LQ ($\mu\text{g Kg}^{-1}$) | HPA | LD ($\mu\text{g Kg}^{-1}$) | LQ ($\mu\text{g Kg}^{-1}$) |
|------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| Fenantreno | 0,178 | 0,55 | Benzo[k]fluoranteno | 0,0034 | 0,01 |
| Antraceno | 0,003 | 0,015 | Benzo[a]pireno | 0,033 | 0,05 |
| Fluoranteno | 0,044 | 0,15 | Dibenzo[a,h]antraceno | 0,014 | 0,45 |
| Pireno | 0,014 | 0,05 | Benzo[g,h,i]perileno | 0,056 | 0,45 |
| Benzo[a]antraceno | 0,051 | 0,1 | Indeno[1,2,3-cd]pireno | 0,022 | 0,60 |
| Criseno | 0,042 | 0,4 | | | |
| Benzo[e]pireno | 0,022 | 0,1 | | | |
| Benzo[e]acefenantri- leno | 0,13 | 0,15 | | | |

3.3.12 Análise de amostras de rapadura

As amostras de rapadura foram obtidas do comércio de Natal (RN) e de Araraquara (SP), e apresentavam-se com coloração escura e com partículas com aspecto de carvão, sendo estas insolúveis em água.

Após a validação do método para a análise dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, utilizou-se o método validado para avaliação das amostras comercializadas em Natal-RN e Araraquara-SP.

Os cromatogramas da Figura 40, representam as análises das amostras obtidas.

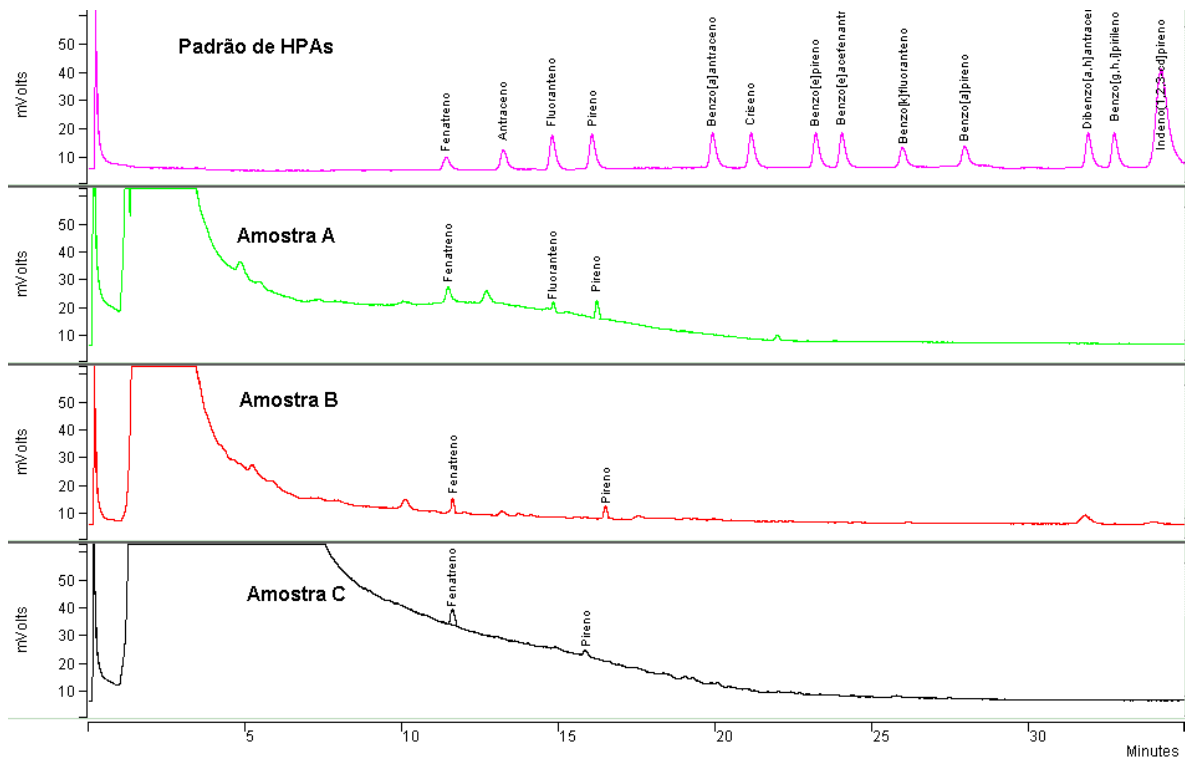


Figura 40: Cromatogramas das rapaduras comercializadas em Natal-RN (A e B) e em Araraquara-SP (C).

A Tabela 19, apresenta dos resultados obtidos na análise das amostras. A concentração no extrato final (0,5 mL) foi obtida pelo uso das equações das curvas analíticas (Figura 43).

Tabela 19: Resultados das análises das rapaduras comercializadas em Natal-RN (A e B) e em Araraquara-SP (C).

| Amostra | Concentração obtida pela curva de calibração ($\mu\text{g L}^{-1}$) | C.V % (Triplicata) | Massa da amostra (g) | Resultados das amostras ($\mu\text{g Kg}^{-1}$) |
|------------|---|---------------------|----------------------------|---|
| Rapadura A | Fenantreno – 13,21 Pireno – 7,28 Fluoranteno – 10,86 | 11,8 8,7 11,2 | 10,023 10,149 10,056 | 0,66 0,36 0,54 |
| Rapadura B | Fenantreno – 16,41 Pireno – 4,97 | 12,1 9,2 | 9,986 10,079 | 0,82 0,25 |
| Rapadura C | Fenantreno – 20,42 Pireno – 3,89 | 11,4 9,4 | 10,112 10,864 | 1,01 0,18 |

Além do tempo de retenção, utilizou-se da técnica de GC-MS-MS para identificar os HPAs encontrados no HPLC-Fluorescência. Os fragmentogramas estão apresentados na Figura 41.

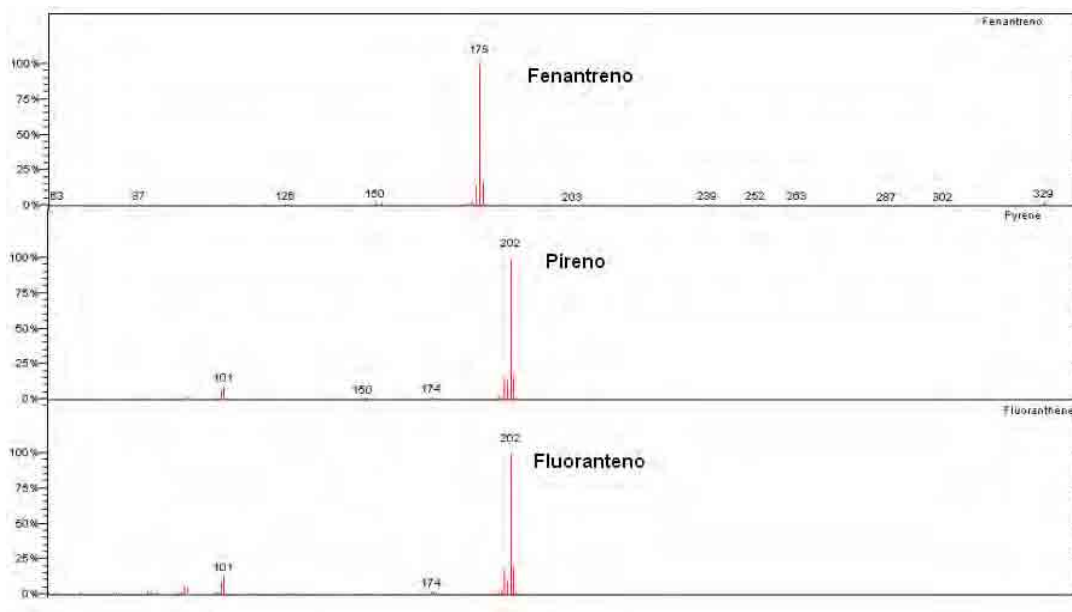


Figura 41: Fragmentogramas encontrados nas análises de rapadura por GC-MS-MS.

Além dos fragmentogramas pertencentes aos HPAs, encontrou-se algumas substâncias poliaromáticas não pertencentes aos considerados prioritários pela NIOSH. Na Tabela 20 e na Figura 42 estão representados os compostos encontrados na rapadura.

Tabela 20: Relação de substâncias encontradas na rapadura por GC-MS.

| <u>Nº</u> | <u>Substância</u> |
|-----------|---|
| 1 | 3-Metoxioxima-Benzaldeido |
| 2 | Fenaleno |
| 3 | 2,3-Dimetil-2,3-Di-(2,2'-naftil)-Butano |
| 4 | Acepireno |
| 5 | Dibenzo[def,mno]criseno |

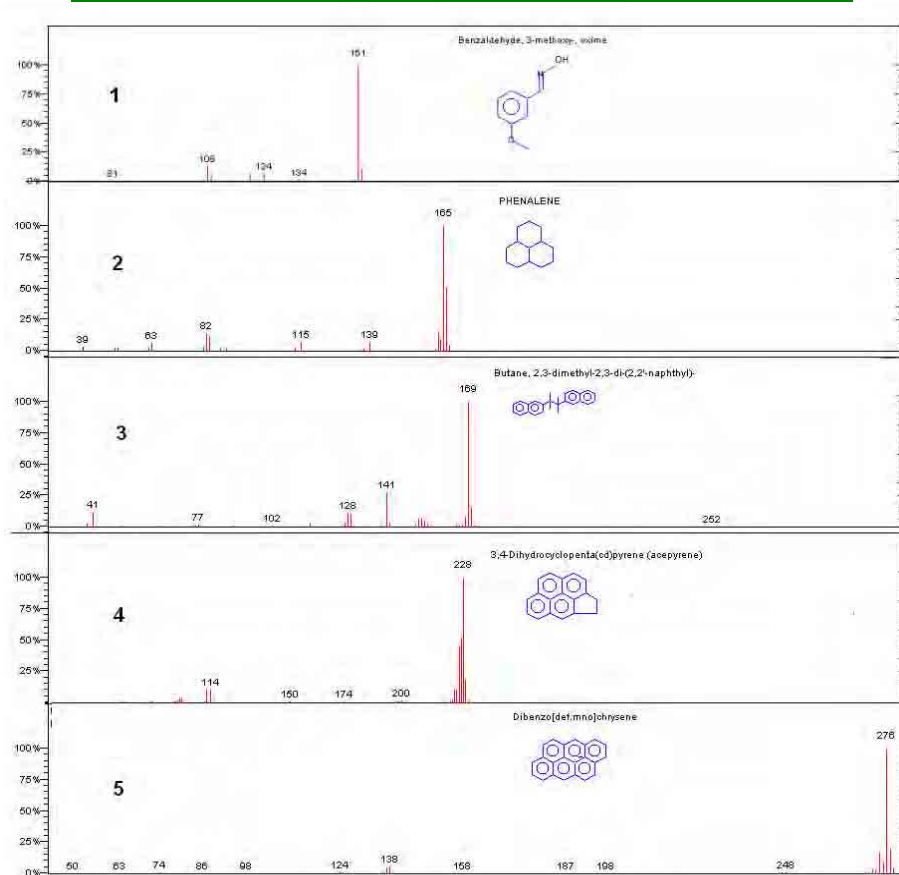


Figura 42: Fragmentogramas das moléculas encontradas na rapadura por análise em GC-MS.

4 Conclusões e perspectivas futuras

O método cromatográfico otimizado apresentou-se dentro dos parâmetros de confiabilidade analítica descritos na literatura⁷⁷. O método otimizado supera os já relatados na literatura em resolução, tempo de análise e número de HPAs analisados, devendo ser adotado em estudos de HPAs que o grupo de pesquisa em que foi desenvolvido este trabalho venha a desenvolver.

O método de tratamento da amostra, apresentou-se eficiente e rápido. O solvente escolhido para a extração dos HPAs em rapadura foi *n*-hexano, por ser muito menos tóxico que a mistura com diclorometano e com recuperações semelhantes (>70%) para os seguintes HPAs: Pireno, Benzo[a]antraceno, Criseno, Benzo[e]pireno, Benzo[e]acenanfrileno, Benzo[k]fluoranteno, Dibenzo[a,h]antraceno e Benzo[g,h,i]perileno.

Tendo em vista que legislações preconizam níveis de concentração apenas para benzo[a]pireno em óleo de oliva^{24,25} (2 µg Kg⁻¹), há a necessidade de monitorar outros tipos de alimentos. Para as amostras analisadas a soma dos HPAs esteve acima do preconizado por alguns países como sendo o máximo permitido de HPAs em alimentos (1 µg Kg⁻¹)¹.

Uma vez que foram encontrados HPAs nas amostras de rapadura analisadas, recomenda-se que o estudo seja continuado no sentido de ampliar o número de amostras analisadas e de localidades produtoras, além de ser importante a investigação do poder mutagênico do extrato de rapadura.

5 Destinação dos Resíduos Químicos

Os resíduos gerados neste trabalho eram constituídos basicamente de solventes orgânicos (principalmente acetonitrila) e HPAs. Ambos resíduos foram segregados (conforme as Normas para Gerenciamento de Resíduos Químicos do IQ/UNESP⁹⁸), armazenados no Depósito de Resíduos do IQ/UNESP e encaminhados posteriormente à incineração.

Anexo

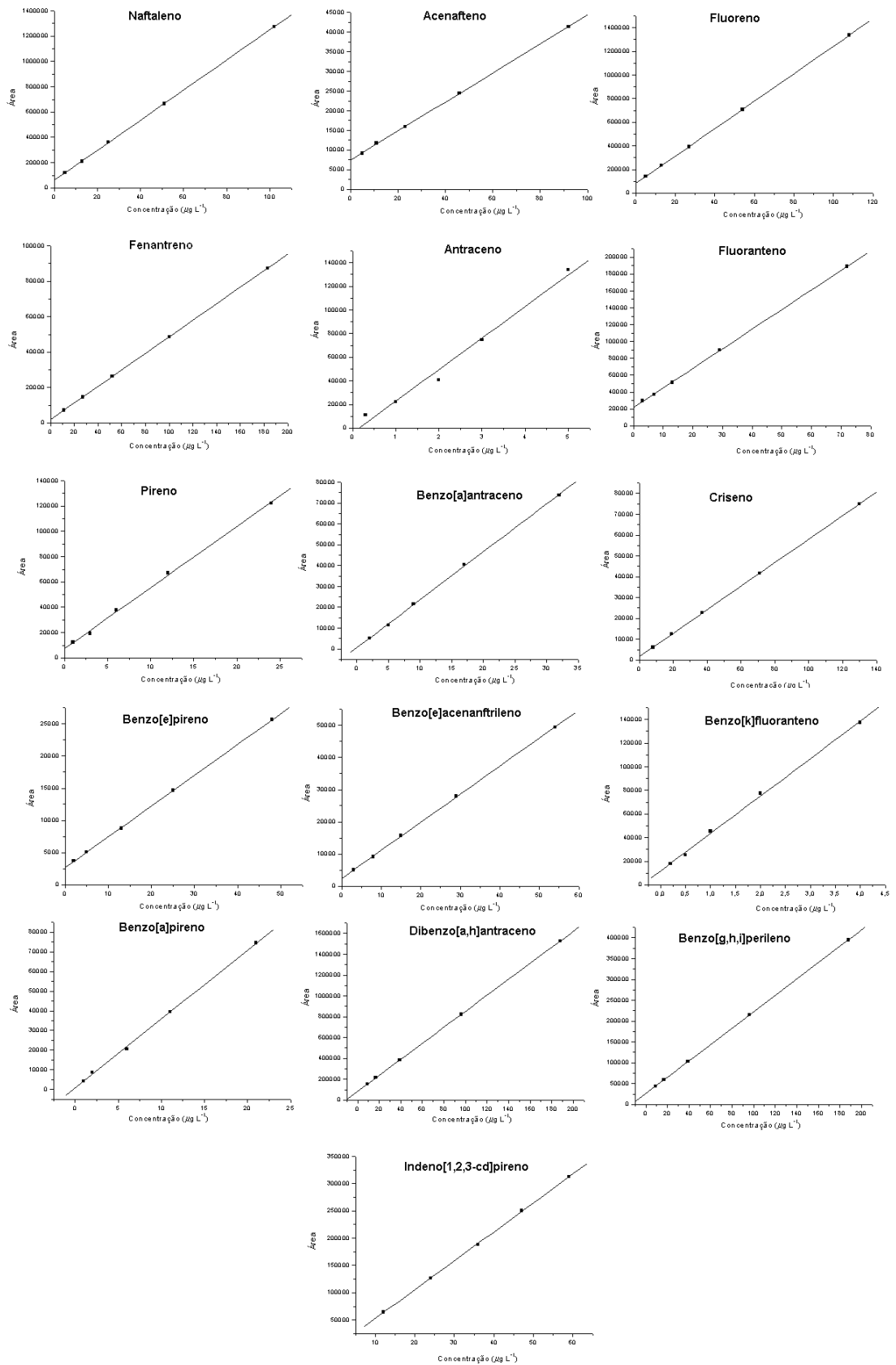


Figura 43: Curvas analíticas dos HPAs estudados.

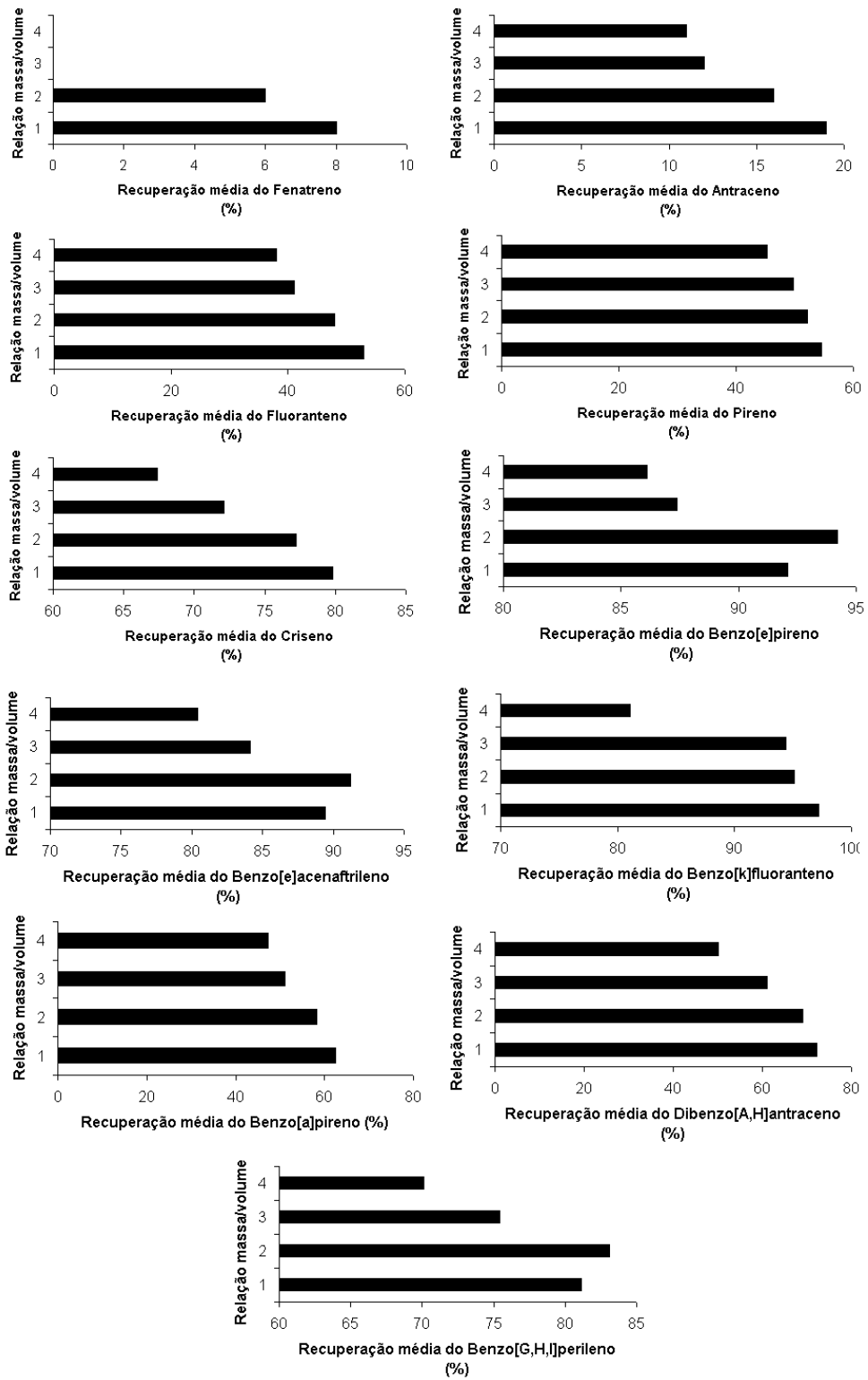


Figura 44: Recuperação média dos HPAs (triplicata) na rapadura com diclorometano, utilizada para a otimização de massa/volume de extração, concentração de cada HPA apresentada na Tabela 14.

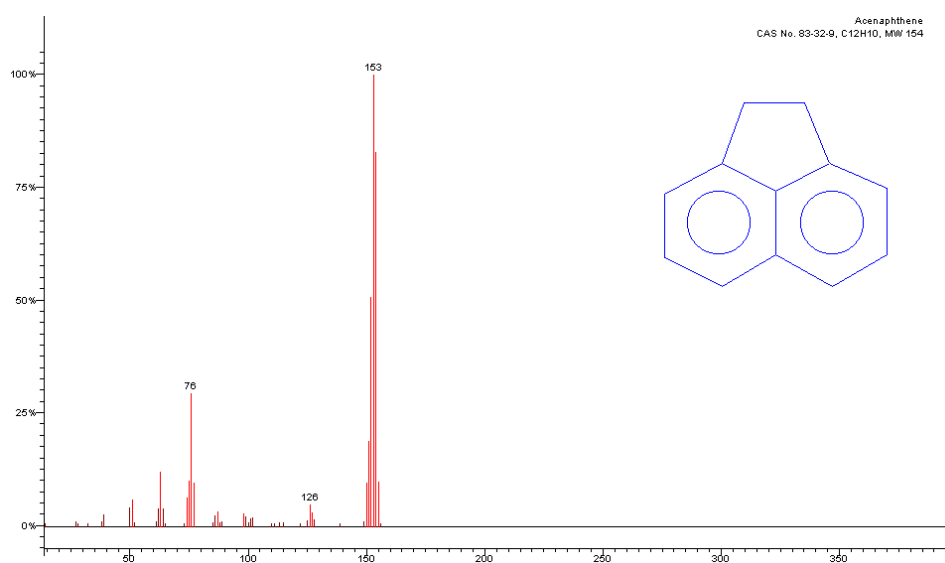


Figura 45: Fragmentograma do acenafeno no modo MS, o íon de maior intensidade m/z (153) foi selecionado para fazer o método MS-MS.

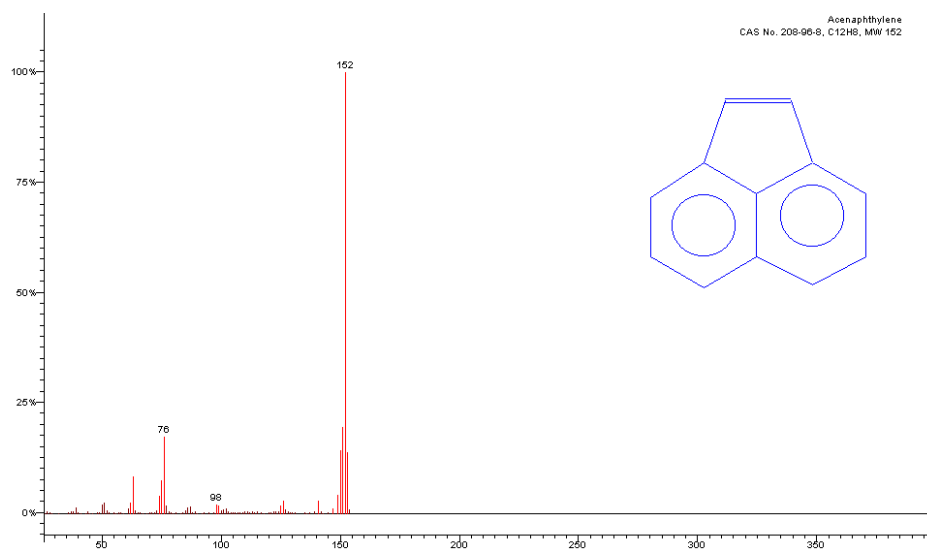


Figura 46: Fragmentograma do acenafileno no modo MS, o íon de maior intensidade m/z (152) foi selecionado para fazer o método MS-MS.

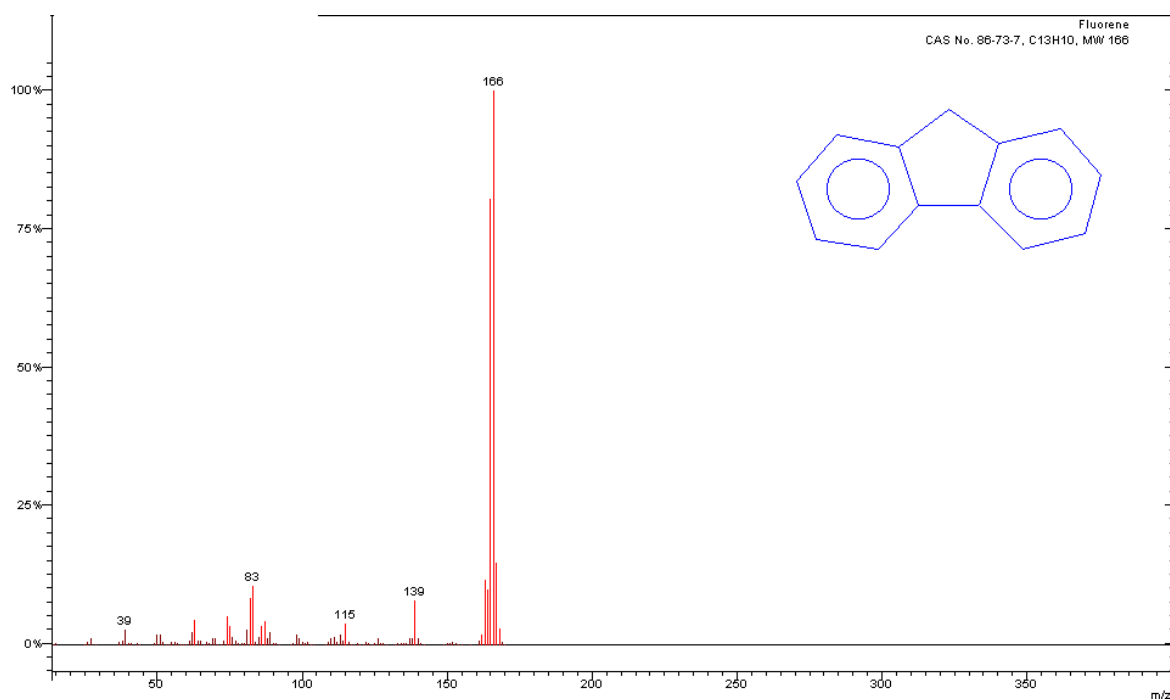


Figura 47: Fragmentograma do fluoreno no modo MS, o íon de maior intensidade m/z (166) foi selecionado para fazer o método MS-MS.

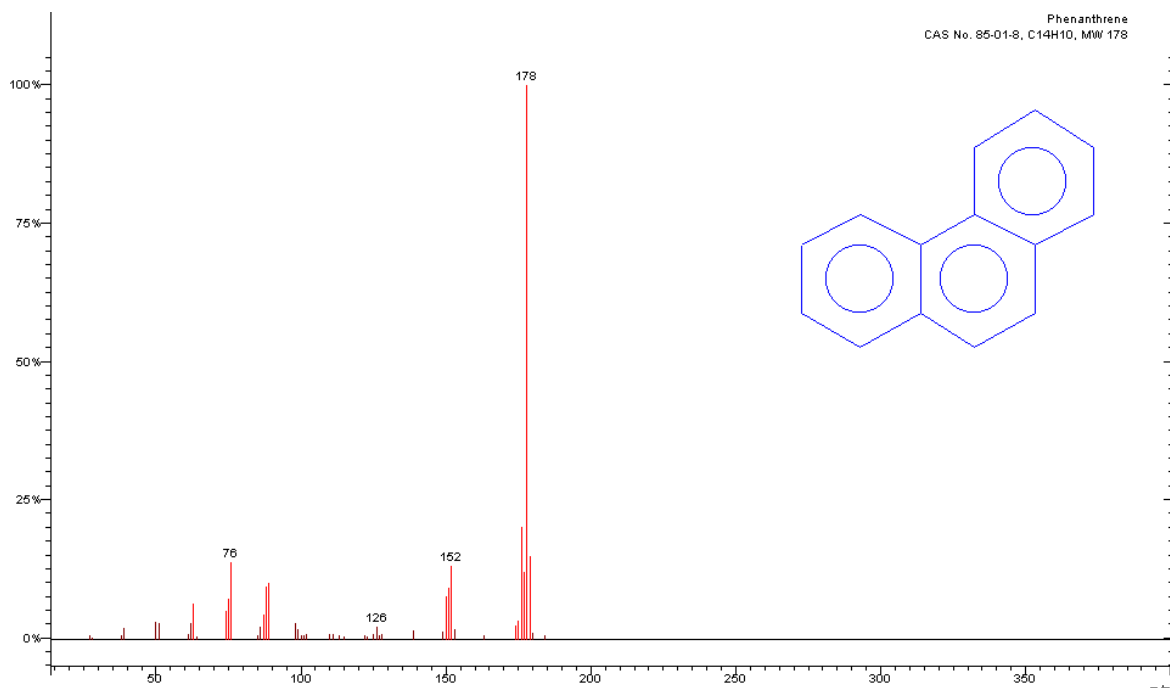


Figura 48: Fragmentograma do fenantreno no modo MS, o íon de maior intensidade m/z (178) foi selecionado para fazer o método MS-MS.

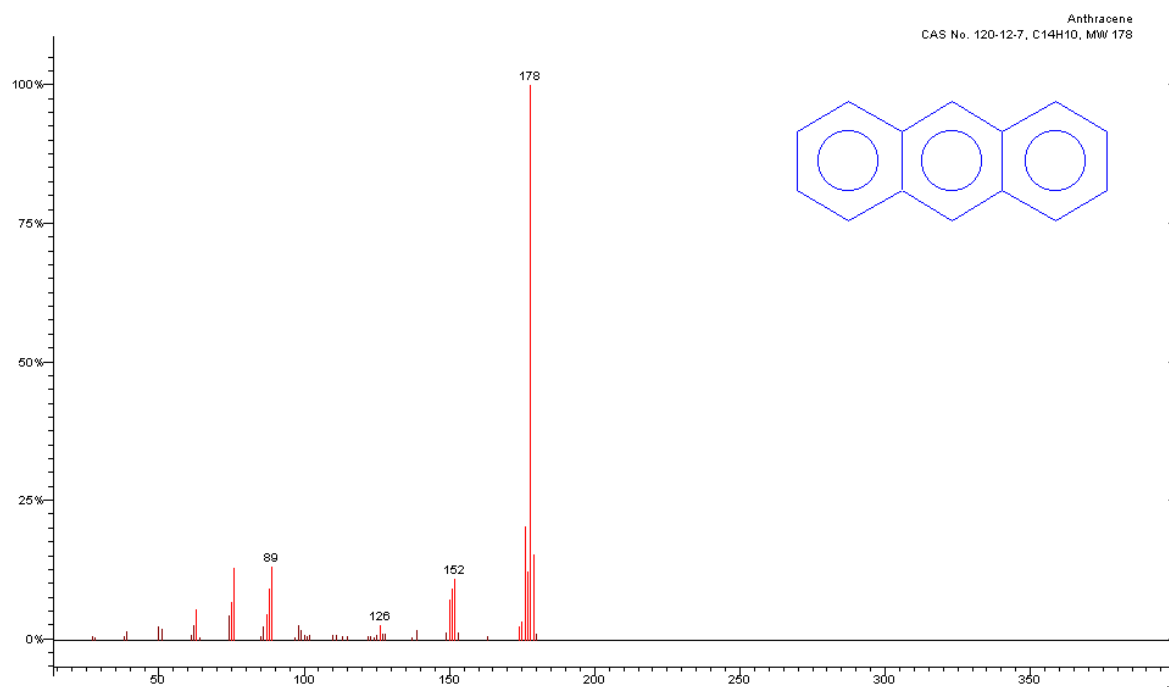


Figura 49: Fragmentograma do antraceno no modo MS, o íon de maior intensidade m/z (178) foi selecionado para fazer o método MS-MS.

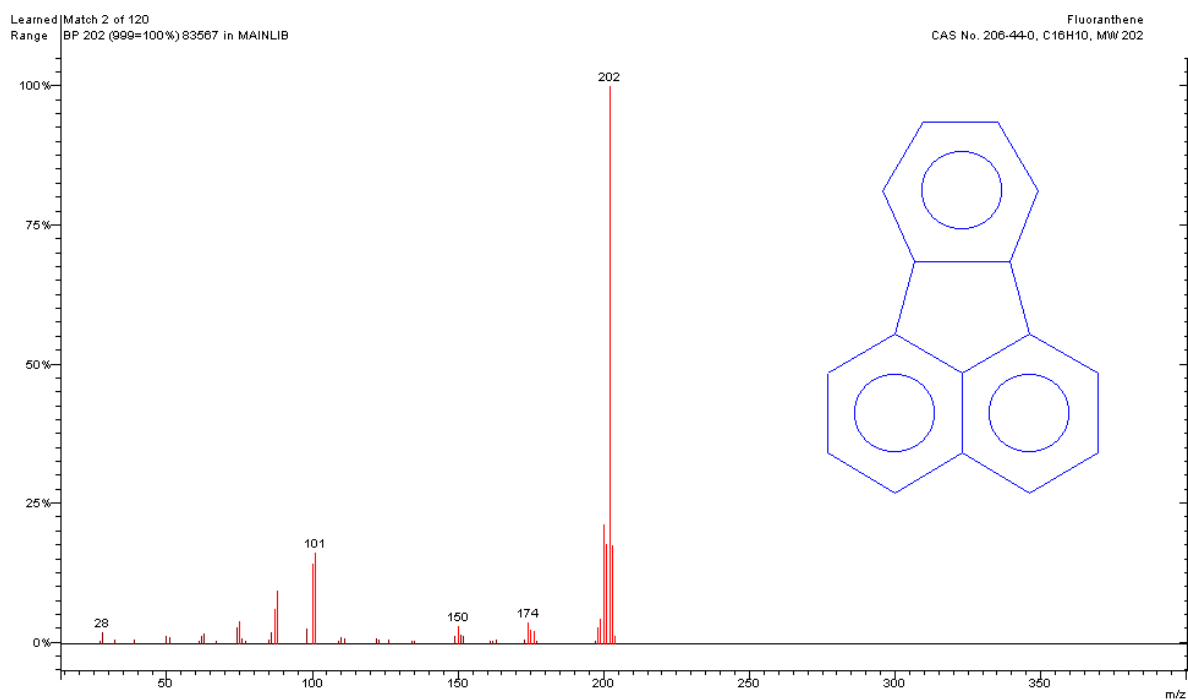


Figura 50: Fragmentograma do fluoranteno no modo MS, o íon de maior intensidade m/z (202) foi selecionado para fazer o método MS-MS.

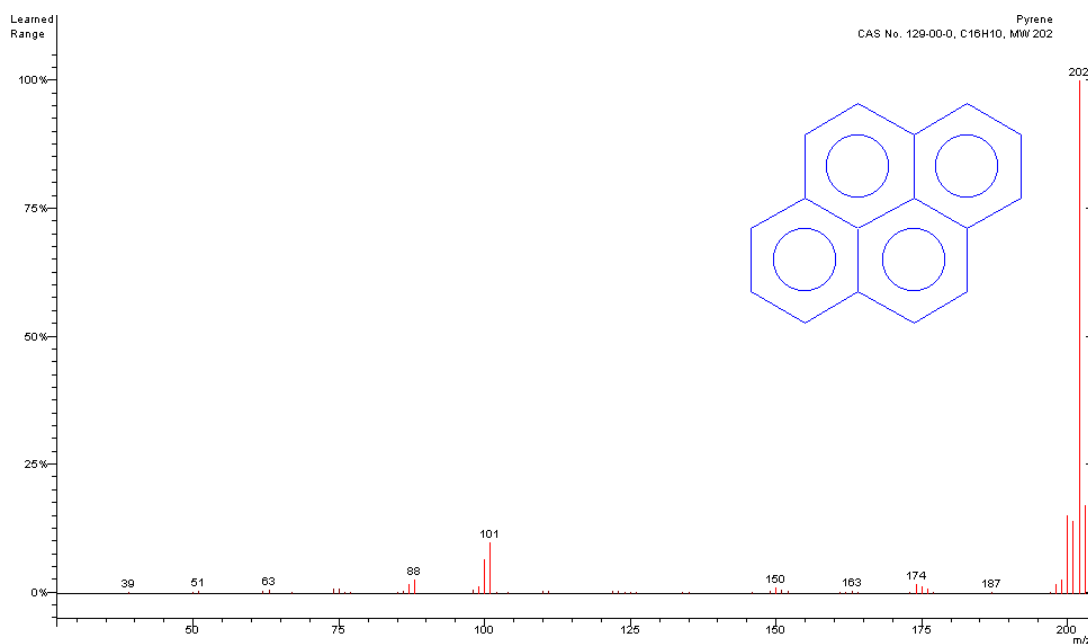


Figura 51: Fragmentograma do pireno no modo MS, o íon de maior intensidade m/z (202) foi selecionado para fazer o método MS-MS.

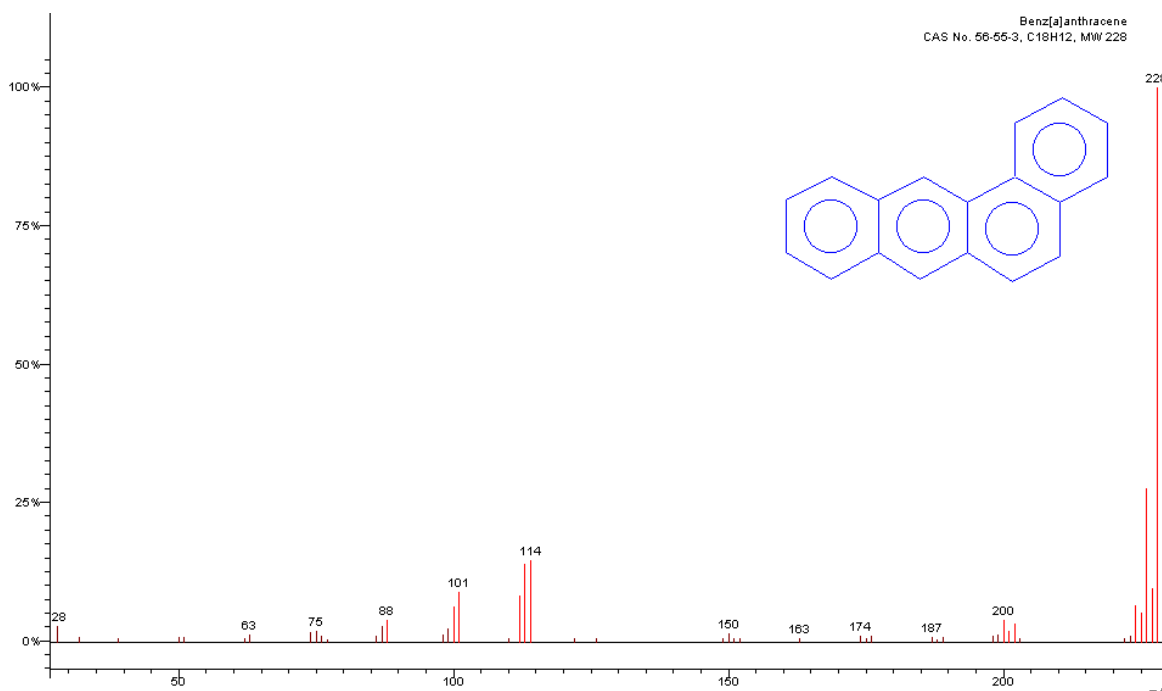


Figura 52: Fragmentograma do benzo[a]antraceno no modo MS, o íon de maior intensidade m/z (228) foi selecionado para fazer o método MS-MS.

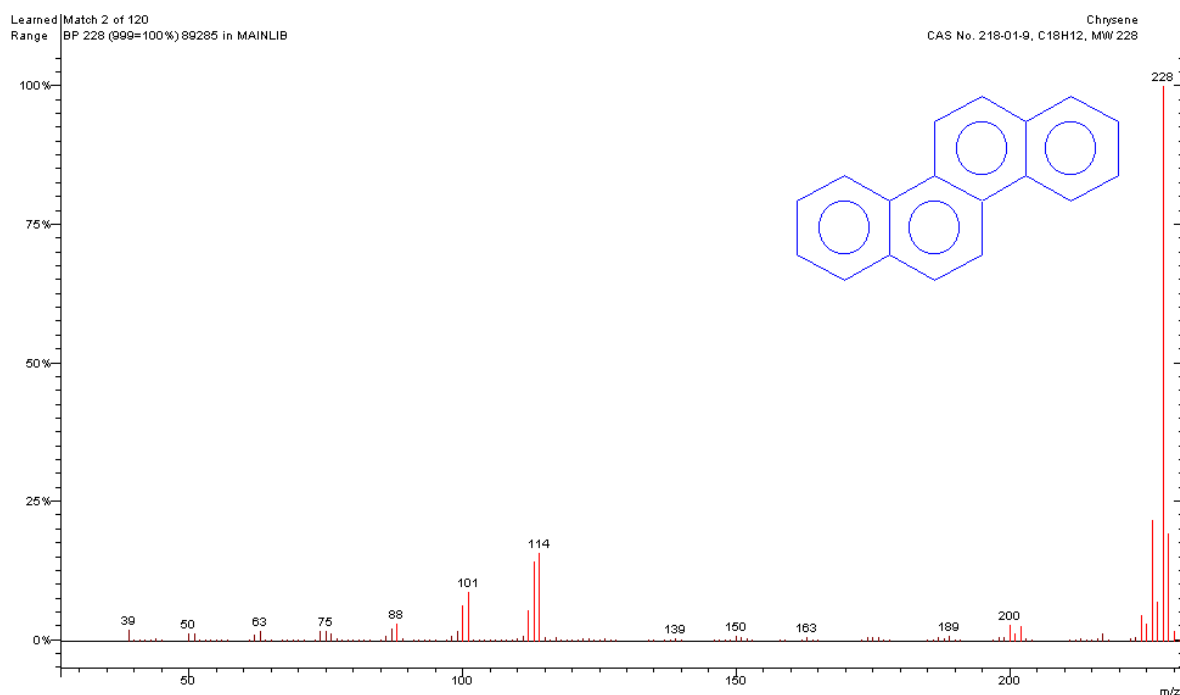


Figura 53: Fragmentograma do criseno no modo MS, o íon de maior intensidade m/z (228) foi selecionado para fazer o método MS-MS.

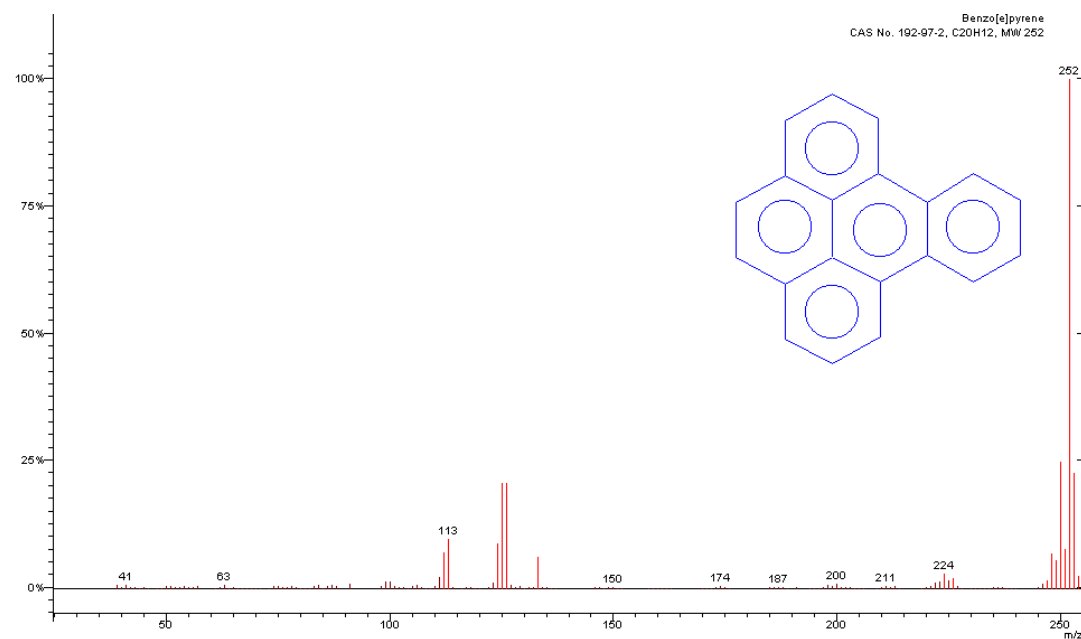


Figura 54: Fragmentograma do benzo[e]pireno no modo MS, o íon de maior intensidade m/z (252) foi selecionado para fazer o método MS-MS.

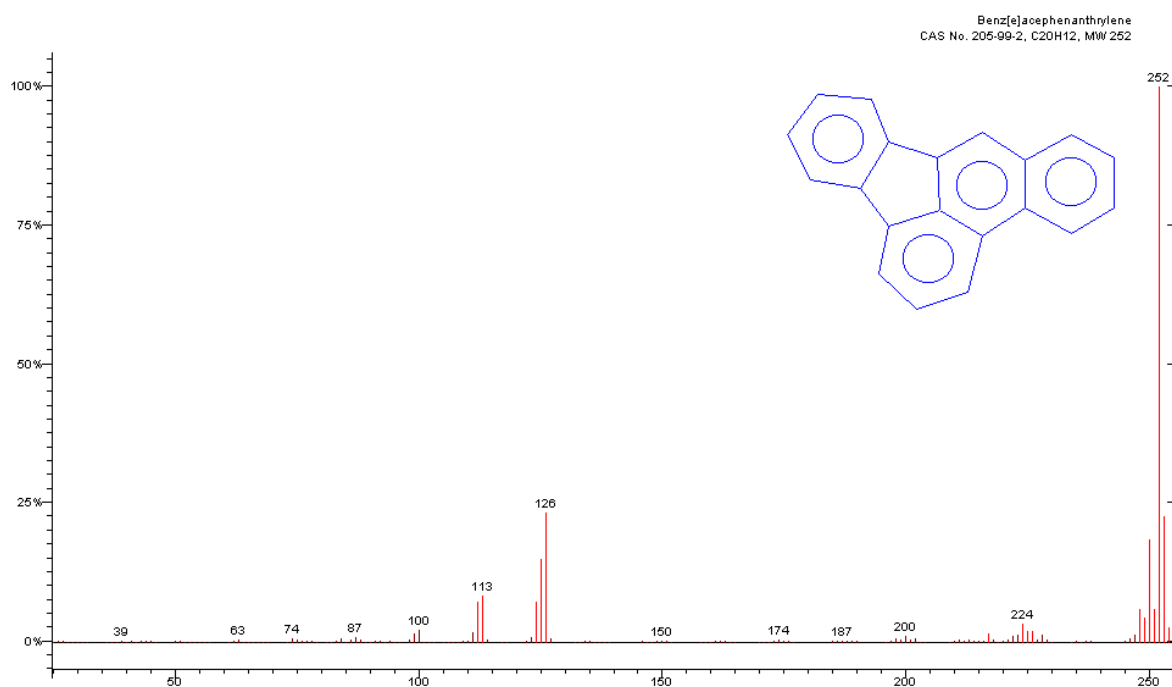


Figura 55: Fragmentograma do benzo[*e*]acenaftrileno no modo MS, o íon de maior intensidade m/z (252) foi selecionado para fazer o método MS-MS.

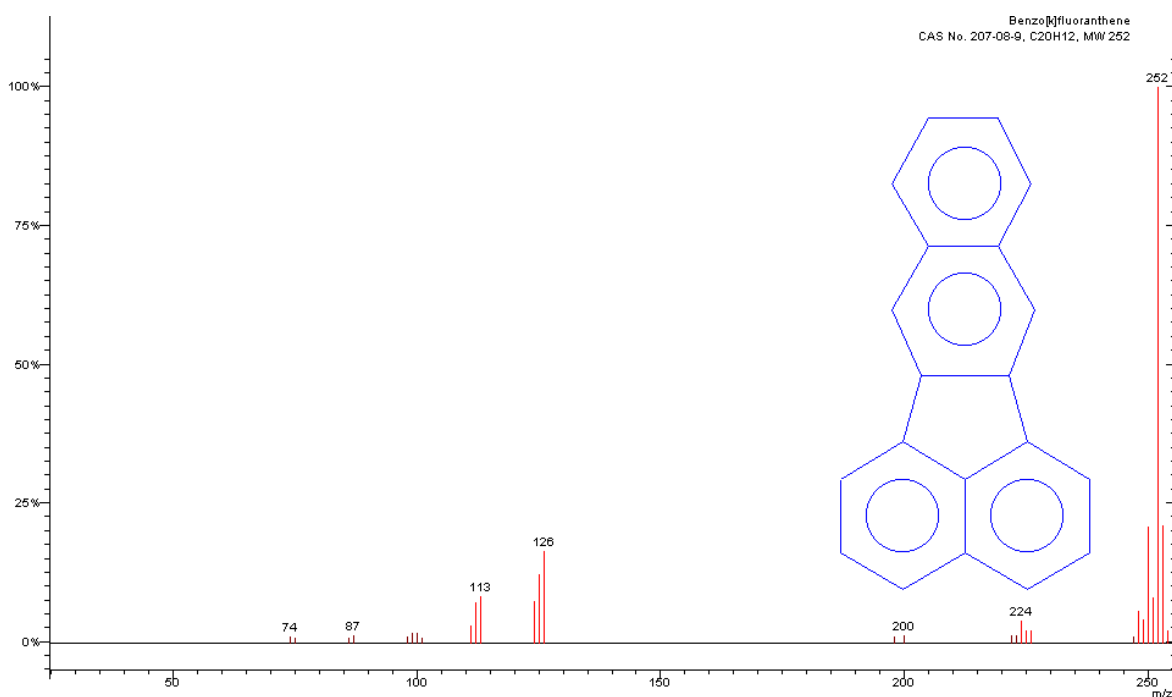


Figura 56: Fragmentograma do benzo[*k*]fluoranteno no modo MS, o íon de maior intensidade m/z (252) foi selecionado para fazer o método MS-MS.

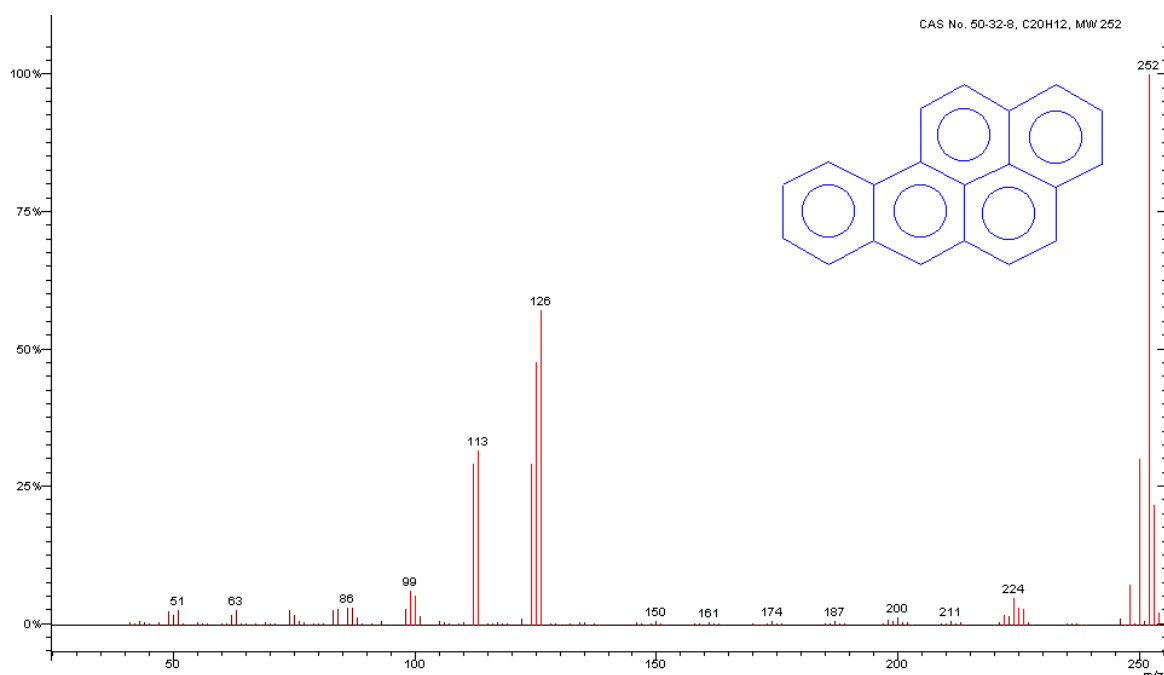


Figura 57: Fragmentograma do benzo[a]pireno no modo MS, o íon de maior intensidade m/z (252) foi selecionado para fazer o método MS-MS.

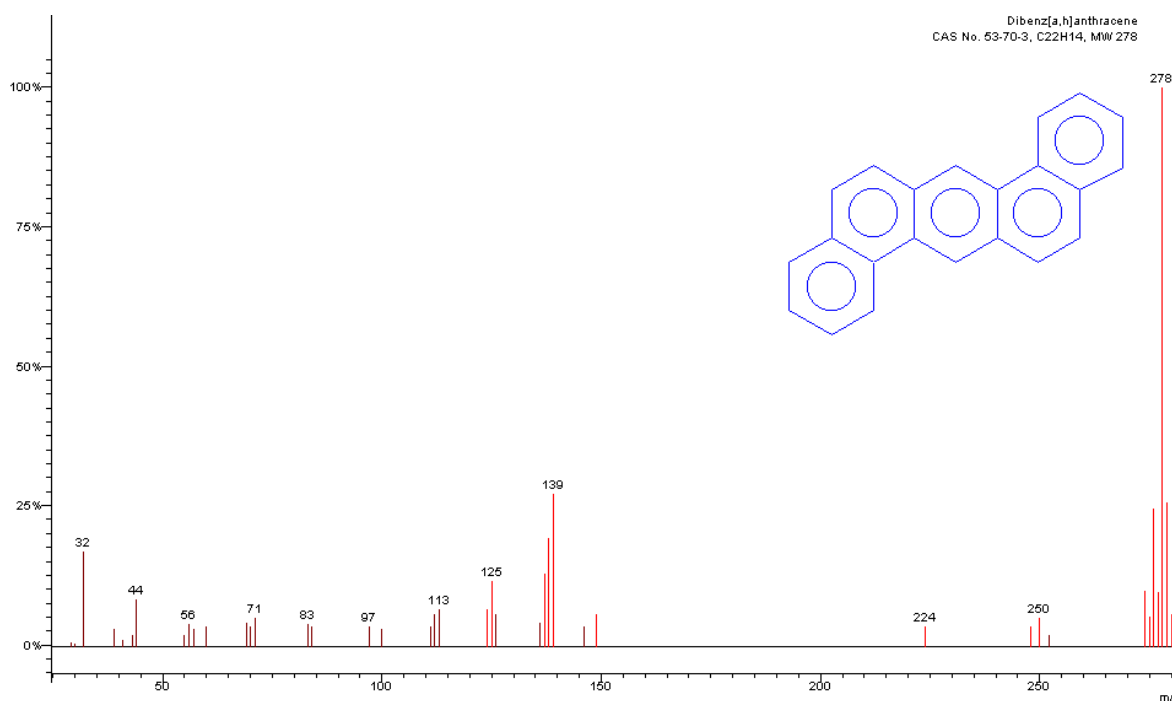


Figura 58: Fragmentograma do dibenzo[a,h]antraceno no modo MS, o íon de maior intensidade m/z (278) foi selecionado para fazer o método MS-MS.

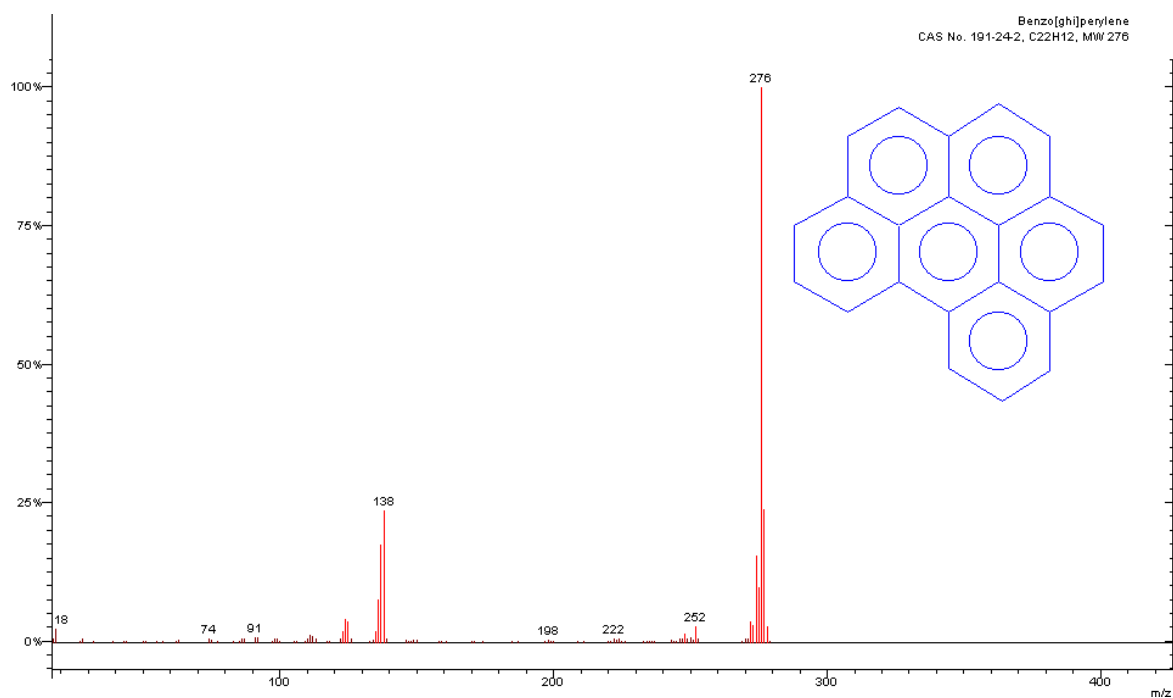


Figura 59: Fragmentograma do benzo[g,h,i]perileno no modo MS, o íon de maior intensidade m/z (276) foi selecionado para fazer o método MS-MS.

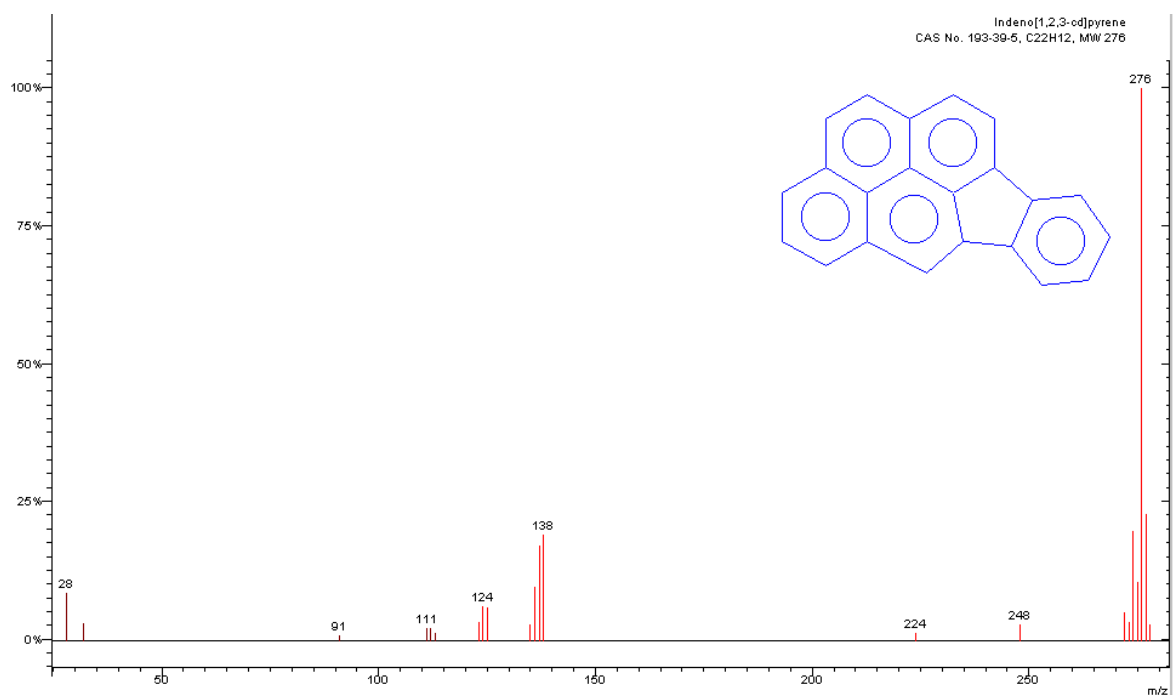


Figura 60: Fragmentograma do indeno(1,2,3-cd)pireno no modo MS, o íon de maior intensidade m/z (276) foi selecionado para fazer o método MS-MS.

Referências

- 1 SILVA, J. A. **Tópicos da tecnologia de alimentos**. São Paulo: Varela, 2000. 229 p.
- 2 WILLETT, W. C.; STAMPFER, M. J. Rebuilding the food pyramid. **Scientific American**, v. 288, n. 1, p. 64-71, 2003.
- 3 WEIS, B.; CHAIM, N. A.; BELIK, W. **Manual de gestão eficiente da merenda escolar**. 2. ed. 2005. Disponível em: <<http://www.apoiofomezero.org.br/arquivos/ManualdeGestaoEficientedaMerendaEscolar2005.pdf>>. Acesso em: 17 jul. 2006.
- 4 PRODUÇÃO da rapadura. Disponível em: <<http://geocities.yahoo.com.br/abtine2000/Rapadura/producao.htm>>. Acesso em: 18 jul. 2006.
- 5 RAPADURA, engenhos. Disponível em: <<http://www.fundaj.gov.br/notitia/servlet/newstorm.ns.presentation.NavigationServlet?publicationCode=16&pageCode=316&textCode=1545&date=currentDate>>. Acesso em: 18 jul. 2006.
- 6 BYE, P.; MEUNIER, A.; MUCHINIK, J. As inovações açucareiras: permanência e diversidade de paradigmas. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, v. 10, n. 1/3, p. 35-52, 1993.
- 7 ZAMPERLINI, G. C. M. **Identificação da fuligem proveniente da cana-de-açúcar com ênfase nos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs)**. 1997. 93 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 1997.
- 8 MENZIE, C. A.; POTOCKI, B. B.; SANTODONATO, J. **Exposure to carcinogenic PAHs in the environment**. *Environmental Science Technology*, n. 7, v. 26, 1992.
- 9 ZAMPERLINI, C. M. G.; SILVA-SANTIAGO, M.; VILEGAS, W. Solid-phase extration of sugar cane soot extract for analysis by gas chromatography with flame ionization and mass spectrometric detection. **Journal of Chromatography, A**, v. 889, n. 1, p. 281-289, 2000.
- 10 HOLLIGER, C. et al. Contaminated environments in subsurface and biodegradation: organic contaminants. **Feems Microbiology Reviews**, v. 20, n. 1, p. 517-523, 1997.
- 11 AKHLAQ, M. S. Detailed analysis of crude oil group types using reversed-phase high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 677, n. 1, p. 265-272, 1994.
- 12 BETTIN, S. M.; FRANCO, D. PHAs in spirits. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 2, p. 234-238, Apr./June 2005.

13 ROJO M. C.; TOLEDO, M. C. F. Coffee and mate tea as a dietary source of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAHs) in Campinas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 22, n. 1, p. 49-53, 2002.

14 RAPADURA. Disponível em:
<<http://www.galeria.fapesq.rpp.br/displayimage.php?album=lastup&cat=0&pos=1>> Acesso em: 18 jul. 2006.

15 VOS, R. H.; DOKKUM, W. Polycyclic aromatic hydrocarbons in total diet samples. **Food Chemical Toxicology**, v. 28, n. 1, p. 263-268, 1990.

16 LEE, M.; NOTNY, M. V.; BARTLE, K. D. **Analytical chemistry of polycyclic aromatic compounds**. New York: Academic Press, 1981. 462 p.

17 O'NEIL, M. J. (Ed.). **The Merck index**. 13th ed. Whitehouse Station : Merck, 2001.

18 LANE, L. D.; HANSEN, L. D.; EATOUGH, D. J. Polycyclic aromatic hydrocarbons: atmospheric physics and chemistry. In: _____. **Organic chemistry of the atmosphere**. Boca Ranton: CRC Press, 1991.

19 WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Selected non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons**. Geneva, 1998. 883 p. (Environmental Health Criteria, 202).

20 CHRISTEN, K. Scrutinizing pavement sealants for PAHs. **Environmental Science & Technology**, v. 39, n. 15, p. 312-313, 2005.

21 BAREK, J.; MEJSTRIK, V.; SVAGROVA, I. Evaluation of human exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons based on monitoring of their metabolites in body fluids. **Chemické Listy**, v. 88, n. 6, p. 341-352, 1994.

22 WIGLEY, C. et al. Carcinogênese química e lesões pré-cancerosas. In: FRANKS, L. M.; TEICH, N. M. **Introdução à biologia celular e molecular do câncer**. São Paulo: Roca, 1990. cap. 7, p. 136-137.

23 AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências. Portaria n. 1469, de 29 de dezembro de 2000. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/1469_00.htm>. Acesso em: 15 jul. 2006.

24 AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Exige como procedimento de importação para "aceite de orujo de oliva" ou óleo de bagaço e ou caroço de oliva, sem prejuízo da documentação exigida para este fim, a apresentação do laudo de análise do produto quanto à presença de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, especificamente o alfa-benzopireno, com identificação do lote e ou data de produção ou fabricação. Resolução RDC n. 281, de 06 de outubro de 2003. Disponível em: <<http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=8136>> Acesso em: 15 jul. 2006.

25 COUNCIL Regulation (EC) No. 1513/2001 of 23 July 2001 amending Regulations No. 136/66/EEC and (EC) No. 1638/98 as regards the extension of the period of validity of the aid scheme and the quality strategy for olive oil. Disponível em: < <http://www.legaltext.ee/text/en/U60878.htm>>. Acesso em: 15 set. 2006.

26 MORET, S.; CONTE, L. Polycyclic aromatic hydrocarbons in edible fats and oils: occurrence and analytical methods. **Journal of Chromatography, A**, v. 882, n. 1, p. 245-253, 2000.

27 NOLL, I. S. **Avaliação da contaminação de carnes por hidrocarbonetos poliaromáticos**. 1993. 125 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade de Campinas, Campinas, 1993.

28 GROVA, N. et al. Detection of polycyclic aromatic hydrocarbon levels in milk collected near potential contamination sources. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50 n. 16, p. 4640-4642, 2002.

29 GROVA, N. et al. Gas chromatography-mass spectrometry study of polycyclic aromatic hydrocarbons in grass and milk from urban and rural farms. **European Journal of Mass Spectrometry**, v. 6, n. 5, p. 457-460, 2000.

30 CAMARGO, M. S. F. O. **Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em óleo de milho, margarina, creme vegetal e maionese e efeito do processamento na contaminação**. 1998. 111 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade de Campinas, Campinas, 1998.

31 MENZIE, C. A.; POTOCKI, B. B. Exposure to carcinogenic PAHs in the environment. **Environmental Science & Technology**, v. 26, n. 7, p. 1278-1284, 1992.

32 JAOUEN-MADOULET, A. et al. Validation of an analytical procedure for polychlorinated biphenyls, coplanar polychlorinated biphenyls and polycyclic aromatic hydrocarbons in environmental samples. **Journal of Chromatography, A**, v. 886, n. 1/2, p. 153-173, 2000.

33 MIEGE, C. et al. Selective immunoclean-up followed by liquid or gas chromatography for the monitoring of polycyclic aromatic hydrocarbons in urban waste water and sewage sludges used for soil amendment. **Journal of Chromatography, A**, v. 859, n. 1, p. 29-39, 1999.

34 BERSET, J. D.; HOLZER, R. Quantitative determination of polycyclic aromatic hydrocarbons, polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides in sewage sludges using supercritical fluid extraction and mass spectrometric detection. **Journal of Chromatography, A**, v. 852, n. 2, p. 545-558, 1999.

35 LI, K. et al. Immunochemical detection of polycyclic aromatic hydrocarbons and 1-hydroxypyrene in water and sediment samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 419, n. 1, p. 1-8, 2000

-
- 36 PINO, V. et al. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in marine sediments by high-performance liquid chromatography after microwave-assisted extraction with micellar media. **Journal of Chromatography, A**, v. 869, n. 1/2, p. 515-522, 2000.
- 37 SUN, F. S.; LITTLEJOHN, D.; GIBSON, M. D. Ultrasonication extraction and solid phase extraction clean-up for determination of US EPA 16 priority pollutant polycyclic aromatic hydrocarbons in soils by reversed-phase liquid chromatography with ultraviolet absorption detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 364, n. 1/3, p. 1-11, 1998.
- 38 KAYALI-SAYADI, M. N. et al. Rapid determination of PAHs in soil samples by HPLC with fluorimetric detection following sonication extraction. **Journal of Analytical Chemistry** v. 368, n. 7, p. 697-701, 2000.
- 39 MIEGE, C.; DUGAY, J.; HENNION, M. C. Optimization and validation of solvent and supercritical fluid extractions for the trace-determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in sewage sludges by liquid chromatography coupled to diode-array and fluorescence detection **Journal of Chromatography, A**, v. 823, n. 1/2, p. 219-230, 1998.
- 40 CLOAREC, O. et al. Improvement of UV spectrophotometry methodology for the determination of total polycyclic aromatic compounds in contaminated soils. **Analytica Chimica Acta**, v. 453, n. 2, p. 245-252, 2002.
- 41 MORET, S.; CERICCO, V.; CONTE, L. S. On-line solvent evaporator for coupled normal phase-reversed phase high-performance liquid chromatography systems: Heavy polycyclic aromatic hydrocarbons analysis. **Journal of Microcolumn Separations**, v. 13, n. 1, p. 13-18, 2001.
- 42 OTTO, M. **Chemometrics: statistics and computer applications in analytical chemistry**. Weinheim: Wiley; VCH, 1999.
- 43 MAHANAMA, K.; GUNDEL, L.; DAISEY, J. Selective fluorescence detection of polycyclic aromatic-hydrocarbons in environmental tobacco-smoke and other airborne particles **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, v. 56, n. 4, p. 289-309, 1994.
- 44 SUN, P. et al. Characterization of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) on lime spray dryer (LSD) ash using different extraction methods. **Chemosphere**, v. 62, n. 2, p. 265-274, 2006.
- 45 HWANG, S.; CUTRIGHT, T. J. Preliminary evaluation of PAH sorptive changes in soil by Soxhlet extraction. **Environment International**, v. 30, n. 2, p. 151-158, 2004.
- 46 GUERIN, T. F. The extraction of aged polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) residues from a clay soil using sonication and a soxhlet procedure: a comparative study. **Journal of Environmental Monitoring**, v. 1, n. 1, p. 63-67, 1999.

-
- 47 LOJKOVA, L.; SEDLAKOVA, J.; KUBAN, V. A two-step supercritical fluid extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from roadside soil samples. **Journal of Separation Science**, v. 28, n. 16, p. 2067-2075, 2005.
- 48 CAJTHAML, T.; SASEK, V. Application of supercritical fluid extraction (SFE) to predict bioremediation efficacy of long-term composting of PAH-contaminated soil. **Environmental Science & Technology**, v. 39, n. 21, p. 8448-8452, 2005.
- 49 RODRIGUEZ, C. et al. PAH soil pollution characterization: supercritical fluid extraction (SFE) contribution. **Analisis**, v. 25, n. 9/10, p. M53-M56, 1997.
- 50 AVILA, V. L.; YOUNG, R. Microwave-assisted extraction of organic compounds from standard reference soils and sediments. **Analytical Chemistry**, v. 66, n. 1, p. 1097-1106, 1994.
- 51 KOK, K. C.; MING, K. W.; HIAN, K. L. Optimization of microwave-assisted solvent extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons in marine sediments using a microwave extraction system with high-performance liquid chromatography-fluorescence detection and gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography, A**, v. 723, n. 2, p. 259-271, n. 13, 1996.
- 52 TOR, A. et al. Separation of some priority organic pollutants in wastewater samples by column chromatography. **Fresenius Environmental Bulletin**, v. 13, n. 7, p. 679-684, 2004.
- 53 NERIN, C.; DOMENO, C. Determination of polyaromatic hydrocarbons and some related compounds in industrial waste oils by GPC-HPLC-UV. **Analyst**, v. 124, n. 1, p. 67-70, 1999.
- 54 ALBERO, B.; SANCHEZ-BRUNETE, C.; TADEO, J. L. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in honey by matrix solid-phase dispersion and gas chromatography/mass spectrometry. **Journal of AOAC International**, v. 86, n. 3, p. 576-582, 2003.
- 55 FUOCO, R. et al. Optimized cleanup methods of organic extracts for the determination of organic pollutants in biological samples. **Microchemical Journal**, v. 79, n. 1/2, p. 69-76, 2005.
- 56 FILIPKOWSKA, A.; LUBECKI, L.; KOWALEWSKA, G. Polycyclic aromatic hydrocarbon analysis in different matrices of the marine environment. **Analytica Chimica ACTA**, v. 547, n. 2, p. 243-254, 2005.
- 57 MARTINEZ-LOPEZ, S. et al. Sample preparation improvement in polycyclic aromatic hydrocarbons determination in olive oils by gel permeation chromatography and liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of AOAC International**, v. 88, n. 4, p. 1247-1254, 2005.
- 58 DU FOUR, V. A. et al. Genotoxic and mutagenic activity of environmental air samples from different rural, urban and industrial sites in Flanders, Belgium. **Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 588, n. 2, p. 106-117, 2005.

59 OSTBY, L. et al. Mutagenicity testing of organic extracts of diesel exhaust particles after fractionation and recombination. **Archives of Toxicology**, v. 71, n. 5, p. 314-319, 1997.

60 OLIVELLA, M. A. Trace analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in suspended particulate matter by accelerated solvent extraction followed by gas chromatography-mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 383, n. 1, p. 107-114, 2005.

61 YUSA, V. et al. Application of accelerated solvent extraction followed by gel performance chromatography and high-performance liquid chromatography for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in mussel tissue. **Food Additives and Contaminants**, v. 22, n. 5, p. 482-489, 2005.

62 MA, L. L. et al. Simultaneous analysis of organic pollutants in soils by gas chromatography and gas chromatography mass spectrometry. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, v. 85, n. 2, p. 89-98, 2005.

63 HELALEH, M. I. H. et al. Validation of various extraction techniques for the quantitative analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in sewage sludges using gas chromatography-ion trap mass spectrometry. **Journal of Chromatography, A**, v. 1083, n. 1/2, p. 153-160, 2005.

64 FEDOTOV, P. S. et al. Dynamic extraction in rotating coiled columns, a new approach to direct recovery of polycyclic aromatic hydrocarbons from soils. **Journal of Chromatography, A**, v. 1023, n. 2, p. 305-309, 2004.

65 SARRAZIN, L. et al. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in marine, brackish, and river sediments by HPLC, following ultrasonic extraction, **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 29, n. 1, p. 69-85, 2006.

66 KUPPITHAYANANT, N. et al. Enhanced sensitivity and selectivity in the detection of polycyclic aromatic hydrocarbons using sequential simplex optimization, the addition of an organic modifier and wavelength programming. **Talanta**, v. 61, n. 6, p.879-888, 2003.

67 MADICHIE, C.; GREENWAY, G. M. The effects of surfactants on the analysis of organic pollutants in natural waters. **Analytica Chimica Acta**, v. 392, n. 1, p. 39-46, 1999.

68 ZHU, L. Z. et al. Highly sensitive automatic analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in indoor and outdoor air. **Talanta**, v. 45, n. 1, p. 113-118, 1997.

69 BERSET, J. D. et al. Comparison of different drying, extraction and detection techniques for the determination of priority polycyclic aromatic hydrocarbons in background contaminated soil samples. **Analytica Chimica Acta**, v.383, n. 3, p. 263-275, 1999.

70 ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Method 8310**: polynuclear aromatic hydrocarbons. Disponível em: <<http://www.epa.gov/sw-846/pdfs/8310.pdf>>. Acesso em: 01 ago. 2006.

71 ESCRIVÃ, C. et al. Comparison of 4 methods for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in airborne-particulates. **Journal of Chromatography, A**, v. 676, n. 1, p. 375-388, 1994.

72 COLLINS, C. H. et al. **Introdução a métodos cromatográficos**. 4. ed. Campinas: Editora UNICAMP, 1990.

73 BROWN, P. R.; HARTWICK, R. A. **High performance liquid chromatography**. New York: John Wiley & Sons, 1989.

74 MAJOR, R. E. Chromatography columns. **LC-GC**, v. 10, n. 1, p. 229, 1992.

75 SADEK, P. C. **The HPLC solvent guide**. New York: John Wiley & Sons, 1996.

76 CIOLA, R. **Fundamentos da cromatografia a líquido de alto desempenho**. São Paulo: Edgard Blucher, 1998.

77 SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; GLAJCHR, J. L. **Practical HPLC method development**. 2nd ed. New York: John Wiley & Sons, 1997.

78 BRETHERICK, I. **Hazards in the chemical laboratory**. 4th ed. London: Royal Society of Chemistry, 1996.

79 LOPES, W. A. et al. Sources, formation, reactivity and quantification of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in atmosphere. **Química Nova**, v. 19, n. 5, p. 497-516, 1996.

80 SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Principles of instrumental analysis**. 5th ed. Philadelphia: Brooks/Cole, 1998. 832 p.

81 HARRIS, D. **Análise química quantitativa**. 5. ed. Rio de Janeiro: LTC, 1999.

82 BRAITHWAITE, A.; SMITH, F. J. **Chromatographic methods**. 5th ed. London: Blackie Academic & Professional. 1996.

83 GONZÁLEZ, A. G.; HERRADOR, M. A.; ASUERO, A. G. Intra-laboratory testing of method accuracy from recovery assays. **Talanta**, v. 48, n.1, p. 729-736, 1999.

84 BRITO, N. M. Avaliação da exatidão e da precisão de métodos de análise de pesticidas mediante ensaios de recuperação. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 12, n. 1, p. 155-168, jan.-dez. 2002.

85 AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Guia para qualidade em química analítica**: uma assistência a acreditação. Brasília, 2004. (Série Acreditação, v. 1. Disponível em:

<<http://www.anvisa.gov.br/divulga/public/series/laboratorios.pdf>> Acesso em: 09 dez. 04.

86 THE FITNESS for purpose of analytical methods: a laboratory guide to method validation and related topics, 1998. Eurachem Guides. Disponível em: <<http://www.eurachem.ul.pt/guides/valid.pdf>> Acesso em: 30 jul. 2006.

87 CURRIE, L. A. Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities (IUPAC Recommendations 1995). **Analytica Chimica Acta**, v. 391, n. 1, p. 105-126, 1999.

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

89 BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. 2. ed. Campinas: Editora da Unicamp, 2003.

90 POLYNUCLEAR aromatic hydrocarbons by hplc 5506: NIOSH Manual of analytical methods (NMAM). 4th ed. Disponível em: <www.cdc.gov/niosh/nmam/pdfs/5506.pdf>. Acesso em: 12 nov. 2006.

91 ANDRADE, S. J. V. **Otimização e validação de metodologia analítica para a determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) em urina**. 2000. 73 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2000.

92 CAMARGO, M. C. R. Determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAS) em guaraná em pó (*Paullinia cupana*). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 1, p.230-234, 2006.

93 STOLYHWO, A.; SIKORSKI, Z. E. Polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked fish - a critical review. **Food Chemistry**, v. 91, n. 2, p. 303-311, 2005.

94 RIBANI, M. et al. Validation for chromatographic and electrophoretic methods. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, n. 5, 2004. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422004000500017&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 02 dez. 2006.

95 PETERSEN, E. T. Uptake of trace elements and pahs by fruit and vegetables from contaminated soils. **Environmental Science & Technology**, v. 36, n. 14, p. 3057-3063, 2002.

96 MINITAB. Minitab statistical software™. Version 13 for Windows. State College, [2004?]. 1 CD-ROM.

97 LOCONTO, P. R. **Trace environmental quantitative analysis: principles, techniques, and applications**, New York: John Wiley & Sons, 2001.

98 UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA. Instituto de Química. **Gerenciamento de resíduos químicos: normas gerais – revisão 2002**.

Disponível em: <<http://www.iq.unesp.br/APOIO-TECNICO/residuos.doc>>. Acesso em: 28 jul. 2006