

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

Willian Miguel Soares

**Estimativa de figuras de mérito para um método de
determinação de benzo(a)pireno em azeite de oliva por
extração líquido-líquido sob baixa temperatura e
espectroscopia de fluorescência**

Belo Horizonte
2021

Willian Miguel Soares

**Estimativa de figuras de mérito para um método de
determinação de benzo(a)pireno em azeite de oliva por
extração líquido-líquido sob baixa temperatura e
espectroscopia de fluorescência**

Dissertação apresentada ao Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Química.

Orientador: Ricardo Mathias Orlando

Coorientador: Helvécio Costa Menezes

Belo Horizonte

2021

Ficha Catalográfica

S676e Soares, Willian Miguel

2021 Estimativa de figuras de mérito para um método de D determinação de benzo(a)pireno em azeite de oliva por extração líquido-líquido sob baixa temperatura e espectroscopia de fluorescência [manuscrito] / Willian

Miguel Soares. 2021.

70 f. : il.

Orientador: Ricardo Mathias Orlando.

Coorientador: Helvécio Costa Menezes.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais - Departamento de Química.

Inclui bibliografia.

1. Química analítica - Teses. 2. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos - Teses. 3. Azeite - Teses. 4. Preparação de amostra (Química) - Teses. 5. Espectroscopia de fluorescência - Teses. 6. Extração (Química) - Teses. 7. Solventes orgânicos - Teses. I. Orlando, Ricardo Mathias, Orientador. II. Menezes, Helvécio Costa, Coorientador. III. Título.

CDU 043



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS



"Determinação e Validação de Um Método de Detecção de Benzo(a)pireno Em Azeite de Oliva Por Extração Líquido-líquido Sob Baixa Temperatura e Espectroscopia de Fluorescência"

Willian Miguel Soares

Dissertação aprovada pela banca examinadora composta pelos Professores:

Prof. Ricardo Mathias Orlando - Orientador
UFMG

Profa. Clésia Cris na Nascentes
UFMG

Prof. Bruno Gonçalves Botelho
UFMG

Belo Horizonte, 24 de setembro de 2021.



Documento assinado eletronicamente por **Ricardo Mathias Orlando, Professor do Magistério Superior**, em 24/09/2021, às 16:08, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Bruno Gonçalves Botelho, Professor do Magistério Superior**, em 24/09/2021, às 16:14, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Clesia Cris na Nascentes, Membro de comissão**, em 24/09/2021, às 16:16, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0972784** e o código CRC **29F786B5**.

*“Os fatos não deixam de existir só porque são
ignorados.”*

Aldous Huxley

RESUMO

A extração líquido-líquido (ELL) sob baixa temperatura foi empregada para extração de benzo(a)pireno (B(a)P) em azeite de oliva. O extrato obtido foi analisado por espectroscopia de fluorescência. A eficácia da fluorescência sincronizada à energia constante (FSEC) foi avaliada, sendo o seu uso essencial para a detecção do B(a)P na concentração ($2,0 \mu\text{g L}^{-1}$) estabelecida pela comissão da união europeia como limite máximo da presença desta substância em óleos comestíveis. O analito foi extraído de 3,0 mL de azeite por 6,0 mL de acetonitrila e acetona 3:2 (v/v) utilizando um agitador vórtex à 1500 rotações por minutos durante 5 minutos. A amostra foi submetida ao resfriamento à $-18 \text{ }^\circ\text{C}$ onde apenas o resíduo de azeite se congela. O extrato líquido é evaporado à $45 \text{ }^\circ\text{C}$ até a secagem, sendo ressuscitado em 2,5 mL de dimetilssulfóxido. Os parâmetros de fluorescência foram otimizados individualmente pela avaliação do solvente de análise, temperatura, abertura das fendas dos monocromadores de emissão e excitação. O percentual de extração alcançado do analito foi cerca de 40% por FSEC com a seleção do comprimento de onda de excitação de 388 nm e $\Delta\nu$ de 1230 cm^{-1} . A linearidade do método otimizado foi estabelecida na faixa de concentração de B(a)P de 0,8 a $3,2 \mu\text{g L}^{-1}$, com LD teórico de $0,008 \mu\text{g L}^{-1}$ e LQ de $0,8 \mu\text{g L}^{-1}$. A precisão e a exatidão foram avaliadas em três níveis de concentração (0,8; 2,0 e $3,2 \mu\text{g L}^{-1}$) alcançando coeficientes de variação e erros relativos menores que 15%, respectivamente. O método se apresenta como uma alternativa viável em relação à ISO 15753:2016 e outros trabalhos que investigaram a presença em concentrações traço de B(a)P em óleos, sendo simples, rápido, seletivo e altamente sensível. A aplicação da ELL sob baixa temperatura e espectroscopia de fluorescência dispensa etapas sucessivas de purificação como a extração em fase sólida, proporcionando um menor consumo de solventes orgânicos.

Palavras-chave: Benzo(a)pireno, Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, Fluorescência sincronizada à energia constante, Extração líquido-líquido sob baixa temperatura, Azeite de oliva.

ABSTRACT

Low temperature liquid-liquid extraction was employed to extract benzo(a)pyrene (B(a)P) from olive oil. The obtained extract was analyzed by fluorescence spectroscopy. The efficiency of Constant energy synchronous fluorescence (CESF) was evaluated, since it is an essential factor for the detection of B(a)P, in the concentration value ($2,0 \mu\text{g L}^{-1}$) established by the European Union Commission as the maximum limit of this substance in edible oils. The analyte was extracted from 3,0 mL of olive oil by 6,0 mL of acetonitrile and acetone 3:2 (v/v) using vortex mixer at 1500 rotations per minute during 5 minutes. The sample underwent cooling at $-18 \text{ }^\circ\text{C}$ which only the oil phase was frozen. The liquid extract was evaporated until dryness at $45 \text{ }^\circ\text{C}$ and resuspended by 2,5 mL of dimethyl sulfoxide. Fluorescence parameters were optimized individually through the evaluation of the solvent effect, temperature and the slit length for both excitation and emission monochromators. After optimization, the extraction efficiency for the analyte was about 40% utilizing CESF with the excitation wavelength of 388 nm and $\Delta\lambda$ in 1230 cm^{-1} . Linearity of the optimized method was established in the range $0,8 - 3,2 \mu\text{g L}^{-1}$ to B(a)P, with theoretical LD was $0,008 \mu\text{g L}^{-1}$ and LQ was $0,8 \mu\text{g L}^{-1}$. The precision and the accuracy were assessed at three concentration levels ($0,8$; $2,0$ and $3,2 \mu\text{g L}^{-1}$) with relative standard deviation and bias values less than 15%, respectively. The method represents a viable alternative in comparison to ISO 15753:2016 and other researches that study the presence of B(a)P in trace concentrations in oils, being simple, fast, selective and highly sensitive. The application of low temperature LLE and fluorescence spectroscopy does not require successive clean up steps such as solid phase extraction, providing a lower consumption of organic solvents.

Key-words: Benzo(a)pyrene, polycyclic aromatic hydrocarbons, Constant energy synchronous fluorescence, Low temperature liquid-liquid extraction, Olive oil.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Gráficos dos números de citações e artigos envolvendo o termo “Olive oil” nos últimos 10 anos.....	19
Figura 2.	Fórmulas estruturais dos 16 HPAs prioritários segundo a EPA.....	24
Figura 3.	Fórmula estrutural do benzo(a)pireno.....	26
Figura 4.	Diagrama de Jablonski simplificado.....	37
Figura 5.	Espectros de emissão do B(a)P ($98 \mu\text{g L}^{-1}$) em diferentes solventes.....	50
Figura 6.	Valores de λ_{em} do B(a)P nos solventes estudados.....	52
Figura 7.	Intensidades médias de emissão do B(a)P nos solventes testados em função da variação de temperatura ($n = 3$).....	55
Figura 8.	Intensidades médias de emissão do B(a)P nos solventes testados em função da abertura das fendas de excitação e emissão. ($n = 3$).....	55
Figura 9.	Curvas de calibração do benzo(a)pireno nos solventes testados ($n = 3$).....	56
Figura 10.	Intensidades médias de emissão do B(a)P ($6 \mu\text{g L}^{-1}$) nos solventes testados para diferentes concentrações % v/v de acetona.....	57
Figura 11.	Espectros de emissão do B(a)P ($6 \mu\text{g L}^{-1}$) em acetonitrila para diferentes concentrações (% v/v) de acetona.....	58
Figura 12.	Espectros de emissão do B(a)P em DMSO para diferentes concentrações (% v/v) de acetona.....	59
Figura 13.	Espectros de emissão do B(a)P em acetonitrila para diferentes combinações de aberturas de fendas - C1 (Exc: 5,0 nm, Em: 5,0 nm), C2 (Exc: 5,0 nm, Em: 10,0 nm), C3 (Exc: 10,0 nm, Em: 5,0 nm) e C4 (Exc: 10,0 nm, Em: 10,0 nm).....	60
Figura 14.	Espectros de emissão do B(a)P em DMSO para diferentes combinações de aberturas de fendas - C1 (Exc: 5,0 nm, Em: 5,0 nm), C2 (Exc: 5,0 nm, Em: 10,0 nm), C3 (Exc: 10,0 nm, Em: 5,0 nm) e C4 (Exc: 10,0 nm, Em: 10,0 nm).....	61
Figura 15.	Espectros de emissão do B(a)P ($10 \mu\text{g L}^{-1}$) nos extratos ressuspensos por acetonitrila e DMSO.....	62
Figura 16.	Deslocamento Stokes para fluorescência.....	63
Figura 17.	Espectros de emissão do B(a)P ($10 \mu\text{g L}^{-1}$) nos extratos ressuspensos por acetonitrila e DMSO.....	64
Figura 18.	Espectro de fluorescência sincronizada do B(a)P ($2,0 \mu\text{g L}^{-1}$) em duas condições distintas.....	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Propriedades físico-químicas do benzo(a)pireno.....	26
Tabela 2.	Seleção de algumas publicações acerca da determinação de HPAs por cromatografia líquida de alta eficiência e detecção por fluorescência.....	28
Tabela 3.	Seleção de algumas publicações acerca da determinação de HPAs por diversos métodos de preparo de amostras.....	30
Tabela 4.	Seleção de algumas publicações acerca da determinação direta de HPAs por espectroscopia de fluorescência.....	32
Tabela 5.	Seleção de algumas publicações acerca da aplicação do clean-up à baixa temperatura.....	34
Tabela 6.	Valores de λ_{em} do B(a)P nos solventes estudados.....	49
Tabela 7.	Equação da reta e coeficiente de determinação para a curva de B(a)P em solventes (n = 3).....	56
Tabela 8.	Equação da reta e coeficiente de determinação para a curva extraída de B(a)P (n = 3).....	66
Tabela 9.	Limites de detecção e quantificação de B(a)P para o método. (n = 10).....	66
Tabela 10.	Valores de precisão intra e interdias para a determinação de B(a)P em três níveis de concentração (n = 6).....	67
Tabela 11.	Valores de exatidão para a determinação de B(a)P em três níveis de concentração (n = 6).....	67

LISTA DE ABREVIATURAS

ACE	Acetona
ACF	Acenafteno
ACN	Acetonitrila
ACY	Acenaftileno
ANOVA	Análise de variância
ANT	Antraceno
ANVISA	Agência de vigilância sanitária
BaA	Benzo(a)antraceno
B(a)P	Benzo(a)pireno
BbF	Benzo(b)fluoranteno
BghiP	Benzo(ghi)perileno
BkF	Benzo(k)fluoranteno
CHR	Criseno
CLR	Clorofórmio
COI	Conselho Oleícola Internacional
CV	Coeficiente de variação
DahA	Dibenzo(ah)antraceno
EC	Comissão europeia (<i>European comission</i>)
EPA	Agência de proteção ambiental (<i>Environmental Protection Agency</i>)
ETBM	Éter tercbutil metílico
FLA	Fluoranteno
FLD	Detector de fluorescência (<i>Fluorescence detector</i>)
FLU	Fluoreno

FSEC	Fluorescência sincronizada à energia constante
GC-FID	Cromatografia gasosa com ionização por chama (<i>Gas chromatography flame-ionization detection</i>)
HEX	Hexano
HFLU	Hidroxifluoreno;
HNAP	Naftol
HOMO	Orbital molecular de mais alta energia ocupado (<i>Highest occupied molecular orbital</i>)
HPA	Hidrocarboneto policíclico aromático
HPLC-UV	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada com detector de ultravioleta-visível (<i>High performance liquid chromatography ultraviolet-visible detector</i>)
HPYR	Hidroxipireno
IARC	Agência internacional de pesquisas sobre o câncer (<i>International agency for research on cancer</i>)
IcdP	Indeno(cd)pireno
LD	Limite de detecção
LDL-C	Lipoproteína de baixa densidade (<i>Low density lipoprotein</i>)
LQ	Limite de quantificação
LUMO	Orbital molecular de mais baixa energia desocupado (<i>Lowest unoccupied molecular orbital</i>)
MET	Metanol
MS	Espectrometria de massas (<i>mass spectrometry</i>)
NAP	Naftaleno
OE	Octanoato de etila
PHE	Fenantreno
PHT	Fenantrol
PYR	Pireno
TOL	Tolueno
UV-Vis	Ultravioleta-visível (<i>ultraviolet-visible</i>)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
1.1	Objetivo geral.....	16
1.2	Objetivos específicos.....	16
2	CONCEITOS GERAIS E REVISÃO DA LITERATURA.....	17
2.1	Azeite de oliva.....	17
2.1.1	Produção.....	17
2.1.2	Consumo.....	18
2.1.3	Composição.....	19
2.1.4	Contaminação em alimentos e azeite.....	21
2.1.5	HPAs em alimentos e azeite.....	22
2.2	Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos.....	23
2.2.1	Origem e formação.....	23
2.2.2	Aspectos toxicológicos.....	25
2.2.3	Benzo(a)pireno.....	26
2.3	Determinação de HPAs em azeite de oliva.....	27
2.4	Espectroscopia de fluorescência.....	35
2.4.1	Fatores que afetam a fluorescência.....	37
2.4.1.1	Estrutura molecular.....	38
2.4.1.2	Solvente.....	38
2.4.1.3	Temperatura.....	39
2.4.1.4	Concentração hidrogeniônica.....	39
2.4.1.5	Concentração de oxigênio dissolvido.....	39
2.4.1.6	Relação quantitativa.....	40
3	PARTE EXPERIMENTAL.....	42
3.1	Materiais e reagentes.....	42
3.2	Equipamentos e softwares.....	42
3.3	Preparo da solução estoque do analito.....	42
3.4	Avaliação do espectro de fluorescência do benzo(a)pireno em diferentes solventes.....	43
3.5	Avaliação do efeito da temperatura no espectro de fluorescência do benzo(a)pireno.....	43
3.6	Avaliação da influência do comprimento de abertura das fendas no espectro de fluorescência do benzo(a)pireno em diferentes solventes.....	44
3.7	Construção das curvas de calibração do benzo(a)pireno.....	44
3.8	Avaliação do efeito <i>quenching</i> da acetona no espectro de fluorescência do benzo(a)pireno.....	45
3.9	Avaliação da combinação das aberturas das fendas na intensidade de detecção do benzo(a)pireno no extrato da matriz.....	45
3.10	Avaliação da extração líquido-líquido sob baixa temperatura pelos parâmetros otimizados.....	46
3.11	Avaliação da viabilidade da fluorescência sincronizada.....	46
3.12	Avaliação da extração de benzo(a)pireno na concentração alvo.....	47
3.13	Estimativa de figuras de mérito de validação.....	47
3.13.1	Linearidade.....	47
3.13.2	Limite de detecção e quantificação.....	48
3.13.3	Precisão intra e interdias.....	48
3.13.4	Exatidão.....	48

4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	49
4.1	Avaliação do espectro de fluorescência do benzo(a)pireno em diferentes solventes.....	49
4.2	Avaliação do efeito da temperatura no espectro de fluorescência do benzo(a)pireno.....	53
4.3	Avaliação da influência do comprimento de abertura das fendas no espectro de fluorescência do benzo(a)pireno em diferentes solventes.....	54
4.4	Construção das curvas de calibração do benzo(a)pireno.....	56
4.5	Avaliação do efeito quenching da acetona no espectro de fluorescência do benzo(a)pireno.....	57
4.6	Avaliação da combinação das aberturas das fendas na intensidade de detecção do benzo(a)pireno no extrato da matriz.....	60
4.7	Avaliação da extração líquido-líquido sob baixa temperatura pelos parâmetros otimizados.....	62
4.8	Avaliação da viabilidade da fluorescência sincronizada.....	63
4.9	Avaliação da extração de benzo(a)pireno na concentração alvo.....	65
4.10	Estimativa de figuras de mérito de validação.....	66
4.10.1	Linearidade.....	66
4.10.2	Limite de detecção e quantificação.....	66
4.10.3	Precisão intra e interdias.....	67
4.10.4	Exatidão.....	67
5	CONCLUSÃO.....	68
6	REFERÊNCIAS.....	69

1 INTRODUÇÃO

A toxicologia dos alimentos é um campo de estudo que abrange amplas pesquisas acadêmicas. Pelos diversos efeitos prejudiciais que contaminantes podem acarretar à saúde, o desenvolvimento tecnológico acerca da análise de alimentos tem permitido um conhecimento mais aprofundado da presença destas substâncias indesejáveis.⁽¹⁾

Neste contexto, uma classe de poluentes que recebe intenso interesse de investigação são os hidrocarbontes policíclicos aromáticos (HPAs). Atualmente, foram registrados mais de 100 HPAs no ecossistema e a indução do câncer em humanos por meio destas substâncias tem sido evidenciada.⁽²⁾ O benzo(a)pireno é o HPA mais proeminente por representar o maior risco biológico e a sua inserção e permanência em diversos componentes da dieta, principalmente óleos, ocorre em função da sua natureza lipossolúvel.⁽³⁾

A determinação de HPAs em óleos é dificultada pela alta complexidade das matrizes alimentares e pelo baixo nível de concentração no qual estas substâncias são encontradas ($\mu\text{g kg}^{-1}$).⁽⁴⁾ Portanto, sua detecção requer a utilização de técnicas de preparo de amostra com alto poder de pré-concentração e *clean up*, associadas a análises de sensibilidade e seletividade adequadas, que podem ser observadas nas técnicas de separação acopladas à espectroscopia de fluorescência e espectrometria de massas.⁽⁵⁻¹¹⁾

Neste trabalho, a fim de simplificar o procedimento experimental convencional, dispensou-se etapas sucessivas da extração líquido-líquido; a extração em fase sólida, comumente utilizada foi substituída pelo *clean up* sob baixa temperatura e a análise direta por fluorescência isenta o emprego da cromatografia. As vantagens destas mudanças são a redução do tempo de execução do método e um menor consumo global de solventes. Além disto, a configuração sincronizada da fluorescência possui um potencial de aumentar a seletividade da técnica sem comprometer a sensibilidade.

1.1 Objetivo geral

Desenvolver um método analítico para a determinação de benzo(a)pireno usando a extração líquido-líquido sob baixa temperatura como preparo de amostra e detecção direta pela espectroscopia de fluorescência.

1.2 Objetivos específicos

Otimizar os parâmetros que afetam a fluorescência avaliando: temperatura, os solventes utilizados para análise e a largura o das fendas dos monocromadores.

Avaliar a performance da fluorescência sincronizada à energia constante.

Estimar figuras de mérito do método proposto a partir da ISO 15753:2016.

2 CONCEITOS GERAIS E REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Azeite de oliva

2.1.1 Produção

O azeite de oliva é gerado a partir da azeitona, o fruto da oliveira (*Olea Europaea L.*). De acordo com as designações do Conselho Oleícola Internacional (COI), o azeite de oliva virgem são os óleos obtidos exclusivamente por processos mecânicos e outros mecanismos físicos sob determinadas condições, particularmente térmicas, que não resultam em alterações no óleo, não sendo submetido a quaisquer outros tratamentos além da lavagem, decantação, centrifugação e filtração. Este órgão define os critérios que indicam a qualidade do azeite baseando-se em sua composição e propriedades organolépticas. O azeite de oliva virgem deve apresentar uma acidez total expressa em concentração de ácido oleico que não deve exceder 2,0 % m/m. O azeite de oliva extravirgem deve apresentar uma acidez total expressa em concentração de ácido oleico que não deve exceder 0,8 % m/m. Caso a acidez do azeite seja superior a 3,3% durante a sua produção, ele deve ser refinado, o que reduz a concentração de componentes minoritários, tornando-o um óleo pertencente à outra categoria comercial.⁽¹²⁾

A resolução RDC nº 270/2005 da Agência de vigilância sanitária (ANVISA) acerca dos óleos vegetais corrobora com a legislação do COI sobre o azeite de oliva.⁽¹³⁾

A produção mundial de azeite de oliva tem aumentado constantemente. Estima-se uma quantidade de $3,314 \times 10^6$ toneladas produzidas em novembro de 2018, representando um crescimento de 29,4% desde 2001. A região mediterrânea é a maior responsável pela produção global de azeite de oliva, dada as condições climáticas que favorecem o cultivo das oliveiras. Atualmente, 75% da produção mundial está concentrada em apenas três países mediterrâneos: Espanha, Itália e Grécia.⁽¹⁴⁾

O Brasil é um país emergente em termos de produção de azeite de oliva, pois o mercado deste produto é dominado pela importação. Entretanto, tem sido evidenciado o interesse em ampliar o agronegócio deste produto por meio da expansão das áreas de cultivo, o aprimoramento das tecnologias e os processos industrializados. Esta iniciativa tem gerado um aumento do índice de exportação que, eventualmente, irá reduzir o custo de comercialização do azeite de oliva.⁽¹⁵⁾

2.1.2 Consumo

O cultivo das oliveiras e a obtenção do azeite de oliva são observados desde a antiguidade (3000 a.C.).⁽¹⁶⁾ Em função de suas propriedades sensoriais, o consumo de azeite de oliva tem se ampliado mundialmente. Entre os anos de 2001 e 2017, este consumo foi de $2,59 \times 10^6$ à $2,726 \times 10^6$ toneladas, correspondendo a um aumento de 5,2%. Também se estima que em 2018, o consumo mundial foi de $3,01 \times 10^6$ toneladas, registrando um aumento de 10,4% em apenas um ano.⁽¹⁴⁾

No Brasil, o consumo vem crescendo nos últimos 25 anos. Tem sido observada uma tendência crescente pela taxa de 10% a 15% anualmente e o consumo per capita dobrou nos últimos 15 anos. No ano de 2018 foi registado um consumo anual de 7×10^4 t. Somente 1% do azeite de oliva consumido no Brasil é produzido no país. Por meio do advento da produção nacional de azeite, é esperado que este óleo se torne economicamente mais acessível à população. Nota-se que os países que mais produzem o azeite de oliva são os que mais o consomem, portanto, o seu uso é prevalecido no mediterrâneo.⁽¹⁵⁾

A dieta do mediterrâneo é uma das mais saudáveis. A alta inserção de frutas, legumes e cereais associam este padrão de alimentação à prevenção de diversas doenças. O azeite de oliva é a principal fonte de lipídios nos países desta região. O seu consumo é estimulado de acordo com os benefícios à saúde que foram comprovados, como: ação anti-inflamatória, antialérgica, antiaterogênica e antitrombótica; redução dos riscos de câncer, diabetes do tipo 2, obesidade, doenças crônicas, cardíacas e neurodegenerativas.⁽¹⁷⁾

Os efeitos mencionados são atribuídos à atividade biológica dos constituintes do azeite de oliva. A elevada presença de ácidos graxos monoinsaturados, como o ácido oleico, promove a diminuição das lipoproteínas de baixa densidade (LDL-C), o colesterol 'ruim'. As vitaminas E e K, a clorofila, os carotenoides e os polifenóis atuam como antioxidantes, sendo de grande importância contra o dano oxidativo dos radicais livres, moléculas capazes de degradar proteínas, lipídios e o DNA, podendo induzir o câncer. Os polifenóis também são capazes de modular o sistema imunológico, protegendo o organismo contra o Alzheimer. O esqualeno pode inibir o desenvolvimento de tumores e favorece a regeneração dos tecidos.⁽¹⁸⁾

De acordo com o banco de dados da plataforma do Web of Science pela pesquisa do termo "olive oil" nos últimos dez anos, o número de publicações vem crescendo consistentemente e as citações tem se mantido regulares, como pode se visualizar na **Figura 1**.

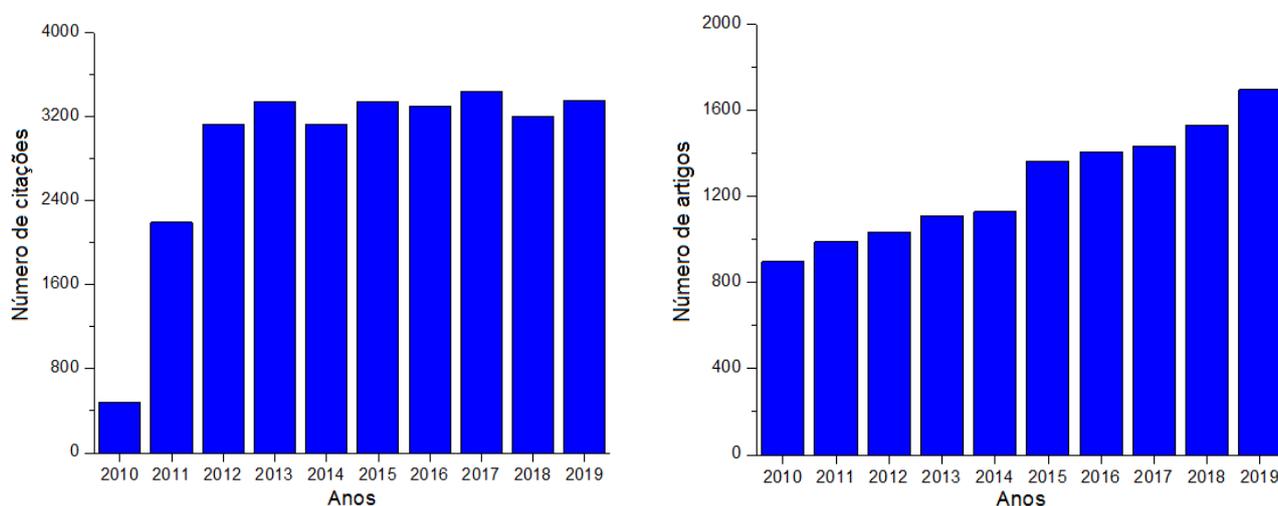


Figura 1. Gráficos dos números de citações e artigos envolvendo o termo “Olive oil” nos últimos 10 anos

2.1.3 Composição

O azeite de oliva é constituído majoritariamente (~98%) por triacilglicerídeos que representam a fração saponificável e, em menor quantidade, ácidos graxos livres, glicerol, esteróis, tocoferóis, polifenóis e hidrocarbonetos; resultando nas características singulares deste óleo. A composição dos triacilglicerídeos, tal como outras substâncias do azeite de oliva, varia de acordo com as condições de cultivo, o grau de maturação do fruto, o clima e a altitude. São formados principalmente pela combinação dos seguintes ácidos graxos com a respectiva percentagem no azeite de oliva: ácido oleico (55% - 83%), ácido linoleico (3,5% - 21%), ácido palmítico (7,5% - 20%) e ácido esteárico (0,5% - 5%). Distintivamente de outros óleos vegetais, o azeite de oliva possui uma maior proporção de ácidos graxos monoinsaturados em relação aos poliinsaturados, tornando-o mais resistente à oxidação.⁽¹⁹⁾

A acidez do azeite de oliva é decorrente da hidrólise que decompõe os triacilglicerídeos em determinado grau, liberando os ácidos graxos livres. Esta reação química pode também induzir a formação de diacilgliceróis, monogliceróis e o glicerol. A ocorrência de doenças fúngicas, assim como o descuido no processo de extração e o tempo entre colheita e extração são fatores que aumentam a acidez do óleo, sendo esta uma medição direta da qualidade do azeite de oliva.⁽²⁰⁾

Os esteróis são os principais constituintes da fração insaponificável e importantes

indicadores da autenticidade do óleo. As quatro classes que são presentes no azeite de oliva são: esteróis comuns, esteróis 4 α -metil, álcoois triterpenos e dialcoois triterpenos. A Comissão da união europeia estabelece o limite mínimo de esteróis totais de 1000 mg kg⁻¹, uma vez que a concentração encontrada varia entre este valor e 2000 mg kg⁻¹. Os principais esteróis que constituem essa fração são o β -sitosterol, o Δ 5-avenasterol e o campesterol. O colesterol é um dos marcadores de qualidade utilizados, embora seja encontrado em baixas quantidades, estas são relativamente fixas.⁽²¹⁾

Os tocoferóis são uma classe de fenóis metilados que agrupam oito isômeros também denominados vitamina E. No azeite de oliva são encontradas os homólogos α , β , γ e σ , sendo o α -tocoferol em sua forma livre, correspondente a 90% deste conteúdo, além de ser o antioxidante natural mais abundante e potente. A concentração média de tocoferóis reportada é de 300 mg kg⁻¹. As vitaminas lipossolúveis A, D e K também estão contidas no azeite de oliva, atuando sinergicamente pela estabilização térmica do óleo mediante à sua fritura.

Os polifenóis são significativos pelo fato de o azeite de oliva virgem ser isento de refinamento, etapa presente em maior parte dos óleos comestíveis que remove estes compostos fenólicos de suas composições. São responsáveis pelo sabor amargo, picante e aroma específicos do azeite de oliva, além de contribuem para a resistência ao aquecimento e armazenamento. A concentração média de polifenóis é 70 mg kg⁻¹, representada principalmente pelo hidroxitirosol e o tirosol, dentre as 50 substâncias que estão presentes nesta fração, pertencentes às classes dos ácidos fenólicos, álcoois fenílicos, flavonoides, lignanas e secoiridoides.

O esqualeno é um dos hidrocarbonetos relevantes na composição do azeite de oliva. É o constituinte em maior quantidade da fração insaponificável, cuja concentração varia entre 200 a 7500 mg kg⁻¹. Além disso, é um precursor direto da síntese de colesterol. O β -caroteno é um hidrocarboneto que junto da clorofila (na forma de feofitina), atua como pigmento, fornecendo as cores amarelo e verde que caracterizam o azeite de oliva.⁽²²⁾

Por fim, aproximadamente 280 compostos voláteis são identificados no azeite de oliva, sendo hidrocarbonetos, álcoois, aldeídos, cetonas, ésteres, éteres, pironas, tiois, pirazinas, derivados do furano e do tiofeno. Deste grupo, 67 encontram-se em quantidades suficientemente altas para contribuírem ao aroma do óleo.⁽¹⁹⁾

2.1.4 Contaminação em alimentos e azeite

A contaminação dos alimentos é um tópico de extrema importância. Em inúmeras circunstâncias, a presença de microrganismos, material particulado e compostos químicos indesejados e em determinadas concentrações podem representar riscos à saúde. Recentemente, alguns casos tiveram grande repercussão nas mídias de comunicação, como a presença de melamina em leite na China e a detecção de dietilenoglicol em lotes de cerveja no Brasil; nos quais foram ressaltadas as casualidades advindas das intoxicações.^(23,24) Este problema estimula o desenvolvimento de diversos estudos e ações que possam minimizar tais danos, como: a elucidação da origem dos contaminantes e as formas de contaminação nos alimentos; a detecção e a eliminação destes compostos, assim como os seus efeitos adversos a curto e longo prazo.⁽²⁵⁾

A inserção de contaminantes abrange a produção, o transporte, o armazenamento e o preparo dos alimentos. Portanto, existem definições que incluem estas substâncias em grupos associados à sua incidência. Os contaminantes ambientais estão presentes no ecossistema pela sua formação natural ou são introduzidos pela ação humana. Os contaminantes do processamento alimentar são produzidos durante o cozimento, assagem, conserva, aquecimento, fermentação e hidrólise. A contaminação pelo contato direto do alimento com o material da sua embalagem pode levar à migração de compostos prejudiciais. E, por fim, a contaminação pelo uso de aditivos e adulterantes não autorizados.⁽²⁶⁾

O processo de obtenção do azeite de oliva que não possui critérios de higienização e controle de qualidade, possibilita a contaminação por múltiplas fontes. As regulamentações do Codex Alimentarius e o COI reportam os limites máximos dos principais contaminantes presentes no azeite de oliva. Esta relação contém: micotoxinas, microorganismos, resíduos de pesticidas, bifenilospoliclorados, hidrocarbonteos policíclicos aromáticos (HPAs), solventes orgânicos, ftalatos, lubrificantes e materiais particulados.^(27,28)

2.1.5 HPAs em alimentos e azeite

A exposição dos seres humanos aos HPAs ocorre via ambiental, ocupacional e pela dieta. A alimentação corresponde a 88% destas fontes. Estudos demonstram que a migração ambiental de HPAs pode ocorrer em plantações, atingindo óleos vegetais, frutas, legumes, chá, café, além de frutos do mar, laticíneos, alimentos defumados e assados. Processos de obtenção de alimentos que envolvem temperaturas elevadas e a oxidação de gorduras, proteínas e carboidratos, estimulam a formação de HPAs. A contaminação também pode ser provocada sob o armazenamento de alimentos em embalagens contaminadas.⁽²⁹⁾

Entre os anos de 1997 e 2017, o número de citações envolvendo este tema na plataforma Web of Science foi de 16667, indicando a relevância e o desenvolvimento da pesquisa acerca da problemática dos HPAs em alimentos.

Os óleos vegetais representam uma das principais fontes de HPAs na dieta humana, devido ao seu elevado consumo e o caráter lipofílico destes alimentos, o que viabiliza a incorporação dos poluentes. A contaminação ocorre mais frequentemente através do processamento alimentar, durante a secagem, assagem e uso de solventes de extração contaminados.⁽³⁰⁾

O azeite de oliva, assim como outros óleos comestíveis tem apresentado quantidades preocupantes de HPAs.⁽³¹⁾ Entretanto, certas condições de produção do azeite de oliva induzem a formação de HPAs, principalmente pela difusão do ar poluído em áreas industriais. Essas substâncias são adsorvidas em nanopartículas sólidas e através do contato direto com as oliveiras ou da precipitação pluviométrica, contamina as azeitonas, propagando-se até o produto final. Os HPAs também podem ser gerados por sistemas eletrogênicos que fornecem energia elétrica ao moinho.⁽²⁸⁾

Geralmente, o azeite de oliva apresenta níveis de concentrações superiores de HPAs em comparação a outros óleos vegetais refinados. A etapa de refinamento reduz drasticamente a contaminação por HPAs.⁽³²⁾

2.2 Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos

2.2.1 Origem e formação

Os HPAs são um grupo de compostos orgânicos constituídos por dois ou mais anéis aromáticos condensados, em alguns casos possuindo grupos substituintes. São originados pela queima incompleta de matéria orgânica por fatores naturais ou por meios antropogênicos. As principais fontes de HPAs consistem em erupções vulcânicas, queimadas espontâneas, queima de carvão, combustíveis, óleos lubrificantes, destilação de petróleo, incineração de resíduos e fumaça de cigarro.⁽³³⁾

A concentração de HPAs no ecossistema tem aumentado em razão do desenvolvimento industrial. Atualmente, a quantidade de HPAs emitida excede a porcentagem que é degradada naturalmente. Um informativo de alto impacto expressa uma emissão atmosférica global de 5×10^{11} g de HPAs em 2007, atribuindo este valor principalmente à atividade industrial.⁽³⁴⁾

Os HPAs são considerados poluentes orgânicos persistentes, pois estão amplamente difundidos em todos os compartimentos da natureza: água, ar, solo, sedimentos recém formados e alimentos. Devido à sua prevalência, entre os HPAs que já foram registrados, 16 foram classificados como contaminantes prioritários pela Agência de proteção ambiental (EPA) dos Estados Unidos, sendo: naftaleno, acenaftaleno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, benzo(b)fluoranteno, antraceno, fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, pireno, benzo(a)antraceno, benzo(a)pireno, criseno, indeno(1,2,3-cd)pireno, dibenzo(ah)antraceno, benzo(ghi)perileno.⁽³⁵⁾ As fórmulas estruturais destes HPAs estão ilustradas a seguir na **Figura 2**.

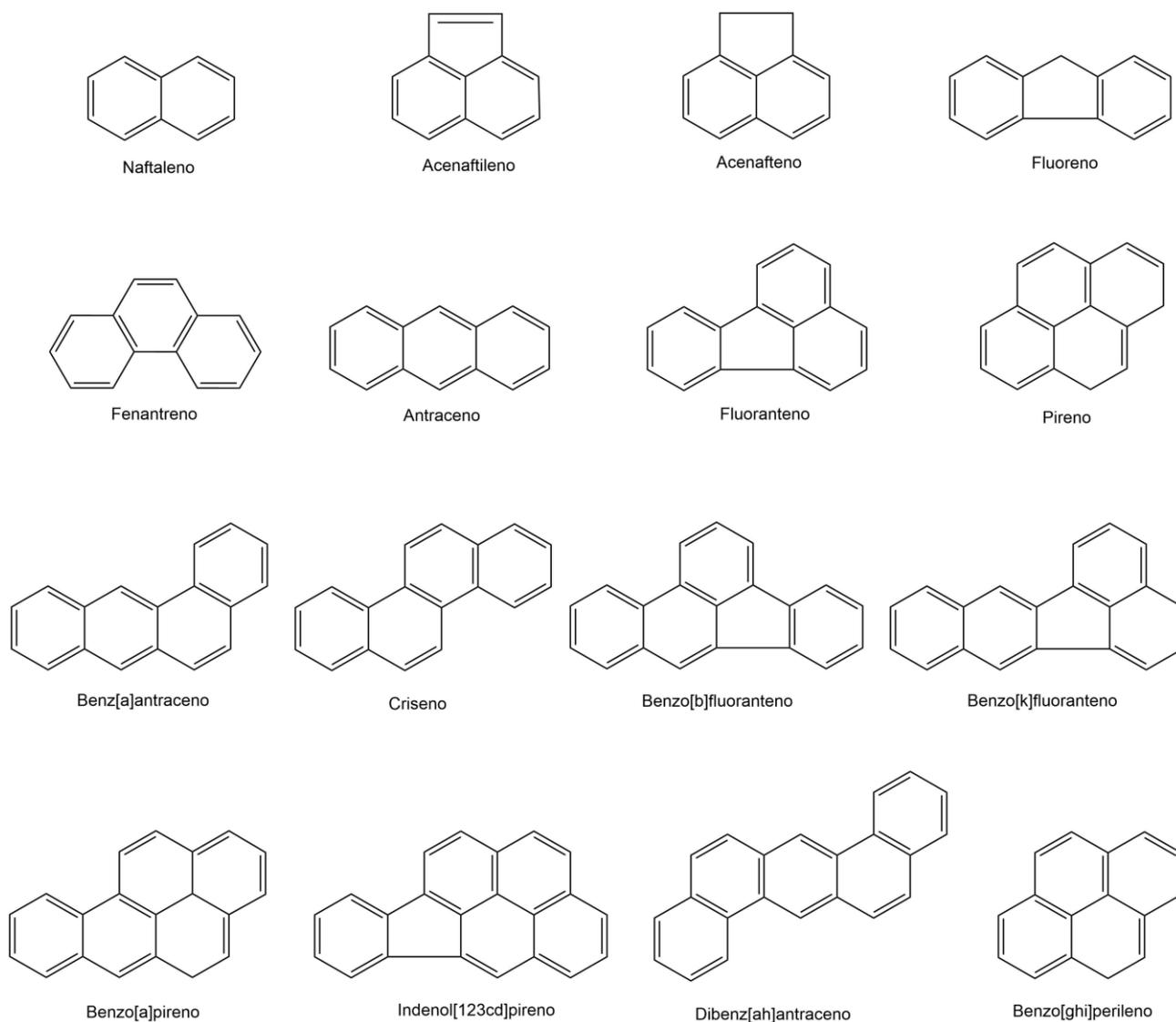


Figura 2. Fórmulas estruturais dos 16 HPAs prioritários segundo a EPA

A formação dos HPAs é determinada por uma combinação complexa de variáveis. As espécies de hidrocarbonetos gerados e a suas respectivas extensões são influenciadas principalmente pela quantidade de calor fornecido ao sistema, a quantidade de oxigênio disponível e a pressão. Existe uma relação linear entre a temperatura e o aumento de concentração de HPAs na faixa de 400 a 1000 °C.⁽³⁶⁾ Sob as condições citadas, o mecanismo reacional de formação de HPAs pode ser descrito como uma pirólise, na qual compostos orgânicos de massa molecular elevada são fragmentados e, pela geração de radicais, cuja instabilidade leva à recombinação em núcleos aromáticos. A síntese do benzo(a)pireno proposta em 1958 fundamentou o estudo da síntese de HPAs.⁽³⁷⁾

Alternativamente, as reações de pirossíntese explicam a estruturação a partir de substratos saturados, principalmente o metano e o etano.⁽³⁸⁾

2.2.2 Aspectos toxicológicos

Os riscos associados à presença dos HPAs no ambiente foram registrados pela primeira vez em 1922, a partir de dados que constatarem o desenvolvimento de câncer em animais por partículas orgânicas de fuligem. Os 16 contaminantes prioritários previamente mencionados, foram identificados na década de 70 de acordo com a sua ocorrência e possível carcinogenicidade. Desta lista, 8 HPAs também estão presentes na legislação da comissão da união europeia que compreende 15 hidrocarbonetos caracterizados como possíveis indutores do câncer, experimentalmente evidenciado em animais.⁽³⁵⁾

Através da ingestão, os HPAs são assimilados pelas células epiteliais do intestino por difusão, onde a intoxicação pode ser propagada. Caso sejam transformadas no organismo, as moléculas de HPAs adquirem caráter eletrofílico na forma de epóxidos e compostos polihidroxilados, o que permite a formação de ligações covalentes com centros nucleófilos, tais como o DNA, cessando a sua replicação. Esta mutação estimula principalmente o processo de desenvolvimento do câncer de pulmão, de pele e gastrointestinal. Alguns dos efeitos a curto prazos notificados são a náusea, vômitos, inflamações, irritação da pele e dos olhos. Porém, como os intermediários de HPAs produzidos metabolicamente são solúveis em água, estas substâncias podem simplesmente serem eliminadas pela urina.⁽³⁹⁾

O potencial carcinogênico e mutanogênico de alguns HPAs tem sido verificado pela Agência internacional de pesquisas sobre o câncer (IARC). Estes estudos são focados no benzo(a)pireno, o único HPA classificado no grupo 1, que o categoriza como carcinogênico para humanos.⁽⁴⁰⁾

2.2.3 Benzo(a)pireno

Dentre os HPAs prioritários, o benzo(a)pireno (figura 3) é o composto mais avaliado.

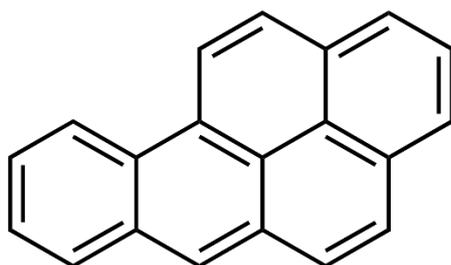


Figura 3. Fórmula estrutural do benzo(a)pireno

A EC (Comissão europeia) estabelecem uma concentração máxima de $2 \mu\text{g kg}^{-1}$ para o benzo(a)pireno em óleos comestíveis.⁽⁴¹⁾ Este HPA é utilizado como o principal marcador da presença de HPAs e bebidas assim como os seus efeitos na indução do câncer. As pesquisas relacionadas a estes poluentes originaram-se através do isolamento do B(a)P. Atualmente, é reconhecido com um dos agentes carcinogênicos mais potentes em animais, além da atividade embriotóxica e teratogênica. Peixes e mamíferos que sofrem exposição ao B(a)P manifestam nitidamente a neoplasia apenas 6 horas após terem sido contaminados por uma concentração de aproximadamente 250 partes por bilhão ($\mu\text{g kg}^{-1}$).⁽⁴²⁻⁴⁶⁾ Na tabela 1 constam as principais características do B(a)P.

Tabela 1. Propriedades físico-químicas do benzo(a)pireno

Aparência	Cristais amarelo pálido
Fórmula molecular	$\text{C}_{20}\text{H}_{12}$
Peso molecular	$252,3 \text{ g mol}^{-1}$
Densidade	$1,24 \text{ g cm}^{-3}$
Volatilidade	Baixa
Ponto de fusão	$178,1 \text{ }^\circ\text{C}$
Ponto de ebulição	$310 \text{ }^\circ\text{C}$
Coefficiente de partição	$\text{Log } K_{ow} = 6,04$ (lipossolúvel)
Solubilidade em água	$3,8 \mu\text{g L}^{-1}$

2.3 Determinação de HPAs em azeite de oliva

A análise instrumental dos HPAs é comumente realizada por Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de ultravioleta (HPLC-UV) ou detector de fluorescência (FLD), cromatografia à gás acoplada ao detector de chamas (GC-FID) ou ao espectrômetro de massas (MS).⁽⁴⁷⁾ Estas técnicas são amplamente aplicadas devido à capacidade de se quantificar simultânea e individualmente os HPAs mediante a sua separação.⁽⁴⁸⁻⁵⁵⁾ Na **Tabela 2**, estão listados trabalhos recentes que foram consolidados pelo uso de HPLC-FLD.

Tabela 2. Seleção de algumas publicações acerca da determinação de HPAs por cromatografia líquida de alta eficiência e detecção por fluorescência

Autor	Ano	Analitos	Matriz	Faixa linear
Li, L.	2020	PHE, ANT, FLA, PYR, BaA	Água	0,5 - 100 $\mu\text{g L}^{-1}$
Sess-Tchotch, D.	2018	BaA, CHR, BbF, BaP	Manteiga de cacau	0 - 32,0 $\mu\text{g L}^{-1}$
Zachara, A.	2017	BaA, CHR, BbF, BaP	Cereais	0,20 - 10,00 $\mu\text{g L}^{-1}$
Shi, Y.	2016	PHE, BaA, CHR, BbF, DBahA, BaP, BkF	Café e chá	0,002-20 $\mu\text{g L}^{-1}$
Akdoğan, A.	2016	BaA, CHR, BbF, BaP	Azeite de oliva, óleos de milho, girassol e gergelim	0,1 - 5,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$
Liaud, C.	2015	NAP, ACY, ACF, FLU, PHE, ANT, FLA, PYR, BaA, CHR, BbF, BkF, BaP, DahA, BghiP, IcdP	Ar	0,1 - 92 $\mu\text{g L}^{-1}$
Krajian, H.	2014	NAP, ACY, ACF, FLU, PHE, ANT, FLA, PYR, BaA, CHR, BbF, BkF, BaP, DahA, BghiP, IcdP	Azeite de oliva	100 - 2000 $\mu\text{g L}^{-1}$
Zhou, Q.	2014	NAP, ACY, ACF, FLU, PHE, ANT, FLA, PYR, BaA, CHR, BbF, BkF, BaP, DahA, BghiP, IcdP	Água	0,5 -100 $\mu\text{g L}^{-1}$

NAP = naftaleno; ACY = acenaftileno; ACF = acenafteno; FLU = fluoreno; PHE = fenantreno; ANT = antraceno FLA = fluoranteno; PYR = pireno; BaA = benzo(a)pireno; CHR = criseno; BbF = benzo(b)fluoranteno; BkF = benzo(k)fluoranteno; BaP = benzo(a)pireno; DahA = dibenzo(a,h)antraceno; BghiP = benzo(g,h,i)preileno; IcdP = indeno(1,2,3-cd)pireno

O preparo de amostras deve remover uma parte suficientemente representativa do analito presente na matriz, isolando-o de compostos que possam impossibilitar a sua análise. Para HPAs, a extração com solvente é o processo mais utilizado, seguida da purificação por remoção de resíduos (*clean-up*) e a concentração do extrato.⁽⁵⁶⁾ Em alimentos, as técnicas de preparo de amostra variam de acordo com a natureza da matriz (lipídica ou não-lipídica), sendo frequentemente notados o uso de extração em fase sólida, extração líquido-líquido, extração por fluido supercrítico e micro extração em fase sólida.⁽⁵⁷⁻⁶³⁾ A **Tabela 3** destaca técnicas utilizadas em publicações listadas nos últimos anos.

Tabela 3. Seleção de algumas publicações recentes acerca da determinação de HPAs por diversos métodos de preparo de amostra

Autor	Ano	Analitos	Preparo de amostra	Matriz
Wicker A.	2018	NAP, ACY, ACF, FLU, PHE, ANT, FLA, PYR, BaA, CHR, BbF, BkF, BaP, DahA, BghiP, IcdP	Extração por fluido supercrítico	Solo
Ji, W.	2017	PYR, ANT, CHR, FLA, BghiP, IcdP, DahA, BaP	Extração em fase sólida magnética	Azeite de oliva, óleos de amendoim, soja e milho
Zheng, H.	2016	CHR, BaA, BbF, BkF, BaP, DahA, BghiP, IcdP	Extração em fase sólida magnética	Óleos de camélia, milho e semente de girassol
Hao, X.	2016	NAP, ACY, ACF, FLU, PHE, ANT, FLA, PYR, BaA, CHR, BbF, BkF, BaP, DahA, BghiP, IcdP	Extração líquido-líquido	Azeite de oliva, óleos de amendoim, soja e colza
Sadeghi, R.	2016	NAP, ACY, ACF, FLU, PHE, ANT, PYR, BaA, CHR, BbF, BaP, DahA, BghiP	Microextração líquido-líquido dispersiva	Água mineral
Eslamizad, S.	2016	BaP	QuEChERS	Pão
Wang, J.	2014	FLU, ANT, FLA, PYR, BaA, BbF, BkF	Extração em fase sólida	Água

A seleção da técnica analítica e preparo de amostra para a determinação de um ou mais analitos deve visar a aquisição de, preferencialmente, um método de execução acessível, barato, rápido, seletivo. Em casos particulares, é essencial que a técnica possa identificar e quantificar tais substâncias mesmo quando estão presentes em concentrações traço (partes por bilhão, trilhão, ...).

Alimentos são matrizes complexas, como tal, possuem uma composição muito diversificada e manifestam uma alta variabilidade entre amostras semelhantes. Portanto, a eficiência da metodologia baseada nos critérios citados, deve ser elaborada e verificada ainda mais minuciosamente.⁽⁶⁴⁾

As técnicas espectroscópicas de absorção e fluorescência no ultravioleta-vísivel (Uv-Vis) são altamente sensíveis para os HPAs, na ordem de 0,1 a 1,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ e são extensivamente utilizadas em sua análise. Ao avaliar a presença de um número inferior de HPAs ou apenas um único analito que atua como marcador para os demais (normalmente o B(a)P), a análise direta é uma alternativa viável, pois dispensa-se a aplicação da cromatografia, reduzindo o tempo de obtenção de dados e o consumo de reagentes.⁽⁶⁵⁻⁷²⁾ A **Tabela 4** contém trabalhos recentes nos quais a fluorescência direta foi empregada

Tabela 4. Seleção de algumas publicações acerca da determinação direta de HPAs por espectroscopia de fluorescência

Autor	Ano	Analitos	Matriz	Faixa linear	Limite de detecção
Kumar, K.	2020	PYR, CHR, BaP	Petróleo	0,06 - 4,08 $\mu\text{g L}^{-1}$	
Cheng, W	2017	BaP	Óleo de gergelim	0,5 - 10,5 $\mu\text{g kg}^{-1}$	
Liu, Y.	2016	CHR, BaA, BaP, BbF	Azeite de oliva, óleos de girassol, amendoim, xantóxilo, soja e canola	10 - 400 $\mu\text{g kg}^{-1}$	3,0; 8,64; 0,16 e 7,68 $\mu\text{g kg}^{-1}$
Pena, E.	2015	PHE, BbF, BaP, HPYR, PHT, HFLU HNAP	Óleo de peixe	10 - 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$	
Cañas, A.	2014	BaA, ChR, BbF, BaP	Água	50 - 600 ng L^{-1}	0,11 ng L^{-1}
Lin, L.	2014	BaP	Leite	0,1 - 10 $\mu\text{g L}^{-1}$	0,03 $\mu\text{g kg}^{-1}$
Zhou, N.	2011	BaP	Água	0 - 12 $\mu\text{g L}^{-1}$	0,11 $\mu\text{g kg}^{-1}$
Li, N.	2011	BaP	Carne suína, peixes e ostras	0 - 50 ng kg^{-1}	0,14 $\mu\text{g kg}^{-1}$

PHT = fenantrol; HFLU = hidroxifluoreno; HNAP = naftol; HPYR = hidroxipireno

Ao complementar uma extração, o método de *clean up* à baixa temperatura apresenta alta capacidade de reduzir interferências por substâncias lipídicas em amostras de óleos e gorduras. Esta técnica destaca-se pela sua simplicidade, alta frequência analítica e baixo consumo de solventes orgânicos. Geralmente, a extração de HPAs nestes tipos de matrizes é realizada pela adição de um solvente orgânico seguida do resfriamento da mistura à -25°C , resultando no congelamento da gordura. Uma fração dos componentes lipídicos presentes no extrato orgânico se precipitam ao se solidificarem. A alteração da temperatura também altera o equilíbrio de partição entre as fases, concentrando o extrato pela transferência de massa do analito. O extrato é separado e submetido à purificação por extração em fase sólida utilizando cartuchos contendo N-alumina.⁽⁷³⁻⁷⁸⁾ **Na tabela 5** estão listados trabalhos recentes que empregaram o *clean up* à baixa temperatura no preparo de amostras em matrizes oleosas.

Tabela 5. Seleção de algumas publicações acerca da aplicação do *clean up* à baixa temperatura

Autor	Ano	Análitos	Matriz	Preparo de amostra
Yu, X.	2019	Aflatoxina B1	Azeite de oliva, óleo de milho, óleo de canola, óleo de soja, óleo de amendoim	Extração líquido-líquido e extração em fase sólida magnética
Yu, X	2017	Inseticidas*	Azeite de oliva, óleo de milho, óleo de canola, óleo de soja, óleo de girassol	Extração líquido-líquido e extração em fase sólida magnética
Mo, R.	2017	BaP	Óleo de camélia	Extração líquido-líquido
Taghvaei, Z.	2016	NAP, ACY, ACF, FLU, PHE, ANT, FLA, PYR, BaA, CHR, BbF, BkF, BaP, DahA, BghiP, IcdP	Azeite de oliva e óleo de bagaço de oliva	Extração líquido-líquido e extração em fase sólida
Huang, J.	2014	Ivermectina, abamectina	Azeite de oliva, óleo de milho, óleo de soja, óleo de amendoim e banha	Extração líquido-líquido e extração em fase sólida
Payanan, T.	2013	NAP, ACY, ACF, FLU, PHE, ANT, FLA, PYR, BaA, CHR, BbF, BkF, BaP, DahA, BghiP, IcdP	Azeite de oliva, óleo de milho, óleo de soja, óleo de girassol e óleo de amendoim	Extração líquido-líquido e extração em fase sólida

*Tetrametrina, fenpropatrina, cipermetrina, decametrina, fenvalerato, acrinatrina, permetrina, bifentrina

2.4 Espectroscopia de fluorescência

A espectroscopia é o estudo da interação da radiação com a matéria. As regiões do espectro eletromagnético denominadas ultravioleta (200 a 400 nm) e visível (400 a 750 nm) normalmente são unificadas como uma única categoria, considerando o comportamento observado nos compostos que são expostos a estas faixas de radiação.

Quando uma molécula absorve um fóton do UV-Vis, a molécula é elevada do seu estado fundamental de energia para um estado eletrônico excitado. Este fenômeno é caracterizado como transição eletrônica e consiste no deslocamento de um elétron entre os orbitais HOMO (Orbital ocupado de energia mais alta) e LUMO (Orbital ocupado de energia menos baixa) de uma molécula.

Em geral, HOMO e LUMO são respectivamente os orbitais π e π^* de um grupo funcional contendo ligações duplas conjugadas. A diferença de energia entre estes orbitais corresponde à energia que deve ser absorvida pela molécula para que ocorra a transição.

A quantificação desta energia é descrita pela equação de Planck:

$$E = h\nu \quad \text{ou} \quad E = h\frac{c}{\lambda} \quad (1)$$

A energia (E) de um fóton é proporcional à sua frequência (ν) pelo fator constante de Planck ($h = 6,6 \cdot 10^{-34}$ J s) ou inversamente proporcional ao seu comprimento de onda (λ), onde c é a velocidade da luz. Ou seja, quanto menor for a diferença de energia entre HOMO e LUMO, maior será o comprimento de onda absorvido. A magnitude desta energia é determinada principalmente pela extensão do sistema conjugado: o aumento da conjugação indica uma menor energia. Os grupos funcionais adjacentes às ligações duplas também influenciam no espaçamento entre os orbitais.

O comprimento de onda que é mais intensamente absorvido por uma substância é o λ máximo ($\lambda_{\text{máx}}$), medido pela espectroscopia de absorção no UV-Vis. Nesta técnica, o espectro exibe bandas de absorção que abrangem uma ampla faixa de comprimentos de onda. Este perfil é a resultante de um agrupamento de picos, sendo os comprimentos muito próximos que por meio da excitação, realizam simultaneamente transições eletrônicas e vibracionais. Os grupos funcionais responsáveis pela absorção são os cromóforos.

A espectroscopia de fluorescência ou espectrofluorimetria é uma técnica complementar à absorção. Envolve os mesmos orbitais mencionados, mas é subsequente de um estado excitado que emite um fóton de energia mais baixa em relação ao absorvido. A variação de energia entre a absorção e a emissão é justificada pela organização dos

estados, de forma que um único nível eletrônico contém múltiplos subníveis vibracionais nos quais estão contidos subníveis rotacionais. Em uma transição eletrônica, há energia suficiente para que ocorra simultaneamente transições vibracionais e rotacionais.

Quando a molécula absorve radiação do ultravioleta, o elétron desloca-se do HOMO (estado eletrônico fundamental) para o LUMO (primeiro estado eletrônico excitado) em um subnível vibracional excitado. A molécula estará suscetível à relaxação vibracional, perdendo de forma não-radiativa (sem emissão de um fóton) parte da energia acumulada, direcionando-se ao subnível vibracional menos energético do estado eletrônico excitado. Esta dissipação é provocada principalmente pela colisão com moléculas vizinhas. A partir desta condição, três eventos se tornam mais prováveis: a ocorrência de uma reação fotoquímica, o retorno ao estado eletrônico fundamental pela emissão de calor ou o decaimento radiativo da molécula pela emissão de um fóton. Este último define a fluorescência. O fóton emitido possui menor energia (maior comprimento de onda) em relação ao fóton absorvido inicialmente. Logo, é natural que a emissão seja efetuada na região visível do espectro eletromagnético. O diagrama de Jablonski ilustrado na figura 4 descreve estes processos.

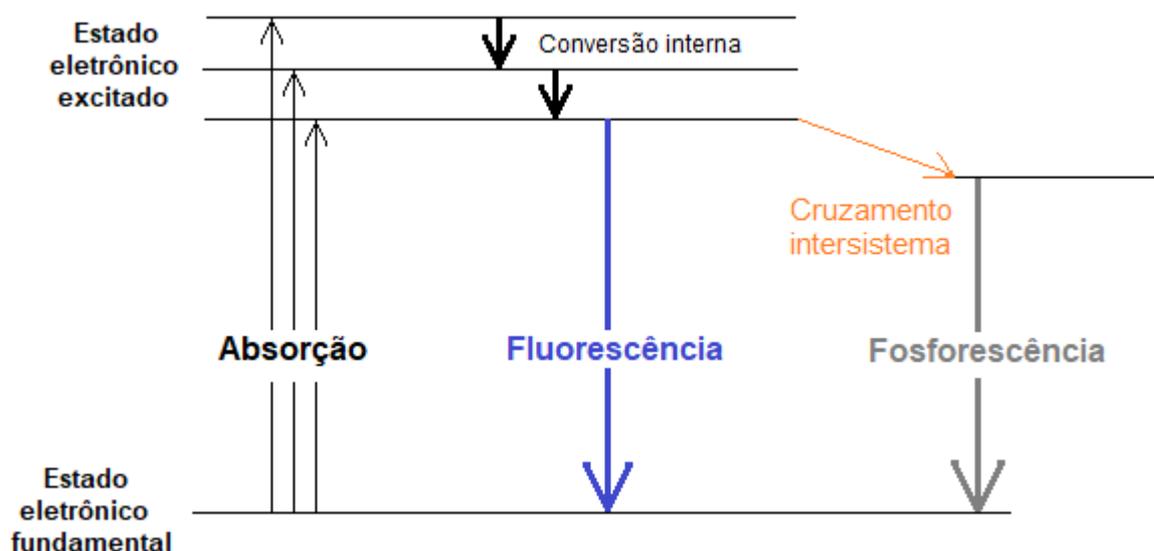


Figura 4. Diagrama de Jablonski simplificado

O espectro produzido indica a intensidade da emissão por fluorescência em função do comprimento de onda (nm). Este perfil é aproximadamente a imagem refletida do espectro de absorção. A substância capaz de produzir fluorescência no meio analisado é o fluoróforo.

A determinação de HPAs por fluorescência é mais sensível (10 a 1000 vezes) em comparação à absorção no UV-Vis, além de ser mais seletiva pela possibilidade de selecionar mais de um comprimento de onda para a determinação de HPAs normalmente absorvem luz na faixa de 200 a 400 nm e são os compostos que apresentam a maior fluorescência natural. tornando-os bastante compatíveis com esta técnica analítica.⁽⁷⁹⁾

2.4.1 Fatores que alteram a fluorescência

O processo de desativação, que a faz uma molécula excitada retornar ao seu estado fundamental pela dissipação da energia absorvida, compreende um conjunto de fenômenos radiativos (emissão por fluorescência) e não-radiativos que competem cineticamente. Portanto, as formas de reduzir as probabilidades de eventos indesejados ocorrerem devem ser consideradas.

A magnitude da eficiência da fluorescência está associada ao rendimento quântico (ϕ), índice que relaciona o número de moléculas fluorescentes (f_l) ao número total de moléculas que foram excitadas (exc):

$$\phi = \frac{f_l}{exc} \quad (2)$$

A equação pode ser reescrita em aspectos cinéticos e o denominador corresponde ao somatório de todos os processos de desativação:

$$\phi = \frac{k_f}{k_f + k_i + k_{ce} + k_{ci} + K_d} \quad (3)$$

Onde:

k_f = constante da emissão por fluorescência

k_i = constante de conversão intersistema

k_{ce} = constante de conversão externa

k_{ci} = constante de conversão interna

k_d = constante de dissociação

As variáveis descritas dependem de parâmetros que podem ser manipulados com o intuito de se otimizar o rendimento quântico, tais como:

2.4.1.1 Estrutura molecular

A fluorescência mais intensa e útil é encontrada em compostos aromáticos, sendo que o rendimento quântico aumenta com o número de anéis e o grau de condensação. Moléculas alifáticas contendo o grupo carbonila ou ligações duplas altamente conjugadas também fluorescem em menor intensidade. Estruturas rígidas favorecem a fluorescência por possuírem maior coeficiente de absorção molar, de forma que moléculas mais flexíveis (baixa conjugação) tendem a dissipar mais energia por meio de vibrações. A flexibilidade aumenta a constante de conversão interna, induzindo a desativação não-radiativa.

2.4.1.2 Solvente

O analito no estado excitado pode perder energia eletrônica ao realizar colisões com moléculas do solvente, conseqüentemente, levando à uma diminuição da fluorescência por conversão externa. O aumento da viscosidade do solvente utilizado reduz a difusão do meio e a taxa colisional.

A polaridade e o caráter prótico do solvente é uma característica importante para a análise da fluorescência. Quando uma molécula se encontra em um estado excitado, o ambiente ao seu redor se reorienta e a energia do estado excitado após a emissão se torna diferente em relação ao valor anterior ao processo de absorção. Quando ocorre a transição $n - n^*$, a molécula no estado excitado é mais polar do que quando ela se encontra no estado fundamental. Logo, o aumento da polaridade do solvente ocasiona uma diminuição da energia relativa do estado excitado, com deslocamento batocrômico do espectro (em direção ao vermelho). Essa redução de energia pode ampliar a conversão interna. No caso das transições $n - \pi^*$, o estado excitado é menos polar e o aumento da polaridade do solvente produz deslocamentos hipsocrômicos (em direção ao azul). Também é comum que ocorra uma mudança entre os estados excitados de $n - \pi^*$ para $\pi - \pi^*$ (principalmente quando as energias destes estados são próximas) na presença de solventes polares ou de maior constante dielétrica. Este fato justifica o motivo de algumas substâncias não serem fluorescentes ou demonstrarem fraca fluorescência em solventes apolares ou não-próticos enquanto fluorescem intensamente em solventes polares e próticos.⁽⁸⁰⁾

2.4.1.3 Temperatura

Além de ser um fator que influencia diretamente na viscosidade do solvente, a temperatura também se relaciona à constante de conversão interna. No estado excitado, a energia eletrônica é parcialmente convertida em energia vibracional. Como fenômenos vibracionais são estimulados por processos térmicos, o aumento da temperatura diminui a intensidade da fluorescência.

A equação de Forster-Höffmann expressa a relação entre estes parâmetros e o rendimento quântico:

$$\log \phi = C + x \log \eta \quad (4)$$

Onde η é a viscosidade, C é uma constante específica do analito, e x é uma constante dependente da temperatura do meio.⁽⁸¹⁾

2.4.1.4 Concentração hidrogeniônica

Em moléculas aromáticas contendo grupos funcionais básicos ou ácidos, o efeito do pH se torna relevante, pois é possível notar uma distinção significativa entre a fluorescência de moléculas na forma protonada e não-protonada. Caso a molécula estudada não possua grupos ionizáveis, o pH não é um parâmetro significativo.

2.4.1.5 Concentração de oxigênio dissolvido

O oxigênio molecular pode reagir com moléculas do analito no estado excitado, sendo um agente supressor da fluorescência. Este parâmetro de supressão (*quenching*) representa tanto a oxidação do fluoróforo quanto a alteração do spin do elétron excitado, transferindo-o para um estado de menor energia pelo cruzamento intersistemas. Deste modo, a probabilidade de se produzir a fosforescência, ao invés da fluorescência, se torna mais expressiva. Embora, o oxigênio seja o principal supressor por este mecanismo, íons de halogênios de massa elevada (I⁻, Br⁻) e metais pesados (Cd²⁺, Pb²⁺, Hg²⁺ e Tl⁺) podem aumentar a velocidade da desativação não-radiativa do analito.

A capacidade de um agente supressor reduzir a eficiência da emissão por fluorescência, pode ser expressa pela equação de Stern-Volmer:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_q \tau_0 [Q] \quad (5)$$

Onde F_0 e F são as intensidade relativas da fluorescência do analito na ausência e presença do agente supressor, respectivamente. K_q é a constante de velocidade da reação de desativação, τ_0 é o tempo de meia vida do fluoróforo e Q é a concentração do supressor.⁽⁸²⁾

2.4.1.6 Relação quantitativa

Como foi observado na equação 1, a intensidade da emissão por fluorescência (I_{fl}) é proporcional à intensidade do feixe de radiação que a molécula do analito absorve (I_{exc}):

$$I_{fl} = \phi I_{exc} \quad (6)$$

O índice de absorção é a diferença entre a intensidade do feixe incidente e a intensidade após atravessar uma distância b do meio, então:

$$I_{fl} = \phi (I_0 - I) \quad (7)$$

A Lei de Beer-Lambert estabelece a relação entre a concentração do analito (c) e a intensidade da radiação absorvida

$$\frac{I}{I_0} = 10^{-\epsilon bc} \quad (8)$$

Onde ϵ é a absorvidade molar característica da molécula absorvente.

Combinando-a com a equação 8 temos a equação 9:

$$I_{fl} = \phi I_0 (1 - 10^{-\epsilon bc}) \quad (9)$$

Considerando que na solução contendo o analito haja uma perda mínima da intensidade da radiação por espalhamento, esta igualdade pode ser expandida como uma série de McLaurin, sendo escrita como:

$$I_{fl} = \phi I_0 \left[2,303 \epsilon bc - \frac{(2,303 \epsilon bc)^2}{2!} + \frac{(2,303 \epsilon bc)^3}{3!} \dots \right] \quad (10)$$

Para sistemas de baixa concentração ($\epsilon bc < 0,05$) apenas o primeiro termo é relevante, obtendo-se:

$$I_{fl} = \phi I_0 2,303 \epsilon bc \quad \text{ou} \quad F = kc \quad (11)$$

Logo, para um sistema de caminho óptico fixo e cuja concentração obedeça tais condições, a fluorescência (F) é diretamente proporcional à concentração do fluoróforo. Eventuais desvios da linearidade podem ser atribuídos às concentrações elevadas, auto-supressão e auto-absorção.⁽⁸³⁾

3 PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Materiais e Reagentes

O padrão de B(a)P $\geq 96\%$ (HPLC) foi obtido da Sigma Aldrich (St Louis MO, EUA). Os solventes metanol, clorofórmio e dimetilsulfóxido foram obtidos da J T Baker (Center Valley, PA, EUA), a acetonitrila da Merck (Darmstadt, HE, Alemanha), a acetona, hexano, octanoato de etila e tolueno da Synth (Diadema, SP, Brasil) e o éter tercbutil metílico da Vetec (Duque de Caxias, RJ, Brasil).

3.2 Equipamentos e *softwares*

O B(a)P foi pesado em balança analítica Shimadzu ATX 224. Para a extração do analito utilizou-se vortex Velp Scientifica ZX Class. Para a evaporação utilizou-se chapa aquecedora Corning PC420D. As análises foram realizadas no espectrofluorímetro Varian Cary Eclipse. A aquisição de dados foi realizada nos *softwares*: Microsoft Excel, OriginLab e Scan.

3.3 Preparo da solução estoque do analito

A solução estoque de B(a)P foi preparada à 98 mg L^{-1} . Para tal, pesou-se 0,0049 g do padrão original. A massa foi solubilizada em 2,00 mL de clorofórmio e foi transferida quantitativamente para um balão volumétrico de 50,00 mL onde preencheu-se o menisco com acetonitrila. As micropipetas e balões volumétricos utilizados foram previamente calibrados segundo as especificações da RBC 159. A solução estoque foi mantida a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ sob proteção da luz. A partir dela foi preparada uma solução intermediária à $98 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ em acetonitrila para ser utilizada eventualmente nos experimentos.

3.4 Avaliação do espectro de fluorescência do benzo(a)pireno em diferentes solventes

Soluções de B(a)P à $98 \mu\text{g L}^{-1}$ foram obtidas a partir de 25 μL da solução estoque e com o respectivo solvente testado completou-se o volume em balões de 25,00 mL. Os solventes empregados foram: acetona, acetonitrila, clorofórmio, dimetilssulfóxido (DMSO), éter tercbutil metílico, hexano, metanol, octanoato de etila e tolueno. Utilizou-se 2,5 mL de cada amostra em uma cubeta de quartzo para análise em triplicata. Também realizou-se a leitura dos solventes não contendo o analito, sendo o branco referente às amostras.

As análises no espectrofluorímetro foram realizadas com a obtenção do espectro de emissão na faixa de 300 a 600 nm e o comprimento de onda de excitação fixado em 295 nm. As demais condições ajustadas foram: temperatura de 20 °C, largura das fendas de excitação e emissão em 5,0 nm.

3.5 Avaliação do efeito da temperatura no espectro de fluorescência do benzo(a)pireno em diferentes solventes

Soluções de B(a)P à $98 \mu\text{g L}^{-1}$ foram obtidas a partir de 20 μL da solução estoque e com o respectivo solvente testado completou-se o volume em balões de 20,00 mL. Os solventes empregados foram: acetonitrila, DMSO e metanol. Utilizou-se 2,5 mL de cada amostra em uma cubeta de quartzo para análise em triplicata. Também realizou-se a leitura dos solventes não contendo o analito, sendo o branco referente às amostras.

As análises no espectrofluorímetro foram realizadas com a obtenção do espectro de emissão na faixa de 300 a 600 nm e o comprimento de onda de excitação fixado em 295 nm. As temperaturas testadas foram de 10, 20 e 30 °C para acetonitrila e metanol; e 20, 25 e 30°C para o DMSO. A largura das fendas de excitação e emissão mantiveram-se em 5,0 nm.

3.6 Avaliação da influência da abertura das fendas no espectro de fluorescência do benzo(a)pireno em diferentes solventes

Soluções de B(a)P à $2 \mu\text{g L}^{-1}$ foram obtidas a partir de $10,2 \mu\text{L}$ da solução intermediária e com o respectivo solvente testado completou-se o volume em balões de $20,00 \text{ mL}$. Os solventes empregados foram: acetonitrila, DMSO e metanol. Utilizou-se $2,5 \text{ mL}$ de cada amostra em uma cubeta de quartzo para análise em triplicata. Também realizou-se a leitura dos solventes não contendo o analito, sendo o branco referente às amostras.

As análises no espectrofluorímetro foram realizadas com a obtenção do espectro de emissão na faixa de 300 a 600 nm e o comprimento de onda de excitação fixado em 295 nm . A temperatura foi de $20 \text{ }^\circ\text{C}$ e as larguras das fendas de excitação e emissão foram ajustadas em $2,3$; $5,0$; $10,0$ e $20,0 \text{ nm}$.

3.7 Construção das curvas de calibração do benzo(a)pireno

Soluções de B(a)P nas concentrações de $1,0$; $2,0$; $4,0$; $8,0$; $12,0$; $16,0$ e $20,0 \mu\text{g L}^{-1}$ foram preparadas em balões de 10 mL a partir da solução intermediária. Este procedimento foi realizado para os solventes acetonitrila e DMSO. Utilizou-se $2,5 \text{ mL}$ de cada amostra em uma cubeta de quartzo para análise em triplicata. Também realizou-se a leitura dos solventes não contendo o analito, sendo o branco referente às amostras.

As análises no espectrofluorímetro foram realizadas com a obtenção do espectro de emissão na faixa de 300 a 600 nm e o comprimento de onda de excitação fixado em 295 nm . A temperatura foi de $20 \text{ }^\circ\text{C}$ e as larguras das fendas de excitação e emissão foram de $10,0 \text{ nm}$.

3.8 Avaliação do efeito *quenching* da acetona no espectro de fluorescência do benzo(a)pireno

Soluções de B(a)P na concentração de $6 \mu\text{g L}^{-1}$ foram preparadas a partir da solução intermediária. Adicionou-se volumes variados de acetona a estas soluções obtendo-se as concentrações em % v/v: 0%, 1%, 0,5%, 0,25% e 0,125%. Este procedimento foi realizado para os solventes acetonitrila e DMSO. Utilizou-se 2,5 mL de cada amostra em uma cubeta de quartzo para análise em triplicata.

As análises no espectrofluorímetro foram realizadas com a obtenção do espectro de emissão na faixa de 300 a 600 nm e o comprimento de onda de excitação fixado em 295 nm. A temperatura foi de 20 °C e as larguras das fendas de excitação e emissão foram de 10,0 nm.

3.9 Avaliação da combinação das aberturas das fendas no espectro de fluorescência do benzo(a)pireno no extrato da matriz

Os experimentos subsequentes a este serão realizados na matriz estudada. O procedimento empregado e descrito a seguir é uma adaptação da ISO 15753:2016⁽⁸⁴⁾. Em um tubo de ensaio de vidro, adicionou-se 3,0 mL de amostra de azeite de oliva comercial. Adicionou-se 6,0 mL de acetonitrila e acetona à 3:2 (v/v) e após fechar o tubo, agitou-se a mistura em um vórtex à 1500 rotações por minuto durante 2 minutos e, em seguida, a mistura permaneceu em repouso por 1 hora, antes de ser submetida ao congelador, onde resfriou-se à -18°C. Após 2 horas, o azeite se congelou e removeu-se a fase superior que se manteve líquida. Transferiu-se o volume para um béquer e utilizou-se uma chapa aquecedora à temperatura de 45°C até a completa secagem do extrato. Ressuspendeu-se cada amostra com 2,5 mL dos solventes estudados (acetonitrila e DMSO) e acrescentou-se 510 μL da solução intermediária de B(a)P obtendo-se uma concentração final de $20 \mu\text{g L}^{-1}$. Transferiu-se todo o volume de amostra para uma cubeta de quartzo para análise em triplicata. Também realizou-se a leitura dos extratos não contendo o analito, sendo o branco referente às amostras.

As análises no espectrofluorímetro foram realizadas com a obtenção do espectro de emissão na faixa de 300 a 600 nm e o comprimento de onda de excitação fixado em 295 nm. A temperatura foi de 20 °C e as larguras das fendas de excitação e emissão foram selecionadas, respectivamente, em quatro diferentes combinações: 5,0 e 5,0 nm; 5,0 e 10,0 nm; 10,0 e 5,0 nm; 10,0 e 10,0 nm.

3.10 Avaliação da extração líquido-líquido sob baixa temperatura pelos parâmetros otimizados

Amostras de azeite de oliva foram fortificadas à $2 \mu\text{g L}^{-1}$ de B(a)P a partir da solução intermediária. Realizou-se a extração das amostras e ao final do procedimento, ressuspendeu-se o extrato com 2,5 mL de DMSO. Transferiu-se todo o volume de amostra para uma cubeta de quartzo para análise em triplicata. Para fins de comparação, foram preparadas amostras fortificadas após a extração na mesma concentração estudada. Também realizou-se a leitura dos extratos não contendo o analito, sendo o branco referente às amostras.

As análises no espectrofluorímetro foram realizadas com a obtenção do espectro de emissão na faixa de 300 a 600 nm e o comprimento de onda de excitação fixado em 295 nm. A temperatura foi de $20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e as larguras das fendas de excitação e emissão foram ajustadas em 10,0 e 5,0 nm, respectivamente.

3.11 Avaliação da viabilidade da fluorescência sincronizada

Amostras de azeite de oliva não fortificadas foram extraídas. A inserção do analito foi realizada somente após a evaporação da amostra. O extrato foi ressuspendido com 2,5 mL de DMSO e fortificado à $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de B(a)P a partir da solução intermediária. Transferiu-se todo o volume de amostra para uma cubeta de quartzo para análise em triplicata. Também realizou-se a leitura dos extratos não contendo o analito, sendo o branco referente às amostras.

As análises no espectrofluorímetro foram realizadas no modo sincronizado com a obtenção do espectro de excitação na faixa de 300 a 600 nm e o comprimento de onda de excitação fixado em 388 nm. A variação de frequência ($\Delta\nu$) entre os monocromadores foi selecionada em 1230 cm^{-1} . A temperatura foi de $20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e as larguras das fendas de excitação e emissão foram ajustadas em 5,0 nm, respectivamente.

3.12 Avaliação da extração na concentração alvo de benzo(a)pireno

Amostras de azeite de oliva foram fortificadas à $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de B(a)P a partir da solução intermediária. Realizou-se a extração das amostras e ao final do procedimento, ressuspendeu-se o extrato com 2,5 mL dos solventes testados, acetonitrila e DMSO. Transferiu-se todo o volume de amostra para uma cubeta de quartzo para análise em triplicata. Também realizou-se a leitura dos extratos não contendo o analito, sendo o branco referente às amostras.

As análises no espectrofluorímetro foram realizadas no modo sincroinizado com a obtenção do espectro de excitação na faixa de 300 a 600 nm e o comprimento de onda de excitação fixado em 388 nm. A variação de frequência ($\Delta\nu$) entre os monocromadores foi selecionada em 1230 cm^{-1} . A temperatura foi de $20 \text{ }^\circ\text{C}$ e as larguras das fendas de excitação e emissão foram ajustadas em 5,0 nm, respectivamente.

3.13 Estimativa de figuras de mérito de validação

Por meio da otimização da análise por fluorescência, foram estimadas as figuras de validação do método foi validado utilizando o azeite de oliva, aplicando a extração líquido-líquido descrita na seção 3.9 e as condições de fluorescência descritas na seção 3.12.

Os experimentos de validação foram executados de acordo com as diretrizes do guia da Eurachem⁽⁸⁵⁾. Os parâmetros avaliados estão relatados a seguir:

3.13.1 Linearidade

Foi construída uma curva matrizada e extraída, em triplicata, nos níveis de fortificação: 0,8; 1,4; 2,0; 2,6, 3,2 e $3,8 \mu\text{g L}^{-1}$. Foram realizados os testes para detecção de *outliers* de Jackknife, de linearidade através da ANOVA e de homocedasticidade de Brown Forsythe.

3.13.2 Limites de detecção e quantificação

A determinação dos limites de detecção (LD) e quantificação (LQ), foi realizada pela extração de 10 amostras branco de azeite de oliva. Os valores de LQ e LD foram estimados pelos cálculos:

$$LD = 3 s'_0 \quad LQ = 10 s'_0$$

Sendo s'_0 definido pela relação:

$$s'_0 = \frac{s_0}{\sqrt{n}}$$

onde s_0 é o desvio padrão das concentrações encontradas para os extrados brancos e n é o número de amostras branco analisadas.

3.13.3 Precisão intra e interdias

A precisão foi estimada em três pontos da curva analítica (0,8; 2,0 e 3,2 $\mu\text{g L}^{-1}$) a partir de uma sextuplicata de extração em cada um desses pontos, que foi realizada no mesmo dia para a precisão intradia (repetitividade) e em dois dias consecutivos para a precisão interdias, ou precisão intermediária. Os resultados foram expressos pelo coeficiente de variação (CV) calculado por:

$$CV = \frac{s}{C_{B(a)P} \text{ média}} \times 100$$

onde s é o desvio padrão das concentrações de B(a)P encontradas e $C_{B(a)P}$ média é a concentração média.

3.13.4 Exatidão

A exatidão foi estimada em três pontos da curva analítica (0,8; 2,0 e 3,2 $\mu\text{g L}^{-1}$) a partir de uma sextuplicata de extração em cada um desses pontos. Os resultados foram expressos pelo erro relativo (E_R) calculado por:

$$E_R = \frac{\bar{C} - C_T}{C_T} \times 100$$

Onde \bar{C} é a média das concentrações encontradas e C_T é a respectiva concentração teórica.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Avaliação do espectro de fluorescência do benzo(a)pireno em diferentes solventes

Este experimento visou definir em qual solvente o benzo(a)pireno apresenta maior intensidade de emissão por fluorescência e verificou-se a sua influência no espectro.

Na espectroscopia de fluorescência, o solvente utilizado tem grande influência na emissão gerada, envolvendo uma combinação complexa de fatores. Deve-se considerar principalmente que a interação entre soluto e solvente será amplamente alterada em função do momento de dipolo de cada solvente, modificando o índice de transições radiativas de interesse. Além disso, é importante que o solvente não seja fluorescente na mesma região do analito.

O comprimento de onda de emissão (λ_{em}) do B(a)P comumente ocorre em 407 nm, A tabela 6 indica os valores observados de emissão mais intensa do analito em cada solvente estudado:

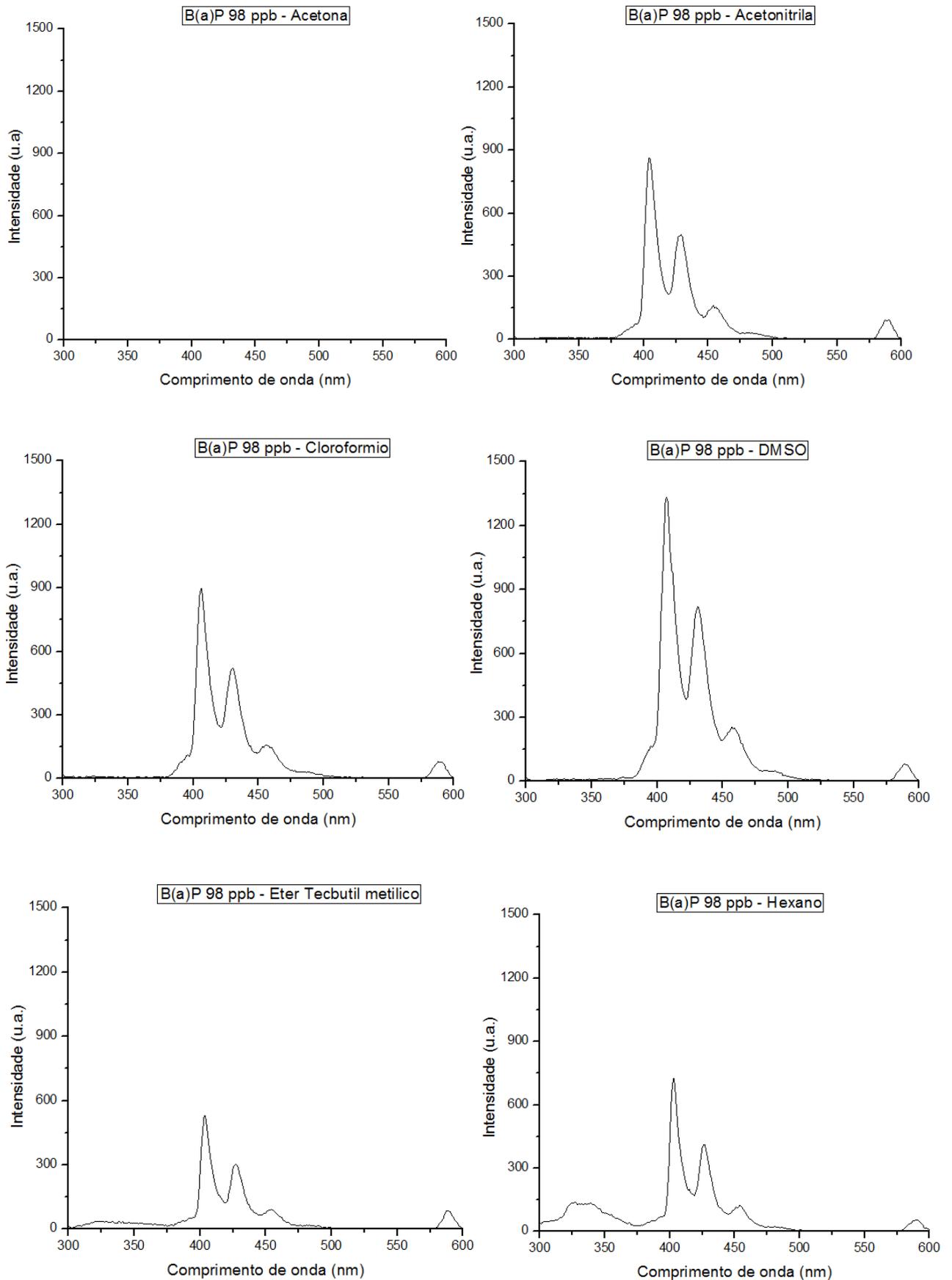
Tabela 6. Valores de λ_{em} do B(a)P nos solventes estudados.

Solvente	λ_{em}
Acetona	405
Acetonitrila	405
Clorofórmio	406
DMSO	407
ETBM	404
Hexano	403
Metanol	404
OE	405
Tolueno	403

DMSO = dimetilssulfóxido, ETBM = éter terbutil metílico, OE = octanoato de etila.

A diminuição do comprimento de onda máximo de emissão caracteriza o deslocamento hipsocrômico. Este efeito é decorrente da interação entre o analito e o solvente, de forma a representar a transposição da transição eletrônica para energias mais altas. Os estados fundamental e excitado se reconfiguram para assumirem maior estabilidade no ambiente químico do solvente.

Os espectros de fluorescência do B(a)P estão representados na **Figura 5**, a seguir:



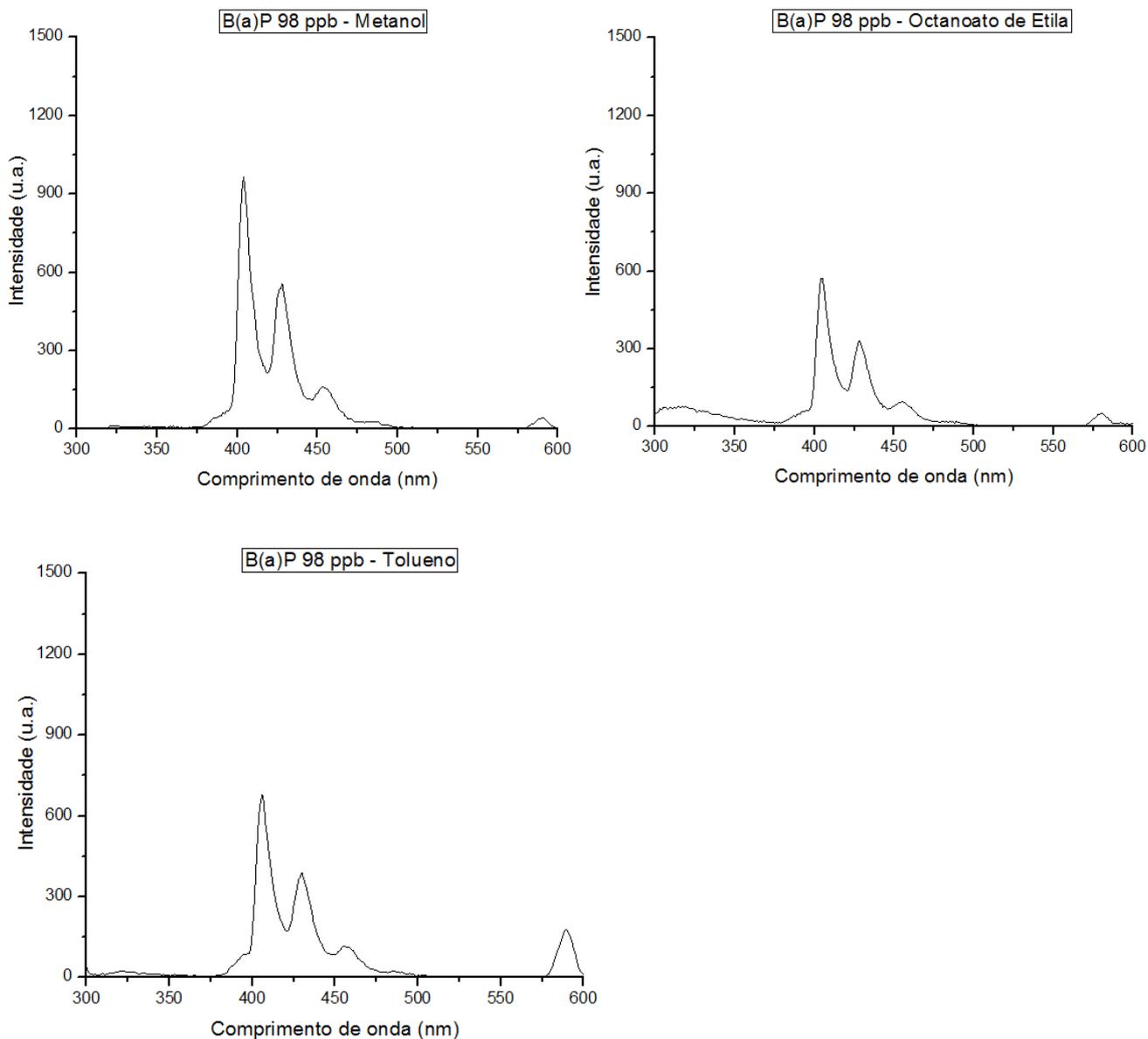


Figura 5. Espectros de emissão do B(a)P ($98 \mu\text{g L}^{-1}$) em diferentes solventes.

Em cada replicata analisada, subtraiu-se a intensidade das respectivas amostras branco em λ_{em} e calculou-se a intensidade média do B(a)P, o desvio padrão e coeficiente de variação. A **Figura 6** contém as intensidades médias corrigidas.

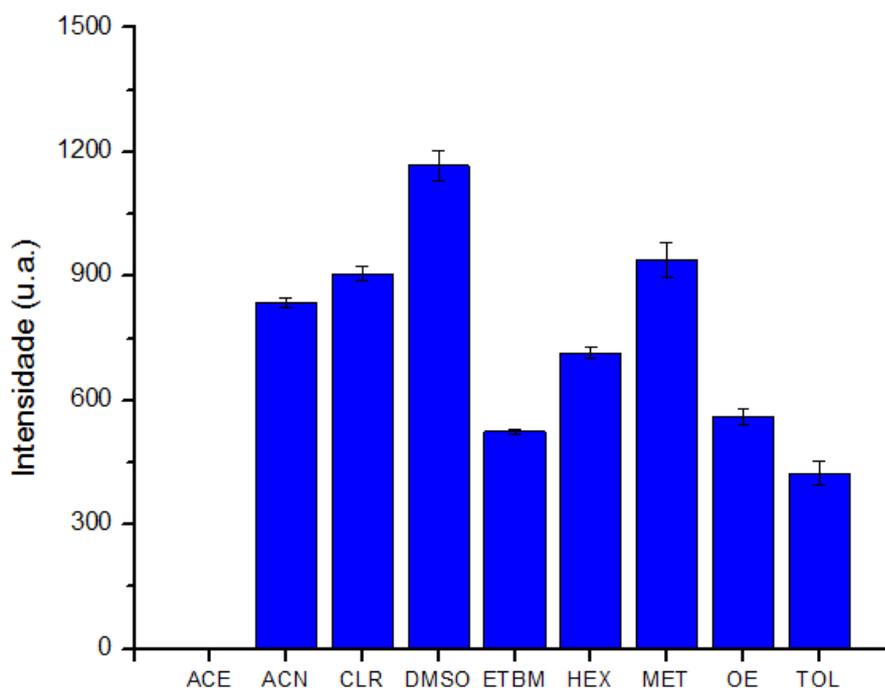


Figura 6. Gráfico correspondente às intensidade médias corrigidas do B(a)P ($98 \mu\text{g L}^{-1}$) nos solventes estudados ($n = 3$).

ACE = Acetona, ACN = Acetonitrila, CLR = Clorofórmio, DMSO = Dimetilssulfóxido. ETBM = Éter tercbutil metílico. HEX = Hexano. MET = Metanol, OE = Octanoato de etila. TOL = Tolueno.

Observa-se que o DMSO é o solvente que produz o maior rendimento quântico e, conseqüentemente, proporciona a melhor eficiência de emissão do analito. Esse resultado já foi observado para o B(a)P em outros trabalhos da literatura.⁽⁸⁶⁾ Pode-se atribuir este resultado ao efeito hipercrômico, aumentando a intensidade da fluorescência do B(a)P e também devido à sua alta solubilidade neste solvente. O DMSO é o composto de maior constante dielétrica dentre os testados. Sendo polar aprótico, provavelmente, não contribui para a perda da planaridade das moléculas de B(a)P, não interferindo no sistema conjugado do analito como os demais solventes.

Deve-se ressaltar que pelo espectro das amostras branco de DMSO e tolueno, estes apresentam intensidades de emissão significativas na região de fluorescência máxima do analito, embora este fato não tenha comprometido a detecção.

Pelo efeito hipocrômico, podemos inferir que a acetona ocasionou a supressão da fluorescência do analito no comprimento de onda de excitação utilizado, não sendo viável de ser utilizada como solvente. cada replicata analisada.

Conclui-se que o DMSO é o composto mais adequado para ser aplicado como o solvente no qual o analito será detectado. Deve-se avaliar o comportamento do solvente diante de outros parâmetros que influenciam diretamente na intensidade da emissão. A acetonitrila e o metanol apresentaram resultados favoráveis, sendo alternativas de substituição do DMSO, dada a maior acessibilidade a estes.

4.2 Avaliação do efeito da temperatura no espectro de fluorescência do benzo(a)pireno em diferentes solventes

Neste experimento observou-se como a dependência entre temperatura e rendimento quântico da fluorescência. Mediante a análise, obteve-se os espectros de fluorescência e as intensidades associadas ao pico mais intenso. A temperatura de detecção ao empregar o DMSO não deve ser inferior à 20 °C, pois este valor é próximo da sua temperatura de fusão (19 °C).

A **Figura 7** apresenta os valores de emissão de fluorescência em $\lambda_{\text{máx}}$ referente às amostras branco foram devidamente subtraídos e construiu-se o gráfico correspondente às intensidades médias corrigidas.

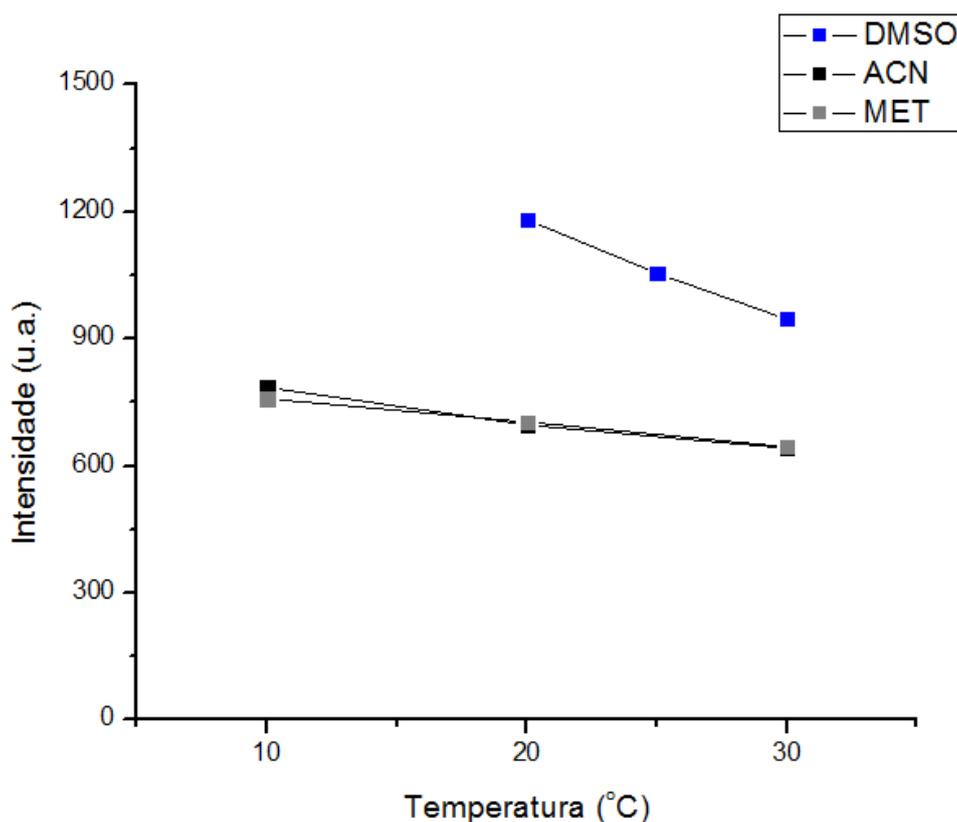


Figura 7. Intensidades médias de emissão do B(a)P nos solventes testados em função da variação de temperatura.

ACN = Acetonitrila, DMSO = Dimetilssulfóxido, MET = Metanol

Verifica-se por uma tendência linear que a diminuição da temperatura favorece a intensidade do sinal analítico. Além de ter sido o solvente com variação da intensidade de emissão mais acentuada, o DMSO novamente produz a maior intensidade de fluorescência na faixa de temperatura estudada. Deve-se verificar dentre os solventes testados, a influência do comprimento de abertura das fendas dos monocromadores no espectro obtido.

4.3 Avaliação da influência da abertura das fendas no espectro de fluorescência do benzo(a)pireno em diferentes solventes

Neste experimento, verificou-se a possibilidade de detectar o analito na concentração alvo ($2 \mu\text{g L}^{-1}$) de B(a)P, valor estabelecido pela CE como a quantidade máxima permitida deste composto em óleos comestíveis. A redução da concentração deste composto em cerca de 40 vezes em relação aos testes anteriores diminuirá drasticamente a intensidade da fluorescência. Portanto, deve-se avaliar outras variáveis que favoreçam a detecção do analito.

As larguras das fendas de excitação e emissão interferem diretamente na intensidade do sinal do analito. O sinal fluorescente é proporcional ao quadrado do produto das larguras das fendas de excitação e de emissão, e, geralmente, o uso de larguras estreitas das fendas resulta em um aumento da seletividade que, diminui a sensibilidade, enquanto que maiores larguras das fendas produzem o efeito oposto.

O espectrofluorímetro utilizado é capaz de alterar as abertura dos monocromadores de excitação e de emissão em valores pré-determinados. Aumentou-se e diminui-se as fendas em relação ao valor padrão de 5,0 nm empregado nos primeiros testes.

Os valores de emissão de fluorescência em λ_{em} referente às amostras branco foram devidamente subtraídos. Construiu-se o gráfico correspondente às intensidades médias corrigidas representadas na **Figura 8**.

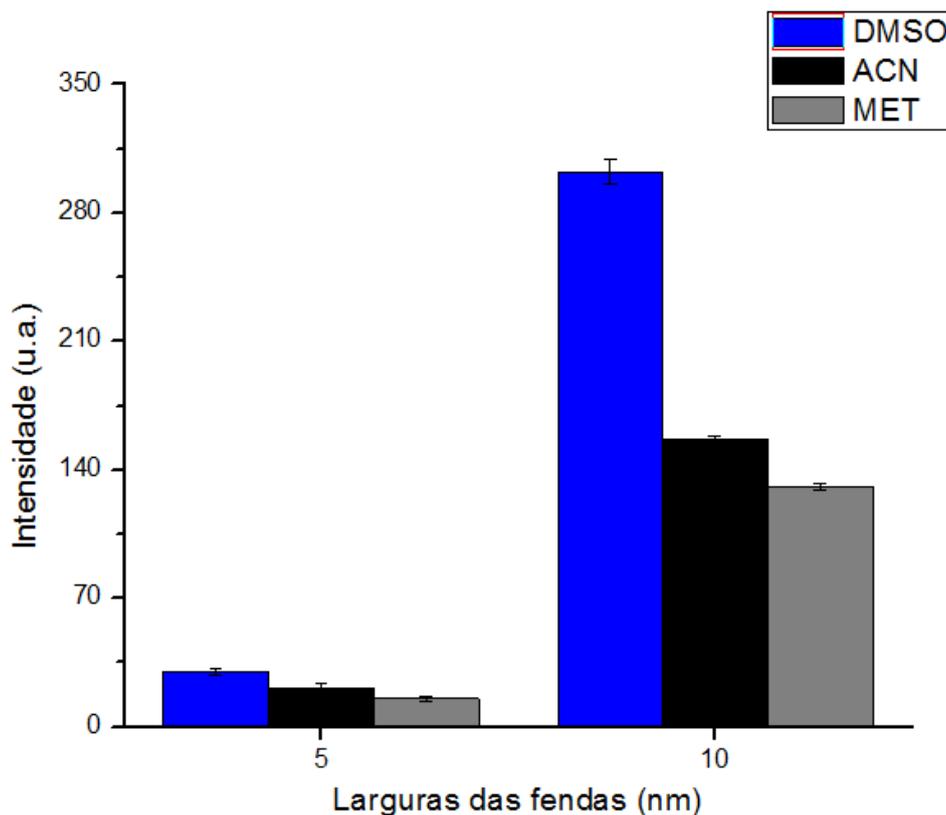


Figura 8. Intensidades médias de emissão do B(a)P nos solventes testados em função da abertura das fendas de excitação e emissão. (n = 3)
ACN = Acetonitrila, DMSO = Dimetilssulfóxido, MET = Metanol

Observou-se que para a largura de 2,5 nm a intensidade do sinal é aproximadamente equivalente ao sinal do branco, inviabilizando a análise. Os espectros gerados sob a abertura de 20,0 nm também não foram considerados, pois os dois picos característicos do B(a)P se associam de forma a não ser possível atribuir um valor discreto para a intensidade máxima de emissão. Como era esperado, a fenda de 5,0 nm gera uma fluorescência bem fraca que, eventualmente, seria ainda mais comprometida pelo efeito de matriz e pela perda decorrente do processo de extração. Por fim, o aumento da fenda para 10,0 nm resulta em uma intensidade de sinal satisfatória.

Conclui-se que a modificação da largura da fenda foi um parâmetro fundamental para que a detecção nos limites legislativos seja factível, visando as dificuldades futuramente advindas da análise na matriz. Como a ordem das intensidades relativas aos solventes utilizados se manteve entre as larguras das fendas, o DMSO produz o sinal analítico mais intenso. Por ter representado um comportamento semelhante à acetonitrila, o metanol será excluído dos experimentos futuros. Deve-se constatar se existe uma dependência constante entre a intensidade da fluorescência e a faixa de concentração do analito estudada até então.

4.4 Construção das curvas de calibração do benzo(a)pireno

Neste experimento, avaliou-se a relação entre a concentração e o sinal analítico do B(a)P. A faixa selecionada de concentração dos padrões compreendem o valor alvo do analito. Ao realizar uma regressão linear estabelecendo-se um conjunto de pontos pela concentração e a respectiva emissão, verifica-se a existência da linearidade entre as variáveis, atribuída por uma equação que descreva a intensidade da emissão da fluorescência em função da concentração de B(a)P.

A **Figura 9** apresenta a regressão linear ajustada para os valores de emissão de fluorescência em λ_{em} referente às amostras. Os sinais analíticos da amostra branco foram devidamente subtraídos em cada ponto de concentração e realizou-se a regressão linear para ambos os solventes.

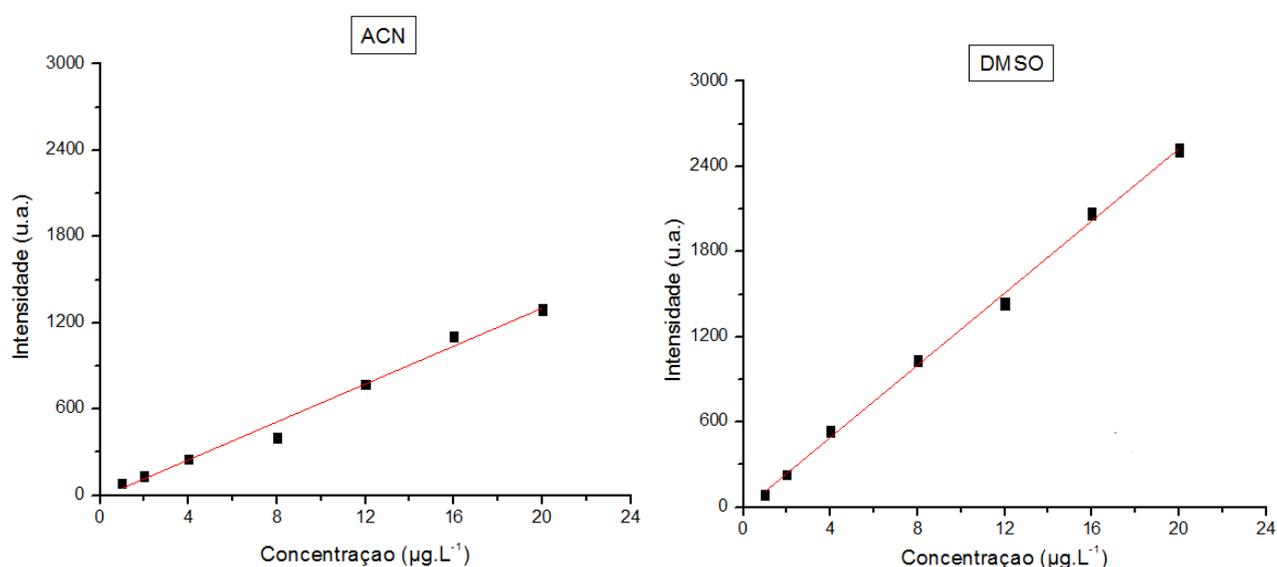


Figura 9. Curvas de calibração do B(a)P nos solventes testados

ACN = Acetonitrila, DMSO = Dimetilssulfóxido

Pelo valor do coeficiente de determinação da curva (**Tabela 7**), nota-se a dependência linear da intensidade em relação à concentração de B(a)P.

Tabela 7. Equação da reta e coeficiente de determinação para a curva de B(a)P em solventes (n = 3)

Solvente	Equação da reta	R ²
Acetonitrila	$y = 65,94 x - 16,61$	0,98577
Dimetilssulfóxido	$y = 127,15 x - 17,12$	0,99749

A curva do analito em solvente possui maior sensibilidade para o DMSO, pois este

parâmetro é dado pela inclinação da reta, sendo cerca de duas vezes maior em comparação à acetonitrila.

4.5 Avaliação do efeito *quenching* da acetona no espectro de fluorescência do benzo(a)pireno

O preparo de amostras empregado neste trabalho será uma adaptação do método da ISO 15753:2016 destinada à determinação de HPAs em amostras de óleos. Considerando o uso da acetona com um dos solventes de extração, verificou-se se uma quantidade residual deste solvente possa comprometer ou dificultar a detecção de B(a)P.

Como foi seção 4.1, o analito tem a sua intensidade de fluorescência reduzida ao nível de ruído quando analisado sob a presença de acetona no comprimento de onda de excitação de 295 nm.

Estabeleceram-se pequenas quantidades de acetona que pudessem ser suficientes para observar o efeito *quenching*. O gráfico da **Figura 10** descreve a supressão da fluorescência do B(a)P. As intensidades relativas às amostras branco foram devidamente subtraídas.

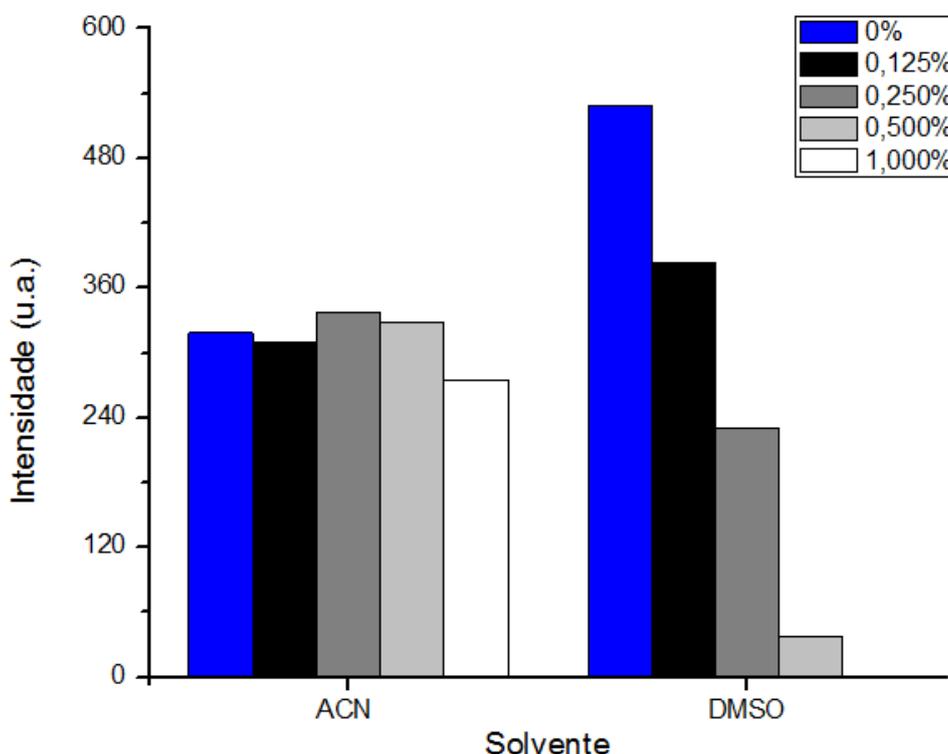


Figura 10. Intensidades médias de emissão do B(a)P nos solventes testados para diferentes concentrações % v/v de acetona

A partir destes dados notou-se que a presença de acetona produz tendências distintas comparando-se os dois solventes utilizados. No caso da acetonitrila, a supressão é pouco pronunciada nesta faixa de concentração de acetona. Para o DMSO, observou-se uma diminuição drástica da fluorescência à medida que se aumentou a quantidade de acetona. Porém, analisando-se a os espectros das **Figuras 11 e 12** sobreposição dos respectivos espectros obtidos, constatou-se a perda da definição dos picos característicos do B(a)P em acetonitrila para as porcentagens maiores de acetona.

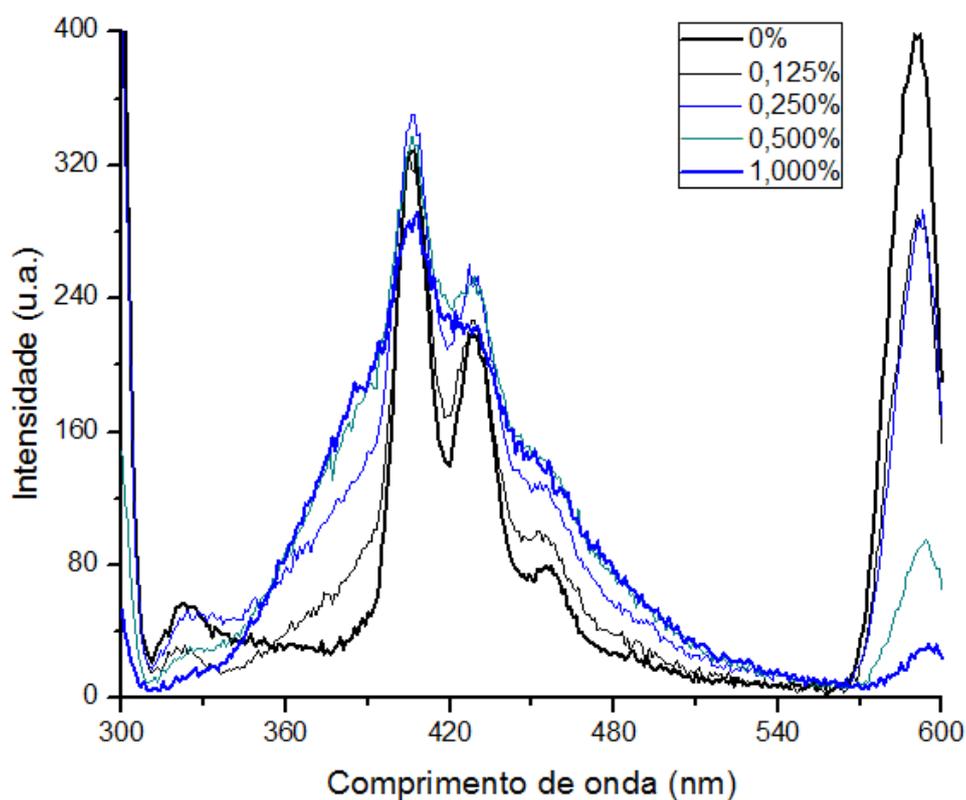


Figura 11. Espectros de emissão do B(a)P ($6 \mu\text{g L}^{-1}$) em acetonitrila para diferentes concentrações (% v/v) de acetona.

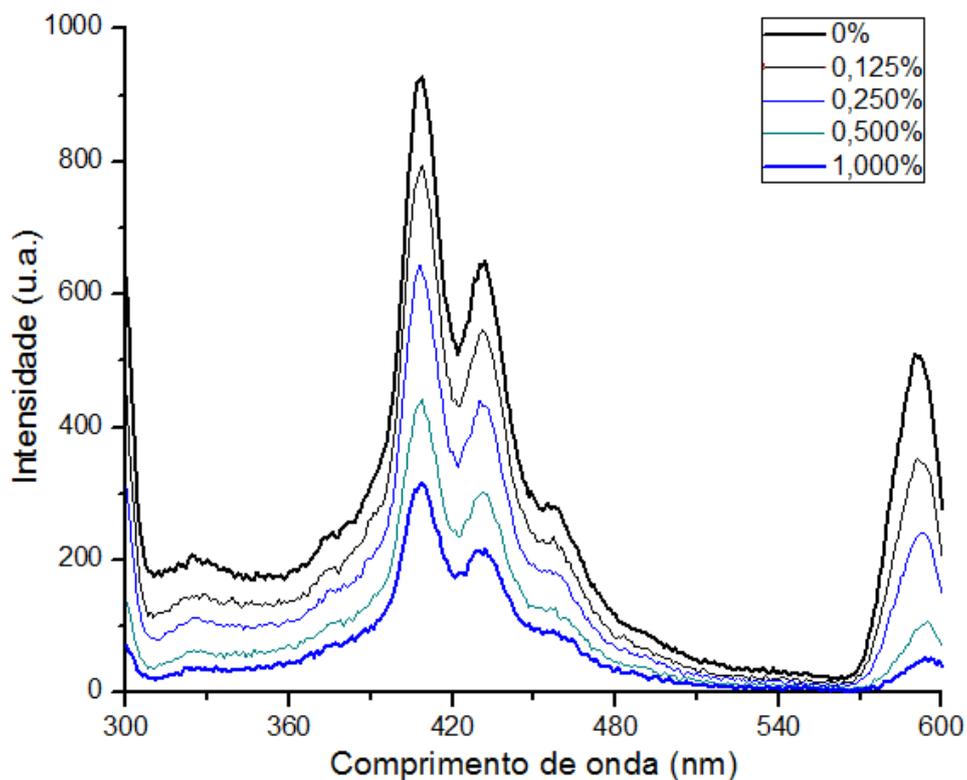


Figura 12. Espectros de emissão do B(a)P ($6 \mu\text{g L}^{-1}$) em DMSO para diferentes concentrações (% v/v) de acetona.

Conclui-se que a presença de acetona prejudica a detecção de B(a)P em ambos os solventes, seja em termos de diminuição do sinal analítico ou perda da definição do pico. Embora seja reportado na literatura o efeito *quenching* da acetona em 3-metil-7-hidroxicumarina, não foram encontradas publicações que demonstrem este efeito em B(a)P.⁽⁸⁷⁾ É possível que este efeito se pronuncie pelo fato da acetona absorver radiação ultravioleta. Deve-se constatar futuramente se a análise do extrato da matriz será inviabilizada mediante uma presença residual de acetona. Caso isto ocorra, a acetona deverá ser substituída para se que o método empregado esteja isento do efeito *quenching*.

4.6 Avaliação da combinação das aberturas das fendas no espectro de fluorescência do benzo(a)pireno no extrato da matriz

Neste experimento observou-se o perfil do espectro de fluorescência do analito sob diferentes combinações de aberturas das fendas dos monocromadores de excitação e emissão. De forma a complementar os resultados obtidos na seção 4.3, foram avaliados o efeito das fendas na análise do B(a)P na matriz estudada.

Utilizando os dois valores de largura com os quais foram possíveis efetuar razoavelmente a análise (5,0 e 10,0 nm), foram estabelecidas as quatro combinações testadas. A notação utilizada foi: C1 (Exc: 5,0 nm, Em: 5,0 nm), C2 (Exc: 5,0 nm, Em: 10,0 nm), C3 (Exc: 10,0 nm, Em: 5,0 nm) e C4 (Exc: 10,0 nm, Em: 10,0 nm).

Pela adaptação da ISO 15753, diminuiu-se a proporção entre o volume de amostra e solvente 1:4 de para 1:2, não foram realizadas extrações líquido-líquido em sequência e não foram executadas as extrações em fase sólida, substituindo-as pelo *clean-up* sob baixa temperatura.

Nas **Figuras 13 e 14** estão representados os espectros obtidos para as combinações de fenda nos solventes estudados.

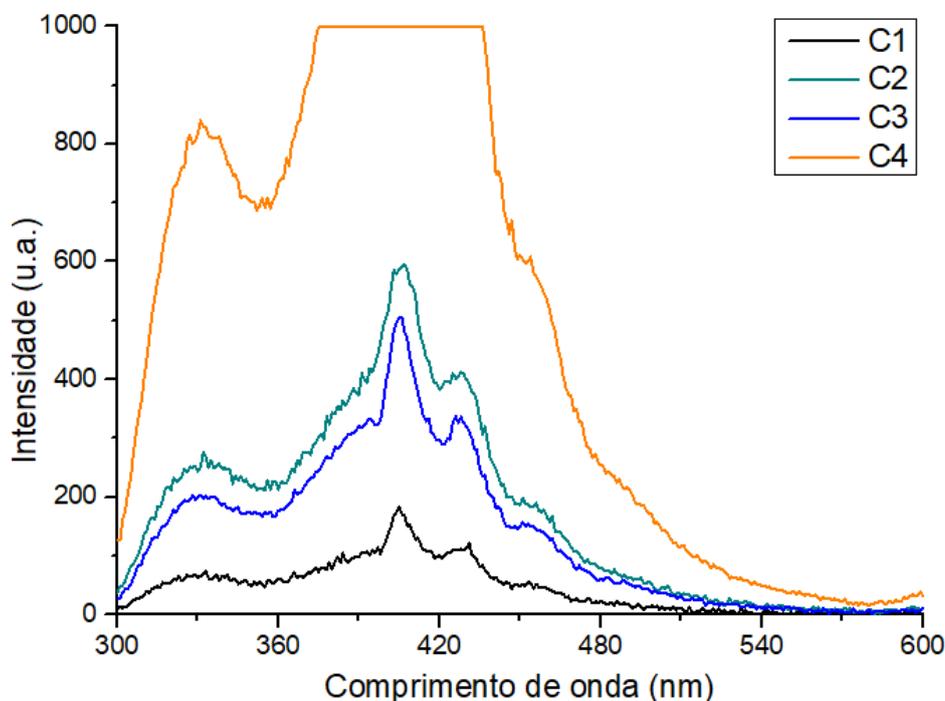


Figura 13. Espectros de emissão do B(a)P ($20 \mu\text{g L}^{-1}$) em acetoneitrila para diferentes combinações de aberturas de fendas - C1 (Exc: 5,0 nm, Em: 5,0 nm), C2 (Exc: 5,0 nm, Em: 10,0 nm), C3 (Exc: 10,0 nm, Em: 5,0 nm) e C4 (Exc: 10,0 nm, Em: 10,0 nm).

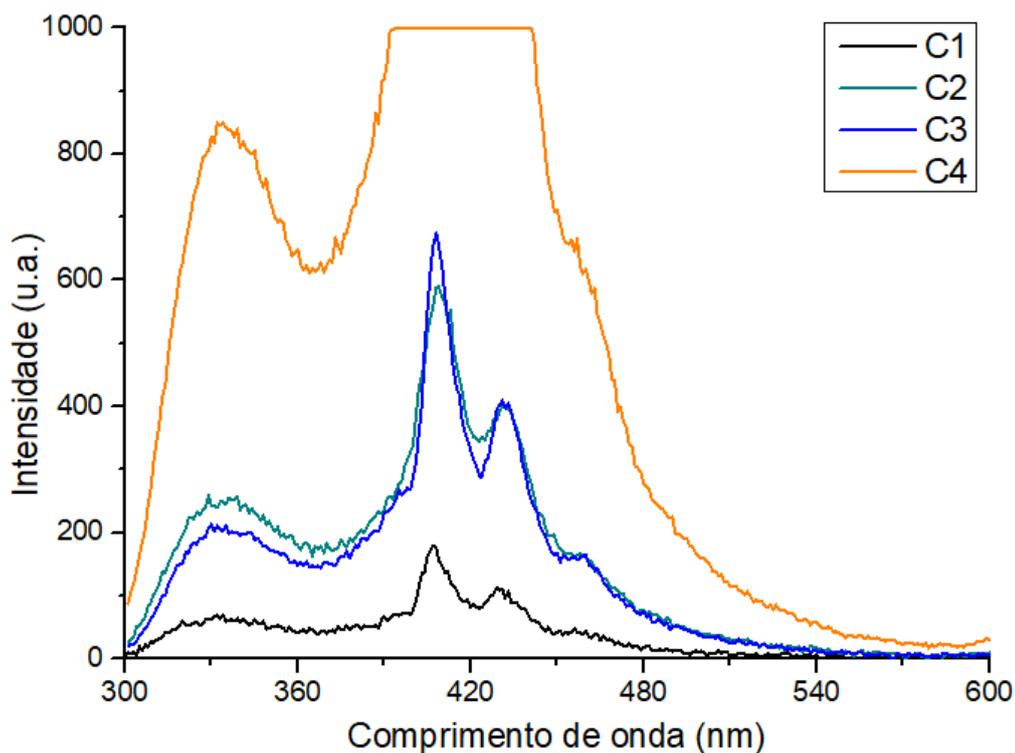


Figura 14. Espectros de emissão do B(a)P ($20 \mu\text{g L}^{-1}$) em DMSO para diferentes combinações de aberturas de fenda. C1 (Exc: 5,0 nm, Em: 5,0 nm), C2 (Exc: 5,0 nm, Em: 10,0 nm), C3 (Exc: 10,0 nm, Em: 5,0 nm) e C4 (Exc: 10,0 nm, Em: 10,0 nm).

Observou-se que para a abertura de 2,5 nm a intensidade do sinal é aproximadamente equivalente ao sinal do branco, inviabilizando a análise. Os espectros gerados sob a abertura de 20,0 nm também não foram considerados, pois os dois picos característicos do B(a)P se fundem de forma a não ser possível atribuir um valor plausível para a intensidade máxima de emissão. Como era esperado, a fenda de 5,0 nm gera uma fluorescência bem fraca que, eventualmente, seria ainda mais comprometida pelo efeito de matriz, pela redução da concentração e pela perda de quantidade matéria decorrente do processo de extração. Por fim, o aumento da fenda para 10,0 nm resulta em uma intensidade de sinal satisfatória.

Conclui-se que a modificação da abertura da fenda foi um parâmetro fundamental para que a posterior detecção do analito na concentração alvo seja facilitada.

Conclui-se que o efeito *quenching* da acetona não foi suficientemente expressivo de forma a impossibilitar a análise; Logo, pode-se deduzir que a quantidade de acetona remanescente após à evaporação do extrato é desprezível. Deve-se levar em consideração que embora, a concentração do analito neste experimento seja superior ao teste anterior, a condição C3 é estabelecida como a mais favorável.

4.7 Avaliação da extração líquido-líquido sob baixa temperatura pelos parâmetros otimizados

Neste experimento observou-se o perfil do espectro de fluorescência do analito em um valor de concentração próximo do limite estabelecido pela legislação para verificar a necessidade de aprimorar a qualidade do sinal analítico.

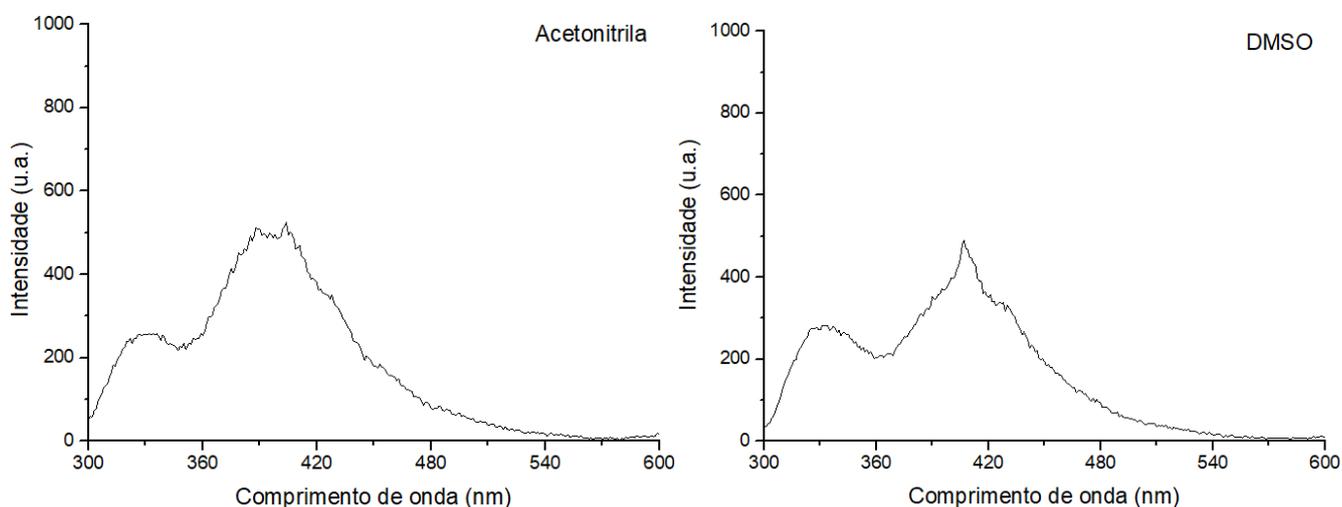


Figura 15. Espectros de emissão do B(a)P ($10 \mu\text{g L}^{-1}$) nos extratos ressuspensos por acetonitrila e DMSO, respectivamente

Observa-se pelos espectros obtidos (e em concordância com o resultado do teste anterior) que para ambos os solventes utilizados, a matriz produz bastante interferência pela emissão na região próxima ao λ_{em} do analito. Embora seja possível identificá-lo, o pico correspondente ao B(a)P possui pouca definição. Além disto, pela análise do branco respectivo, nota-se que as intensidades relativas de fluorescência foram baixas.

Estes valores também podem ser atribuídos à impossibilidade de realizar a leitura da amostra com redução de temperatura, pois em função da pandemia, o não funcionamento do ar condicionado da sala acarretou instabilidade no controle térmico do espectrofluorímetro.

Como a análise está sendo realizada com o volume mínimo de amostra necessária, não é possível buscar um aumento da intensidade da fluorescência por pré concentração ao diminuir o volume de ressuspensão. Portanto, é essencial tornar a detecção mais seletiva e sensível. Para que se possa detectar o analito na concentração alvo.

Conclui-se que deve se aplicar o modo sincronizado da fluorescência para favorecer a detecção do B(a)P.

Pelos resultados obtidos, o DMSO foi selecionado definitivamente como o solvente

de análise do B(a)P neste método

4.8 Avaliação da viabilidade da fluorescência sincronizada

Neste experimento observou-se o perfil do espectro de fluorescência sincronizada do analito e o comparou com a fluorescência convencional. A fluorescência sincronizada é estabelecida pela varredura simultânea dos monocromadores de excitação e emissão. A técnica utilizada é a fluorescência sincronizada à energia constante (FSEC), na qual mantém-se fixa uma variação do número de onda (cm^{-1}) ajustada entre os monocromadores durante toda a varredura. Desta forma, obtém-se um espectro que evidencia transições eletrônicas geradas particularmente por este valor de $\Delta\nu$, tornando a fluorescência ainda mais seletiva. É conveniente que o $\Delta\nu$ selecionado corresponda ao deslocamento Stokes (**Figura 16**) do fluoróforo, ou seja, a diferença numérica entre os comprimentos de onda máximos de emissão e excitação.

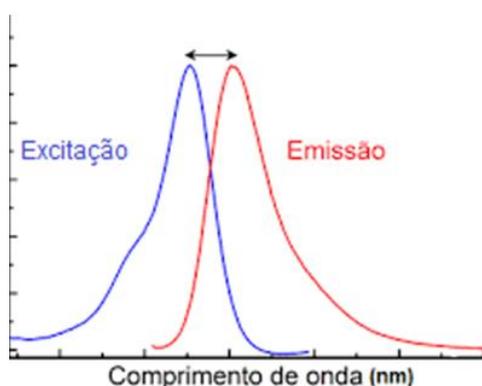


Figura 16. Deslocamento Stokes para a fluorescência

Desta forma, registra-se um espectro que contém apenas as substâncias cujas variações de energia entre a absorção e a emissão que resultem em fluorescência. No caso da FSEC, converte-se os comprimentos de onda em números de onda (diretamente proporcionais à energia).⁽⁸⁸⁾

Embora o λ_{em} máximo de excitação do B(a)P seja 295 nm, este comprimento de onda não é adequado para ser utilizada na FSEC da matriz estudada, pois com a variação de energia associada, registra-se a fluorescência de interferentes presentes. O espectro de excitação do B(a)P indica um pico de máximo local em 388 nm que é um comprimento adequado para a análise, pois o $\Delta\nu$ correspondente registra a fluorescência do B(a)P de forma mais destoante em relação aos demais compostos, favorecendo a detecção do analito. Convertendo-se os valores de $\lambda_{em} = 408$ nm e $\lambda_{exc} = 388$ nm para número de onda, encontra-se o valor de $\Delta\nu = 1230$ cm^{-1} . A **Figura 17** indica o espectro obtido nesta condição.

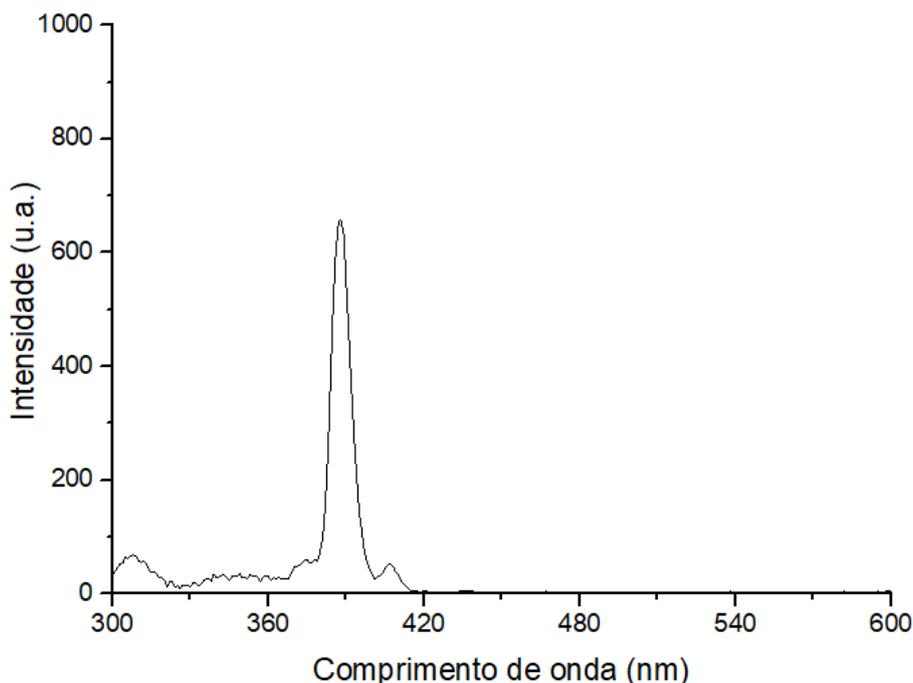


Figura 17. Espectro de fluorescência sincronizada do B(a)P ($10 \mu\text{g L}^{-1}$) no extrato ressuspendido em DMSO

A FSEC fornece o espectro de excitação, observa-se um pico altamente definido no comprimento de onda de 388 nm referente ao B(a)P. Comparando este resultado em relação ao experimento anterior, constata-se que a fluorescência sincronizada é um artifício de grande importância para a detecção eficiente do analito nas concentrações inferiores às avaliadas até então. Desta forma, o aumento da seletividade é notado pela diminuição expressiva da interferência da matriz. Embora a leitura tenha sido realizada com ambas as aberturas de fendas em 5,0 nm. Não é esperado que ao retornar à fenda de excitação à 10,0 nm, a detecção seja comprometida. Por fim, a intensidade do analito é comprovada pelo branco da amostra que não apresenta sinais significativos no λ_{exc} , assegurando o efeito da FSEC na sensibilidade da análise.

Conclui-se que o modo sincronizado favorece a detecção do B(a)P na matriz pelo aprimoramento da seletividade e sensibilidade do sinal analítico.

Considerando o resultado obtido, deve-se avaliar a eficiência da extração na concentração alvo.

4.9 Avaliação da extração na concentração alvo de benzo(a)pireno

Neste experimento foi possível realizar a extração do analito na concentração alvo. A **Figura 18** compara os espectros obtidos com a amostra fortificada pelo analito antes e após a extração.

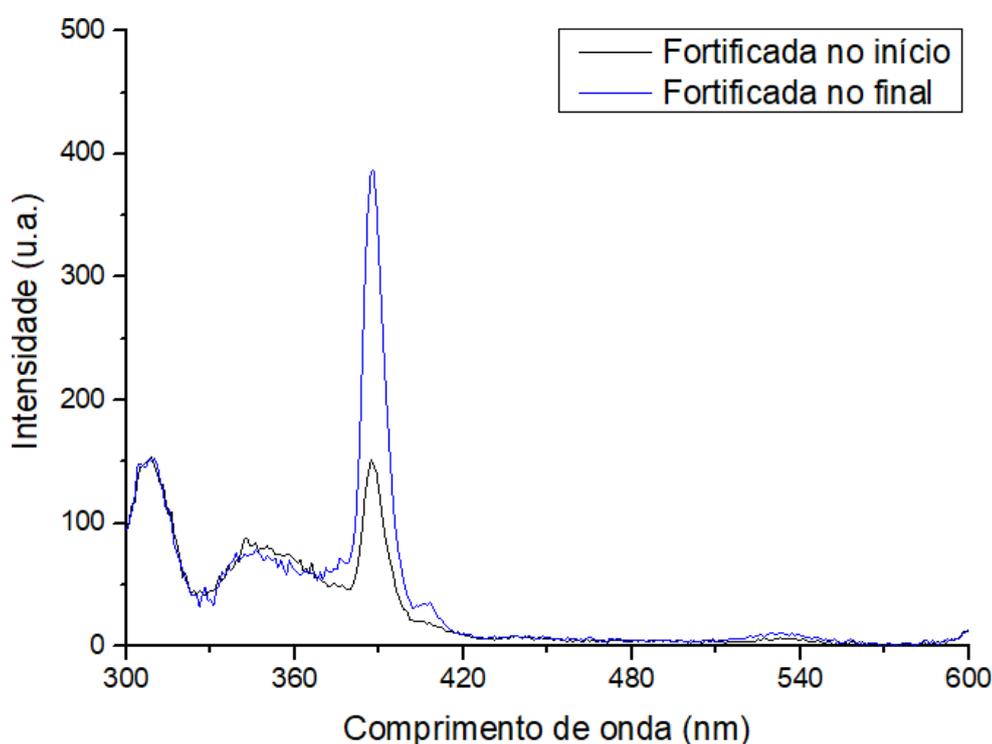


Figura 18. Espectro de fluorescência sincronizada do B(a)P ($2,0 \mu\text{g L}^{-1}$) em duas condições distintas

Como pode se observar nos espectros obtidos, a sobreposição representa o grau de extração de analito por meio da extração, pois considera-se que as amostras fortificadas no final do procedimento experimental não possuem perda de quantidade de matéria (100%). Desta forma, calcula-se a eficiência da extração pela razão entre a intensidade do sinal analítico na amostra inicialmente fortificada e a intensidade do analito quando inserido no extrato ressuspensionado. Destas intensidades foi subtraído o sinal do branco da matriz:

$$\text{Recuperação média} = (39,63 \pm 0,55) \%$$

Este valor é suficientemente alto para identificar a presença de B(a)P na concentração de $2 \mu\text{g L}^{-1}$ em uma amostra de azeite de oliva.

É importante reiterar que este resultado foi obtido em temperatura ambiente. Sendo possível obter intensidades maiores nesta condição pela redução da temperatura da análise. Além disto, como esperado, o aumento da abertura da fenda de excitação para 10,0 nm produz um aumento da linha de base, o que não reduz a definição do pico.

4.10 Estimativa de figuras de mérito de validação

4.10.1 Linearidade

Os dados do ensaio de linearidade passaram pelo teste de resíduos de Jackknife os possíveis *outliers* foram removidos. Através dos testes de Ryan-Joiner, Brown-Forsythe e Durbin-Watson, foi verificado que os resíduos seguiram uma distribuição normal, apresentaram-se homocedásticos, e ausentes de autocorrelação, respectivamente. A curva analítica mostrou-se linear na faixa estudada de 0,8 a 3,8 $\mu\text{g L}^{-1}$, cuja equação e coeficiente de determinação correspondentes estão apresentados na **Tabela 8**.

Tabela 8. Equação da reta e coeficiente de determinação para a curva extraída de B(a)P. (n = 3)

Analito	Equação da reta	r^2
Benzo(a)pireno	$65,782 x + 46,656$	0,9943

4.10.2 Limites de detecção e quantificação

Os sinais obtidos para as amostras branco foram transformados em concentração através da curva analítica e os limites de detecção e quantificação foram calculados. Seus valores estão dispostos na **Tabela 9**.

Tabela 9. Limites de detecção e quantificação de B(a)P para o método. (n = 10).

Analito	LD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Benzo(a)pireno	0,008	0,8

O valor de LQ encontrado de $0,027 \mu\text{g L}^{-1}$ está fora da faixa linear estudada, então representa-se esta figura de mérito como o menor valor da curva analítica. O LD teórico é menor em relação a outro trabalho que realiza a detecção direta de B(a)P no extrato de azeite de oliva. Liu, Y e colaboradores encontraram LD de $0,16 \mu\text{g L}^{-1}$ em uma faixa linear de 10 - $400 \mu\text{g kg}^{-1}$.

4.10.3 Precisão inter e intra dias

A precisão do método foi apresentada através do cálculo do coeficiente de variação (CV) de uma sextuplicata de extração em três níveis de fortificação ao longo da curva analítica. Para estimar a precisão interdias o mesmo procedimento de extração foi repetido no dia consecutivo. Os valores obtidos estão resumidos na **Tabela 10**.

Tabela 10. Valores de precisão intra e interdias para a determinação de B(a)P em três níveis de concentração (n = 6).

Analito	Precisão (%)					
	0,8 µg L ⁻¹		2,0 µg L ⁻¹		3,2 µg L ⁻¹	
	intradia	interdias	intradia	interdias	intradia	interdias
Benzo(a)pireno	11,5	12,5	6,5	9,1	4,4	5,9

Para o guia de validação utilizado é estipulado que o CV deve ser menor que 15%, o que torna os resultados obtidos aceitáveis.

4.10.4 Exatidão

A exatidão do método foi apresentada através do erro padrão relativo (E_R) de uma sextuplicata de extração em três níveis de fortificação ao longo da curva analítica. Os valores obtidos estão resumidos na **Tabela 11**.

Tabela 11. Valores de exatidão para a determinação de B(a)P em três níveis de concentração (n = 6).

Analito	Exatidão (%)		
	0,8 µg L ⁻¹	2,0 µg L ⁻¹	3,2 µg L ⁻¹
Benzo(a)pireno	11,2	1,6	2,6

Para o guia de validação utilizado é estipulado que o módulo do erro relativo deve ser menor que 15%, o que torna os resultados obtidos aceitáveis.

5 CONCLUSÃO

Um método de extração líquido-líquido proposto a partir da ISO 15753:2016 foi desenvolvido com a incorporação do *clean up* sob baixa temperatura e subsequente análise direta por fluorescência sincronizada à energia constante. Esta combinação é adequada à determinação de benzo(a)pireno em azeite de oliva.

Por meio do desenvolvimento do método verificou-se que os parâmetros avaliados que mais influenciaram a análise foram o solvente de detecção, a largura das fendas dos monocromadores e o modo sincronizado da fluorescência. Os resultados obtidos foram condizentes com estes parâmetros bem estabelecidos na literatura sobre espectrofluorimetria.

Após a estimativa das figuras de mérito de validação, constatou-se que o método é exato, linear, preciso e com limites de quantificação e detecção aceitáveis. E como tal, ele pode ser empregado como técnica de preparo de amostras e análise por fluorescência. Pela simplicidade de execução é uma alternativa apropriada para análises recorrentes que demandam alta frequência analítica.

A fluorescência é uma técnica compatível para análise de matrizes alimentares demonstrando alta sensibilidade e capacidade de discriminar o analito diante das interferências da matriz. É possível que esta técnica possa identificar e quantificar outros HPAs presentes na matriz sem a necessidade de separação cromatográfica. Por meio de um aprimoramento mais minucioso de outras variáveis do preparo de amostras e da análise instrumental, existe um potencial de que este método torne-se ainda mais eficiente.

REFERÊNCIAS

1. Gosslau A. Assessment of food toxicology. Food Science and Human Wellness. 2016.
2. Bansal V, Kim KH. Review of PAH contamination in food products and their health hazards. Environment International. 2015.
3. EFSA. Polycyclic aromatic hydrocarbons in food. Scientific opinion of the panel on contaminants in the food chain. In: E. F. S. Authority (Ed.), Question No. EFSA-Q-2007-136. EFSA J. 2008;
4. Wu S, Yu W. Liquid-liquid extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons in four different edible oils from China. Food Chem. 2012;
5. Brum DM, Cassella RJ, Pereira Netto AD. Multivariate optimization of a liquid-liquid extraction of the EPA-PAHs from natural contaminated waters prior to determination by liquid chromatography with fluorescence detection. Talanta. 2008;
6. Tfouni SAV, Souza NG, Neto MB, Loredo ISD, Leme FM, Furlani RPZ. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in sugarcane juice. Food Chem. 2009;
7. El Harrak R, Calull M, Margé RM, Borrull F. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in water by solid-phase extraction membranes. Int J Environ Anal Chem. 1996;
8. Rey-Salgueiro L, Martínez-Carballo E, García-Falcón MS, González-Barreiro C, Simal-Gándara J. Occurrence of polycyclic aromatic hydrocarbons and their hydroxylated metabolites in infant foods. Food Chem. 2009;
9. Alomirah H, Al-Zenki S, Al-Hooti S, Zaghloul S, Sawaya W, Ahmed N, et al. Concentrations and dietary exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) from grilled and smoked foods. Food Control. 2011;
10. Jira W, Ziegenhals K, Speer K. Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) method for the determination of 16 european priority polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked meat products and edible oils. Food Addit Contam - Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess. 2008;
11. Orecchio S, Ciotti VP, Culotta L. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in coffee brew samples: Analytical method by GC-MS, profile, levels and sources. Food Chem Toxicol. 2009;
12. IOC (INTERNATIONAL OLIVE COUNCIL). Trade standard applying to olive oils and olive pomace oils. Int OLIVE Counc. 2019;
13. BRASIL - Ministério da Saúde. ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC N° 270, de 22 de Setembro de 2005. Regulamento Técnico para Óleos Vegetais, Gorduras Vegetais e Creme Vegetal. Diário Of da União N° 184. 2005;
14. Council IO. Olive oil - Provisional data 2018/2019 crop year [Internet]. 2019 [cited 2020 Aug 5]. Available from: <https://www.internationaloliveoil.org/olive-oil-provisional-data-2018-19-crop-year/>

15. Antonialli F, Mesquita DL, Valadares GC, de Rezende DC, de Oliveira AF. Olive oil consumption: a preliminary study on Brazilian consumers. *Br Food J.* 2018;
16. Caruso MS, Alaburba J. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos - benzo(a)pireno: uma revisão. *Rev Inst Adolfo Lutz.* 2008;
17. Phillips P. Mediterranean dietary pattern for the primary prevention of cardiovascular disease. *Journal of Cardiovascular Nursing.* 2015.
18. Foscolou A, Critselis E, Panagiotakos D. Olive oil consumption and human health: A narrative review. *Maturitas.* 2018.
19. Boskou D, Blekas G, Tsimidou M. Olive Oil Composition. In: *Olive Oil: Chemistry and Technology: Second Edition.* 2006.
20. European Commission. amending Regulation (EEC) No 2568/91 on the characteristics of olive oil and olive-residue oil and on the relevant methods of analysis. *Off J Eur Union.* 2013;
21. Grob K, Lanfranchi M, Mariani C. Evaluation of olive oils through the fatty alcohols, the sterols and their esters by coupled LC-GC. *J Am Oil Chem Soc.* 1990;
22. Anklam E. H.-D. Belitz, W. Grosch, P. Schieberle: *Food Chemistry, Third Edition.* Anal Bioanal Chem. 2005;
23. Pei X, Tandon A, Alldrick A, Giorgi L, Huang W, Yang R. The China melamine milk scandal and its implications for food safety regulation. *Food Policy.* 2011;
24. Sanchez ZM, Oliveira CL, Laranjeira R, Caetano R. Intoxication and deaths from diethylene glycol present in brazilian craft beers. *Journal of Studies on Alcohol and Drugs.* 2020.
25. Faille C, Cunault C, Dubois T, Bénézech T. Hygienic design of food processing lines to mitigate the risk of bacterial food contamination with respect to environmental concerns. *Innovative Food Science and Emerging Technologies.* 2018.
26. Rather IA, Koh WY, Paek WK, Lim J. The sources of chemical contaminants in food and their health implications. *Frontiers in Pharmacology.* 2017.
27. Codex Alimentarius. Codex Stan 33-1981. STANDARD FOR OLIVE OILS AND OLIVE POMACE OILS. *Codex Aliment.* 2017;
28. Peri C. The extra-virgin olive oil handbook. *The Extra-Virgin Olive Oil Handbook.* 2014.
29. Sun Y, Wu S, Gong G. Trends of research on polycyclic aromatic hydrocarbons in food: A 20-year perspective from 1997 to 2017. *Trends in Food Science and Technology.* 2019.
30. Sánchez-Arévalo CM, Olmo-García L, Fernández-Sánchez JF, Carrasco-Pancorbo A. Polycyclic aromatic hydrocarbons in edible oils: An overview on sample preparation, determination strategies, and relative abundance of prevalent compounds. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety.* 2020.
31. Rose M. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Olive Oil: Methodological Aspects of Analysis. In: *Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention.* 2010.

32. Mafra I, Amaral JS, Oliveira MBPP. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH) in Olive Oils and Other Vegetable Oils; Potential for Carcinogenesis. In: Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention. 2010.
33. Sierra M del R, Rosazza NG, Préndez M. Polycyclic aromatic hydrocarbons and their molecular diagnostic ratios in urban atmospheric respirable particulate matter. *Atmos Res.* 2005;
34. Shen H, Huang Y, Wang R, Zhu D, Li W, Shen G, et al. Global atmospheric emissions of polycyclic aromatic hydrocarbons from 1960 to 2008 and future predictions. *Environ Sci Technol.* 2013;
35. Keith LH. The Source of U.S. EPA's Sixteen PAH Priority Pollutants. *Polycycl Aromat Compd.* 2015;
36. Toxicological Profile for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, U.S. Department of Health & Human Services, Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Washington, D.C., August, 1985. *J Toxicol Cutan Ocul Toxicol.* 1999;
37. Badger GM, Buttery RG, Kimber RWL, Lewis GE, Moritz AG, Napier IM. 498. The formation of aromatic hydrocarbons at high temperatures. Part I. Introduction. *J Chem Soc.* 1958;
38. Manahan SE. Environment chemistry. *Environ Chem.* 2000;
39. Cavret S, Feidt C. Intestinal metabolism of PAH: In vitro demonstration and study of its impact on PAH transfer through the intestinal epithelium. *Environ Res.* 2005;
40. IARC. Agents Classified by the IARC Monographs, Volumes 1-129 - IARC Monographs on the Identification of Carcinogenic Hazards to Humans. WHO. 2021.
41. EC (European Commission). COMMISSION REGULATION (EC) No 208/2005 of 4 February 2005 amending Regulation (EC) No 466/2001 as regards polycyclic aromatic hydrocarbons. *Off J Eur Union.* 2005;L 34(208):3-5.
42. Abdel-Shafy HI, Mansour MSM. A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: Source, environmental impact, effect on human health and remediation. *Egyptian Journal of Petroleum.* 2016.
43. Baird WM, Hooven LA, Mahadevan B. Carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts and mechanism of action. *Environmental and Molecular Mutagenesis.* 2005.
44. Denissenko MF, Pao A, Tang MS, Pfeifer GP. Preferential formation of benzo[a]pyrene adducts at lung cancer mutational hotspots in P53. *Science (80-).* 1996;
45. Ni Y, Wang P, Song H, Lin X, Kokot S. Electrochemical detection of benzo(a)pyrene and related DNA damage using DNA/hemin/nafion-graphene biosensor. *Anal Chim Acta.* 2014;
46. Zhan S, Zhang X, Cao S, Huang J. Benzo(a)pyrene disrupts mouse preimplantation embryo development. *Fertil Steril.* 2015;
47. Mahgoub H. Analytical Techniques for Identification and Quantification of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. 2018;(January 2016).

48. Li L, Han D, Wang M, Han Y, Yan H. Molybdenum disulfide-hypercrosslinked polymer composite as an adsorbent for determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in environmental water coupled with HPLC-FLD. *Microchim Acta*. 2020;
49. Sess-Tchotch DA, Kedjebo KBD, Faulet BM, Fontana-Tachon A, Alter P, Durand N, et al. Analytical Method Validation and Rapid Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Cocoa Butter Using HPLC-FLD. *Food Anal Methods*. 2018;
50. Zachara A, Gałkowska D, Juszczyk L. Occurrence of polycyclic aromatic hydrocarbons in selected cereal products. *Zywn Nauk Technol Jakosc/Food Sci Technol Qual*. 2017;
51. Shi Y, Wu H, Wang C, Guo X, Du J, Du L. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in coffee and tea samples by magnetic solid-phase extraction coupled with HPLC-FLD. *Food Chem*. 2016;
52. Akdoğan A, Buttlinger G, Wenzl T. Single-laboratory validation of a saponification method for the determination of four polycyclic aromatic hydrocarbons in edible oils by HPLC-fluorescence detection. *Food Addit Contam - Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*. 2016;
53. Liaud C, Millet M, Le Calvé S. An analytical method coupling accelerated solvent extraction and HPLC-fluorescence for the quantification of particle-bound PAHs in indoor air sampled with a 3-stages cascade impactor. *Talanta*. 2015;
54. Krajian H, Odeh A. Polycyclic aromatic hydrocarbons in Syrian olive oils and their likely daily intakes. *Toxicol Environ Chem*. 2014;
55. Mojiri A, Zhou JL, Ohashi A, Ozaki N, Kindaichi T. Comprehensive review of polycyclic aromatic hydrocarbons in water sources, their effects and treatments. *Science of the Total Environment*. 2019.
56. Purcaro G, Moret S, Conte LS. Overview on polycyclic aromatic hydrocarbons: Occurrence, legislation and innovative determination in foods. *Talanta*. 2013.
57. Wicker AP, Carlton DD, Tanaka K, Nishimura M, Chen V, Ogura T, et al. On-line supercritical fluid extraction–supercritical fluid chromatography-mass spectrometry of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci*. 2018;
58. Zheng HB, Ding J, Zheng SJ, Zhu GT, Yuan BF, Feng YQ. Facile synthesis of magnetic carbon nitride nanosheets and its application in magnetic solid phase extraction for polycyclic aromatic hydrocarbons in edible oil samples. *Talanta*. 2016;
59. Ji W, Zhang M, Duan W, Wang X, Zhao H, Guo L. Phytic acid-stabilized super-amphiphilic Fe₃O₄-graphene oxide for extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from vegetable oils. *Food Chem*. 2017;
60. Hao X, Li J, Yao Z. Changes in PAHs levels in edible oils during deep-frying process. *Food Control*. 2016;
61. Sadeghi R, Kobarfard F, Yazdanpanah H, Eslamizad S, Bayat M. Validation of an analytical method for determination of 13 priority polycyclic aromatic hydrocarbons in mineral water using dispersive liquid-liquid microextraction and GC-MS. *Iran J Pharm Res*. 2016;
62. Eslamizad S, Kobarfard F, Javidnia K, Sadeghi R, Bayat M, Shahanipour S, et al.

- Determination of benzo[a]pyrene in traditional, industrial and semi-industrial breads using a modified QuEChERS extraction, dispersive SPE and GC-MS and estimation of its dietary intake. *Iran J Pharm Res.* 2016;
63. Wang J, Liu S, Chen C, Zou Y, Hu H, Cai Q, et al. Natural cotton fibers as adsorbent for solid-phase extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons in water samples. *Analyst.* 2013;
 64. Plaza-Bolaños P, Frenich AG, Vidal JLM. Polycyclic aromatic hydrocarbons in food and beverages. *Analytical methods and trends. Journal of Chromatography A.* 2010.
 65. Li N, Luo HD, Jia YZ, Zhou N, Li YQ. Rapid determination of benzo(a)pyrene in processed meat and fish samples by second-derivative constant-energy synchronous fluorescence spectrometry. *Food Addit Contam - Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess.* 2011;
 66. Zhou N, Luo HD, Li N, Jia YZ, Li YQ. Highly sensitive and selective spectrofluorimetric approach for the rapid determination of trace benzo[α]pyrene in drinking water and in solutions leached from disposable paper cups. *Luminescence.* 2011;
 67. Lin LR, Luo HD, Li XY, Li N, Zhou N, Jia YZ, et al. A novel method for the rapid detection of benzo(a)pyrene in liquid milk by dimethyl sulfoxide selectively enhanced synchronous fluorescence spectrometry. *Food Addit Contam - Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess.* 2014;
 68. Cañas A, Richter P, Escandar GM. Chemometrics-assisted excitation-emission fluorescence spectroscopy on nylon-attached rotating disks. Simultaneous determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in the presence of interferences. *Anal Chim Acta.* 2014;
 69. Pena EA, Ridley LM, Murphy WR, Sowa JR, Bentivegna CS. Detection of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in raw menhaden fish oil using fluorescence spectroscopy: Method development. *Environ Toxicol Chem.* 2015;
 70. Liu YH, Wu PP, Liu Q, Luo HD, Cao SH, Lin GC, et al. A Simple Fluorescence Spectroscopic Approach for Simultaneous and Rapid Detection of Four Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH4) in Vegetable Oils. *Food Anal Methods.* 2016;
 71. Cheng W, Liu G, Wang X, Liu X, Liu B. Formation of Benzo(a)pyrene in Sesame Seeds during the Roasting Process for Production of Sesame Seed Oil. *JAOCS, J Am Oil Chem Soc.* 2015;
 72. Kumar K. Analysis of Carcinogenic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Complex Background of the Petroleum Fluorescence Using Multivariate Curve Resolution Alternating Least Square and Total Synchronous Fluorescence Spectroscopic Technique. *J Fluoresc.* 2020;
 73. Yu X, Li Z, Zhao M, Lau SCS, Ru Tan H, Teh WJ, et al. Quantification of aflatoxin B 1 in vegetable oils using low temperature clean-up followed by immuno-magnetic solid phase extraction. *Food Chem.* 2019;275(April 2018):390-6.
 74. Yu X, Ang HC, Yang H, Zheng C, Zhang Y. Low temperature cleanup combined with magnetic nanoparticle extraction to determine pyrethroids residue in vegetables oils. *Food Control.* 2017;
 75. Mo R, Zhang Y, Ni Z, Tang F. Determination of benzo[a]pyrene in camellia oil via

- vortex-assisted extraction using the UPLC-FLD method. *Food Sci Biotechnol*. 2017;
76. Taghvaei Z, Piravivanak Z, Rezaei K, Faraji M. Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Olive and Refined Pomace Olive Oils with Modified Low Temperature and Ultrasound-Assisted Liquid-Liquid Extraction Method Followed by the HPLC/FLD. *Food Anal Methods*. 2016;
 77. Huang JX, Lu DH, Wan K, Wang FH. Low temperature purification method for the determination of abamectin and ivermectin in edible oils by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Chinese Chem Lett*. 2014;
 78. Payanan T, Leepipatpiboon N, Varanusupakul P. Lower temperature cleanup with solid-phase extraction for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in edible oils by reversed phase liquid chromatography with fluorescence detection. *Food Chem* [Internet]. 2013;141(3):2720-6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.05.092>
 79. Lakowicz JR, Masters BR. *Principles of Fluorescence Spectroscopy, Third Edition*. J Biomed Opt. 2008;
 80. Skoog H& C. *Principles of Instrumental Analysis (6ed)* - Skoog, Holler & Crouch. Principles of Instrumental Analysis. 2007.
 81. Faust S, Tea G, Dreier T, Schulz C. Temperature, pressure, and bath gas composition dependence of fluorescence spectra and fluorescence lifetimes of toluene and naphthalene. *Appl Phys B Lasers Opt*. 2013;
 82. Gehlen MH. The centenary of the Stern-Volmer equation of fluorescence quenching: From the single line plot to the SV quenching map. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*. 2020.
 83. Itagaki H. Chapter 3 I Fluorescence Spectroscopy. *Exp Methods Polym Sci Mod Methods Polym Res Technol*. 2000;
 84. International Standard Organization. 15753: Animal and vegetable fats and oils – Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons. 2016;
 85. Magnusson B OU. *Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods - A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics*. Vol. 379, Eurachem Guide. 2014. 183-189 p.
 86. Falcón MSG, Amigo SG, Yusty MAL, Lage BL, Lozano JS. Application of the effects of solvent and dissolved oxygen on the determination of benzo[a]pyrene by constant-wavelength synchronous spectrofluorimetry in smoke-flavouring. *Talanta*. 1999;
 87. Sharma VK, Mohan D, Sahare PD. Fluorescence quenching of 3-methyl 7-hydroxyl Coumarin in presence of acetone. *Spectrochim Acta - Part A Mol Biomol Spectrosc*. 2007;
 88. Li Y-Q, Li X-Y, Shindi AAF, Zou Z-X, Liu Q, Lin L-R, et al. Synchronous Fluorescence Spectroscopy and Its Applications in Clinical Analysis and Food Safety Evaluation. In 2012.