

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

FACULDADE DE FARMÁCIA

RAFAEL PISSINATTI

**HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS
AROMÁTICOS EM CAFÉ TORRADO:
OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO POR
CROMATOGRAFIA A GÁS ACOPLADA A
ESPECTROMETRIA DE MASSAS**

Belo Horizonte
2013

RAFAEL PISSINATTI

**HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS
AROMÁTICOS EM CAFÉ TORRADO:
OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO POR
CROMATOGRAFIA A GÁS ACOPLADA A
ESPECTROMETRIA DE MASSAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos.

Orientadora: Scheilla Vitorino Carvalho de Souza

Co-orientador: Roberto Gonçalves Junqueira

Área de concentração: Ciências de Alimentos

Belo Horizonte
2013



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS -PPGCA

RAFAEL PISSINATTI

**HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS EM CAFÉ TORRADO:
OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO POR CROMATOGRAFIA A
GÁS ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS**

APROVADA EM 26 DE ABRIL DE 2013

COMISSÃO EXAMINADORA

Clésia Cristina Nascentes

Profa. Dra. CLÉSIA CRISTINA NASCENTES

Rosemary G. F. A. Pereira

Profa. Dra. ROSEMARY GUALBERTO F. ALVARENGA PEREIRA

Scheilla

Profa. Dra. SCHEILLA VITORINO CARVALHO DE SOUZA FERREIRA
Orientadora e Presidente da Comissão

Silvana da Motta

Profa. Dra. SILVANA DA MOTTA

Dedico esse trabalho à Sabrina,
pelo amor, incentivo e por estar presente
nos momentos mais difíceis,
sempre.

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos (PPGCA) da Faculdade de Farmácia (FAFAR) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

Ao Laboratório Nacional Agropecuário - Minas Gerais do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento de Minas Gerais, base física Pedro Leopoldo, MG (Lanagro-MG/MAPA).

À Pró-Reitoria de Pesquisa (PRPq) da UFMG pelo apoio ao desenvolvimento deste trabalho por meio do Programa de Auxílio à Pesquisa de Doutor Recém-Contratado.

À Biblioteca da FAFAR, Secretaria do Departamento de Alimentos da FAFAR/UFMG e Secretaria do PPGCA pela assistência nas pesquisas bibliográficas e resolução de questões administrativas.

AGRADECIMENTOS PESSOAIS

À minha orientadora, Scheilla Vitorino C. de Souza, pela amizade, por repassar seu amplo conhecimento teórico e prático, sempre de forma agradável, empolgante e incansável, e pelo apoio nos momentos de turbulência.

Ao meu co-orientador, Roberto Gonçalves Junqueira, pela amizade, sugestões e colaborações que enriqueceram o trabalho.

À Carolina Mariana Nunes e Amauri G. de Souza, que participaram ativamente do procedimento de validação e Renata França C. Belo pela ajuda, ideias e discussões técnicas.

Aos amigos do Laboratório de Dioxinas e PCBs, Unidade Instrumental de CG e Coordenação Técnica do Lanagro-MG, Carol, Daniella, Eleonora, Igor, Nilson e Ravi, que entenderam minha ausência em certos momentos.

Aos demais amigos do Lanagro-MG pela ajuda e companheirismo durante todo esse período.

Aos membros da banca examinadora Profa. Dra. Rosemary Gualberto Fonseca Alvarenga Pereira, Profa. Dra. Clésia Cristina Nascentes e Profa. Dra. Silvana da Motta pelas considerações e sugestões que muito contribuíram para a qualidade deste trabalho.

À minha família, pelo apoio, incentivo e compreensão pela ausência em certos momentos.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	10
LISTA DE FIGURAS	12
LISTA DE ABREVIações E SIGLAS	15
RESUMO	16
ABSTRACT	17
1 INTRODUÇÃO	18
2 OBJETIVOS	21
2.1 OBJETIVO GERAL	21
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
3 REVISÃO DE LITERATURA	22
3.1 HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS (HPAs)	22
3.1.1 Propriedades físico-químicas	22
3.1.2 Toxicidade	24
3.1.3 Contaminação de alimentos	26
3.1.4 Regulamentação em alimentos	30
3.2 CAFÉ	32
3.2.1 Agronegócio e consumo nacional	32
3.2.2 Processamento	33
3.2.2.1 Torração	34
3.2.3 Estudos de contaminação por HPAs no Brasil e no mundo	36
3.3 MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DE HPAs	37
3.3.1 Extração e purificação	37
3.3.1.1 Extração líquida pressurizada	39
3.3.2 Determinação	40

3.3.3	Recurso do padrão interno	41
3.4	VALIDAÇÃO DE MÉTODOS	42
3.4.1	Validação no processo analítico	43
3.4.2	Validação em sistemas de gestão	43
3.4.3	Validação intralaboratorial	44
3.4.4	Parâmetros de desempenho	45
3.4.4.1	Linearidade, sensibilidade e faixa	46
3.4.4.2	Efeitos de matriz e seletividade	47
3.4.4.3	Veracidade e precisão	47
3.4.4.4	Limites e incerteza	48
4	MATERIAL E MÉTODOS	50
4.1	AMOSTRAS	50
4.2	EQUIPAMENTOS	50
4.3	MATERIAIS	51
4.4	REAGENTES, PADRÕES E SOLVENTES	51
4.5	SOLUÇÕES	52
4.5.1	Padrão nativo EPA	52
4.5.2	Padrão interno	53
4.5.3	Padrão de seringa	53
4.5.4	Padrão nativo União Europeia	53
4.6	OTIMIZAÇÃO DAS ETAPAS DE EXTRAÇÃO, PURIFICAÇÃO E DETERMINAÇÃO	53
4.6.1	Detecção e quantificação	54
4.6.2	Extração	54
4.6.3	Purificação	55
4.6.4	Planejamento fatorial	55
4.7	PROCEDIMENTO ANALÍTICO OTIMIZADO	57
4.8	VALIDAÇÃO	58

4.8.1	Linearidade, sensibilidade e faixa	59
4.8.2	Efeitos de matriz e seletividade	60
4.8.3	Recuperação e precisão	61
4.8.4	Limites e incerteza	62
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	64
5.1	OTIMIZAÇÃO DAS ETAPAS DE EXTRAÇÃO, PURIFICAÇÃO E DETERMINAÇÃO	64
5.1.1	Detecção e quantificação	64
5.1.2	Extração	67
5.1.3	Purificação	69
5.1.4	Planejamento fatorial	70
5.2	VALIDAÇÃO	74
5.2.1	Linearidade, sensibilidade e faixa	74
5.2.2	Efeitos de matriz e seletividade	78
5.2.3	Recuperação e precisão	85
5.2.4	Limites e incerteza	90
5.3	APLICAÇÃO DO MÉTODO VALIDADO NA ANÁLISE DE AMOSTRAS COMERCIAIS	92
6	CONCLUSÕES	95
7	PERSPECTIVAS	96
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	97

LISTA DE TABELAS

1	Propriedades físico-químicas dos dezesseis hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) considerados prioritários pela agência de proteção ambiental dos Estados Unidos - <i>Environment Protection Agency</i>	24
2	Classificação pela <i>International Agency for Research on Cancer</i> quanto à carcinogenicidade dos dezesseis hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) considerados prioritários pela agência de proteção ambiental dos Estados Unidos - <i>Environment Protection Agency</i>	25
3	Limites máximos permitidos para hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) em diversos gêneros alimentícios adotados pela União Europeia	31
4	Critérios de desempenho para métodos de análise de benzo(a)pireno, benzo(a)antraceno, criseno e benzo(b)fluoranteno	32
5	Delineamento fatorial 2 x 2 com quatro replicatas no ponto central	56
6	Variações máximas permitidas para as intensidades relativas de íons com diversas técnicas de espectrometria de massas	60
7	Relação dos íons monitorados para os analitos de interesse, padrões nativos, internos e padrão de seringa	65
8	Comparação entre os teores de gordura extraídos com acetona, hexano e hexano:diclorometano (85:15, v:v), utilizando o método Soxhelt em equipamento Foss modelo Soxtec 2050	68
9	Comparação de extração de gordura com mistura de solventes hexano:diclorometano (85:15, v/v) empregando Soxhlet e extração líquida pressurizada com e sem purificação na cela de extração	68
10	Recuperação média e desvio padrão dos analitos por fração de hexano eluída em coluna de sílica de 5 g	70
11	Equações, coeficientes de determinação e estatísticas relacionadas à avaliação da linearidade para os dezesseis hidrocarbonetos policíclicos	78

aromáticos

- 12 Comparações entre as inclinações das curvas usuais e matrizadas para os dezesseis hidrocarbonetos policíclicos aromáticos 79
- 13 Intensidades relativas dos íons confirmatórios obtidas para soluções padrões e amostras adicionadas, por anaito, e respectivas variações 83
- 14 Médias de recuperação, desvios padrão relativos e razões de Horrat, sob condições de repetibilidade e precisão intermediária, obtidos para amostras de café torrado adicionadas de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em diferentes níveis de concentração 86
- 15 Médias de recuperação, desvios padrão relativos obtidos para os padrões internos 90
- 16 Limites de detecção (teóricos) e de quantificação (teóricos e do método) estimados para os dez hidrocarbonetos policíclicos aromáticos 91
- 17 Estimativas das incertezas de medição por nível estudado e respectivas incertezas máximas aceitáveis 92
- 18 Resultados das concentrações dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e respectivas incertezas de medição, obtidas na avaliação de amostras comerciais para a marca que apresentou contaminação 93

LISTA DE FIGURAS

- 1 Fórmulas estruturais de dezesseis hidrocarbonetos policíclicos aromáticos considerados prioritários pela agência de proteção ambiental dos Estados Unidos - *Environment Protection Agency* 23
- 2 Limites superiores e inferiores para as médias das somas de oito hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) (benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)-pireno, indeno(1,2,3-c,d)pireno, dibenzo(a,h)antraceno, benzo(g,h,i)perileno) em 4.065 amostras divididas em 33 categorias/subcategorias de alimentos 28
- 3 Estimativa da participação percentual na produção de café para safra 2013 por Unidade Federativa no Brasil 33
- 4 Diagrama de funcionamento de um equipamento de extração líquida pressurizada - Thermo/Dionex modelo ASE 350[®] 40
- 5 Marcha analítica do método otimizado 58
- 6 Cromatogramas típicos obtidos para solução de uso do padrão nativo (200 ng/mL) para os dezesseis hidrocarbonetos policíclicos aromáticos estudados 66
- 7 Extratos obtidos após extração em Soxhlet com (A) acetona e (B) hexano e hexano:diclorometano (85:15, v/v) 67
- 8 Cella do equipamento Thermo/Dionex modelo ASE 350[®] para purificação simultânea à extração líquida pressurizada 69
- 9 Gráficos de pareto dos efeitos padronizados em relação aos fatores e interações estudados no planejamento fatorial ($t_{crit} = 3,182$, $\alpha = 0,05$) para os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos naftaleno, acenaftileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno e pireno 71

- 10 Gráficos de pareto dos efeitos padronizados em relação aos fatores e interações estudados planejamento fatorial ($t_{crit} = 3,182$, $\alpha = 0,05$) para os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, indeno(1,2,3-c,d)pireno, dibenzo(a,h)antraceno e benzo(g,h,i)perileno 72
- 11 Influência das condições experimentais na recuperação do padrão interno para os analitos benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, indeno(1,2,3-c,d)pireno, dibenzo(a,h)antraceno, benzo(g,h,i)perileno 73
- 12 Gráficos exploratórios dos resíduos da regressão dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos naftaleno, acenaftileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno e pireno, com os respectivos *outliers* diagnosticados pelo teste de resíduos padronizados Jackknife 75
- 13 Gráficos exploratórios dos resíduos da regressão dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, indeno(1,2,3-c,d)pireno, dibenzo(a,h)antraceno e benzo(g,h,i)perileno, com os respectivos *outliers* diagnosticados pelo teste de resíduos padronizados Jackknife 76
- 14 Cromatogramas típicos obtidos para amostras adicionadas de padrão nativo a 0,25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ e padrão interno a 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 81
- 15 Co-eluição dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos ciclopenta(c,d)pireno e benzo(j)fluoranteno com benzo(a)antraceno e benzo(b)fluoranteno, respectivamente 82
- 16 Cromatogramas típicos obtidos para amostra adicionada (1 $\mu\text{g}/\text{kg}$) para os dezesseis hidrocarbonetos policíclicos aromáticos estudados 84
- 17 Distribuição dos resultados individuais de porcentagem de recuperação obtidos para fluoranteno, pireno, benzo(a)antraceno e criseno, nos três níveis de concentração estudados 87

18 Distribuição dos resultados individuais de porcentagem de recuperação obtidos para benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)-pireno, indeno(1,2,3-c,d)pireno, dibenzo(a,h)antraceno e benzo(g,h,i)perileno nos três níveis estudados

88

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

ABIC	Associação Brasileira da Indústria de Café
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ASE	<i>Accelerated solvent extraction</i>
ATSDR	<i>Agency for Toxic Substances and Disease Registry</i>
CG	Cromatografia gasosa
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CONAB	Companhia Nacional de Abastecimento
DMF	Dimetilformamida
DPR _r	Desvio padrão relativo sob condições de repetibilidade
DPR _R	Desvio padrão relativo sob condições de reprodutibilidade
EFSA	<i>European Food Standard Agency</i>
ELP	Extração líquida pressurizada
EM	Espectrometria de massas
EPA	<i>Environment Protection Agency</i>
FAO	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>
FL	Fluorescência
HPAs	Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
LDP	Laboratório de Dioxinas e PCBs
LANAGRO-MG	Laboratório Nacional Agropecuário - Minas Gerais
MAE	Extração por solvente assistida por microondas
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MR	Material de referência
MRC	Material de referência certificado
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCB	Bifenila policlorada
PLE	<i>Pressurized liquid extraction</i>
PNCRC	Programa Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes
RIVM	<i>National Institute of Public Health and Environment - Holanda</i>
SCF	<i>Scientific Committee on Food</i>

RESUMO

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) compreendem uma classe de compostos orgânicos provenientes da pirólise ou combustão incompleta da matéria orgânica, podendo apresentar características carcinogênicas. A presença de HPAs no café pode ser atribuída à contaminação dos grãos verdes e, principalmente, à formação durante o processo de secagem e torrefação. A importância do café para o Brasil é notória, destacando-se como o maior produtor mundial e o segundo maior mercado consumidor em termos de consumo absoluto. Em razão disso, um método para determinação de HPAs considerados prioritários em café torrado foi otimizado e validado por procedimentos intralaboratoriais. Foram otimizados parâmetros da extração líquida pressurizada e purificação. Para as etapas de detecção e quantificação foi utilizada cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas. A seletividade ficou comprometida para os analitos de menor massa molecular e menor toxicidade: naftaleno, acenaftileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno e antraceno. Faixa linear de 0,25 a 4,00 µg/kg foi determinada, com atendimento a todas as premissas da regressão linear simples e ausência de efeitos de matriz significativos, exceto para naftaleno e acenaftileno. A precisão foi adequada sob condições de repetibilidade e precisão intermediária, com desvios padrão relativos entre 3,26 e 23,75 % e entre 3,29 % e 33,34 %, respectivamente. Os valores de recuperações médias variaram de 87,08 a 111,28 %. Esses valores, assim como os limites de detecção, limites de quantificação e incertezas atenderam aos critérios de desempenho regulamentados pela União Europeia. O método foi aplicado na análise de amostras comerciais. Das três marcas analisadas, uma apresentou contaminação de até $11,29 \pm 2,33$ µg/kg para o somatório dos HPAs encontrados. Os resultados indicaram a necessidade de estudos subsequentes de investigação dos pontos críticos que levam à contaminação do café torrado brasileiro por HPAs, bem como a implementação de ações de controle e monitoramento.

Palavras-chave: hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, café torrado, cromatografia gasosa, espectrometria de massas, validação intralaboratorial de métodos.

ABSTRACT

POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS IN ROASTED COFFEE: METHOD OPTIMIZATION AND VALIDATION BY GAS CHROMATOGRAPHIC WITH MASS SPECTROMETRY

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) comprise a class of organic compounds generated from incomplete combustion or pyrolysis of organic matter, and may present carcinogenic properties. The presence of PAHs in coffee can be attributed to the contamination of green beans and, mainly, to the formation during drying and roasting. The coffee importance for Brazil is notorious, especially considering that this country is the world's largest producer and second largest consumer in terms of absolute consumption. For this reason, a method for determination of priority PAHs in roasted coffee was optimized and validated by in-house procedures. Parameters for pressurized liquid extraction and purification were optimized. For detection and quantification gas chromatography coupled to mass spectrometry was employed. The selectivity was compromised for the lower molecular weight and lower toxicity analytes: naphthalene, acenaphthylene, acenaphthene, fluorene, phenanthrene and anthracene. Linearity, in accordance to all premises of simple linear regression, was obtained in the concentration range from 0.25 to 4.00 µg/kg. Matrix effects were not significant, except for naphthalene and acenaphthylene. The precision was adequate under conditions of intermediate precision and repeatability with relative standard deviation varying entre 3.26 and 23.75% and between 3.29% and 33.34%, respectively. The values of average recoveries ranged from 87.08 to 111.28%. These values, as well as the limits of detection, limits of quantification and uncertainties of measurements met the performance criteria established by the European Union regulations. The method was applied for the analysis of commercial samples. One of the three brands tested showed contamination up to 11.29 ± 2.33 mg/kg for the sum of PAHs. These results indicated the need of future researches to establish the critical points for the contamination of the Brazilian roasted coffee with PAH, as well the adoption of control and monitoring actions.

Key-words: polycyclic aromatic hydrocarbons, rostead coffee, gas chromatography, mass spectrometry, in-house validation.

1 INTRODUÇÃO

A presença de substâncias prejudiciais à saúde em alimentos deve ser uma preocupação constante para as autoridades de todos os países. Essas substâncias podem estar presentes nos alimentos como resultado de práticas de produção agropecuária ou devido à contaminação ambiental. Sua pesquisa e controle precisam ser encarados como ferramentas essenciais, seja para garantir a segurança alimentar da população ou para tornar os produtos nacionais aptos a mercados internacionais cada vez mais exigentes.

O crescente número de resíduos e contaminantes, assim como a diversidade de matrizes de origem animal e vegetal, monitorados no âmbito do Programa Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), nos últimos anos (MAURÍCIO, LINS & ALVARENGA, 2009), comprovam essa necessidade.

Nesse contexto, o café se destaca como matriz a ser monitorada, tanto pelo fato de o Brasil ser o maior produtor mundial, quanto por se tratar do segundo maior mercado consumidor em termos de consumo absoluto. Tratando-se de consumo per capita, dados da Associação Brasileira da Indústria de Café (ABIC), do ano de 2013(a), indicam um consumo de 4,98 kg/habitante/ano de café torrado, o que resulta num consumo em cerca de 83 L/habitante/ano da bebida. Os dados representam uma evolução de 2,10 % em relação ao período anterior. A constante evolução do consumo brasileiro aproxima o consumo nacional per capita ao da Alemanha, superando os índices da Itália e da França, também considerados grandes consumidores de café. Os campeões mundiais de consumo per capita, entretanto, ainda são os países nórdicos - Finlândia, Noruega e Dinamarca - com um volume próximo dos 13 kg/habitante/ano (ABIC, 2013a).

O Brasil ocupa, ainda, a posição de maior exportador mundial de café e tem como principais mercados a Alemanha, Estados Unidos, Itália, Japão e Bélgica (ABIC, 2013a). Contudo, para a manutenção desses e a conquista de novos mercados, faz-se necessária a identificação de barreiras existentes às nossas exportações, assim como a prospecção de novas barreiras, de forma sistemática e atualizada, visando, simultaneamente, informar e melhorar o desempenho do setor exportador, bem como subsidiar às negociações internacionais que visam à eliminação de obstáculos comerciais (MDIC, 2010).

Entre os principais contaminantes orgânicos presentes em alimentos, destacam-se os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs). Esses constituem uma grande classe de compostos, com estrutura de dois ou mais anéis benzênicos ligados entre si de forma linear, angular ou agrupada (NETTO *et al.*, 2000), a qual é referida, também, como hidrocarbonetos aromáticos polinucleares ou poliarenos (LEITE, 2008).

A presença desses contaminantes em alimentos representa um perigo potencial para a saúde humana, segundo a *International Agency for Research on Cancer* (IARC) (IARC, 2012). A Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) da Organização Mundial de Saúde (OMS) (WHO, 2006) e, no âmbito da União Européia, o *Scientific Committee on Food* (SCF) (EC, 2002b) consideram os HPAs genotóxicos e carcinogênicos, recomendando seu monitoramento em alimentos.

Os HPAs são provenientes da queima incompleta de matéria orgânica, como produtos plásticos, combustíveis fósseis, fumaça de cigarro, incineração de lixo, máquinas de combustão interna e refinarias de petróleo (CODEX ALIMENTARIUS, 2005; POSTER, 2006; ZHENG *et al.*, 2006). A incorporação de HPAs em alimentos pode ser proveniente da contaminação ambiental (deposição de partículas por via aérea ou crescimento de vegetais em solo contaminado), do processamento tecnológico (torrefação, secagem e defumação) e, em baixas quantidades, do material de embalagem contaminado (CIECIERSKA & OBIEDZINSK, 2007).

No caso específico do café, a presença de HPAs pode ser atribuída à contaminação dos grãos verdes por via ambiental, secagem e beneficiamento, ou dos grãos torrados durante o processo de torrefação. A literatura indica que condições como temperatura e tempo de torrefação devem ser controladas a fim de evitar a formação dos HPAs (HOUESSOU *et al.*, 2007; STANCIU *et al.*, 2008). Dados sugerem, ainda, uma possível transformação dos HPAs de menor massa molecular em HPAs sabidamente mais tóxicos, de maior massa molecular, em função do grau de torrefação (HOUESSOU *et al.*, 2007). Os níveis de HPAs reportados em café (GARCIA-FALCON, CANCHO-GRANDE & SIMAL-GANDARA, 2005; STANCIU *et al.*, 2008; ORECCHIO, CIOTTI & CULOTTA, 2009) são considerados baixos em relação aos grupos de alimentos tidos como prioritários para monitoramento destes contaminantes, como óleos, alimentos defumados e de origem marinha, nos quais admite-se uma concentração de até 2 µg/kg (EC, 2006). Porém, recentes relatórios publicados pela *European Food Standard Agency* (EFSA) (EFSA, 2008a,b) colocam a matriz café, para a qual não existem limites máximos regulamentados, em posição de destaque em relação à contaminação de alimentos por HPAs. Dados mostraram contaminação em

níveis acima de 10 µg/kg para o benzo(a)pireno, indicando a necessidade de maiores investigações sobre o assunto.

As principais técnicas de detecção e quantificação utilizadas para análise desses contaminantes em alimentos são a cromatografia gasosa (CG) acoplada à espectrometria de massas (EM) (MORET *et al.*, 2007; ORECCHIO, CIOTTI & CULOTTA, 2009; ZIEGENHALS, SPEER & JIRA, 2009) e a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detector de fluorescência (FL) (BADOLATO *et al.*, 2006; HOUESSOU, DELTEIL & CAMEL, 2006). Métodos que utilizam a detecção por FL têm a desvantagem da necessidade de confirmação da identidade do analito por outra técnica, já que esta apresenta baixa seletividade (EC, 2002a). A CLAE acoplada à EM apresenta limites de detecção mais elevados que as demais técnicas, sendo, portanto, adequada para matrizes ambientais, para as quais são reportados maiores níveis de HPAs (PURCARO, MORET & CONTE, 2013).

Especificamente para a matriz café torrado, não há registros na literatura de métodos empregando EM para análise de outros HPAs, além do benzo(a)pireno. Apesar de ser o composto mais tóxico da classe, o uso do benzo(a)pireno como indicador da presença destes compostos em alimentos é questionado (EC, 2002b).

Dados analíticos não confiáveis podem conduzir a decisões desastrosas e a prejuízos financeiros irreparáveis (RIBANI *et al.*, 2004). Assim, um monitoramento efetivo da contaminação do café produzido no Brasil por HPAs depende da disponibilidade de metodologia devidamente validada. A validação é o processo que confirma a adequação de um método ao propósito de uso (*fitness for purpose*) (EURACHEM, 1998). Trata-se de um componente essencial dentre as medidas que os laboratórios devem implementar, no âmbito de seus sistemas de gestão da qualidade, visando a garantia da confiabilidade, rastreabilidade e comparabilidade dos resultados emitidos (THOMPSON, ELLISON & WOOD, 2002; ABNT, 2005).

Dessa forma, com o objetivo de gerar dados confiáveis sobre os níveis desses contaminantes no café, auxiliando a manutenção da segurança alimentar do consumidor nacional e antecipando possíveis barreiras sanitárias a serem impostas por países importadores, uma metodologia para determinação de HPAs em café torrado por CG-EM foi otimizada e validada.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Disponibilizar um método de análise validado para determinação de HPAs considerados prioritários em café torrado, visando subsidiar ações de controle e monitoramento da contaminação desse produto pelo MAPA.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Otimizar um método de ensaio para determinação de HPAs considerados prioritários em café torrado, empregando extração líquida pressurizada e CG acoplada a EM para detecção e quantificação dos analitos.

- Avaliar o impacto do recurso de uso de padrão interno nos parâmetros de desempenho do método.

- Validar o método otimizado, em processo intralaboratorial, de acordo com protocolos aceitos internacionalmente.

- Aplicar o método validado na análise de amostras de café torrado e moído disponíveis no mercado de Belo Horizonte, MG.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS (HPAs)

3.1.1 Propriedades físico-químicas

Os HPAs compreendem uma classe de compostos orgânicos que contêm carbono e hidrogênio combinados em dois ou mais anéis aromáticos condensados, podendo haver ou não substituição. No meio ambiente, eles predominam como compostos com dois a sete anéis condensados, com massa molar de 128 e 302 g/mol (MING-HO, 2005).

De acordo com a agência de proteção ambiental dos Estados Unidos - *Environment Protection Agency* (EPA), dezesseis HPAs são considerados particularmente importantes no monitoramento ambiental de poluentes orgânicos prioritários (EPA, 1986). Suas fórmulas estruturais são representadas na **Figura 1**.

As características físico-químicas dos HPAs, como solubilidade e pressão de vapor, são fatores importantes que direcionam a distribuição desses contaminantes entre as fases solúvel e particulada dos meios atmosférico, aquoso e biótico. Em geral, a solubilidade dos HPAs em água diminui com o aumento da massa molecular, variando entre os altamente insolúveis, como o benzo(g,h,i)perileno (solubilidade de 0,0003 mg/L), aos pouco solúveis, como o naftaleno (solubilidade de 31 mg/L). São também classificados como moderadamente a altamente lipossolúveis, com coeficientes de partição octanol-água ($\log K_{oa}$) variando entre 3,37 e 7,10 (IPCS,1998; MEIRE, AZERERDO & MACHADO, 2007).

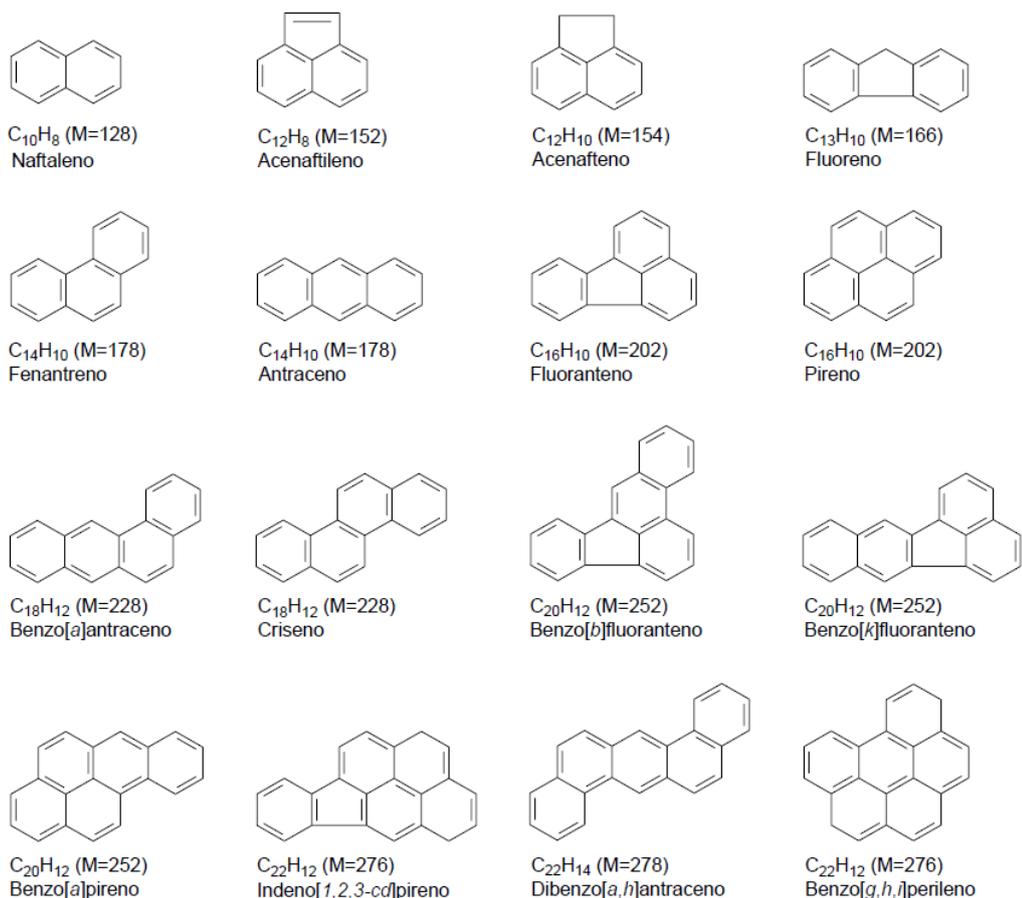


Figura 1 - Fórmulas estruturais de dezesseis hidrocarbonetos policíclicos aromáticos considerados prioritários pela agência de proteção ambiental dos Estados Unidos - *Environment Protection Agency*.

Fonte: LEITE (2008).

M: massa molecular (*u*); Nomenclatura: moléculas orientadas de forma que o maior número de anéis fique na horizontal e à direita. Letras entre colchetes representam a ligação entre carbonos, nomeada em ordem alfabética, em sentido horário a partir do primeiro carbono presente no anel superior não ligado a outro anel (IUPAC, 1993).

A maioria dos HPAs tem elevada tendência de adsorção em material atmosférico particulado. Os HPAs contendo cinco ou mais anéis aromáticos são encontrados, predominantemente, em associação com partículas como cinzas ou fuligens, geralmente pequenas (< 2,5 µm). Os compostos com dois ou três anéis encontram-se na atmosfera quase totalmente na fase de vapor, enquanto aqueles com quatro anéis estão em posição intermediária (EC, 2002b). Na **Tabela 1** são relacionadas às principais características físico-químicas dos HPAs.

Tabela 1 - Propriedades físico-químicas dos dezesseis hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) considerados prioritários pela agência de proteção ambiental dos Estados Unidos - *Environment Protection Agency*

HPAs	Nº de anéis	Massa Molecular (g/mol)	Solubilidade em água a 25°C (mg/L)	Pressão de vapor a 25°C (Pa)	Coefficiente de partição octanol/água Log K _{oa} (-)
Naftaleno	2	128	3,1x10 ¹	1x10 ¹	3,37
Acenaftileno	3	152	3,9	9x10 ⁻¹	4,00
Acenafteno	3	154	3,8	3x10 ⁻¹	3,92
Fluoreno	3	166	1,9	8x10 ⁻²	4,18
Fenantreno	3	178	1,1	2x10 ⁻²	4,57
Antraceno	3	178	4,5x10 ⁻²	8x10 ⁻⁴	4,54
Fluoranteno	4	202	2,6x10 ⁻¹	1,2x10 ⁻³	5,22
Pireno	4	202	1,3x10 ⁻¹	6x10 ⁻⁴	5,18
Benz(a)antraceno	4	228	1,1x10 ⁻²	2,8x10 ⁻⁵	5,61
Criseno	4	228	2,0x10 ⁻³	8,4x10 ⁻⁵	5,91
Benz(b)fluoranteno	5	252	1,5x10 ⁻³	1,3x10 ⁻⁷	5,80
Benz(k)fluoranteno	5	252	7,6x10 ⁻⁴	1,3x10 ⁻⁷	6,84
Benzo(a)pireno	5	252	3,8x10 ⁻³	7,3x10 ⁻⁷	6,50
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	6	276	6,2x10 ⁻²	1,3x10 ⁻⁸	6,58
Dibenzo(a,h)antraceno	5	278	6,0x10 ⁻⁴	1,3x10 ⁻⁸	6,50
Benzo(g,h,i)perileno	6	276	2,6x10 ⁻⁴	1,4x10 ⁻⁸	7,10

Fonte: adaptado de IPCS (1998).

3.1.2 Toxicidade

Os HPAs representam um dos grupos de compostos mais extensivamente estudados capazes de produzir câncer em animais de laboratório. Pesquisas mostraram que determinados HPAs podem provocar câncer se inalados, ingeridos e mesmo após contato com a pele. Imunossupressão, hipertrofia hepática e alterações no crescimento de outros tecidos também foram relatados em animais de laboratório (ATSDR, 1995). A evidência da carcinogenicidade em humanos vem de estudos ocupacionais em trabalhadores expostos a conhecidas fontes de HPAs, como refino de óleo, trabalho em carvoarias, fornos e chaminés (ATSDR, 1995; WHO, 2006).

Muitos dos HPAs são considerados compostos tóxicos, mesmo em pequenas concentrações, sendo que os compostos de menor massa molecular formados por dois ou três anéis (como naftaleno, fenantreno e antraceno) possuem elevada toxicidade aguda, mas baixo ou nenhum potencial carcinogênico, enquanto os compostos de maior massa molecular contendo quatro, cinco ou seis anéis (como benzo(a)pireno)

possuem baixa toxicidade aguda, mas um maior potencial carcinogênico (MEIRE, AZERERDO & MACHADO, 2007). Os efeitos agudos atingem, principalmente, o rim e fígado, levando a inflamações cutâneas, hiperqueratose e ulcerações. São relatadas, ainda, alterações nos linfonodos e indução de efeitos imunossupressores (CCME, 2008).

Recentemente, a IARC atualizou a classificação do composto benzo(a)pireno para o nível mais tóxico, grupo 1 (IARC, 2012). Neste grupo, estão presentes 109 agentes (ou misturas) com evidências suficientes de carcinogênese em humanos. Na **Tabela 2** encontra-se apresentada a classificação dos dezesseis HPAs classificados como prioritários pela EPA.

Tabela 2 - Classificação pela *International Agency for Research on Cancer* quanto à carcinogenicidade dos dezesseis hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) considerados prioritários pela agência de proteção ambiental dos Estados Unidos - *Environment Protection Agency*

HPAs	Grupo IARC ¹	Ano da última atualização
Naftaleno	2B	2002
Acenaftileno	não classificado	-
Acenafteno	3	2010
Fluoreno	3	2010
Fenantreno	3	2010
Antraceno	3	2010
Fluoranteno	3	2010
Pireno	3	2010
Benz(a)antraceno	2B	2010
Criseno	2B	2010
Benz(b)fluoranteno	2B	2010
Benz(k)fluoranteno	2B	2010
Benzo(a)pireno	1	2012
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	2B	2010
Dibenzo(a,h)antraceno	2A	2010
Benzo(g,h,i)perileno	3	2010

Fonte: IARC (2012).

¹Grupo 1: carcinogênico para humanos; Grupo 2A: provável carcinogênico para humanos; Grupo 2B: possível carcinogênico para humanos; Grupo 3: falta evidências quanto à carcinogenicidade para humanos.

Os HPAs são substâncias que pertencem à classe dos pró-carcinogênicos, ou seja, necessitam sofrer ativação metabólica para formar o carcinógeno ativo capaz de reagir com o DNA e outras moléculas (GALINARO & FRANCO, 2009). A carcinogenicidade dos HPAs está associada com a complexidade da molécula, isto é,

com o número de anéis benzênicos presentes (BOSTRÖM *et al.*, 2002). O mecanismo de toxicidade passa pela oxidação dos anéis aromáticos, realizada por enzimas da família do citocromo P450, gerando intermediários epóxidos que se ligam de forma covalente a sítios críticos do DNA, causando erros de replicação e levando a mutação (BOSTRÖM *et al.*, 2002; EC, 2002b; MARQUES, VALENTE & ROSA, 2009). Os principais sítios são os grupamentos amino da guanina e da adenina (WHO, 2006).

Além disso, há evidências de que outras reações intermediárias também são geradas por um processo de oxidação, o que pode resultar em instabilidade química na alquilação do DNA, levando ao processo mutagênico (MARQUES, VALENTE & ROSA, 2009).

Alguns HPAs e seus metabólitos ligam-se, ainda, ao receptor aril hidrocarboneto, resultando em regulação positiva de diversas enzimas envolvidas no metabolismo dos próprios HPAs. Isso pode levar a relações de dose-resposta não lineares quando da presença de misturas de HPAs (WHO, 2006), o que dificulta o estabelecimento de limites seguros para ingestão desses contaminantes.

Assim, algumas agências e autoridades internacionais, como a agência americana *Agency for Toxic Substances and Disease Registry* (ATSDR), o comitê científico europeu *Scientific Committee on Food* (SCF) e a agência européia EFSA, evitam o estabelecimento de um limite crônico mínimo seguro de exposição, recomendando que a exposição aos HPAs seja tão baixa quanto razoavelmente possível (BULDER *et al.*, 2006).

Porém, outras organizações internacionais calcularam a chamada “dose segura virtual” baseada em extrapolações de dados provenientes de experimentos com animais de laboratório. A EPA considera uma dose de ingestão de 0,14 ng/kg de massa corpórea/dia para o benzo(a)pireno, com um nível de risco de câncer de 1×10^{-6} . Já a agência Holandesa de saúde pública e meio ambiente *National Institute of Public Health and Environment* (RIVM) calcula como limite para o mesmo nível de risco de câncer 0,50 ng/kg de massa corpórea/dia (BULDER *et al.*, 2006).

3.1.3 Contaminação de alimentos

Estudos realizados na Itália (LODOVICI *et al.*, 1995) alertaram para o fato de que a exposição a HPAs proveniente de ingestão de alimentos contaminados é significativamente maior do que aquela devida a exposição ambiental, ou seja, pela respiração e absorção cutânea. A presença de HPAs em alimentos tem sido extensivamente descrita na literatura (MORET, CONTE & DEAN 1999; WEIßHAAR,

2002; DILETTI *et al.*, 2004; CIECIERSKA & OBIEDZINSK, 2007; WINDAL, BOXUS & HANOT, 2008; ZIEGENHALS, SPEER & JIRA, 2009).

Várias são as vias de contaminação dos alimentos por HPAs. Essa contaminação pode ter origem tanto na poluição ambiental, da maneira que ocorre com frutas, verduras e grãos cultivados em regiões industriais; como no processamento, destacando-se nesse caso específico a defumação de carnes, a torrefação e a secagem direta com madeira (CAMARGO & TOLEDO, 2002a,b; TFOUNI, VITORINO & TOLEDO, 2007).

Em vegetais e frutas, a presença de HPAs se origina principalmente pela deposição de partículas do ar poluído em suas superfícies. Os níveis encontrados dependem da localização do cultivo e do produto, visto que amostras de áreas altamente industrializadas ou cultivos próximos a estradas e vias expressas geralmente apresentam níveis mais altos de HPAs do que aquelas provenientes de áreas rurais. As concentrações dos HPAs são geralmente maiores nas superfícies dos vegetais, tais como na casca de frutas e folhas externas do repolho, do que nos tecidos internos. Os níveis mais altos de HPAs em vegetais cultivados em áreas de ar poluído são especialmente encontrados em vegetais com uma grande área superficial exposta, por exemplo, alface, couve e espinafre (CAMARGO & TOLEDO, 2003).

Os HPAs podem ser encontrados na fumaça do processo de defumação, podendo se depositar na superfície e migrar para dentro do alimento que está sendo defumado. Inúmeros fatores no processo de defumação influenciam a composição da fumaça e a absorção de HPAs pelo alimento defumado, podendo ser destacada a temperatura de combustão durante a geração da fumaça, como parâmetro particularmente crítico (WRETLING *et al.*, 2010).

A associação dos HPAs de maior massa molecular com material particulado em suspensão na atmosfera é uma importante fonte de contaminação (NIELSEN FEILBERG & BINDERUP, 1999). Desse forma, esses contaminantes depositam-se em rios, vegetais com folhas grandes e na pastagem. A superfície serosa de vegetais e frutas pode concentrar os HPAs de baixa massa molecular (EC, 2002b).

Em geral, devido às características lipofílicas dos HPAs, óleos e gorduras são os alimentos que apresentam maiores índices de contaminação, tendo como principais causas a contaminação ambiental, assim como a secagem das sementes anterior à extração dos óleos. Alimentos defumados, como carnes e peixes também apresentam níveis elevados. Contudo, sua contribuição ao total de HPAs ingerido não é significativa, pois a participação destes produtos na constituição de dietas populacionais

usualmente é baixa (CODEX ALIMENTARIUS, 2009), o que também pode ser aplicado aos casos de alimentos ricos em óleos e gorduras, os quais têm sido restritos nas tendências dietéticas atuais.

Levantamentos publicados no ano de 2008 pela EFSA, envolvendo dados obtidos em dezesseis países europeus, indicaram peixes e frutos do mar, óleos vegetais, carnes, café e chá, suplementos alimentares e temperos como os principais grupos de alimentos contaminados, ou seja, aqueles que apresentaram contaminações em níveis maiores que 10 µg/kg para a soma de oito HPAs (benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)-pireno, indeno(1,2,3-c,d)pireno, dibenzo(a,h)antraceno, benzo(g,h,i)perileno) (**Figura 2**). Tais resultados sinalizam para que atenção seja dada aos grupos café e chá, suplementos alimentares e temperos, uma vez que não existe regulamentação dos níveis de HPAs nestas matrizes alimentares (EFSA, 2008a,b).

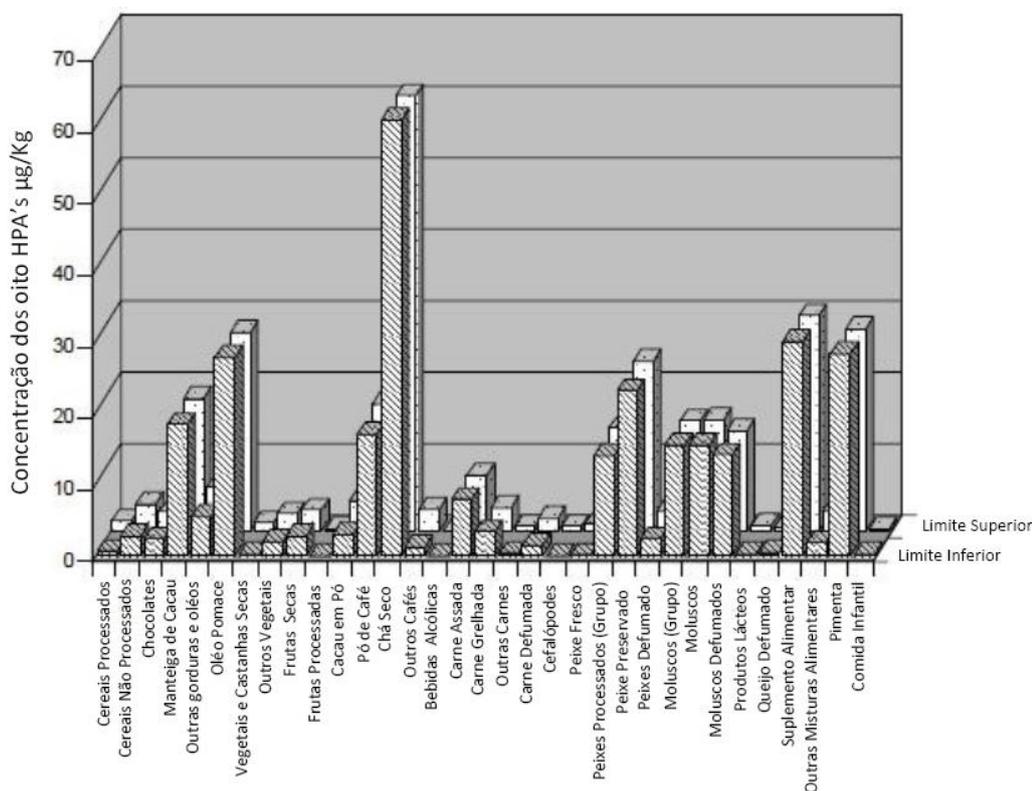


Figura 2 - Limites superiores e inferiores para as médias das somas de oito hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) (benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)-pireno, indeno(1,2,3-c,d)pireno, dibenzo(a,h)antraceno, benzo(g,h,i)perileno) em 4.065 amostras divididas em 33 categorias/subcategorias de alimentos.

Fonte: BULDER (2006).

A dieta é a maior fonte não-ocupacional de HPAs para indivíduos não-fumantes. Neste estudo Europeu, considerando os perfis dietéticos dos 16 países envolvidos, uma dieta média forneceria 235 ng/dia de benzo(a)pireno e 1729 ng/dia dos oito HPAs, enquanto numa dieta de alta exposição os valores seriam de 389 ng/dia de benzo(a)pireno e de 3078 ng/dia dos oito HPAs. Os produtos responsáveis pela maior exposição aos HPAs foram os frutos do mar, cereais, vegetais, carnes, óleos e gorduras, peixes e café, considerando tanto o benzo(a)pireno quanto os oito HPAs. É importante ressaltar que o número de amostras de cereais e café foi significativamente inferior ao das demais matrizes estudadas (EFSA, 2008a,b).

Neste contexto, o uso do benzo(a)pireno como marcador da presença de HPAs, proposto pelo comitê científico europeu SCF (EC, 2002b) tem sido questionado. Os dados do levantamento da EFSA (EFSA, 2008a,b) indicam, ainda, que a correlação entre o benzo(a)pireno e outros compostos da classe, como o pireno e o benzo(a)antraceno, também considerados tóxicos, foi baixa em produtos como peixe, crustáceos, chás e café. Das 9.714 amostras analisadas, compreendendo 95 grupos de matrizes alimentares do CODEX, 33 % apresentaram valores maiores que o limite de detecção para um ou mais HPAs prioritários, enquanto o benzo(a)pireno não foi detectado.

A avaliação da presença dos HPAs em matrizes alimentares diversas é descrita na literatura. Ziegenhals, Speer & Jira (2009) analisaram chocolates disponíveis no comércio da Alemanha, devido à possível contaminação por HPAs da manteiga de cacau usada como matéria prima. A presença destes compostos na aguardente de cana foi avaliada por Bettin & Franco (2005). Diferentes alimentos, incluindo produtos lácteos, cereais, farinhas e massas, panificados, produtos cárneos defumados e açúcares refinados, foram analisados quanto à presença de dez HPAs por Camargo & Toledo, (2002a). Segundo estes autores, o açúcar foi o alimento que apresentou a maior quantidade média de HPAs totais. Nesse caso a contaminação foi atribuída à queima da cana-de-açúcar, resultando em valores altos de HPAs no produto final mesmo após o processo de refinação do açúcar.

De 2009 a 2011, o MAPA efetuou monitoramento no pescado (cultivo e captura) para oito HPAs (benzo(a)pireno, benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, indeno(1,2,3-c,d)pireno, dibenzo(a,h)antraceno e benzo(g,h,i)perileno). O limite de referência estabelecido era de 2 µg/kg para benzo(a)pireno, o mesmo limite preconizado pelo Regulamento 1881/2006 da União

Européia (EC, 2006). Nenhuma amostra apresentou níveis maiores que o limite de quantificação (0,5 µg/kg). Esse monitoramento foi parte do Programa de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC) em carnes, leite, mel, ovos e pescado (BRASIL, 1999).

3.1.4 Regulamentação em alimentos

No Brasil, a legislação que trata sobre o limites de HPAs em alimentos é restrita. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) estabelece limite máximo para: água potável, 0,7 µg/L (BRASIL, 2004); óleo de bagaço ou caroço de oliva, 2,0 µg/kg (BRASIL, 2003); e para aromas de fumaça a serem utilizados em alimentos, 0,3 µg/kg (BRASIL, 2007). Em todas as legislações, considera-se apenas o composto benzo(a)pireno.

A União Europeia, em seu regulamento 1881/2006/CE, alterado pelo regulamento 835/2011/UE (UE, 2011a), fixou os teores máximos permitidos para HPAs em gêneros alimentícios. Os valores são mostrados na **Tabela 3**. Até 2011, o teor máximo era aplicado apenas para benzo(a)pireno. A alteração incluiu os compostos benzo(a)antraceno, benzo(b)fluoranteno e criseno, já que o monitoramento apenas do benzo(a)pireno mostrou-se ineficiente quanto a indicação da presença de HPAs em alimentos.

Já o regulamento 836/2011/UE (UE, 2011b) da União Europeia diz respeito aos métodos de amostragem e análise para o controle oficial dos níveis de chumbo, cádmio, mercúrio, estanho inorgânico, 3-monocloropropano-1,2-diol (3-MCPD) e benzo(a)pireno em produtos alimentares. No referido documento são destacados os critérios de desempenho para métodos de análise de HPAs (**Tabela 4**).

Tabela 3 - Limites máximos permitidos para hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) em diversos gêneros alimentícios adotados pela União Europeia

Gêneros alimentícios	Teores máximos de benzo(a)pireno (µg/kg)	Teores máximos para soma de benzo(a)pireno, benz(a)antraceno, benzo(b)fluoranteno e criseno (µg/kg)
Óleos e gorduras (com exceção da manteiga de cacau e do óleo de coco) destinados ao consumo humano direto ou à utilização como ingredientes alimentares	2,0	10,0
Grãos de cacau e produtos derivados	5,0 µg/kg de gordura a partir de 01.04.2013	35,0 µg/kg de gordura a partir de 01.04.2013 até 31.03.2015 30,0 µg/kg de gordura a partir de 01.04.2015
Óleo de coco destinado ao consumo humano direto ou como ingrediente alimentar	2,0	20,0
Carne defumada e produtos à base de carne defumada	5,0 até 31.08.2014 2,0 a partir de 01.09.2014	30,0 a partir de 01.09.2012 até 31.08.2014 12,0 a partir de 01.09.2014
Parte comestível de peixe defumado e produtos da pesca defumados. Para os crustáceos defumados, o teor máximo aplica-se à parte comestível dos apêndices e do abdômen. No caso dos caranguejos e crustáceos similares (<i>Brachyura</i> e <i>Anomura</i>) defumados, aplica-se à parte comestível dos apêndices	5,0 até 31.08.2014 2,0 a partir de 01.09.2014	30,0 a partir de 01.09.2012 até 31.08.2014 12,0 a partir de 01.09.2014
Espadilhas defumadas e espadilhas defumadas em lata (<i>Sprattus sprattus</i>); moluscos bivalves (frescos refrigerados ou congelados); carne tratada termicamente e produtos à base de carne tratada termicamente vendidos ao consumidor final	5,0	30,0
Moluscos bivalves (defumados)	6,0	35,0
Alimentos transformados à base de cereais e alimentos para bebês destinados a lactentes e crianças	1,0	1,0
Fórmulas para lactentes e fórmulas de transição, incluindo leite para bebês e leite de transição	1,0	1,0
Alimentos dietéticos destinados a fins medicinais específicos especificamente destinados a lactentes.	1,0	1,0

Fonte: EU (2011a).

Tabela 4 - Critérios de desempenho para métodos de análise de benzo(a)pireno, benzo(a)antraceno, criseno e benzo(b)fluoranteno

Parâmetro	Valor/Comentário
Aplicabilidade	Alimentos especificados no Regulamento (EC) n ^o 1881/2006
Limite de detecção	Menor do que 0,3 µg/kg
Limite de quantificação	Menor do que 0,9 µg/kg
Precisão	Valores Horrat _r ¹ ou Horrat _R ² menores do que 2
Recuperação	50 a 120 %
Seletividade ³	Livre de interferências de matriz ou espectrais, verificação de detecção positiva

Fonte: UE (2011b).

¹ Horrat_r: razão entre o desvio padrão relativo de repetibilidade do método e o desvio padrão relativo de repetibilidade, definido como 2/3 do desvio padrão relativo de reprodutibilidade obtido a partir das funções de Horwitz (1982) ou Thompson (2000).

² Horrat_R: razão entre o desvio padrão relativo de reprodutibilidade do método e o desvio padrão relativo de reprodutibilidade, obtido a partir das funções de Horwitz (1982) ou Thompson (2000).

³ Termo utilizado na referência é *Especificidade*.

3.2 CAFÉ

Com a finalidade de produção comercial, existem duas variedades principais de café produzidas: *Coffea arábica L.* (café arábica) e o *Coffea canephora Pierre* (café robusta ou conilon). O primeiro é cultivado principalmente na América do Sul, na América Central, no Quênia e na Tanzânia. O segundo é cultivado no Vietnã, no Brasil, na Indonésia, na Costa do Marfim e em outros países da Ásia, África e Oceania. O arábica propicia um café de melhor qualidade (menos áspero e menos cafeinado), porém com custo de produção mais elevado (RUFINO & ARÊDES, 2009).

A qualidade dos grãos de café arábica determina o preço de mercado, alcançando valores 20 a 25 % superiores aos da espécie robusta. Vale a pena ressaltar que a maioria do café torrado é comercializado como mistura das duas espécies, o chamado *blend* (ESTEBAN-DIEZ *et al.*, 2007).

3.2.1 Agronegócio e consumo nacional

O Brasil destaca-se como maior produtor e exportador de café. Segundo dados do MAPA (2013) a produção no Brasil no ano de 2012 atingiu 50,8 milhões de sacas, com 25,4 % de participação em relação ao total das exportações mundiais do produto. O segundo maior produtor mundial é o Vietnã, com 26 milhões de sacas, seguido da Indonésia, 8,3 milhões de sacas, e Colômbia, 7,7 milhões de sacas (USDA, 2013).

Verifica-se que o estado de Minas Gerais é o maior produtor de café do país, conforme dados históricos e estimativa da Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB) (CONAB, 2013) mostrada na **Figura 3**. Na safra de 2012, foram produzidas mais de 26,9 milhões de sacas de café nesse estado, sendo quase a totalidade de café arábica. No estado do Espírito Santo, segundo maior produtor, com pouco mais de 12,5 milhões de sacas produzidas em 2012, o café conilon tem expressão econômica bem maior que o arábica (ABIC, 2013a).

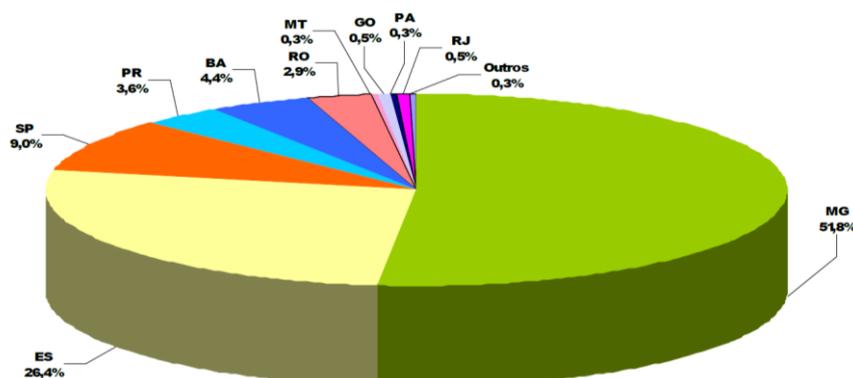


Figura 3 - Estimativa da participação percentual na produção de café para safra 2013 por Unidade Federativa no Brasil.

Fonte: CONAB (2013).

O consumo interno brasileiro de café vem crescendo ano a ano. Isso é provado pela ampliação do espaço dedicado ao café nos supermercados, pela abertura de lojas especializadas em cafés, como acontece no mercado americano e europeu (RUFINO & ARÊDES, 2009). No período compreendido entre novembro de 2011 a outubro de 2012, a ABIC registrou o consumo de 20,33 milhões de sacas, representando um acréscimo de 3,09 % em relação ao período anterior correspondente (ABIC, 2013a).

Tanto o consumo doméstico, quanto o consumo fora do lar, apresentaram taxas de crescimento positivas. Já o consumo per capita foi de 6,23 kg de café em grão cru ou 4,98 kg de café torrado, quase 83 L para cada brasileiro por ano, registrando uma evolução de 2,10 % em relação ao período anterior. Este resultado aproxima o consumo per capita brasileiro ao da Alemanha (5,86 kg/habitante/ano) e já supera os índices da Itália e da França, que são grandes consumidores de café. Os campeões de consumo, entretanto, ainda são os países nórdicos - Finlândia, Noruega, Dinamarca - com um volume próximo dos 13 kg/por habitante/ano (ABIC, 2013a).

Entre as razões que justificam o aumento do consumo interno, destacam-se a melhora da qualidade da produção brasileira e a percepção do público com relação aos

benefícios do café para a saúde humana (ABIC, 2013a), com destaque para compostos bioativos do café ou compostos com atividades funcionais antioxidantes (PINO-GARCÍA, *et al.*, 2012; LIM *et al.*, 2012; SIROTA *et al.*, 2013).

3.2.2 Processamento

Após a colheita, os frutos que fornecem os grãos de café passam por um processamento com finalidade de originar um produto comercializável.

No processamento que origina os cafés naturais, os frutos, após a lavagem e separação das frações cereja e verde da porção bóia, são encaminhados para a secagem (EMBRAPA, 2004).

O processamento por via úmida pode originar os cafés cereja descascados, despulpados e desmucilados. Após a limpeza, os frutos passam por despulpamento, fermentação e lavagem. O despulpamento consiste na retirada da polpa (exocarpo e parte do mesocarpo) dos frutos, utilizando-se água. Mesmo após a retirada da polpa, os grãos ainda estão cobertos por uma mucilagem (mesocarpo) que deve ser retirada para facilitar a etapa da secagem. Essa mucilagem é hidrolisada por fermentação e posteriormente retirada por lavagem (BORGES, 2003).

A secagem pode ser realizada em terreiros ou em secadores mecânicos, utilizando a ventilação natural ou forçada por meio de ventiladores e ar aquecido. Para o aquecimento do ar são utilizados dispositivos denominados fornalhas ou queimadores. A fornalha de fogo indireto tem seu uso mais frequente. Nela, o ar que entra em contato com o café é isento de impurezas e odores que podem alterar a qualidade final do café. Já a fornalha de fogo direto produz fumaça, que entra em contato com o café e pode levar a contaminação do produto final (REINATO, 2002). Após a secagem, os grãos de café passam por processos de descascamento, classificação por tamanho, separação e armazenamento. A partir daí os grãos de café estão prontos para serem comercializados (BORGES, 2003).

3.2.2.1 Torração

O processo de torrefação é dependente do tempo e da temperatura e induz mudanças químicas nos grãos de café, podendo ser dividido em três fases: secagem, torrefação propriamente dita e resfriamento (SANTOS, 2004).

No início do processo o café perde sua água livre, enquanto sua temperatura permanece constante ao redor de 100 a 104 °C. Quando toda a água livre ($\pm 10\%$) do

grão é evaporada, a temperatura deste eleva-se lentamente, enquanto que a água ligada (1 a 2 %) evapora-se também vagarosamente. Quando a temperatura do grão estiver em torno de 200 °C, a absorção de calor pelo grão é intensificada pela liberação de calor produzido nas reações de pirólise, que se processam no interior deste. Alguns produtos dessas reações, formados durante a torra do café, são açúcares caramelizados, carboidratos, aldeídos, ácido acético, cetonas, furfural, ésteres, ácidos graxos, CO₂ e sulfetos. (SILVA, 2008a). O aquecimento dos óleos naturais vegetais (glicerídeos) na presença da água e ácidos propicia hidrólise, gerando glicerina e ácidos gordurosos. Com a liberação dos óleos coloidais durante o processo, há formação de uma fumaça vermelha. A torração promove a ruptura da estrutura celular dos grãos, liberando o óleo que estava ligado quimicamente, estes óleos iniciam um processo de movimentação livre pelos grãos, possibilitando evidenciar fisicamente as gotículas superficiais nos grãos que são submetidos a um grau de torração mais intenso (SIVETZ & FOOTE, 1963 citado por SILVA, 2008b).

O grau de torração é determinado por meio da cor externa do grão, do sabor desenvolvido, da perda de massa seca e de mudanças químicas de componentes selecionados. A evolução do processo de torrefação tem sido intensa nos últimos anos, permitindo redução no tempo de torrefação, de trinta para apenas cinco minutos, e na temperatura do processo, de 900°C para próxima de 200°C. (MORAES, 2006) Em geral, os tempos do processo variam de menos de cinco minutos para torrações “rápidas”, de doze a dezoito minutos para torrações “convencionais”. Entretanto, muitas delas são realizadas entre cinco e nove minutos (GODINHO, 2003). A temperatura da etapa de torração ocorre entre 182 e 240 °C (SANTOS, 2004).

Os cafés brasileiros caracterizam-se por apresentar, em geral, torração excessiva com baixa qualidade de bebida (MOURA *et al.*, 2001). Segundo ABIC (2013 b) o processo de torração deve ser controlado por classificação feita por meio do Sistema Agtron / *Roast Classification Color Disk* ou por instrumento similar de detecção eletrônica de cores, colorímetro, que dê resultado equivalente. A recomendação descrita para cafés torrados em grão ou torrados e moídos é de ponto de torra variando entre 45 e 75 pontos no *Disco Agtron*, ou equivalente. Isso corresponde à classificação denominada *Moderadamente Escura a Moderadamente Clara*. Torras que levam à classificação *Escura* ou *Muito Escura*, assim como *Clara* e *Muito Clara* devem ser evitadas.

Diferentes tratamentos de torração modificam a composição final do produto. Temperaturas excessivas durante a torração causam mudanças químicas indesejáveis,

demandando controle considerável no processo para a obtenção de produto final com qualidade (GODINHO, 2003).

3.2.3 Estudos de contaminação por HPAs no Brasil e no mundo

Não existem definidos limites nacionais ou internacionais para presença de HPAs em café. Os dados encontrados na literatura sobre a ocorrência dos HPAs em café são escassos, porém recentes, o que indica a crescente preocupação com o assunto nos últimos anos.

Camargo & Toledo (2002b) estudaram a contaminação de amostras de café por dez HPAs, avaliando o pó e a bebida pronta para consumo. As somas dos valores médios dos HPAs detectados no pó de café foram de 20,04 µg/kg. Os resultados da análise da bebida indicaram que a técnica de preparo influencia na transferência destes contaminantes do pó para a bebida pronta. A concentração encontrada foi de 3,06 µg/kg na bebida preparada pela filtragem direta da água fervida sobre o pó de café, e 17,17 µg/kg para a bebida preparada com fervura do pó com a água antes da filtração.

Badolato *et al.* (2006) pesquisaram a ocorrência de benzo(a)pireno em grãos crus de café robusta e arábica em café torrado em diferentes graus de torrefação. Os resultados mostraram clara influência do processo de torrefação na formação do composto. Os valores encontrados para benzo(a)pireno foram de até 12,5 µg/kg para amostras com torrefação mais severa. Não foi detectada a presença de benzo(a)pireno em amostras de café verde.

O efeito da torrefação na formação de onze HPAs foi estudado de forma mais detalhada por Houessou *et al.* (2007). Foi utilizado torrador em escala piloto, de forma que permitisse o ajuste das condições para o experimento. Várias condições de torração foram realizadas em temperaturas entre 180 e 260 °C, e tempo entre 5 e 20 minutos. Quantidades significativas de benzo(a)antraceno e criseno, cerca de 13 µg/kg, foram encontradas quando utilizadas temperaturas próximas a 260 °C. Segundo os autores, provavelmente, os HPAs de baixa massa molecular foram formados em condições brandas de torração e degradados, formando HPAs de maior massa molecular (e mais tóxicos), com o aumento da temperatura. A formação do composto benzo(a)antraceno aumentou de forma linear com o aumento da temperatura. Para os demais compostos, não foi possível correlacionar sua formação com o tempo de torração. Os autores sugeriram maiores estudos e uso de modelos matemáticos mais complexos para o estudo do tempo do processo de torração como condição para a

formação dos HPAs. Curiosamente, o benzo(a)pireno não foi encontrado em níveis significantes, mesmo nas maiores temperaturas e tempos de torração. Grãos de café verde foram analisados, revelando a presença de fenantreno, fluoranteno e pireno.

O benzo(a)pireno, assim como benzo(a)antraceno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno e indeno(1,2,3-c,d)pireno foram encontrados por Stanciu *et al.* (2008) na maioria das amostras de café torrado, instantâneo e descafeinado disponíveis comercialmente na Romênia. Porém, as concentrações encontradas foram consideradas baixas. O composto presente em maior concentração foi o benzo(a)pireno, num máximo de 0,857 µg/kg para o café instantâneo. No café verde analisado, foram encontrados apenas traços de HPAs (0,023 µg/kg).

Em estudo realizado na Korea, 10 amostras de café torrado foram analisadas, estando o benzo(a)pireno abaixo do limite de quantificação (0,10 µg/kg) em 4. Quando quantificado, este composto apresentou concentrações de até 0,36 ± 0,2 µg/kg. Apesar da baixa concentração para o benzo(a)pireno, foram encontradas concentrações altas de benzo(k)fluoranteno em duas amostras, chegando a 48,72 ± 9,38 µg/kg (LEE & SHIN, 2010)

No Brasil, Tfouni *et al.* (2012) reportaram níveis de até 0,814 µg/kg para o somatório dos quatro HPAs de maior massa molecular em café torrado. Apesar dos baixos níveis encontrados, os autores ressaltaram a necessidade de levantamento de maior número de dados sobre a contaminação de HPAs em café torrado no Brasil.

Nos estudos nos quais foi investigada a relação entre os níveis de HPAs formados e as diferentes cultivares ou espécies de café (BADOLATO *et al.*, 2006; TFOUNI *et al.*, 2012), correlação significativa não foi observada.

3.3 MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DE HPAs

3.3.1 Extração e purificação

Os métodos tradicionais para extração dos HPAs de matrizes alimentares e sua conseqüente purificação são laboriosos e demandam grande quantidade de solvente. Usualmente, envolvem saponificação da amostra com solução de hidróxido de potássio, seguida de partição líquido-líquido em solventes orgânicos e purificação em coluna utilizando sílica gel, alumina ou florisil como fase estacionária (CAMARGO & TOLEDO, 2002a,b; BADOLATO *et al.*, 2006; ZHENG, 2006; STANCIU *et al.*, 2008). Esses métodos apresentam desvantagens significativas, entre elas a necessidade de

uso de solventes de alta pureza e a formação de emulsões difíceis de serem quebradas, que podem afetar a recuperação para alguns analitos (ORECCHIO, CIOTTI & CULOTTA, 2009). A necessidade da etapa de saponificação para a determinação quantitativa dos HPAs é controversa. Houessou, Delteil & Camel (2006) consideraram essa etapa importante para a eliminação de interferentes. Contudo, Moret *et al.* (2007), mostraram ser possível a extração sem utilização desta etapa, enfatizando ainda que este processo poderia levar a perdas dos analitos de interesse.

A busca por maior confiabilidade desses métodos, associada às questões ambientais e de sustentabilidade, têm impulsionado o desenvolvimento de novas tecnologias para extração e purificação de amostras, além da miniaturização de sistemas analíticos. Alguns autores utilizam a cromatografia de permeação em gel (CPG) para remoção de lipídios e compostos de alta massa molecular (JIRA, 2004; LIGOURI *et al.*, 2006). Porém, prevalece a técnica de extração em fase sólida, na qual o volume de solvente e tempo gasto são consideravelmente menores quando comparados à extração líquido-líquido, além de permitir automação (WEIßHAAR, 2002; TOBISZEWSKI *et al.*, 2009). Cartuchos com 2 g de C₁₈ e florisil foram usados por TEIXEIRA, CASAL & OLIVEIRA (2007) para amostras de óleos comestíveis. Houessou *et al.* (2005) avaliaram a eficiência de extração com cartuchos de C₁₈ (0,5 g) e com o copolímero polistireno-divinilbenzeno (PS-DVB) (0,2 e 0,5 g) para amostras de bebida de café. Essa fase, também utilizada por Veyrand *et al.* (2007), é seletiva para os HPAs devido a sua lipofilicidade e capacidade de formar ligações π - π com o anel aromático dos HPAs. Os resultados encontrados por Houessou *et al.* (2005) indicaram recuperação semelhante para as duas fases sólidas estudadas, embora melhor repetibilidade tenha sido observada com o uso da fase PS-DVB (0,5 g).

Em trabalhos subsequentes deste grupo (HOUESSOU, DELTEIL & CAMEL, 2006; HOUESSOU *et al.*, 2007), cartuchos com sílica foram empregados para a purificação dos HPAs em extratos de amostras de café verde e torrado. Tais amostras foram primeiramente extraídas em sistema de extração líquida pressurizada. Foi necessária a saponificação e partição com ciclohexano para eliminação dos interferentes.

Stanciu *et al.* (2008) empregou coluna empacotada com sílica, óxido de alumínio e sulfato de sódio anidro, após extração líquido-líquido para a purificação de extratos de café verde e torrado, obtendo recuperações adequadas.

3.3.1.1 Extração Líquida pressurizada

A extração líquida pressurizada (ELP), do inglês *Pressurized Liquid Extraction (PLE)* ou *accelerated solvent extraction (ASE)*, é um tipo de extração que utiliza solventes orgânicos convencionais sob elevadas temperatura (100 a 180 °C) e pressão ($6,9 \times 10^6$ a $1,0 \times 10^7$ Pa) para realizar a extração de analitos orgânicos em amostras sólidas ou semisólidas. Seu uso teve início em 1995, e em 1996 foi aprovado como método padrão EPA para análise de contaminantes orgânicos, como pesticidas, herbicidas clorados, bifenilas policloradas (PCB) e dioxinas, em matrizes ambientais (MITRA, 2003).

A temperatura e pressão elevadas têm efeito no solvente, na amostra e na interação entre eles. O solvente tem seu ponto de ebulição aumentado, o que possibilita que a extração ocorra sob maior temperatura, resultando em menores viscosidade e tensão superficial. Em alta temperatura a solubilidade do analito aumenta, resultado do enfraquecimento de interações como força de Van der Waals e pontes de hidrogênio, permitindo uma transferência de massa mais rápida. A alta pressão também permite que o solvente penetre mais profundamente na matriz. Esse conjunto de fatores propicia uma extração mais rápida e com melhores recuperações (MITRA, 2003).

Na **Figura 4** encontra-se apresentado um diagrama geral de funcionamento de um equipamento de ELP. O sistema é automatizado e consiste de seis etapas principais: i) após a adição de quantidade conhecida de amostra à cela de extração e colocação no carrossel, a cela é levada ao forno e aquecida até a temperatura desejada; ii) a cela é preenchida com solvente; iii) inicia-se a extração estática à pressão constante pelo tempo programado; iv) a válvula estática é aberta e o extrato coletado; v) a amostra é lavada com uma quantidade definida de solvente novo (volume de rinsagem). Esse ciclo de extração pode ser repetido até cinco vezes para aumentar a recuperação dos analitos de interesse; vi) ao final do processo, o solvente é purgado com fluxo de nitrogênio (tempo de purga). Em média, de um a três ciclos de extração de até 15 mins são suficientes. O volume de solvente é reduzido quando comparado à extração por soxhlet (WANG *et al.*, 2007).

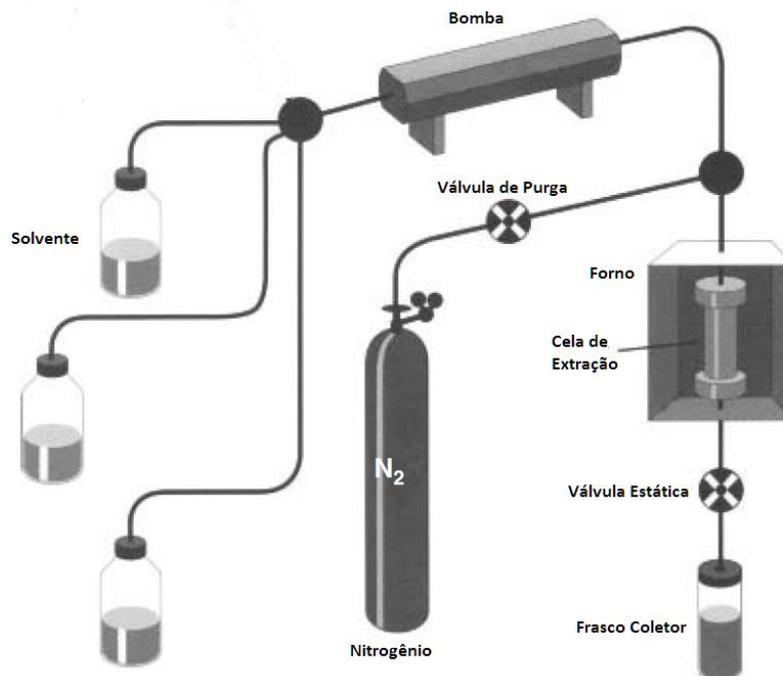


Figura 4 - Diagrama de funcionamento de um equipamento de extração líquida pressurizada - Thermo/Dionex modelo ASE 350[®].

Fonte: MITRA (2003).

Muitos autores demonstraram a eficiência do uso da ELP para análises de HPAs. Wang (2007) comparou as técnicas de ELP, Soxhlet e extração por solvente assistida por microondas (MAE) para extração de HPAs em amostras de solos. Segundo o autor, a ELP apresentou maior eficiência de extração, além das vantagens já descritas anteriormente. Resultados similares foram obtidos por Poop, Mooder & Paschke(1997).

A ELP realizada em equipamento como o Thermo/Dionex modelo ASE 350[®] permite, ainda, a adição de adsorventes na cela de extração para que seja feita purificação simultânea à extração. Para matrizes de menor complexidade, é possível a realização do método de extração/purificação em apenas uma etapa (KIM *et al.*, 2003), porém a maioria dos autores utiliza opção de pré-purificação dentro da cela, de forma a simplificar uma posterior purificação. Os adsorventes mais utilizados são retentores de gordura, como alumina, sílica ou florisil (LIGUOURI *et al.*, 2006; LUND, DUEDAHL-OLESEN & CHRISTENSEN, 2009; VEYRAND *et al.*, 2007).

3.3.2 Determinação

Muitos autores reportam o uso de CLAE com detector de FL como técnica de detecção e quantificação para análise de HPAs (CAMARGO & TOLEDO, 2002a,b; WEIßHAAR, 2002; HOUESSOU *et al.*, 2005; BADOLATO *et al.*, 2006; HOUESSOU,

DELTEIL & CAMEL, 2006). Porém, CG também é amplamente utilizada (ZAMPERLINNI, SIVA-SANTIAGO & VILEGAS, 2000; DILETTI *et al.*, 2004; ZHENG *et al.*, 2006; MORET *et al.*, 2007; ORECCHIO, CIOTTI & CULOTTA, 2009). Poster (2006) considerou que a CG apresenta melhor seletividade, resolução e sensibilidade quando comparada a cromatografia líquida para esses compostos. Este autor considera, ainda, a facilidade da CG ser acoplada a EM, permitindo a confirmação da presença do composto de interesse e sua quantificação, levando à preferência pela CG. Outro fator importante são as propriedades térmicas dos HPAs, que os tornam facilmente volatilizáveis, sem serem degradados com o aumento da temperatura.

Um estudo sobre o perfil do espectro de massas dos HPAs foi realizado por Veyrand *et al.* (2007) durante desenvolvimento de método para análise desses contaminantes em alimentos. Segundo este autor, a pequena fragmentação observada quando se utiliza ionização por impacto de elétrons em condições usuais é resultante da estabilidade da molécula. Dessa forma, observa-se o íon molecular em grande intensidade, ou a presença de íons com perda de dois hidrogênios. A mesma observação foi feita por Poster (2006), concluindo que isso confere sensibilidade à técnica. Essa característica dificulta o uso de EM sequencial, na qual o íon formado (precursor) é fragmentado em íons produto específicos, aumentando ainda mais a seletividade da EM.

A CLAE acoplada a EM tem maior utilização para amostras ambientais devido aos maiores limites de detecção em relação às outras técnicas, ocasionada pelo caráter apolar dos HPAs (PURCARO, MORET & CONTE, 2013), sendo que apenas recentemente esta falta de sensibilidade passou a ser superada (GOSETTI, 2011; CAI, STEVENSB & SYAGEA, 2012).

3.3.3 Recurso do padrão interno

A diluição isotópica consiste na modificação da composição isotópica natural de um analito alvo, presente na amostra, pela adição de uma quantidade conhecida de um análogo isotopicamente marcado (padrão interno) (SARGENT, HARTE & HARRINGTON, 2002).

A técnica de EM com diluição isotópica foi inicialmente desenvolvida durante a década de 1950 para a análise elementos inorgânicos. A partir de 1970, foi estendida para o campo da química orgânica, com aplicações em análise de traços, como poluentes orgânicos persistentes e em análises clínicas (SARGENT, HARTE &

HARRINGTON, 2002; MECHLINSKA, WOLSKA & NAMIESNIK, 2010). Na EM, ao contrário de técnicas espectrofotométricas, não existe uma relação fixa entre a quantidade ou concentração de uma substância em particular e a resposta do instrumento. A sensibilidade para um mesmo composto pode variar ao longo do tempo ou de acordo com a calibração do equipamento. Estas variações são somadas às variações causadas, por exemplo, por perdas durante a extração analítica ou pela introdução da amostra no sistema cromatográfico. O padrão interno, adicionado ao início da etapa analítica permite a compensação de perdas e erros ao longo de todo o processo analítico (SARGENT, HARTE & HARRINGTON, 2002).

O critério mais importante na escolha do padrão interno é que o composto mimetize, tão próximo quanto possível, as propriedades físico-químicas do analito alvo. Isso é alcançado com o uso de moléculas análogas, isotopicamente marcadas com ^{13}C , ^2H ou ^{37}Cl . Dessa forma, se ocorre perda do analito alvo, a perda do padrão interno será da mesma ordem de magnitude, já que ambas foram submetidas ao mesmo tratamento. Como a quantidade do padrão interno adicionada a amostra é conhecida, o percentual de recuperação pode ser calculado e utilizado como uma medição indireta da recuperação do analito alvo (MECHLINSKA, WOLSKA & NAMIESNIK, 2010).

O uso de EM com diluição isotópica é frequentemente utilizado nas análises de HPAs. De fato, quase a totalidade dos trabalhos publicados com uso de EM, adotam esse recurso (JIRA, 2003; KIM, 2003; DILETTI, 2004; MARTINEZ, 2004; LIGOURI, 2006; VEYRAND, 2007; LEITE, 2008; LUND, DUEDAHL-OLESEN & CHRISTENSEN, 2009; ORECCHIO, CIOTTI & CULOTTA, 2009). Desta forma, os métodos de extração usualmente longos e a volatilidade dos compostos fazem o uso da diluição isotópica quase uma necessidade para esse tipo de análise, permitindo um ganho de acurácia a níveis aceitáveis mesmo em baixas concentrações ($\mu\text{g}/\text{kg}$).

3.4 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS

Apesar do significativo número de trabalhos publicados sobre o desenvolvimento de novas metodologias e equipamentos para determinação dos HPAs em amostras, principalmente, da área ambiental, a questão da determinação de HPAs não pode ser considerada como resolvida. Estudos demonstram limitações das técnicas analíticas contemporâneas para obtenção de informações confiáveis em relação aos níveis e

formas de ocorrência de HPAs no ambiente. Isto tem persuadido os analistas para uma nova ótica em relação à determinação destes compostos, presentes em níveis baixos de concentração em amostras de composição altamente variável e complexa, o que compreende questões de controle e garantia da qualidade dos resultados (KONIECZKA, WOLSKA & NAMIESNIK, 2010). No contexto de gestão, garantia e controle da qualidade dos resultados analíticos, a validação de métodos é uma ferramenta de fundamental importância.

3.4.1 Validação no processo analítico

O processo analítico pode ser didaticamente dividido nas etapas de desenvolvimento, otimização, validação, aplicação e revalidação do método (BRUCE, MINKKINEN & RIEKKOLA, 1998). Contudo, do ponto de vista prático, é difícil separar as diferentes fases do processo analítico. A validação é tratada muitas vezes como parte integrante do desenvolvimento, indicando que o desenvolvimento do método somente poderia ser considerado completo após avaliação e demonstração de performance analítica aceitável, ou seja, o desenvolvimento e validação de métodos são considerados processos iterativos (GREEN, 1996; HUBER, 1998). O guia publicado pela EURACHEM (1998) considera a validação de métodos intimamente vinculada ao desenvolvimento sendo que, muito freqüentemente, não é possível determinar o ponto no qual o desenvolvimento de um método termina para dar início à validação. Isto porque muitos dos parâmetros de desempenho associados à validação do método são normalmente avaliados como parte do desenvolvimento. O processo de validação tem sido dividido, ainda, em dois estágios, sendo uma “pré-validação” conduzida durante o desenvolvimento do método e outra validação “formal” após o desenvolvimento ter sido completado (JENKE, 1996).

3.4.2 Validação em sistemas de gestão

A norma ISO/IEC 17025 (ABNT, 2005) representa a síntese da experiência acumulada em todo o mundo em avaliações e na demonstração da competência de laboratórios. Esta norma contém requisitos de direção e técnicos que devem ser atendidos pelos laboratórios para implementação e manutenção de um sistema de gestão laboratorial adequado. Dentre os requisitos técnicos abordados estão: pessoal; acomodações e condições ambientais; métodos e validação de métodos;

equipamentos; rastreabilidade da medição; amostragem; manuseio de itens (amostras); garantia da qualidade de resultados; e apresentação dos resultados.

Todos os requisitos exigidos pela norma são essenciais e estão integrados no âmbito de sistemas de gestão laboratoriais e de processos de acreditação. Desta forma, embora os objetivos específicos de ferramentas como validação de métodos, controle de qualidade interno e participação em programas de comparação interlaboratorial ou ensaios de proficiência sejam diferentes, estas ferramentas possuem características complementares no processo de garantia da confiabilidade e comparabilidade dos resultados (SOUZA, 2007).

Na norma ISO/IEC 17025 é estabelecido que métodos normalizados utilizados fora dos escopos para os quais foram concebidos, ampliados ou modificados; métodos não normalizados; e métodos criados ou desenvolvidos pelos laboratórios devem ser validados. Apesar de não tratar da necessidade de validação para métodos normalizados, nesta norma é definido que os laboratórios devem confirmar que têm condições de operar adequadamente os métodos normalizados antes da implantação dos ensaios (ABNT, 2005). Os métodos normalizados são aqueles desenvolvidos por um organismo de normalização ou outras organizações, cujos métodos sejam aceitos pelo setor técnico em questão. Métodos não normalizados são aqueles desenvolvidos pelo próprio laboratório ou outras partes, ou adaptados a partir de métodos normalizados e validados (ILAC, 2010). Neste contexto, assume-se que os métodos designados como normalizados tenham sido submetidos a validações prévias por estudos colaborativos (MAC NEIL, PATTERSON & MARTZ, 2000). Frequentemente, isto procede, visto que a escolha de um método como oficial ou padrão requer que dados de precisão sejam incluídos (WOOD, 1999) e baseados em resultados obtidos de estudos colaborativos (HUND, MASSART & SMEYERS-VERBEKE, 2000).

3.4.3 Validação intralaboratorial

Validações intralaboratoriais correspondem a estudos analíticos que envolvem um único laboratório, utilizando um mesmo método, para analisar a mesma ou diferentes amostras, sob diferentes condições, em um intervalo de tempo justificado (EC, 2002a). Estes estudos permitem a avaliação do desempenho de métodos com um número considerável de experimentos, utilizando diferentes combinações de analitos, concentrações e matrizes, em um curto intervalo de tempo, facilmente adaptáveis à diferentes situações. As validações intralaboratoriais atendem um importante nicho de processos de validação de métodos devido à sua flexibilidade e habilidade em fornecer

resultados rápidos para novos métodos (VAN DER VOET, VAN RHIJN & VAN DE WIEL, 1999).

Procedimentos de validação intralaboratoriais têm sido internacionalmente aceitos, uma vez que diferentes organismos internacionais EURACHEM (1998); EC (2002a); *Association of Official Analytical Chemists (AOAC International)*, *International Standards Organization (ISO)* e *International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC)* (THOMPSON, ELLISON & WOOD, 2002) e nacionais INMETRO (2010) e BRASIL (2011) têm proposto documentos orientativos para este tipo de validação.

Processos de validação intralaboratorial permitem avaliar não somente a exatidão e a precisão de um método, mas também outros parâmetros de desempenho (VAN DER VOET, VAN RHIJN & VAN DE WIEL, 1999) como linearidade, faixa de trabalho, sensibilidade, efeitos de matriz, seletividade, limites de detecção e de quantificação (SOUZA, 2007). Por outro lado, trabalhar isoladamente reduz, de forma inevitável, a quantidade de dados obtidos, restringindo informações como, por exemplo, àquelas relativas à comparabilidade interlaboratorial. Apesar da impossibilidade de estudo do parâmetro reprodutibilidade nas validações intralaboratoriais, o que exigiria a execução de experimentos em diferentes laboratórios, esta informação nem sempre é necessária (EURACHEM, 1998). Muitas vezes, estudos de reprodutibilidade parcial são suficientes (VAN DER VOET, VAN RHIJN & VAN DE WIEL, 1999). Também é possível ter uma estimativa da comparabilidade de resultados de medição de qualquer método com outros métodos pelo ensaio de materiais de referência certificados ou pela comparação do método em estudo com outro para o qual a validação já tenha sido feita (SOUZA, 2007).

3.4.4 Parâmetros de desempenho

Parâmetro de desempenho é definido pela EC (2002a) como uma qualidade funcional que pode ser atribuída a um método de ensaio.

Os parâmetros de desempenho típicos na validação intralaboratorial de métodos de ensaio quantitativos são: aplicabilidade, seletividade, linearidade da curva de calibração, sensibilidade, faixa de trabalho, efeitos de matriz, exatidão, precisão, limites de detecção e quantificação e robustez (THOMPSON, ELLISON & WOOD, 2002).

3.4.4.1 Linearidade, sensibilidade e faixa

Calibração é um procedimento que determina a diferença sistemática existente entre um sistema de medição e um sistema de referência representado por um material de referência e seus valores aceitos (ISO, 1996). Considerando que a maioria dos métodos de ensaio em análises de alimentos utiliza relações lineares, a determinação da equação de calibração é extremamente importante tanto em ensaios de rotina quanto em procedimentos de validação de métodos (RSC, 2005).

Linearidade é a habilidade de um método analítico em produzir resultados que sejam diretamente proporcionais à concentração do analito em amostras, em uma dada faixa de concentração (EURACHEM, 1998). Mais ainda, uma adequada avaliação da linearidade é fundamental para a qualidade dos demais parâmetros de desempenho estabelecidos para métodos quantitativos (como sensibilidade, efeitos de matriz, seletividade, exatidão, precisão e limites) (SOUZA, 2007). Entretanto, exceto quando ocorrem grandes erros no preparo das curvas, os erros devidos à calibração correspondem aos menores componentes na compilação da incerteza total (THOMPSON, ELLISON & WOOD, 2002).

A sensibilidade é o gradiente da função de calibração, ou seja, a alteração na resposta do instrumento que corresponde a uma mudança na concentração do analito (EURACHEM, 1998; THOMPSON, ELLISON & WOOD, 2002).

As faixas de trabalho e linear podem ser diferentes para diferentes matrizes, de acordo com o efeito de interferentes provenientes de cada matriz. A avaliação destas faixas é essencial para o entendimento da aplicabilidade de um método de ensaio (INMETRO, 2010) e também útil para o planejamento do grau de calibração que será requerido na aplicação do método em atividades de rotina (EURACHEM, 1998; TAVERNIERS, DE LOOSE & VAN BOCKSTAELE, 2004; INMETRO, 2010). A faixa de trabalho deve cobrir a faixa de aplicação para a qual o ensaio vai ser usado e a concentração mais esperada da amostra deve, sempre que possível, se situar no centro da faixa de trabalho. No limite inferior da faixa, o fator limitante é o valor do limite de quantificação. No limite superior, os fatores limitantes dependem do sistema de resposta do equipamento de medição. Dentro da faixa de trabalho pode existir uma faixa de resposta linear e dentro desta, a resposta do sinal terá uma relação linear com o analito ou valor da propriedade (INMETRO, 2010).

3.4.4.2 Efeitos de matriz e seletividade

Uma amostra consiste do analito a ser medido, da matriz e de outros componentes que podem ter algum efeito na medição, mas que não se quer detectar ou quantificar (BRUCE, MINKKINEN & RIEKKOLA, 1998; INMETRO, 2010). A seletividade é um parâmetro de desempenho relacionado ao evento de detecção do analito na presença destes componentes. Este parâmetro possui grande importância, principalmente quando se considera a área de análises de alimentos, na qual as matrizes são misturas de constituições químicas complexas (SOUZA, 2007).

Dependendo de como a identidade do analito é estabelecida, interferentes podem inibir a detecção distorcendo o sinal proveniente do analito. Diferentemente, os interferentes também podem contribuir para o sinal atribuído ao analito, com efeito de aumentar a concentração do mesmo (EURACHEM, 1998). A medição pode ser alterada porque matriz, reagentes ou outros componentes afetam a sensibilidade do detector que mede o analito ou porque estes compostos afetam diretamente a resposta. Assim, efeitos de erros constantes devidos a interferentes e erros proporcionais à calibração devidos a efeitos de matriz podem estar presentes ao mesmo tempo (BRUCE, MINKKINEN & RIEKKOLA, 1998).

Estudos dos efeitos de matriz correspondem um tipo específico de estudo de seletividade que objetiva averiguar possíveis interferências causadas por elementos diversos que compõem a matriz amostral. Efeitos de matriz não significativos simplificam enormemente o processo de validação e de rotina analítica, visto que os padrões dos analitos podem ser preparados diretamente no solvente (THOMPSON, ELLISON & WOOD, 2002).

3.4.4.3 Veracidade e precisão

Veracidade e precisão são consideradas os parâmetros de validação mais importantes (TAVERNIERS, DE LOOSE & VAN BOCKSTAELE, 2004). A precisão diz respeito à distribuição dos erros aleatórios de um sistema de medição, enquanto a veracidade expressa os erros sistemáticos (ISO, 1993; RSC, 2003).

A veracidade é o grau de concordância entre o valor médio de uma grande série de resultados de ensaios e o valor de referência aceito, sendo geralmente expressa como erro sistemático ou tendência. É declarada quantitativamente em termos de tendência (*bias*) ou erro sistemático, com pequenas tendências indicando veracidade (EC, 2002a; THOMPSON, ELLISON & WOOD 2002). Para avaliação da veracidade de um método são utilizados materiais de referência certificados (MRC), materiais de

referência (MR), métodos de referência ou ensaios de adição/recuperação (THOMPSON, ELLISON & WOOD 2002).

Precisão é o grau de concordância entre resultados de ensaios independentes obtidos em condições, pré-estabelecidas, específicas. O valor da precisão é geralmente expresso em termos de imprecisão e normalmente calcula-se sob a forma de um desvio padrão do resultado do ensaio. Uma menor precisão é indicada por elevado desvio padrão (EC, 2002a; THOMPSON, ELLISON & WOOD 2002). As três condições mais comuns para obtenção da precisão são repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade (INMETRO, 2010). A repetibilidade avalia a variabilidade encontrada quando resultados independentes são obtidos utilizando o mesmo método, em um mesmo laboratório, com o mesmo analista, usando o mesmo equipamento em um curto intervalo de tempo. A reprodutibilidade representa a variabilidade encontrada quando resultados são obtidos utilizando o mesmo método, em laboratórios diferentes, com diferentes analistas e usando equipamentos diferentes. A precisão intermediária refere-se à precisão avaliada utilizando o mesmo método, no mesmo laboratório, mas variando condições como: diferentes analistas; diferentes equipamentos; diferentes tempos. A precisão, tanto sob condições de repetibilidade quanto de reprodutibilidade, é dependente da concentração do analito (EURACHEM, 1998; THOMPSON, ELLISON & WOOD 2002).

3.4.4.4 Limites e incerteza

A habilidade em detectar um composto presente na amostra, mesmo em concentrações extremamente baixas, é relacionada aos limites de detecção, quantificação, decisão e capacidade de detecção (EC, 2002a). Uma observação importante é que não é verdade que a detecção ou quantificação sejam impossíveis abaixo dos limites. Acontece que, nestes níveis, a incerteza da medição pode ser maior que o próprio valor da medição (TAVERNIERS, DE LOOSE & VAN BOCKSTAELE, 2004). Considerando que os resultados analíticos não são somente concentrações, mas sim estimativas de concentração propensas a erros, nas medições abaixo dos limites estas estimativas acompanhadas por suas respectivas incertezas podem levar a resultados negativos (RSC, 2001). Limites não são diretamente relevantes na estimativa de incerteza, porém a incerteza abaixo do limite de detecção e próxima ao limite de quantificação pode exigir cuidados especiais (EURACHEM/CITAC, 2000).

O limite de detecção é a menor quantidade ou concentração do analito que pode ser significativamente distinguida de zero. Este limite corresponde a média mais três

desvios padrão das respostas obtidas para as amostras brancas ou três desvios padrão das respostas obtidas para amostras de concentração baixa do analito (THOMPSON, ELLISON & WOOD, 2002).

Limite de quantificação é a menor concentração de uma substância que pode ser quantificada com exatidão e precisão aceitáveis nas condições estipuladas do teste (EC, 2002a) ou a concentração abaixo da qual o método analítico não pode operar com precisão e exatidão aceitáveis (THOMPSON, ELLISON & WOOD, 2002).

Sobre o limite de quantificação, THOMPSON, ELLISON & WOOD (2002) sugerem que, enquanto operar acima de um limite fornece alguma segurança, devemos reconhecer que há uma dicotomia artificial na escala de concentração, uma vez que medidas abaixo deste limite não são privadas de informações de conteúdo e podem ser adequadas para o propósito de uso. Estes autores não recomendam o uso deste tipo de limite, sendo preferível tentar expressar a incerteza da medição em função da concentração, comparando com os critérios acordados entre o laboratório e o cliente ou o usuário final dos resultados.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios foram realizados no Laboratório de Dioxinas e PCBs (LDP), pertencente ao Laboratório Nacional Agropecuário - Minas Gerais (LANAGRO-MG, base física Pedro Leopoldo) do MAPA.

4.1 AMOSTRAS

Para o estudo de otimização e validação, amostras de café torrado e moído, 100 % arábica, foram adquiridas no comércio de Belo Horizonte, MG. Tais amostras foram abertas, homogeneizadas manualmente, por quarteamento, acondicionadas em frascos de vidro âmbar com tampa de rosca, os quais foram devidamente vedados e mantidos sob refrigeração (2 a 8 °C) até o momento das análises.

Para o estudo de ocorrência, foram coletadas, no mercado de Belo Horizonte, MG, no ano de 2012, três marcas de café torrado e moído, sendo dois tipos (tradicional e extra-forte) de cada marca e dois lotes de cada tipo, com duplicata de cada lote, totalizando 24 amostras. As amostras foram armazenadas sob temperatura ambiente, nas embalagens comerciais, até o momento das análises. Nenhuma amostra era embalada a vácuo.

4.2 EQUIPAMENTOS

- Balança analítica marca Bel, modelo Mark 500 (São Paulo, Brasil) calibrada.
- Balões volumétricos de 5,00; 10,00; 20,00 e 50,00 mL calibrados.
- Banho-maria com sistema para evaporação sob fluxo de nitrogênio Biotage Turbovap II (Suécia).
- Bloco aquecedor com fluxo de nitrogênio React-Therm (Pierce, Rockford, EUA).
- Congelador Sanyo com capacidade de até - 20° (Japão).
- Equipamento para ELP Thermo/Dionex modelo ASE 350[®] (EUA).
- Pipetas volumétricas de 1,00; 2,00; 4,00 e 10,00 mL, calibradas.
- Refrigerador Consul (Brasil).
- Sistema de extração Soxhlet Foss modelo Soxtec 2050 (EUA).
- Sistema para rotoevaporação, sob baixa pressão Multivapor-P6 Buchi (Flawil, Suíça).
- Micropipetas Eppendorf de volume variável de 20 a 1000 µL calibradas (Alemanha).

- Sistema cromatográfico CG-EM constituído por um CG Thermo modelo TRACE (Milão, Itália), acoplado a EM, com analisador de massas tipo *ion trap*, Thermo modelo Polaris Q (Austin, EUA) e injetor automático modelo AI/AS 3000.

4.3 MATERIAIS

- Béquer de 100 mL.
- Coluna capilar para CG-EM DB-5-MS (5% fenil-metil-polisiloxano): 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno, 0,25 µm de espessura do filme Agilent Technologies (Santa Clara, EUA).
- Coluna de vidro com 1,33 cm de diâmetro interno e 30 cm de altura.
- Funil de separação de 250 mL.
- Garrafa lavadeira de teflon com capacidade para 500 mL.
- Luvas de nitrila descartáveis.
- Papel de filtro para celas de extração de 66 mL (Thermo/Dionex, EUA)
- Pêra de borracha para pipeta de Pasteur.
- Pipeta de Pasteur, de vidro, de 150 mm.
- Pipetadores adaptáveis a pipetas volumétricas de vidro.
- Provetas de 50 e 500 mL.
- Suprimento de hélio ultrapuro, com filtro de carvão ativado White Martins (Brasil).
- Suprimento de nitrogênio, com filtro de carvão ativado White Martins (Brasil).
- *Vial* de 2 mL, com insert de 200 µL para injetor automático.

4.4 REAGENTES, PADRÕES E SOLVENTES

Foram utilizados solventes e reagentes em grau de pureza apropriado.

- Acetona para análise de resíduos (p.a.r.).
- Água grau reagente ultrapura ou tipo 1, obtida de sistema de purificação Milipore Milli-Q (Molshein, França).
- Diclorometano, grau CG Tedia (EUA).
- Hexano p.a.r. J. T Baker (Philipsburg, EUA).
- N-N-dimetilformamida (DMF) p.a.r. Fisher Scientific (Reino Unido).
- Nonano p.a.r. Sigma Aldrich Co Ltd. (Steinhein, Alemanha).

- Padrão de seringa (padrão de injeção) de 40 µg/mL certificado, contendo PCB número IUPAC 202, isotopicamente marcado (¹³C), em nonano, pureza de 98,9 %, lote SCHA-018, Cambridge Isotopes Laboratories – CIL (Andover, Reino Unido).
- Padrão interno de HPAs de 5 µg/mL certificado, contendo os dezesseis HPAs prioritários EPA isotopicamente marcados (¹³C) em nonano: naftaleno, acenaftileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, indeno(1,2,3-c,d)pireno, dibenzo(a,h)antraceno, benzo(g,h,i)perileno, (¹³C, 99%), pureza de 97,7 a 100,0 %, lote ER102811-01, Cambridge Isotopes Laboratories - CIL (Andover, Reino Unido).
- Padrão nativo (não marcado) de HPAs de 2 mg/mL certificado, contendo os dezesseis HPAs prioritários EPA em nonano: naftaleno, acenaftileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)-pireno, indeno(1,2,3-c,d)pireno, dibenzo(a,h)antraceno, benzo(g,h,i)perileno, pureza de 97,2 a 100 %, incerteza expandida de 2 %, lote 210091031-01, Accustandard (New Haven, EUA).
- Padrão nativo (não marcado) de HPAs de 10ng/µL, contendo os dezesseis HPAs prioritários da União Europeia em ciclohexano: Benzo(a)antraceno, benzo(g,h,i)perileno, benzo(a)pireno, dibenzo(a,h)antraceno, dibenzo(a,l)pireno, indeno(1,2,3-cd)pireno e 5-metilcriseno , Dibenzo(a,i)pireno; Benzo(b)fluoranteno, benzo(j)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(c)fluoreno, criseno, ciclopenta(c,d)pireno, dibenzo(a,e)pireno e dibenzo(a,h)pireno, pureza de 99,0 a 99,9 %, incerteza expandida de 2 %, lote 210091031-01, Agilent (EUA).
- Sílica gel, com granulometria de 63-210 µm / 70-230 mesh Macherey-Nagel (Duren, Alemanha).

4.5 SOLUÇÕES

4.5.1 Padrão nativo EPA

- Solução estoque (40 µg/mL): 1.000 µL do padrão de origem foram diluídos com nonano em balão volumétrico de 50 mL.
- Solução intermediária (1.000 ng/mL): 500 µL da solução estoque foram diluídos com nonano em balão volumétrico de 20 mL.

- Solução de uso (200 ng/mL): 2.000 µL da solução intermediária foram diluídos com nonano em balão volumétrico de 10 mL.

4.5.2 Padrão interno

- Solução de uso (200 ng/mL): 400 µL do padrão de origem foram diluídos com nonano em balão volumétrico de 10 mL.

4.5.3 Padrão de seringa

- Solução estoque (4.000 ng/mL): 1.000 µL do padrão de origem foram diluídos com nonano em balão volumétrico de 10 mL.

- Solução de uso (200 ng/mL): 500 µL da solução estoque foram diluídos com nonano em balão volumétrico de 10 mL.

4.5.4 Padrão nativo União Europeia

- Solução de uso (200 ng/mL): 200 µL do padrão de origem foram diluídos com nonano em balão volumétrico de 10 mL.

4.6 OTIMIZAÇÃO DAS ETAPAS DE EXTRAÇÃO, PURIFICAÇÃO E DETERMINAÇÃO

Foram analisados os dezesseis HPAs prioritários EPA: naftaleno, acenaftileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)-pireno, indeno(1,2,3-c,d)pireno, dibenzo(a,h)antraceno, benzo(g,h,i)perileno. A técnica de diluição isotópica foi adotada, com um padrão interno ¹³C marcado, para cada analito, o qual foi adicionado à amostra previamente à extração. O método empregou ELP com purificação simultânea na cela de extração, seguido de partição líquido-líquido com DMF e purificação por extração em fase sólida com coluna de sílica. Ao final da extração e purificação, foi adicionado o padrão de seringa PCB 202 ¹³C marcado, que permitiu a avaliação da recuperação do método com base nos padrões internos.

Ensaio preliminares foram realizados visando à redução de volume de solventes com substituição da partição líquido-líquido por centrifugação, remoção da DMF na etapa de partição líquido-líquido e substituição das colunas de purificação por

cartuchos comerciais de extração em fase sólida. Tanto no processo de centrifugação quanto no emprego dos cartuchos, os resultados obtidos não foram satisfatórios, visto que houve contaminação dos controles brancos, provavelmente devido ao material plástico empregado. O emprego da DMF foi considerado necessário, visto que houve uma quantidade significativa de interferentes nos extratos obtidos.

4.6.1 Detecção e quantificação

A detecção e quantificação foram realizadas por CG acoplada a EM adaptado de Rose *et al.* (2007). O EM foi operado no modo de monitoramento seletivo de íons (MSI), com ionização positiva. As condições do equipamento utilizadas foram: volume de injeção de 1 µL; modo de injeção *splitless* (*splitless time* de 2 min); temperatura do injetor de 260 °C; fluxo de gás de arraste de 1 mL/min (hélio). A programação do forno teve temperatura inicial de 70 °C por 1 min, seguido de rampa de aquecimento a 40 °C/min até 160 °C, e uma segunda rampa a 6 °C/min até 300 °C, mantendo a temperatura constante por 10 min. A linha de transferência e a fonte de ionização foram mantidas a 250 °C. Foi utilizada energia de ionização de 70 eV.

A escolha dos íons a serem monitorados foi feita pela injeção das soluções de uso dos padrões nativo e interno, sendo adotado o critério de maior intensidade para o íon quantificador e segunda maior intensidade para o íon confirmatório de cada composto.

4.6.2 Extração

O procedimento de extração foi adaptado de Badolato *et al.* (2006) e Houessou *et al.* (2007). Para escolha do solvente extrator acetona, hexano ou hexano:diclorometano (85:15, v/v) foi realizada a extração por Soxhlet, empregando o equipamento Foss modelo Soxtec 2050, com tempo total de extração de 1 h e 30 min, em triplicata. A eficiência na extração de gordura foi avaliada, considerando o caráter lipofílico dos HPAs. A seletividade dos solventes também foi considerada, sendo indicada pela coloração dos extratos.

Para reduzir o tempo de extração e o volume do solvente selecionado, a ELP foi testada, empregando o equipamento Thermo/Dionex modelo ASE 350[®], frente ao Soxhlet, o qual foi considerado procedimento de referência para extração de gordura. A ELP foi conduzida com e sem o uso de adsorvente (16 g de sílica ativada) na parte inferior da cela de extração para realização de purificação simultânea, em triplicata.

Em todos os testes foram utilizados 10 g de amostra. Os resultados dos teores de gordura foram analisados pelo teste de Tukey (SNEDECOR & COCHRAN, 1989). O nível de significância adotado foi $\alpha = 0,05$.

4.6.3 Purificação

Para purificação empregando coluna de sílica após a ELP, adaptado de Rose *et al.* (2007), foi otimizado o volume do solvente de eluição, de forma a garantir uma adequada recuperação dos analitos, com a menor quantidade de solvente. Antes de ser utilizada, a sílica foi previamente ativada em estufa sob temperatura de 130 °C por, no mínimo, 15 h. Em seguida, foi parcialmente desativada, com a adição de 10 % de água ultrapura, e homogeneizada em frasco fechado, sob rotação, por no mínimo 1 h. A coluna de vidro foi preparada, adicionando-se 5 g de sílica 10 % desativada e condicionada com 10 mL de hexano. Para a otimização do volume de eluição, foi adicionada solução de uso do padrão nativo dos HPAs, equivalente a 1 µg/kg de café, para cada HPA, em 3 mL de hexano, mimetizando as condições do método, em duplicata. Foi utilizado volume de eluição de 80 mL, coletando-se, separadamente, uma primeira fração de 20 mL e mais quatro frações de 15 mL. As frações foram concentradas até quase secura, quando foi adicionado o padrão de injeção. As recuperações de cada composto foram estimadas.

4.6.4 Planejamento fatorial

Definidas as condições de extração e purificação, foi realizado um planejamento fatorial com a escolha de três parâmetros considerados críticos para o método, sendo os dois primeiros no procedimento de ELP e o último como parte da purificação:

- **Volume de rinsagem na ELP:** volume de hexano:diclorometano (85:15, v/v) utilizado para lavagem do conteúdo da cela de extração, após a amostra ser submetida ao tempo estático em alta pressão ($1,0 \times 10^7$ Pa) e temperatura de 100 °C. No equipamento, o volume de rinsagem é referido em porcentagem em relação ao volume da cela utilizada, sendo avaliados 70, 85 e 100 %.

- **Tempo de purga na ELP:** ao final da extração, foi utilizado nitrogênio, como gás inerte para secagem do conteúdo da cela de extração. Foram avaliados tempos de purga de 50, 150 e 250 s.

- **Volume de hexano:** utilizado na etapa de partição com DMF, para extrair os analitos de interesse da DMF. Foram avaliados volumes de 50, 75 e 100 mL.

Foi realizado delineamento fatorial 2 x 3 com quatro replicatas no ponto central para estimativa da variância, totalizando 12 tratamentos. O nível de significância adotado nos testes de hipóteses foi $\alpha = 0,05$. O experimento foi repetido para confirmação dos resultados.

As amostras de café foram adicionadas de solução de uso do padrão interno contendo os dezesseis analitos, na concentração a ser utilizada no método, 1,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Foi realizada a análise nas condições dos tratamentos definidos na **Tabela 5**, em um único bloco.

Tabela 5 - Delineamento fatorial 2 x 3 com quatro replicatas no ponto central

Ordem de análise	Volume de rinsagem (%)	Tempo de purga (s)	Volume de hexano (mL)
1	100	250	100
2	100	50	50
3	70	250	100
4	85	150	75
5	70	50	50
6	70	50	100
7	100	50	100
8	85	150	75
9	70	250	50
10	85	150	75
11	85	150	75
12	100	250	50

Destacadas em cinza as replicatas do ponto central.

Ao final da extração, foi utilizado padrão de seringa para retomar o extrato. Foi realizada injeção no equipamento CG-EM. O parâmetro utilizado para avaliação foi a porcentagem de recuperação do padrão interno, calculada de acordo com a **Equação 1** (EPA, 1994; ROSE *et al.*, 2007):

$$Re_{C_{PI}} = \frac{A_{Ia} * A_{sc}}{A_{Sa} * A_{IC}} * 100 \quad (\text{Eq. 1})$$

sendo,

$Re_{C_{PI}}$: recuperação do padrão interno (%)

A_{Ia} : área do padrão interno na amostra

A_{SC} : área do padrão de seringa na solução de calibração

A_{Sa} : área do padrão de seringa na amostra

A_{IC} : área do padrão interno na solução de calibração

4.7 PROCEDIMENTO ANALÍTICO OTIMIZADO

O fluxograma geral do método otimizado, baseado em Badolato *et al.* (2006), Houessou *et al.* (2007) e Rose *et al.* (2007), é mostrado na **Figura 5**.

Em 10 g de café foram adicionados 50 µL de solução de uso de padrão interno de HPAs (200 ng/mL), resultando em concentração de 1 µg/kg de café. Para a ELP com purificação simultânea, foi preparada a cela extração de 66 mL, adicionando-se dois papéis de filtro na parte inferior, seguido de 16 g de sílica e um papel de filtro acima da camada de sílica para que não houvesse deformação durante a extração. A amostra foi adicionada e mais um papel de filtro foi colocado na parte superior. A extração foi realizada com solução de hexano:diclorometano (85:15, v/v), em dois ciclos de extração de 5 min. O equipamento de ELP foi programado para extração sob temperatura de 100 °C, com uma relação de 100 % entre o volume de rinsagem e o volume da cela, além de um tempo de purga de 50 s. O extrato foi concentrado a 40 °C, sob pressão reduzida, até cerca de 50 mL, em equipamento de rotoevaporação. Em seguida, procedeu-se a partição líquido-líquido em funil de separação, com mesmo volume de solução de DMF:água ultrapura (9:1, v/v). A camada de hexano:diclorometano foi descartada e a camada de DMF:água ultrapura foi desativada com igual volume de solução aquosa de cloreto de sódio a 1 %. Foi feita uma nova partição com 50 mL de hexano, desta vez descartando-se a fase mais polar. O extrato em hexano foi concentrado nas mesmas condições utilizadas anteriormente até cerca de 5 mL, aplicado em coluna de vidro contendo 5 g de sílica 10 % desativada e eluído com 50 mL de hexano. O extrato foi concentrado em banho com temperatura de 40° C e fluxo de nitrogênio até 0,5 mL. A etapa final de evaporação foi realizada em bloco aquecedor com fluxo de nitrogênio brando à mesma temperatura, até quase secura. Foi feita a retomada do extrato com 50 µL do padrão de seringa e transferência para *vial* de 2 mL com *insert* de 300 µL. O extrato foi mantido sob temperaturas inferiores a -10 °C, até ser injetado no sistema CG-EM, sob as condições descritas em 4.6.1.

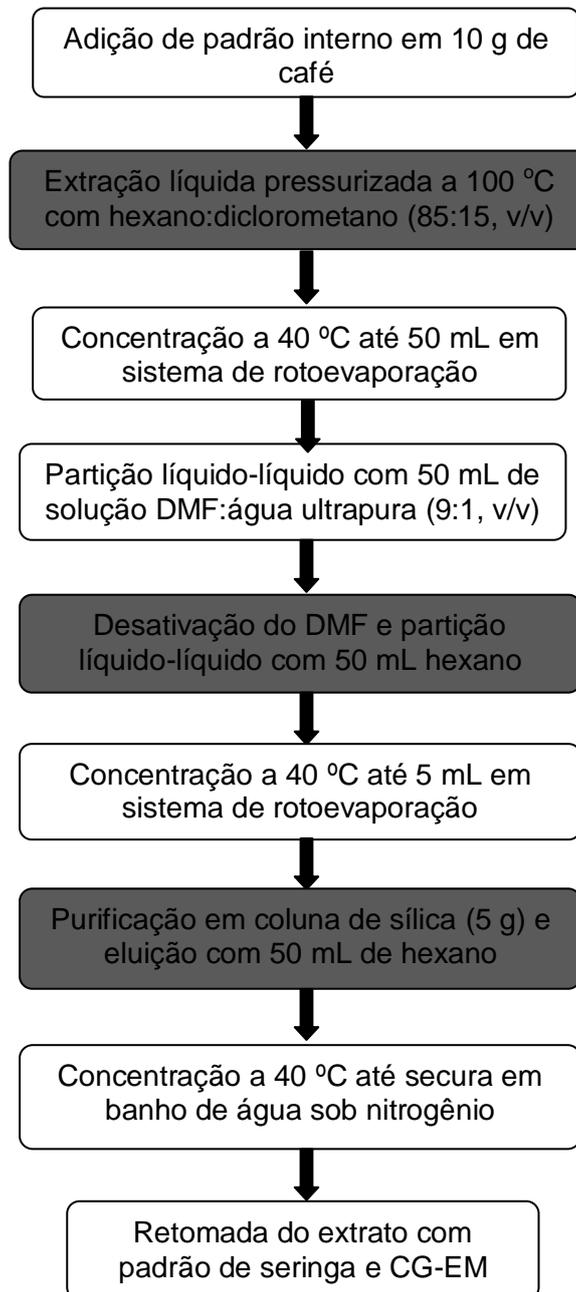


Figura 5 - Marcha analítica do método otimizado.

Destacadas em cinza as etapas otimizadas.

DMF: N-N-dimetilformamida, CG: cromatografia gasosa; EM: espectrometria de massas.

4.8 VALIDAÇÃO

Os parâmetros linearidade, sensibilidade, faixa, efeitos de matriz e seletividade, veracidade (recuperação), precisão, limites de detecção e de quantificação foram estabelecidos em ensaios intralaboratoriais com soluções padrão dos HPAs prioritários EPA e amostras adicionadas. A adequação para o propósito de uso do método foi avaliada em função dos parâmetros estudados e respectivos critérios de aceitabilidade

definidos (EC, 2002a; THOMPSON, ELLISON & WOOD, 2002; EC, 2007; SOUZA, 2007). O nível de significância adotado nos testes de hipóteses foi $\alpha = 0,05$.

4.8.1 Linearidade, sensibilidade e faixa linear

A linearidade dos métodos foi avaliada em experimentos com curvas de calibração dos analitos, conforme procedimento descrito por Souza & Junqueira (2005). Após a definição da faixa de interesse, soluções dos analitos foram preparadas em sete níveis de concentração, sendo 50, 200, 350, 500, 650, 800 e 950 pg/ μ L de nonano, correspondentes a 0,25; 1,00; 1,75; 2,50; 3,25; 4,00 e 4,75 μ g/kg de café. Foram preparadas três replicatas verdadeiras e independentes de cada nível, sendo as leituras feitas em ordem aleatória. Os brancos de solvente foram preparados, em triplicata, para todas as curvas como ferramenta de controle de qualidade interno e verificação do zero do equipamento. Em todas as soluções, foi adicionado padrão interno e padrão de seringa, visando manter as condições utilizadas na quantificação das amostras.

Os parâmetros da regressão foram estimados pelo método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO), sendo a razão entre as áreas do analito e padrão interno correspondente à variável dependente y_i e a razão entre a concentração do analito e a concentração do padrão interno correspondente à variável independente x_i . Gráficos dos resíduos da regressão foram avaliados em relação a perfis óbvios que demonstrassem heterocedasticidade ou desvio de linearidade, sendo indicados como *outliers* os pontos fora do intervalo $\pm t_{(1-\alpha/2;n-2)} s_{res}$, sendo s_{res} o desvio padrão dos resíduos da regressão. Em seguida, os *outliers* foram diagnosticados pelo teste de resíduos padronizados Jackknife, o qual foi aplicado sucessivamente até que novos *outliers* não fossem detectados ou até uma exclusão máxima de 22,2 % no número original de resultados. As premissas de normalidade (teste de Ryan & Joiner), homocedasticidade (teste de Brown & Forsythe), independência dos resíduos da regressão (teste de Durbin & Watson) foram verificadas, bem como a significância da regressão e adequação do ajuste ao modelo linear (ANOVA) (SOUZA & JUNQUEIRA, 2005).

4.8.2 Efeitos de matriz e seletividade

Para avaliação dos efeitos de matriz foi empregado o método de adição de padrão. Duas curvas de calibração foram preparadas, com mesmas concentrações dos analitos, sendo 50, 200, 350, 500, 650 e 800 pg/ μ L de nonano, sendo uma curva preparada com o solvente (curva usual) e a outra em extratos de amostras de café torrado (curva matrizada). As curvas foram avaliadas como descrito para o estudo da linearidade. As inclinações foram comparadas pelo teste t com as variâncias combinadas ou distintas, após verificação da premissa de homogeneidade das variâncias dos resíduos das curvas pelo teste de F. As interseções não foram comparadas visto que as amostras utilizadas para elaboração da curva matrizada não eram brancas (THOMPSON, ELLISON & WOOD, 2002; SOUZA, 2007; BRASIL, 2011).

Um experimento complementar de seletividade foi realizado, empregando solução de uso do padrão nativo dos HPAs prioritários para a União Europeia, visando avaliar a capacidade de separação dos compostos presentes neste padrão, não contemplados no escopo do presente trabalho, pelo perfil dos cromatogramas e íons monitorados.

Para determinação da seletividade, após o estudo de recuperação e precisão, foi realizada também uma avaliação da variação entre as intensidades relativas dos íons obtidas para padrões e amostras, conforme critérios estabelecidos na **Tabela 6** (EC, 2002a). Desta forma, espectros obtidos para soluções das curvas de calibração e para amostras adicionadas foram selecionados, aleatoriamente, para estimativa das intensidades relativas e respectivas variações.

Tabela 6. Variações máximas permitidas para as intensidades relativas de íons com diversas técnicas de espectrometria de massas

Intensidade relativa (% do pico base)	Variações máximas (%)	
	IE-CG-EM	IQ-CG-EM, CG-EM ⁿ , CL-EM, CL-EM ⁿ
>50	±10	±20
>20-50	±15	±25
>10-20	±20	±30
≤10	±50	±50

Fonte: EC (2002a).

IQ: ionização química; CG: cromatografia gasosa; LC: cromatografia líquida; EM: espectrometria de massas; EMⁿ: espectrometria de massas sequencial.

4.8.3 Recuperação e precisão

Devido à inexistência de material de referência certificado (MRC) disponível para HPAs em café, a veracidade não pôde ser avaliada no presente trabalho. Recuperação e precisão, sob condições de repetibilidade e de precisão intermediária (reprodutibilidade parcial), foram investigadas em experimentos com amostras adicionadas de solução padrão dos analitos, em três níveis de concentração, na faixa linear. Os níveis de adição escolhidos foram 0,25; 1,00 e 3,00 $\mu\text{g}/\text{kg}$. A amostra sem adição também foi avaliada para estimativa da concentração nativa dos HPAs. Para cada nível de concentração estudado, incluindo a amostra sem adição, dezoito replicatas verdadeiras e independentes foram preparadas e analisadas. As replicatas foram divididas em três baterias analíticas com seis replicatas de cada nível de concentração. As baterias analíticas foram realizadas em diferentes dias, por diferentes analistas, com variação de equipamentos e marcas/lotos de reagentes, quando possível, simulando condições de precisão intermediária (EC, 2002a; THOMPSON, ELLISON & WOOD, 2002; EC, 2007; SOUZA, 2007).

As recuperações foram estimadas, considerando a concentração total dos analitos nas amostras, ou seja, a média estimada para a concentração nativa somada à concentração adicionada. *Outliers* foram investigados dentre os valores de porcentagem de recuperação, de cada nível de concentração, pelo teste de Grubbs. Após remoção do valor, o teste de Grubbs foi aplicado, sucessivamente, até que novos *outliers* não fossem detectados ou até uma exclusão máxima de 22,2 % no número original de dados (SOUZA, 2007). Foram considerados aceitáveis, valores médios de recuperação entre 50 a 120 % (UE, 2011b).

Os desvios padrão relativos, sob condições de repetibilidade (DPR_r) e reprodutibilidade parcial (DPR_R), foram estimados por análise de variância dos resultados de porcentagem de recuperação, em cada nível de concentração. Para realização da análise de variância, as premissas relacionadas aos teste de F foram previamente testadas: normalidade (teste de Ryan & Joiner) e homoscedasticidade (teste de Brown & Forsythe) dos resíduos da recuperação (SOUZA, 2007). Para avaliação da precisão foram considerados os critérios estabelecidos pela UE (2011b).

O uso da técnica de diluição isotópica, com a adição de padrões internos no início da extração e do padrão de seringa, ao final desta, permitiu a avaliação da recuperação do método baseada no padrão interno. Esse parâmetro foi utilizado como uma ferramenta de controle de qualidade do método, avaliando a eficiência da extração individualmente para cada amostra e analito. Assim, as recuperações das amostras

adicionadas foram corrigidas pelas respectivas recuperações de padrão interno. Para esta última, o mesmo critério de aceitabilidade (50 a 120 %) foi adotado (UE, 2011b).

4.8.4 Limites e incerteza

O limite de detecção do equipamento foi definido pela injeção de diluições sucessivas de solução de padrões nativos dos HPAs, sendo correspondente ao menor massa de HPAs na qual tenha sido observado uma relação sinal ruído > 3.

Como não foram encontradas amostras brancas para o estudo de validação, os limites de detecção e quantificação teóricos foram estimados adotando-se duas abordagens distintas. Primeiro, pela análise de brancos de reagentes, em 21 replicatas independentes. Neste caso, os limites de detecção teóricos foram calculados como sendo as médias das respostas, sem supressão de zero e resultados negativos, mais três vezes os desvios padrão e os limites de quantificação teóricos como as médias das respostas somadas a dez vezes os desvios padrão. A segunda abordagem foi feita pela análise de amostras de café torrado, em 18 replicatas independentes. Os limites de detecção e quantificação foram estimados como três e dez vezes os desvios padrão obtidos para as concentrações nativas, respectivamente, sem a supressão de zero ou valores negativos (THOMPSON, ELLISON & WOOD, 2002; EC, 2007).

Os limites de quantificação do método corresponderam às concentrações abaixo das quais o método não operou com precisão e recuperação aceitáveis (SOUZA, 2007). Desta forma, os referidos limites foram definidos como os menores níveis de concentração avaliados no processo de validação, para os quais os valores de recuperação, precisão e incerteza foram aceitáveis.

Para a estimativa da incerteza foi utilizada a abordagem *Top Down*, considerando os dados obtidos nos estudos de validação. Os componentes considerados foram: a incerteza-padrão devida à precisão intermediária ou reprodutibilidade parcial (u_{repro}) obtida nos estudos de precisão e a incerteza-padrão devida à curva de calibração (u_{curva}) obtida no estudo da linearidade (**Equação 2**).

$$u_{curva} = \sqrt{c_a^2 u^2(a) + c_b^2 u^2(b) + 2c_a c_b u(a)u(b)r(a,b)} \quad (\text{Eq. 2})$$

sendo

c_a o coeficiente de sensibilidade de da interseção (a) dado por $-1/b$, $u(a)$ a incerteza-padrão de a , c_b o coeficiente de sensibilidade da inclinação (b) dado por $(a-y)/b^2$, $u(b)$ a incerteza-padrão de b , $r(a, b)$ o coeficiente de correlação entre a e b , y_i variável dependente, x_i variável independente, s_{res} o desvio padrão dos resíduos da regressão, e n o número de observações.

$$r_{(a,b)} = - \frac{\sum x_i}{\sqrt{n \sum x_i^2}} \quad u_{(a)} = \sqrt{\frac{s_{res}^2 \sum x_i^2}{n \sum x_i^2 - (\sum x_i)^2}} \quad u_{(b)} = \sqrt{n \frac{s_{res}^2}{n \sum x_i^2 - (\sum x_i)^2}}$$

As incertezas-padrão foram somadas, de acordo com a Lei da Propagação das Incertezas, para estimativa da incerteza combinada (u_c) (**Equação 3**):

$$u_c = \sqrt{(u_{repro})^2 + (u_{curva})^2} \quad (\text{Eq. 3})$$

A incerteza expandida (U) (**Equação 4**), associada aos resultados de medição, foi obtida multiplicando-se a incerteza combinada (u_c) pelo fator de abrangência ($k=2$, para um nível de confiança aproximado de 95 %) (EURACHEM/CITAC, 2000).

$$U = k * u_c \quad (\text{Eq. 4})$$

As incertezas estimadas foram avaliadas frente aos critérios descritos em UE (2011b). Desta forma, para fins de monitoramento, as incertezas combinadas devem ser inferiores à incerteza de medição máxima (u_f) (**Equação 5**):

$$u_f = \sqrt{(LD/2)^2 + (\alpha C)^2} \quad (\text{Eq. 5})$$

sendo

LD limite de detecção do método, C a concentração de interesse, α um fator numérico cuja utilização depende do valor de C (igual a 0,2 para valores de C menores ou iguais a 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 OTIMIZAÇÃO DAS ETAPAS DE EXTRAÇÃO, PURIFICAÇÃO E DETERMINAÇÃO

5.1.1 Detecção e quantificação

Na **Tabela 7** estão apresentados os íons selecionados, em razão entre massa e carga (m/z), para monitoramento de cada analito, no modo MSI. A alta estabilidade dos anéis aromáticos fundidos torna as moléculas dos HPAs difíceis de serem fragmentadas. Mesmo a ionização por impacto de elétrons, considerada agressiva, leva à formação quase que exclusiva do íon molecular, ou à perda de dois hidrogênios (VEYRAND *et al.*, 2007; MARTINEZ *et al.*, 2004).

As condições cromatográficas utilizadas levaram a uma resolução satisfatória dos picos para os dezesseis HPAs estudados, o que foi válido mesmo para os isômeros de difícil separação, como os pares: criseno/benzo(a)antraceno; benzo(b)fluoranteno/benzo(k)fluoranteno; dibenzo(a,h)antraceno / indeno-1,2,3(c,d)pireno (GÓMEZ-RUIZ & WENZL, 2009). Cromatogramas típicos são mostrados na **Figura 6**, apresentados em oito segmentos, divididos de acordo com o tempo de retenção dos compostos. O tempo total de corrida foi de 36 min.

Tabela 7 - Relação dos íons monitorados para os analitos de interesse, padrões nativos, internos e padrão de seringa

Analito	Íons (m/z)	Analito	Íons (m/z)
Naftaleno	127, <u>128</u>	Criseno	226, <u>228</u>
Naftaleno - ¹³ C ₆	133, <u>134</u>	Criseno- ¹³ C ₆	232, <u>234</u>
Acenaftileno	151, <u>152</u>	Benzo(b)fluoranteno	250, <u>252</u>
Acenaftileno- ¹³ C ₆	157, <u>158</u>	Benzo(b)fluoranteno- ¹³ C ₆	256, <u>258</u>
Acenafteno	152, <u>153</u>	Benzo(k)fluoranteno	250, <u>252</u>
Acenafteno- ¹³ C ₆	158, <u>159</u>	Benzo(k)fluoranteno- ¹³ C ₆	256, <u>258</u>
Fluoreno	163, <u>165</u>	Benzo(a)pireno	250, <u>252</u>
Fluoreno- ¹³ C ₆	169, <u>171</u>	Benzo(a)pireno- ¹³ C ₆	254, <u>256</u>
Fenantreno	176, <u>178</u>	Indeno(1,2,3-c,d)pireno	<u>276</u> , <u>277</u>
Fenantreno- ¹³ C ₆	182, <u>184</u>	Indeno(1,2,3-c,d)pireno- ¹³ C ₆	280, <u>282</u>
Antraceno	176, <u>178</u>	Dibenzo(a,h)antraceno	<u>278</u> , <u>279</u>
Antraceno - ¹³ C ₆	182, <u>184</u>	Dibenzo(a,h)antraceno- ¹³ C ₆	<u>282</u> , <u>284</u>
Fluoranteno	200, <u>202</u>	Benzo(g,h,i)perileno	<u>276</u> , <u>277</u>
Fluoranteno - ¹³ C ₆	206, <u>208</u>	Benzo(g,h,i)perileno- ¹³ C ₁₂	<u>286</u> , <u>288</u>
Pireno	200, <u>202</u>		
Pireno - ¹³ C ₃	203, <u>205</u>	PCB 202 ¹³ C	440, <u>442</u>
Benzo(a)antraceno	226, <u>228</u>		(<u>370</u> , <u>372</u>)
Benzo(a)antraceno- ¹³ C ₆	232, <u>234</u>		

Destacados em preto os padrões nativos e em cinza os padrões internos.

Não sublinhados os íons confirmatórios e sublinhados os íons quantificadores.

PCB 202 ¹³C: padrão de seringa isotopicamente marcado de bifenila policlorada número IUPAC 202 para o qual foi utilizado monitoramento de reações múltiplas (MRM) para seleção dos íons.

m/z: razão entre massa e carga.

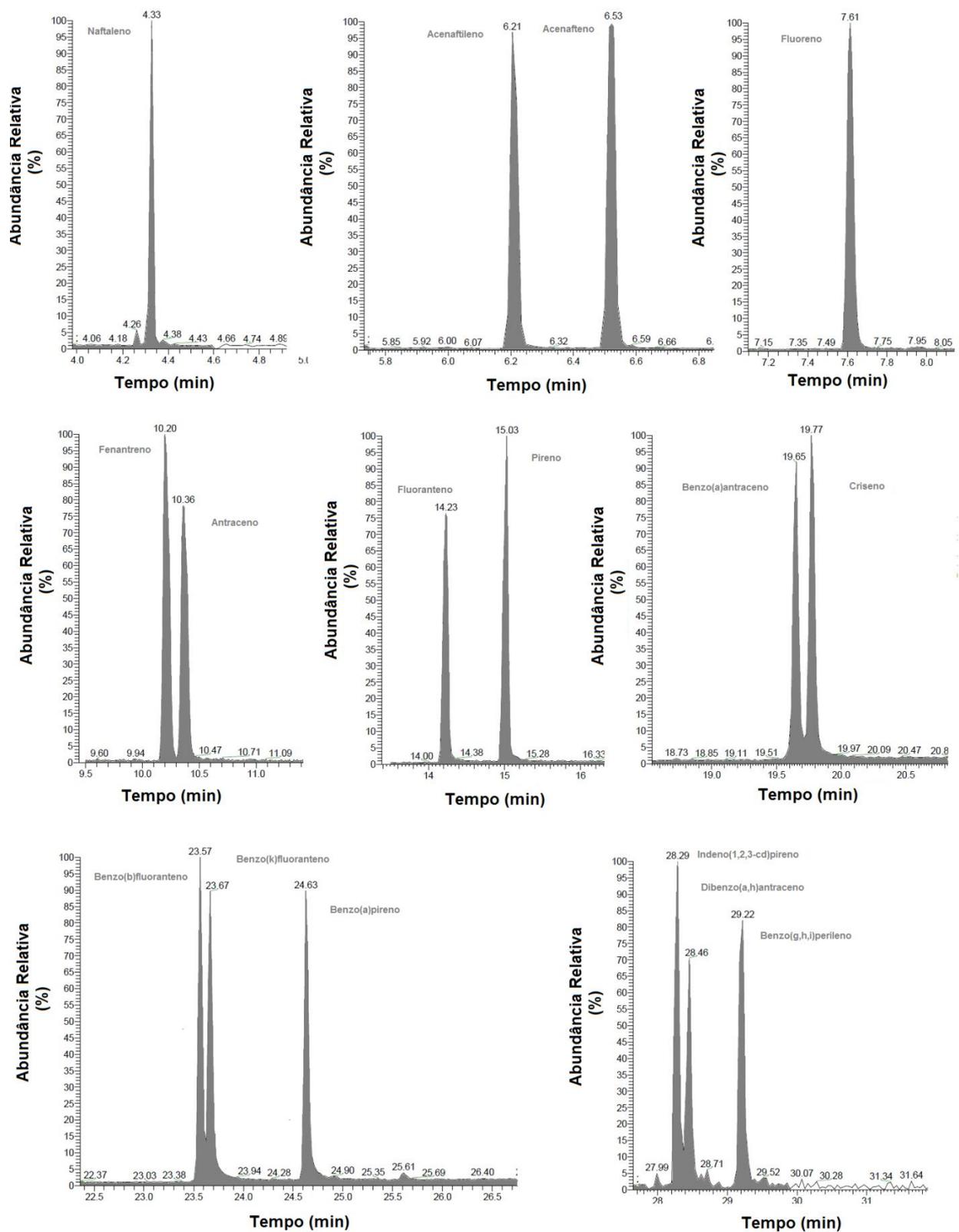


Figura 6 - Cromatogramas típicos obtidos para solução de uso do padrão nativo (200 ng/mL) para os dezesseis hidrocarbonetos policíclicos aromáticos estudados.

5.1.2 Extração

A utilização de acetona, como proposto por Badolato *et al.* (2006), levou à extração de maior quantidade de compostos interferentes, quando comparada com a extração utilizando hexano e hexano:diclorometano (85:15, v/v) (**Figura 7**).

A falta de seletividade da extração com acetona foi mostrada anteriormente por Houessou *et al.* (2005), que obteve extratos com forte coloração, mesmo após emprego de cartuchos de extração em fase sólida. O hexano foi o solvente utilizado por Orecchio, Ciotti & Culotta (2009) e Stanciu (2008). Outros autores (LUND, DUEDAHL-OLESEN & CHRISTENSEN, 2009; MARTINEZ *et al.*, 2004) adicionaram ao hexano, uma quantidade de solvente de maior polaridade, como o diclorometano ou acetona, para permitir maior penetração do solvente na matriz. O uso de mistura hexano:diclorometano levou a maiores recuperações do que hexano:acetona (MARTINEZ *et al.*, 2004).

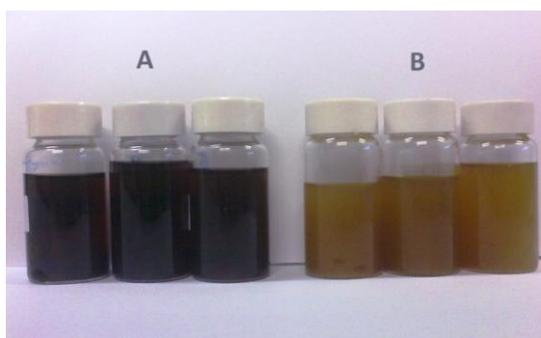


Figura 7 - Extratos obtidos após extração em Soxhlet com (A) acetona e (B) hexano e hexano:diclorometano (85:15, v/v).

Conforme apresentado na **Tabela 8**, percebe-se que não houve diferença significativa entre as médias ($p > 0,05$) obtidas para os teores de gordura, empregando acetona, hexano e hexano:diclorometano (85:15, v/v). Os valores obtidos estavam próximos aos valores encontrados na literatura para a matriz analisada, de 9 a 20 % (CLARKE & MACRAE, 1985; OLIVEIRA *et al.*, 2006; TURATTI, 2001), e próximos ao indicado no rótulo do produto, 10 %, sugerindo que a extração de gordura foi eficiente. Desta forma, a mistura hexano:diclorometano (85:15, v/v) foi escolhida.

-

Tabela 8 - Comparação entre os teores de gordura extraídos com acetona, hexano e hexano:diclorometano (85:15, v/v), utilizando o método Soxhelt em equipamento Foss modelo Soxtec 2050

Solvente extrator ¹	Teor de gordura ² (%)	DPR ³ (%)
Acetona	12,21 ^a	6,50
Hexano	12,02 ^a	6,87
Hexano:diclorometano (85:15, v/v)	11,92 ^a	6,44

¹ Tempo total de extração 1 h 30 min.

² Médias indicadas pela mesma letra não diferiram significativamente pelo teste de Tukey com um nível de significância de 0,05.

³ DPR: desvio padrão relativo.

O equipamento de ELP foi operado nas seguintes condições: temperatura 100 °C, tempo estático de extração 5 min, volume de rinsagem 100 %, tempo de purga 250 s, com dois ciclos de extração. Nestas condições, o tempo de extração foi de cerca de 15 min por amostra. Os teores de gordura obtidos nestas condições não diferiram daqueles alcançados pela extração empregando o método Soxhlet, adotado como referência ($p > 0,05$) (**Tabela 9**). Eficiência na retenção de gordura também foi demonstrada ($p < 0,05$), quando utilizados 16 g de sílica ativada na parte inferior da cela de extração, conforme **Figura 8**. Nestas condições, a purificação na cela de extração reteve quase a totalidade de gordura proveniente da matriz, auxiliando as etapas de purificação seguintes. O alto desvio padrão relativo obtido na extração com purificação pode ser explicado pela pequena quantidade de gordura extraída, em termos absolutos, 7 mg em média.

Tabela 9 - Comparação de extração de gordura com mistura de solventes hexano:diclorometano (85:15, v/v) empregando Soxhlet e extração líquida pressurizada com e sem purificação na cela de extração

Tipo de extração (equipamento)	Teor de gordura ⁴ (%) ⁴	DPR ⁵ (%)
Soxhlet ¹ (Foss Soxtec 2050)	11,92 ^a	6,44
ELP sem purificação ² (Thermo/Dionex ASE 350 [®])	12,05 ^a	6,77
ELP com purificação ^{2,3} (Thermo/Dionex ASE 350 [®])	0,07 ^b	37,78

¹ Tempo total de extração 1 h 30 min.

² Cela de 66 mL; temperatura 100 °C, tempo estático de 5 min; volume de rinsagem: 100 %; tempo de purga de 250 s; 2 ciclos de extração. Tempo total de extração 15 min

³ Com 16 g de sílica na cela de extração.

⁴ Médias indicadas pela mesma letra não diferiram significativamente pelo teste de Tukey com um nível de significância de 0,05.

⁵ DPR: desvio padrão relativo.

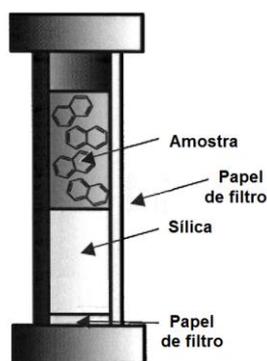


Figura 8 - Cella do equipamento ASE 350 para purificação simultânea à extração líquida pressurizada.

Fonte: adaptado de Veyrand *et al.*(2007).

5.1.3 Purificação

A etapa de partição líquido-líquido com uso de DMF garantiu a retirada de compostos interferentes do extrato. O solvente DMF tem a propriedade de extrair HPAs de matrizes complexas, quando em solventes alifáticos, com relativa seletividade. Ocorre a interação dos elétrons π dos anéis aromáticos e os elétrons livres dos átomos de oxigênio das moléculas de DMF (MANDALAKIS, ZEBÜHR & GUSTAFSSON, 2004). Outros compostos aromáticos também são extraídos, porém a adição de hexano após a desativação da DMF previne a extração de compostos de menor polaridade. Esse tipo de purificação foi também utilizado por outros autores (CAMARGO & TOLEDO, 2002a,b; ROSE, 2007).

Os resultados da otimização do volume do solvente de eluição na purificação com coluna de sílica 10 % desativada são mostrados na **Tabela 10**. Todos os HPAs foram eluídos até a fração III, que correspondeu a um volume total de 50 mL. Os valores encontrados na fração IV foram considerados traços ou interferentes, visto que não prejudicam a recuperação dos analitos. Percebeu-se uma interação mais forte com a sílica para os HPAs de maior massa molecular. Estes, com exceção do benzo(a)antraceno, iniciaram a eluição após os 20 mL iniciais, enquanto que os compostos de menor massa molecular eluíram a partir da primeira fração.

Tabela 10 - Recuperação média e desvio padrão dos analitos por fração de hexano eluída em coluna de sílica de 5 g

Analito	Recuperação média (%)					Soma das frações
	Fração I ¹	Fração II ²	Fração III ²	Fração IV ²	Fração V ²	
Naftaleno	77,5 ± 17,9	7,6 ± 4,7	2,7 ± 2,8	-	-	87,9 ± 19,8
Acenaftileno	84,8 ± 35,2	24,2 ± 8,5	-	-	-	109 ± 26,7
Acenafteno	62 ± 9,2	20,2 ± 1,6	12,3 ± 8	0,2 ± 0,3	-	94,6 ± 0,1
Fluoreno	53 ± 2,6	42,7 ± 0,1	10,6 ± 10,8	0,6 ± 0,8	-	106,8 ± 12,5
Fenantreno	27,4 ± 10,3	32,3 ± 6	36 ± 31,8	0,6 ± 0,8	-	96,3 ± 14,8
Antraceno	54,8 ± 5,9	41 ± 5,5	5,5 ± 3,7	0,6 ± 0,9	-	101,9 ± 3,3
Fluoranteno	18,8 ± 14,6	60 ± 9,4	22,1 ± 5,5	0,7 ± 0,9	-	101,5 ± 9,7
Pireno	53,8 ± 9,6	57,5 ± 0,5	-	-	-	111,3 ± 10,1
Benzo(a)antraceno	14,6 ± 0,4	85 ± 14,3	-	-	-	99,6 ± 13,9
Criseno	-	88,5 ± 14,4	11,5 ± 0,4	-	-	100 ± 14,8
Benzo(b)fluoranteno	-	85,6 ± 13,5	9,5 ± 0,7	-	-	95,1 ± 12,8
Benzo(k)fluoranteno	-	88,3 ± 14,4	7,4 ± 3,5	-	-	95,7 ± 11
Benzo(a)pireno	12,7 ± 9,1	94,5 ± 19,5	16,1 ± 7,1	2,1 ± 3	-	125,3 ± 14,6
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	-	83,5 ± 12,4	21,4 ± 5,9	-	-	104,9 ± 6,5
Dibenzo(a,h)antraceno	-	62,3 ± 13,1	37,9 ± 4,6	-	-	100,1 ± 8,5
Benzo(g,h,i)perileno	-	85,4 ± 11,7	16,1 ± 5,7	-	-	101,5 ± 6

¹ Fração I foi de 20 mL.

² frações II a V de 15 mL.

5.1.4 Planejamento fatorial

Os resultados do planejamento fatorial indicaram que o volume de rinsagem (relação entre o volume de rinsagem e o volume da cela) na ELP e o volume de hexano na partição líquido-líquido influenciaram significativamente ($p < 0,05$) a recuperação dos analitos de maior massa molecular. Os tempos de purga avaliados na ELP não apresentaram influência significativa ($p > 0,05$) para nenhum dos analitos. O mesmo perfil de resultados foi observado para a repetição do experimento fatorial. Os resultados obtidos para o primeiro experimento são mostrados nas **Figuras 9 e 10**.

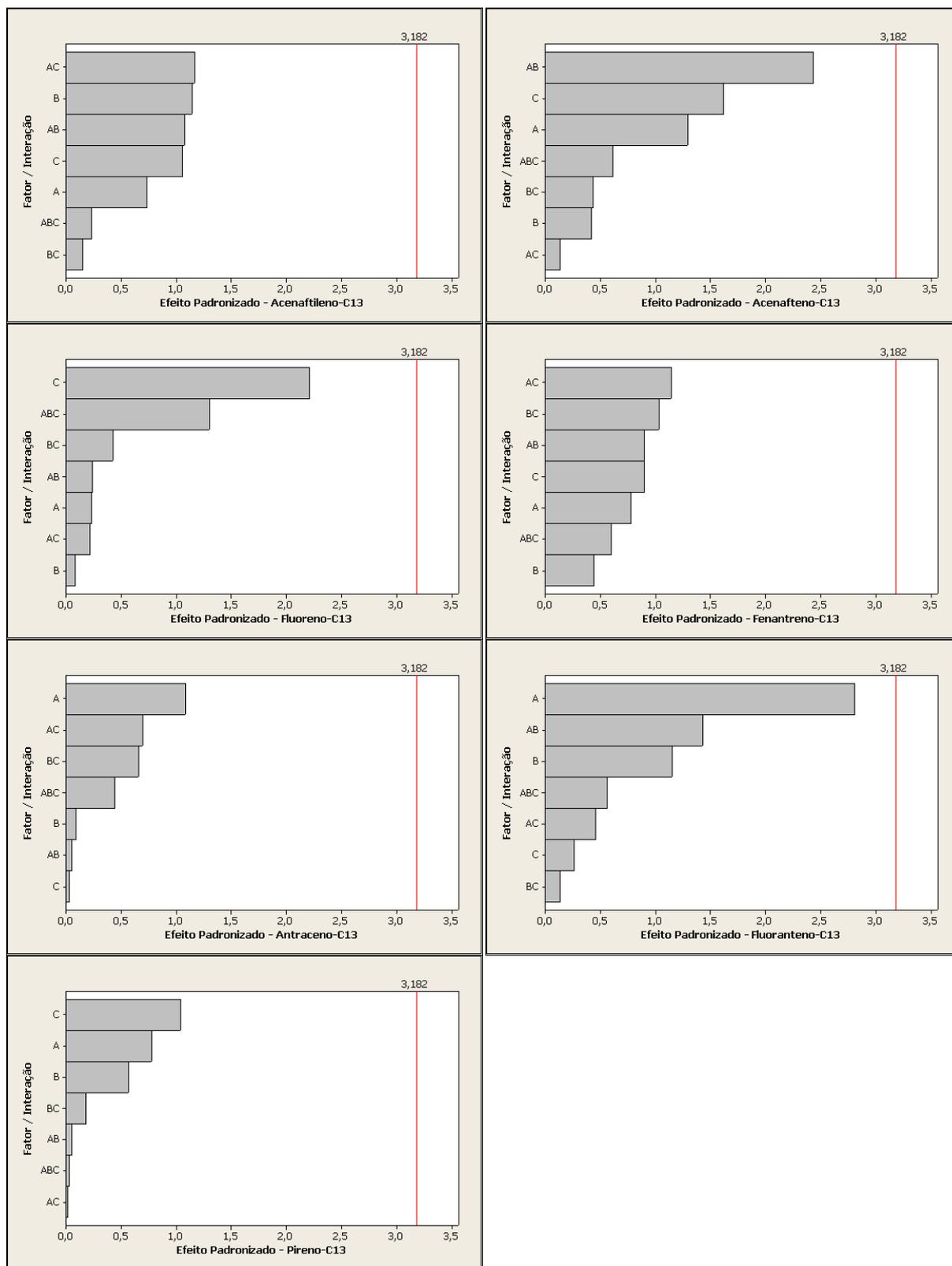


Figura 9 - Gráficos de pareto dos efeitos padronizados em relação aos fatores e interações estudados no planejamento fatorial ($t_{crit} = 3,182$, $n = 12$, $\alpha = 0,05$) para os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos naftaleno, acenafileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno e pireno.

A: volume de rinsagem na extração líquida pressurizada; B: tempo de purga na extração líquida pressurizada; C: volume de hexano na partição líquido-líquido.

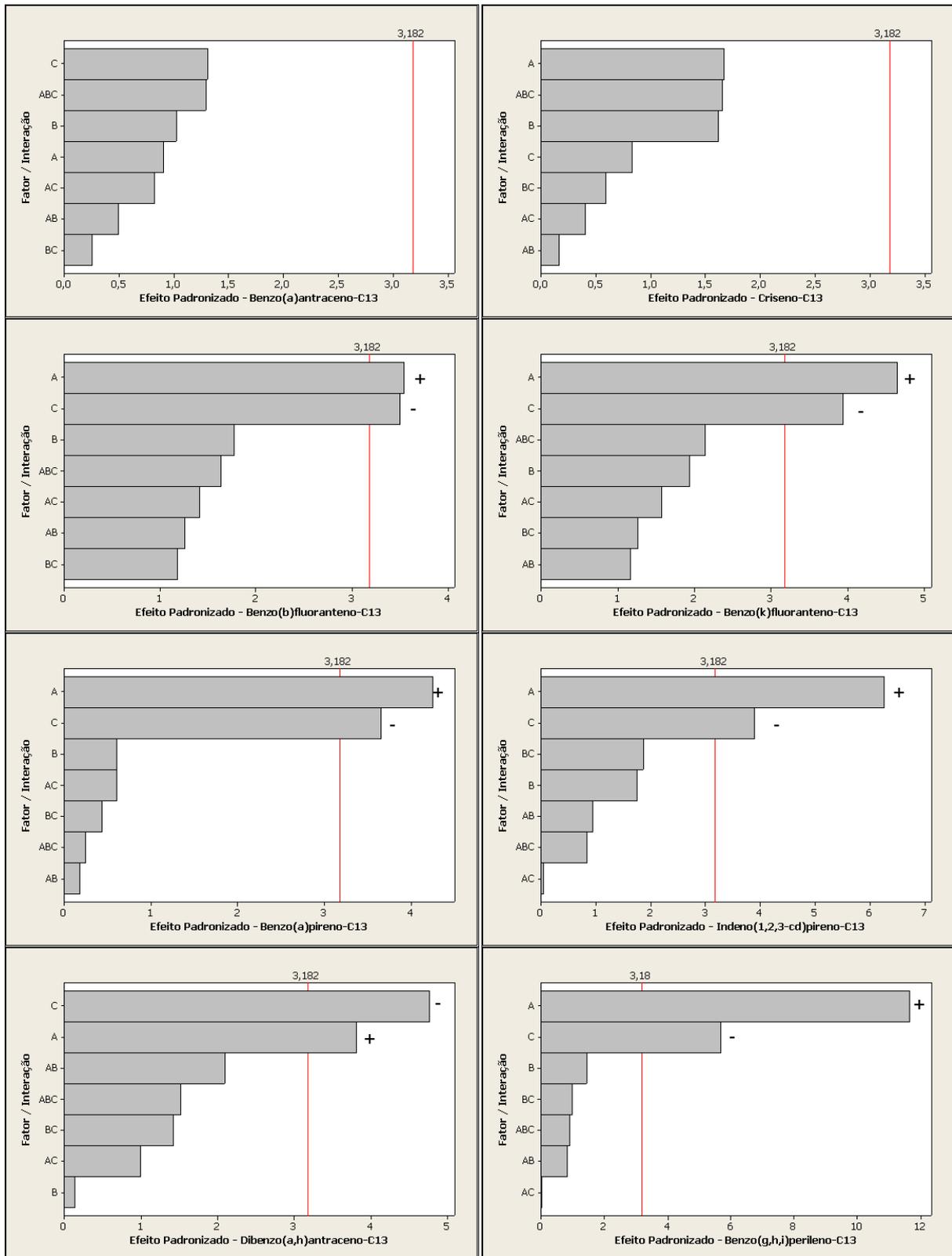


Figura 10 - Gráficos de pareto dos efeitos padronizados em relação aos fatores e interações estudados planejamento fatorial ($t_{crit} = 3,182$, $n = 12$, $\alpha = 0,05$) para os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, indeno(1,2,3-c,d)pireno, dibenzo(a,h)antraceno e benzo(g,h,i)perileno.

A: volume de rinsagem na extração líquida pressurizada; B: tempo de purga na extração líquida pressurizada; C: volume de hexano na partição líquido-líquido; +: influência positiva; -: influência negativa.

A influência do volume de rinsagem foi positiva, ou seja, maior para a maior condição avaliada. Com volumes de 70 e 85 %, uma quantidade significativa dos analitos mais pesados ficou retida na sílica e não foi extraída, mesmo com uso de grande quantidade de nitrogênio (tempo de purga de até 250 s). A interação com a sílica foi maior para os analitos de maior massa molecular, os quais foram os últimos a serem eluídos, conforme observado por Lund, Duedahl-Olesen & Christensen (2009) e no presente trabalho, na etapa de eluição em coluna de sílica descrita previamente.

Já o volume de hexano utilizado na etapa de partição líquido-líquido com DMF, teve influência negativa, ou seja, as recuperações foram maiores quando o volume utilizado foi menor, 50 mL. Na **Figura 11**, são representados os valores de recuperação obtidos apenas para os analitos de maior massa molecular, já que para os demais, as condições estudadas não influenciaram na recuperação.

Uma possível explicação para a influência negativa do volume de hexano seria que um volume maior de hexano nessa etapa arrastaria interferentes provenientes da matriz contidos na DMF. Estes interferentes dificultariam a ionização do extrato quando da detecção por EM, reduzindo os valores de recuperação.

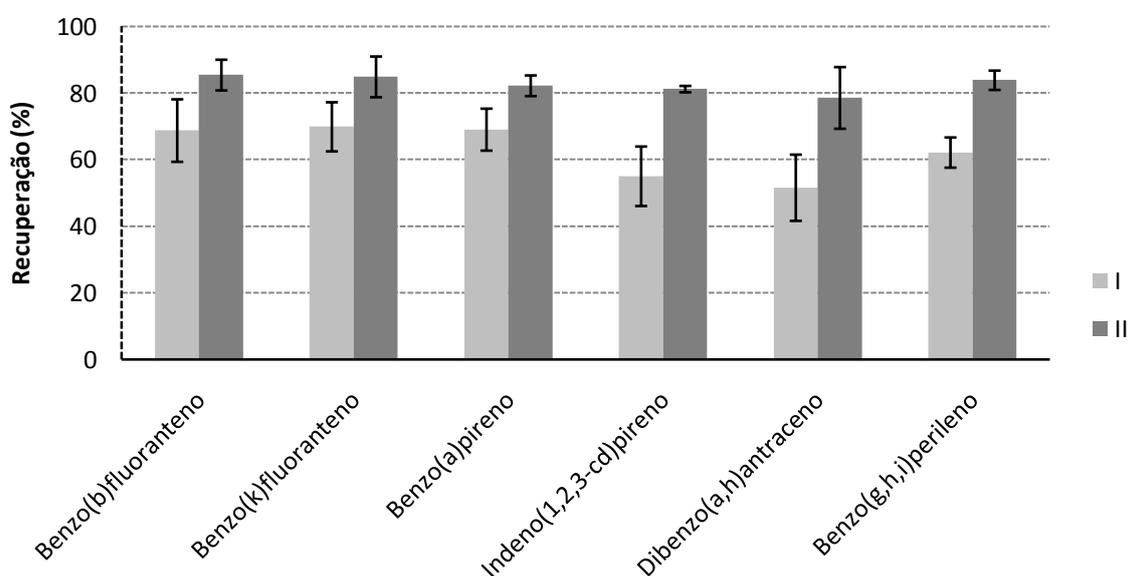


Figura 11 - Influência das condições experimentais na recuperação do padrão interno para os analitos benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, indeno(1,2,3-c,d)pireno, dibenzo(a,h)antraceno, benzo(g,h,i)perileno.

Condição I: volume de rinsagem na extração líquida pressurizada: 70 %, volume de hexano na partição líquido-líquido: 100 mL .
 Condição II: volume de rinsagem na extração líquida pressurizada: 100 %, volume de hexano na partição líquido-líquido: 50 mL.

Após os estudos de otimização, o método foi definido com volume de rinsagem de 100 % na etapa de ELP e volume de hexano na etapa de partição de 50 mL. O

tempo de purga definido foi de 50 s, menor valor estudado, visto que o referido fator afetou significativamente os resultados de recuperação. Como a recuperação do padrão interno variou entre 79 e 85 %, sugerindo perdas mínimas para os analitos de maior massa molecular, não foram realizados outros testes de otimização.

5.2. VALIDAÇÃO

5.2.1 Linearidade, sensibilidade e faixa linear

Na faixa de 50 a 950 pg/ μ L, correspondente a 0,25 a 4,75 μ g/kg de café, houve indicação de falta de ajuste ao modelo linear ($p < 0,05$) para a maioria dos analitos estudados. Desta forma, uma faixa mais estreita foi considerada, de 50 a 800 pg/ μ L, correspondente a 0,25 a 4,00 μ g/kg de café.

Perfil de heterocedasticidade ou desvio de linearidade não foram evidenciados pela inspeção dos gráficos de resíduos apresentados nas **Figuras 12 e 13**. Nas referidas figuras, também estão indicados os *outliers* diagnosticados pelo teste de resíduos padronizados Jackknife. Em nenhum caso o limite máximo de 22,2 % dos dezoito dados originais, ou seja, de quatro *outliers*, foi excedido.

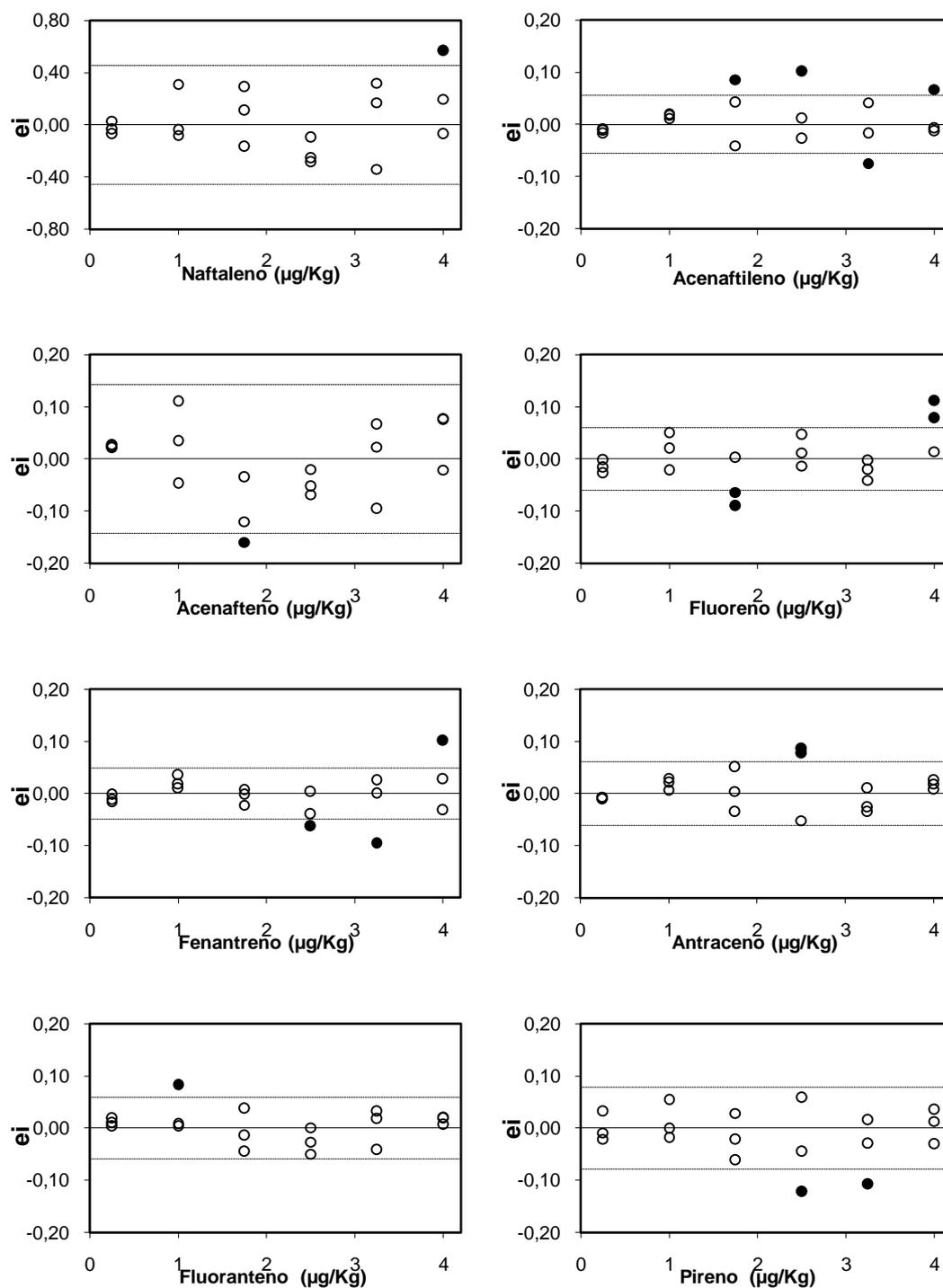


Figura 12 - Gráficos exploratórios dos resíduos da regressão dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos naftaleno, acenaftileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno e pireno, com os respectivos *outliers* diagnosticados pelo teste de resíduos padronizados Jackknife.

e_i = resíduo da regressão; \bullet = *outlier*; $e - \dots = (\pm t_{(0,975;n-2)} S_{res})$.

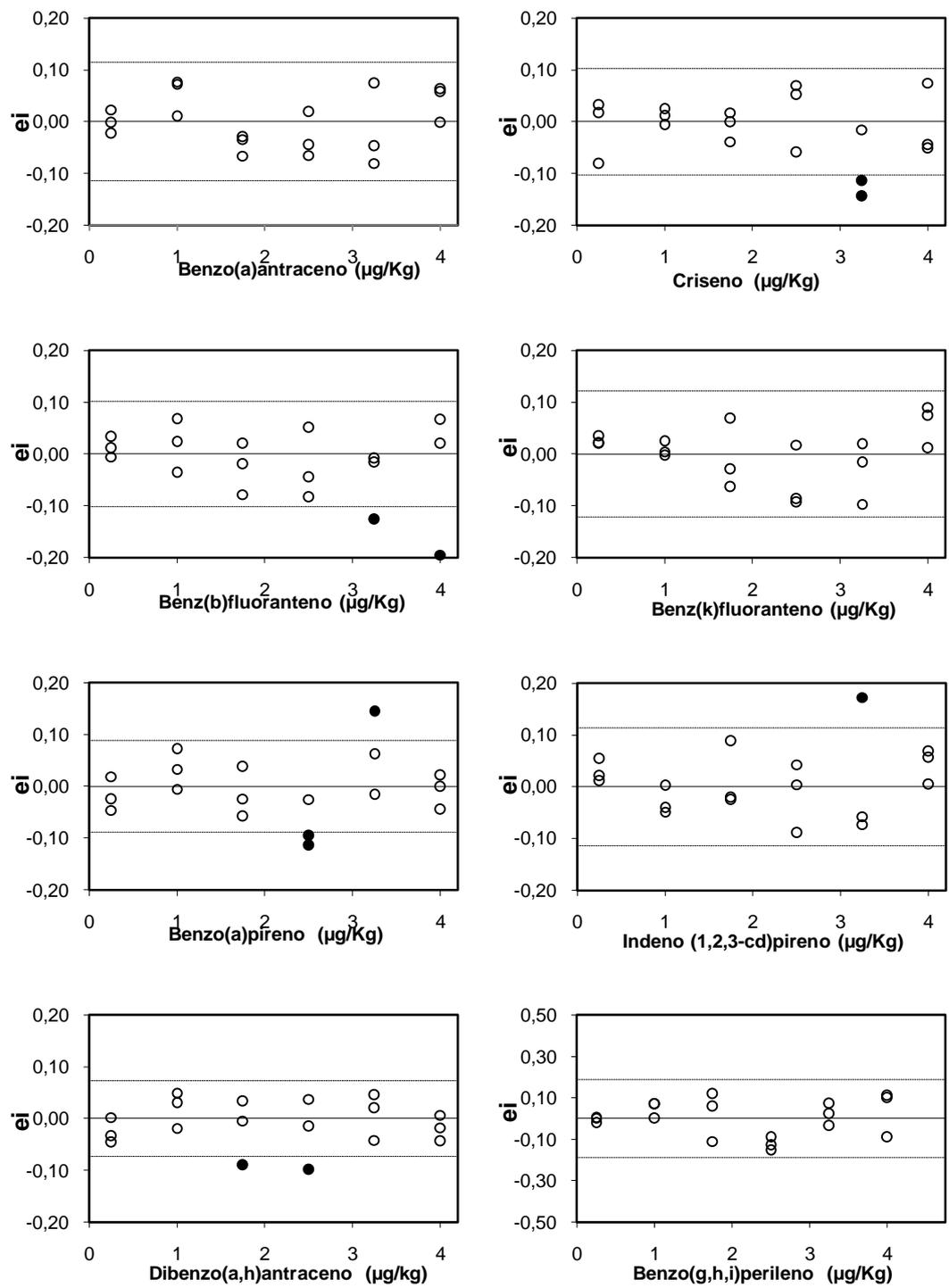


Figura 13 - Gráficos exploratórios dos resíduos da regressão dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, indeno(1,2,3-c,d)pireno, dibenzo(a,h)antraceno e benzo(g,h,i)perileno, com os respectivos *outliers* diagnosticados pelo teste de resíduos padronizados Jackknife.

e_i = resíduo da regressão; • = *outlier*; e - - - = $(\pm t_{(0,975;n-2)} S_{res})$.

As equações, coeficientes de determinação, assim como os resultados da avaliação das premissas do MMQO para os dezesseis analitos estudados encontram-se compilados na **Tabela 11**.

O teste de Ryan-Joiner para avaliação da normalidade dos resíduos indicou correlação significativa entre os resíduos da regressão e os valores normais teoricamente esperados. Os coeficientes de correlação de Ryan-Joiner variaram entre 0,956 e 0,995, para todos os analitos considerados, demonstrando que o desvio da distribuição normal não foi significativo ($p > 0,10$).

Houve independência dos resíduos da regressão. As estatísticas de Durbin-Watson foram calculadas entre 1,159 e 2,654 para os dezesseis HPAs, sugerindo que não houve autocorrelação ($p > 0,10$). A variabilidade dos resíduos ao longo das concentrações estudadas foi constante, uma vez que as estatísticas t de Levene estimadas não foram significativas ($p > 0,05$), confirmando a premissa de homocedasticidade dos resíduos da regressão.

A confirmação das premissas do MMQO garantiram uma aplicação segura dos testes de hipóteses t e F, além do emprego adequado do MMQO, sem ponderações.

A regressão foi altamente significativa ($p < 0,001$) em todos os casos e o desvio de linearidade não foi significativo ($p > 0,05$) em nenhum caso, indicando linearidade na faixa estudada, de 50 a 800 pg/ μ L, correspondente a 0,25 a 4,00 μ g/kg de café. A significância da regressão sinalizou, ainda, para a sensibilidade do método.

Badolato *et al.* (2006) e Houessou, Delteil & Camel (2006) trabalharam com faixas semelhantes a do presente trabalho entre 1 e 1000 pg/ μ L e 5 e 800 pg/ μ L, respectivamente. No entanto, o número de analitos considerado pelos referidos autores foi menor, tendo em vista que Badolato *et al.* (2006) investigaram somente o benzo(a)pireno e Houessou, Delteil & Camel (2006) estudaram onze HPAs. Faixas mais restritas foram reportadas na literatura, como 0,05 a 2 pg/ μ L para quinze HPAs (ISHIZAKI *et al.*, 2010) e 0,2 a 10 pg/ μ L para sete HPAs (STANCIU *et al.*, 2008). Nestes casos, a técnica empregada foi CLAE com detector de FL, a qual permitiu determinação em níveis menores. Porém, considerando os limites máximos regulamentados (UE, 2011b), a faixa validada como linear no presente trabalho foi considerada adequada.

Cumpra considerar que os trabalhos que tratam sobre a validação de métodos para determinação de HPAs na matriz café, acima relatados, apresentaram uma avaliação da linearidade inapropriada, visto que foram restritos à avaliação do coeficiente de correlação (THOMPSON, ELLISON & WOOD, 2002).

Tabela 11 - Equações, coeficientes de determinação e estatísticas relacionadas à avaliação da linearidade para os dezesseis hidrocarbonetos policíclicos aromáticos

Analito	Equação	Estatística						
		R ²	n	R	d	t _L	F _{Regressão}	F _{FaltaAjuste}
Naftaleno	$Y = (0,82 \pm 0,042)x + (0,186 \pm 0,099)$	0,962	17	0,981	1,725	-1,207	$3,81 \times 10^2$	1,011
Acenaftileno	$Y = (1,073 \pm 0,006)x + (0,013 \pm 0,014)$	1,000	14	0,995	1,815	-1,079	$4,17 \times 10^4$	0,603
Acenafteno	$Y = (1,553 \pm 0,012)x + (-0,088 \pm 0,031)$	0,999	17	0,990	1,614	-0,287	$1,59 \times 10^4$	2,142
Fluoreno	$Y = (1,164 \pm 0,006)x + (0,008 \pm 0,014)$	1,000	14	0,978	2,566	-0,151	$3,80 \times 10^4$	1,355
Fenantreno	$Y = (1,045 \pm 0,005)x + (0,043 \pm 0,011)$	1,000	15	0,993	2,619	-1,086	$5,12 \times 10^4$	1,560
Antraceno	$Y = (1,2 \pm 0,005)x + (0,06 \pm 0,013)$	1,000	16	0,990	2,145	-0,541	$5,26 \times 10^4$	2,803
Fluoranteno	$Y = (1,048 \pm 0,005)x + (-0,02 \pm 0,013)$	1,000	17	0,956	1,737	-0,782	$4,11 \times 10^4$	1,088
Pireno	$Y = (1,092 \pm 0,007)x + (0,057 \pm 0,017)$	0,999	16	0,988	2,654	-0,377	$2,50 \times 10^4$	0,251
Benz(a)antraceno	$Y = (1,072 \pm 0,01)x + (-0,017 \pm 0,025)$	0,999	18	0,975	2,175	-1,004	$1,16 \times 10^4$	2,799
Criseno	$Y = (0,995 \pm 0,009)x + (0,092 \pm 0,022)$	0,999	16	0,990	1,999	-1,682	$1,16 \times 10^4$	0,216
Benz(b)fluoranteno	$Y = (1,089 \pm 0,01)x + (-0,059 \pm 0,022)$	0,999	16	0,986	2,292	-0,581	$1,28 \times 10^4$	1,100
Benz(k)fluoranteno	$Y = (1,029 \pm 0,011)x + (-0,059 \pm 0,026)$	0,998	18	0,970	1,159	-1,591	$9,52 \times 10^4$	2,599
Benzo(a)pireno	$Y = (1,058 \pm 0,008)x + (0,029 \pm 0,019)$	0,999	15	0,984	2,240	0,557	$1,84 \times 10^4$	0,996
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	$Y = (0,944 \pm 0,01)x + (-0,041 \pm 0,024)$	0,998	17	0,993	2,042	-0,955	$8,83 \times 10^3$	2,509
Dibenzo(a,h)antraceno	$Y = (1,134 \pm 0,006)x + (0,023 \pm 0,016)$	1,000	16	0,976	2,530	-0,158	$3,26 \times 10^4$	1,149
Benzo(g,h,i)perileno	$Y = (0,995 \pm 0,016)x + (-0,042 \pm 0,04)$	0,996	18	0,978	1,983	-1,639	$3,73 \times 10^3$	2,757

R²: coeficiente de determinação; n: número de observações após tratamento de *outliers* pelo teste do resíduo padronizado Jack-Knife ($p < 0,05$); R: coeficiente de correlação de Ryan-Joiner ($p > 0,10$); d: estatística de Durbin-Watson ($p > 0,10$); t_L: estatística t de Levene ($p > 0,05$); F_{Regressão}: razão entre variâncias para significância da regressão ($p < 0,001$); F_{Falta de Ajuste}: razão entre variâncias para falta de ajuste ao modelo linear ($p > 0,05$).

5.2.2 Efeitos de matriz e seletividade

Tanto para a curva usual quanto para a matrizada, as premissas de que os resíduos da regressão seguiram a distribuição normal ($p > 0,10$), foram homocedásticos ($p > 0,05$) e independentes ($p > 0,10$) foram confirmadas. Além disto, regressão significativa ($p < 0,001$) e desvio de linearidade não significativo ($p > 0,05$) foram evidenciados. Tal confirmação não ocorreu para o composto naftaleno, para o qual foi evidenciado desvio de linearidade na curva usual ($p < 0,01$) e problemas na obtenção de respostas da curva matrizada, o que impossibilitou a aplicação do MMQO. Assim, a comparação entre as inclinações das duas curvas usual e matrizada foi conduzida para todos os analitos, exceto para o naftaleno.

Houve indicação de heterocedasticidade ($p < 0,05$), na comparação entre as variâncias dos resíduos das curvas usual e matrizada, para os compostos mais leves,

até o fluoranteno. A partir do composto pireno, não houve diferença significativa entre as variâncias de ambas as curvas ($p > 0,05$). Com base nesses resultados, foi conduzido teste t com variâncias distintas e combinadas, respectivamente, para comparação das inclinações (**Tabela 12**).

Ausência de efeitos de matriz significativos ($p > 0,05$) foi observada para todos os analitos, exceto para o composto acenaftileno ($p < 0,05$). A ausência de efeitos de matriz para quase a totalidade dos HPAs estudados pode ser atribuída à utilização da técnica de diluição isotópica, associada às etapas de extração e purificação, o que resultou em um extrato com poucos interferentes, principalmente para os compostos de maior massa molecular.

Assim, foi possível concluir que soluções padrão de acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)-pireno, indeno(1,2,3-c,d)pireno, dibenzo(a,h)antraceno e benzo(g,h,i)perileno, quando preparadas em solvente (nonano), forneceram respostas que não diferiram daquelas obtidas para amostras de café torrado contendo concentrações correspondentes. Conseqüentemente, curvas de solventes foram utilizadas nas etapas subseqüentes da validação para estimar as concentrações destes quatorze HPAs em amostras de café torrado.

Tabela 12 - Comparações entre as inclinações das curvas usuais e matrizadas para os dezesseis hidrocarbonetos policíclicos aromáticos

Analito	Homogeneidade das variâncias		Comparação das inclinações	
	F	p	t	p
Naftaleno	-	-	-	-
Acenaftileno	9,763	$4,91 \times 10^{-5}$	5,478	$8,14 \times 10^{-5}$
Acenafteno	46,776	$3,59 \times 10^{-9}$	1,155	0,270
Fluoreno	5,844	$1,17 \times 10^{-3}$	1,084	0,293
Fenantreno	21,494	$1,12 \times 10^{-7}$	0,289	0,777
Antraceno	7,452	$5,08 \times 10^{-4}$	1,420	0,177
Fluoranteno	3,672	0,010	1,501	0,148
Pireno	2,295	0,075	1,916	0,066
Benzo(a)antraceno	2,476	0,053	1,428	0,164
Criseno	1,523	0,229	1,666	0,108
Benzo(b)fluoranteno	1,687	0,174	0,847	0,405
Benzo(k)fluoranteno	1,417	0,268	0,954	0,349
Benzo(a)pireno	1,394	0,287	0,972	0,341
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	1,279	0,338	0,065	0,949
Dibenzo(a,h)antraceno	1,700	0,180	0,271	0,788
Benzo(g,h,i)perileno	2,142	0,095	0,025	0,980

F: razão entre variâncias; p = significância; t: estatística t para contrastes entre inclinações.

A avaliação dos efeitos de matriz é pouco explorada na literatura, não havendo estudos deste importante parâmetro de desempenho reportados nos trabalhos de validação de métodos para determinação de HPAs em café. Brito (2009) avaliou efeitos de matriz em método empregando CLAE-FL para análise de dezesseis HPAs em sedimentos, sendo observada ausência dos referidos efeitos. Belo *et al.* (2012) observaram efeitos de matriz em método para determinação de sete HPAs em óleos comestíveis por CG-EM com uso de diluição isotópica.

A diluição isotópica, além de aumentar a acurácia da medição, tem a capacidade de compensar possíveis efeitos de matriz (ROSE *et al.*, 2007; SARGENT, HARTE & HARRINGTON, 2002; SANCO, 2009). Os padrões internos utilizados diferenciam-se dos compostos de interesse apenas por possuírem de três a doze carbonos ¹³C marcados. Dessa forma, apresentam o mesmo comportamento na extração, sendo eluídos e chegando à fonte de ionização praticamente ao mesmo tempo. Portanto, uma eventual supressão ou pontencialização do sinal, causada por interferentes co-eluídos da matriz, tende a ser a mesma para o composto de interesse e seu padrão interno. Desta forma, quando da aplicação da razão das áreas dos picos, tais interferências tendem a se anular. Exemplos de cromatogramas típicos de compostos alvos e seus respectivos padrões internos são mostrados na **Figura 14**.

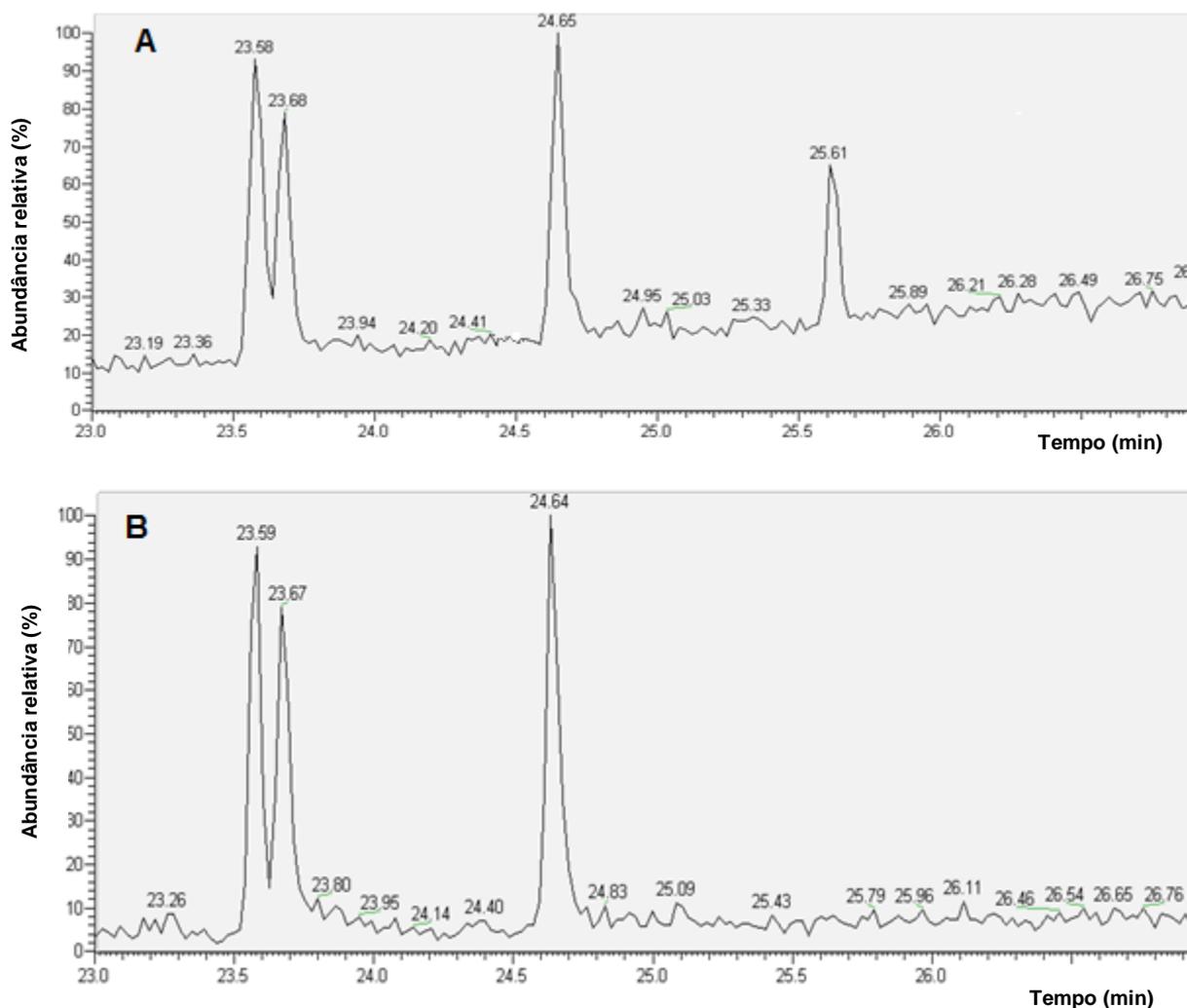


Figura 14 - Cromatogramas típicos obtidos para amostras adicionadas de padrão nativo a 0,25 µg/kg e padrão interno a 1 µg/kg.

A: padrões nativos. Tempos de retenção de 23,58; 23,68 e 24,65 min referentes aos compostos benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno e benzo(a)pireno, respectivamente.

B: padrões internos. Tempos de retenção de 23,59; 23,69 e 24,64 min referentes aos compostos benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno e benzo(a)pireno, respectivamente.

A resolução dos picos indicou capacidade de quantificação isolada dos dezesseis HPAs estudados, incluindo os pares de isômeros considerados críticos: benzo(b)fluoranteno/benzo(k)fluoranteno; criseno/benzo(a)antraceno; indeno(1,2,3-c,d)pireno/dibenzo(a,h)antraceno (GÓMEZ-RUIZ & WENZL, 2009), conforme os cromatogramas apresentados na **Figura 6**.

Na avaliação da seletividade empregando solução de uso do padrão nativo dos HPAs prioritários para a União Europeia, a coluna utilizada não permitiu a separação de dois analitos, o ciclopenta(c,d)pireno e o benzo(j)fluoranteno. Tais analitos, não cobertos pelo escopo do presente trabalho, co-eluíram com benzo(a)antraceno e benzo(b)fluoranteno, respectivamente (**Figura 15**).

Para o composto ciclopenta(c,d)pireno, foi possível obter uma diferenciação do do benzo(a)antraceno pelo íon específico de m/z 228 Da. Contudo, para o benzo(j)fluoranteno, não foi obtida seletividade suficiente, visto que este composto possui a mesma massa do benzo(b)fluoranteno, não sendo possível uma diferenciação. Quando presente nas amostras, a quantificação dos compostos benzo(b)fluoranteno e benzo(j)fluoranteno será reportada como somatório dos dois compostos. Essa abordagem também é utilizada por outros autores (VEYRAND *et al.*, 2007). Estes compostos só podem ser eluídos isoladamente com o uso de colunas específicas, com fase estacionária de média polaridade, como colunas DB-17MS (50% fenil-metil-polisiloxano) ou DB-EUPAH (Agilent Technologies). GÓMEZ-RUIZ & WENZL (2009) conseguiram uma separação satisfatória para os isômeros, com tempo total de corrida de 45 min, utilizando coluna DB-17MS (20 m de comprimento, 0,18 mm de diâmetro interno e 0,14 μm de espessura do filme), confeccionada exclusivamente para o trabalho.

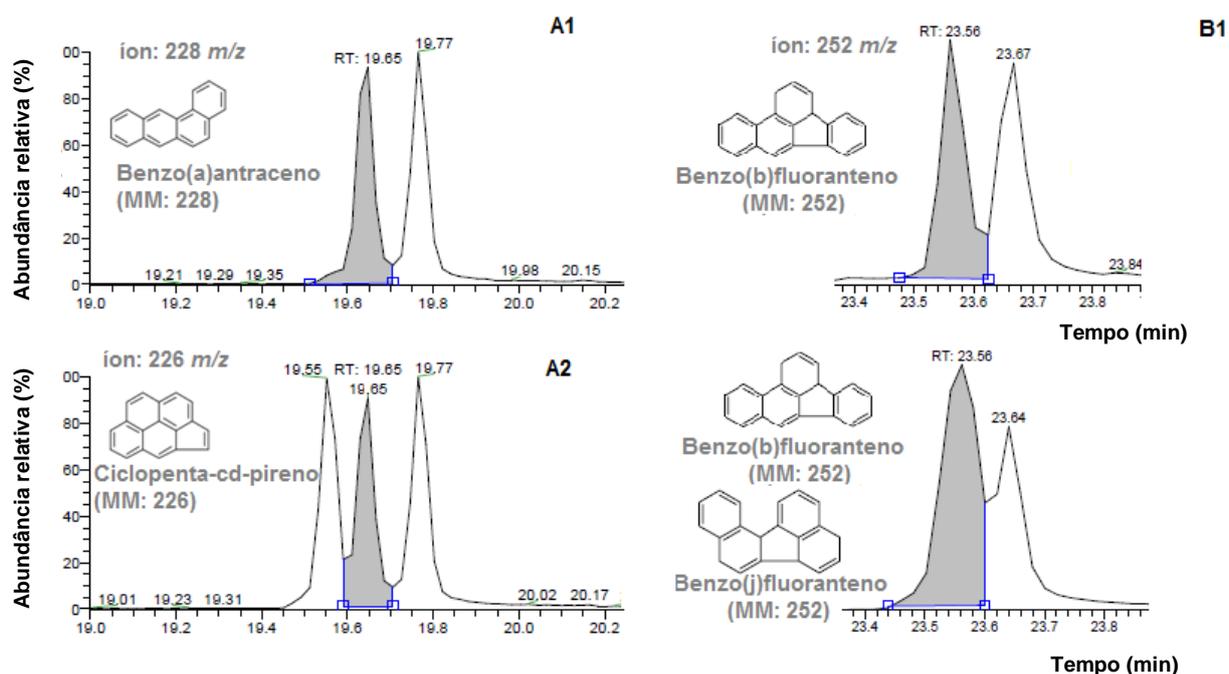


Figura 15 - Co-eluição dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos ciclopenta(c,d)pireno e benzo(j)fluoranteno com benzo(a)antraceno e benzo(b)fluoranteno, respectivamente.

A1: benzo(a)antraceno, padrão nativo União Europeia, tempo de retenção de 19,65 min, detectado sem interferência quando m/z = 228 Da; A2: ciclopenta(c,d)pireno, padrão nativo União Europeia, tempo de retenção de 19,55 min; B1: benzo(b)fluoranteno, padrão nativo EPA, tempo de retenção de 23,56 min; B2: benzo(b)fluoranteno e benzo(j)fluoranteno, padrão nativo União Europeia, tempo de retenção de 23,56 min e mesma massa.

A avaliação da variação entre as intensidades relativas dos íons confirmatórios obtidas para padrões e amostras adicionadas dos HPAs está apresentada na **Tabela**

13, sendo adotados os critérios descritos na **Tabela 6**. A seletividade do método foi evidenciada para os dez analitos de maior massa molecular, visto que as variações foram menores que 10 % quando a intensidade relativa dos íons foi maior que 50 % e menores que 15 % quando a intensidade relativa variou entre 25 e 50 %. Para os compostos indeno(1,2,3-c,d)pireno, dibenzo(a,h)antraceno e benzo(g,h,i)perileno as intensidades relativas diferiram no primeiro nível de concentração estudado em relação aos demais, sendo, portanto, reportadas separadamente na **Tabela 13**.

Tabela 13 - Intensidades relativas dos íons confirmatórios obtidas para soluções padrões e amostras adicionadas, por anaito, e respectivas variações

Analito	Íons ¹ (m/z)	Intensidade Relativa Média – padrões ² (%)	Intensidade Relativa Média – amostras ² (%)	Varição ³ (%)
Pireno	200, <u>202</u>	96,3 ± 6,2	93,3 ± 7,2	3,1
Fluoranteno	200, <u>202</u>	95,8 ± 6,4	91,1 ± 8,4	4,9
Benzo(a)antraceno	226, <u>228</u>	74,3 ± 8,9	76,4 ± 7,8	2,9
Criseno	226, <u>228</u>	79,5 ± 9,4	83,1 ± 9,1	4,5
Benzo(b)fluoranteno	250, <u>252</u>	73,5 ± 9,1	72,5 ± 8,9	1,4
Benzo(k)fluoranteno	250, <u>252</u>	72,3 ± 10,0	69,7 ± 9,4	3,6
Benzo(a)pireno	250, <u>252</u>	78,5 ± 9,2	75,7 ± 7,8	3,6
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	<u>276</u> , 277	50,9 ± 9,3 ⁴	53,0 ± 9,6	4,1
		28,4 ± 8,6 ⁵	30,0 ± 14,4	5,6
Dibenzo(a,h)antraceno	<u>278</u> , 279	56,3 ± 10,0 ⁴	55,9 ± 8,2	5,4
		32,2 ± 8,5 ⁵	35,1 ± 13,4	9,3
Benzo(g,h,i)perileno	<u>276</u> , 277	52,6 ± 6,3 ⁴	56,5 ± 7,7	0,8
		26,3 ± 8,3 ⁵	28,2 ± 13,5	7,3

¹ Os íons sublinhados correspondem aos íons de maior intensidade no espectro de massas de cada composto e utilizados na quantificação. m/z: razão entre massa e carga.

² Número de observações: 24

³ Valor absoluto da diferença entre as intensidades relativas médias dos padrões e amostras, dividida pelas intensidades relativas médias dos padrões, expressa em porcentagem.

⁴ Consideradas as intensidades do primeiro nível de concentração da curva e de adição em amostra (0,25 µg/kg).

⁵ Consideradas as intensidades dos demais níveis de concentração, exceto o primeiro, da curva (1,00 a 4,00 µg/kg) e de adição em amostra (1,00 e 3,00 µg/kg).

A avaliação dos espectros para os seis compostos de menor massa molecular (naftaleno, acenaftileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno) ficou prejudicada. A presença de grande quantidade de interferentes nos cromatogramas das amostras

adicionadas (**Figura 16**) dificultou a identificação dos compostos. Foi decidido não realizar alterações no método para contemplar a análise destes HPAs, em função de sua menor toxicidade (**Tabela 2**) e maior volatilidade (**Tabela 1**), resultando em menor importância para monitoramento, especialmente na matriz café.

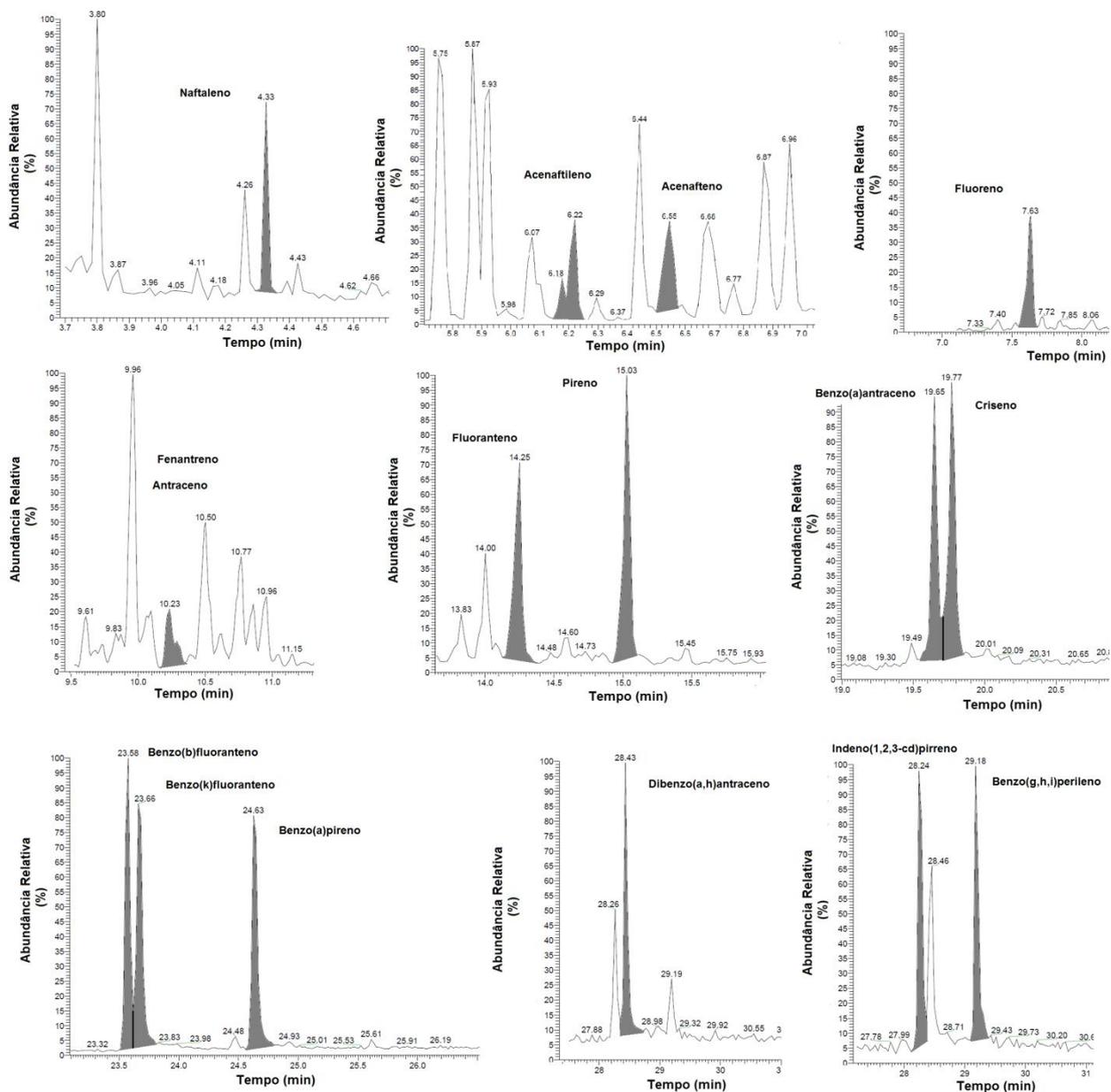


Figura 16 - Cromatogramas típicos obtidos para amostra adicionada (1µg/kg) para os dezesseis hidrocarbonetos policíclicos aromáticos estudados.

5.2.3 Recuperação e precisão

A amostra utilizada para validação do método continha uma quantidade nativa de 2,74 $\mu\text{g/kg}$ de pireno, 0,58 $\mu\text{g/kg}$ de benzo(a)antraceno, 0,47 $\mu\text{g/kg}$ de criseno, 0,30 $\mu\text{g/kg}$ dos benzo-fluorenos b e j, 0,58 $\mu\text{g/kg}$ dibenzo(a)antraceno. Continham ainda traços dos analitos: fluoranteno (0,08 $\mu\text{g/kg}$), benzo(k)fluoranteno (0,01 $\mu\text{g/kg}$), benzo(a)pireno (0,15 $\mu\text{g/kg}$), indeno(1,2,3-c,d)pireno (0,08 $\mu\text{g/kg}$) e benzo(g,h,i)perileno (0,17 $\mu\text{g/kg}$). Estes valores representaram as médias das concentrações obtidas na análise de dezoito replicatas independentes da amostra sem adição e foram somados às concentrações adicionadas para estimativa das porcentagens de recuperação.

O teste de Grubbs indicou presença de *outliers* ($p > 0,05$) para todos os compostos, considerando os três níveis de concentração estudados, exceto para o benzo(a)pireno. Em nenhum caso houve indicação de *outliers* acima do limite máximo de 22,2 % dos dados originais.

Os resíduos, obtidos pela diferença entre a recuperação média e os valores individuais de recuperação obtidos em cada bateria analítica, para cada nível de concentração, apresentaram distribuição normal ($p > 0,10$) e variâncias homogêneas ($p > 0,05$), permitindo estimativa dos DPR_r e DPR_R por análise de variância.

Na **Tabela 14** são apresentados os resultados de porcentagem de recuperação média, DPR_r e DPR_R , bem como as razões de Horrat, para os diferentes níveis de concentração e analitos pesquisados.

Tabela 14 - Médias de recuperação, desvios padrão relativos e razões de Horrat, sob condições de repetibilidade e precisão intermediária, obtidos para amostras de café torrado adicionadas de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em diferentes níveis de concentração

Analito	Concentração ¹ (µg/kg)	n ²	Recuperação Média (%)	DPR _r ³ (%)	DPR _R ⁴ (%)	Horrat _r ⁵	Horrat _R ⁶
Fluoranteno	3,09	16	102,85	9,92	10,74	0,68	0,49
	3,84	16	99,31	5,35	7,93	0,36	0,36
	5,84 ⁷	16	97,31	10,90	11,47	0,74	0,52
Pireno	2,99	16	99,06	23,75	33,34	1,62	1,52
	3,74	17	96,09	20,09	30,43	1,37	1,38
	5,74 ⁷	18	87,92	11,34	23,40	0,77	1,06
Benzo(a)antraceno	0,83	18	100,19	3,54	3,54	0,68	0,49
	1,58	18	102,04	8,75	9,28	0,36	0,36
	3,58	16	98,87	5,52	5,57	0,74	0,52
Criseno	0,72	18	104,09	5,35	5,35	0,36	0,24
	1,47	16	111,28	3,29	3,29	0,22	0,15
	3,47	17	99,64	4,73	4,73	0,32	0,22
Benzo(b)fluoranteno ⁸	0,55	18	98,19	6,29	6,50	0,43	0,30
	1,30	16	97,57	6,69	6,69	0,46	0,30
	3,30	18	97,76	5,99	7,06	0,41	0,32
Benzo(k)fluoranteno	0,32	17	97,25	11,16	14,04	0,76	0,64
	1,01	16	100,08	9,21	11,64	0,63	0,53
	3,01	18	99,30	6,45	6,86	0,44	0,31
Benzo(a)pireno	0,40	18	98,62	7,28	8,68	0,50	0,39
	1,15	18	99,05	10,45	10,45	0,71	0,47
	3,15	18	100,03	4,84	4,84	0,33	0,22
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	0,33	16	99,89	10,87	11,12	0,74	0,51
	1,08	17	102,40	9,20	9,36	0,63	0,43
	3,08	16	98,42	4,88	4,88	0,33	0,22
Dibenzo(a,h)antraceno	0,26	16	87,08	9,04	14,82	0,62	0,67
	1,01	18	104,60	13,94	16,46	0,95	0,75
	3,01	15	99,65	9,94	9,94	0,68	0,45
Benzo(g,h,i)perileno	0,42	16	95,19	5,84	11,07	0,40	0,50
	1,17	17	97,05	6,83	6,83	0,47	0,31
	3,17	17	99,49	3,26	4,88	0,22	0,22

¹ Níveis de adição: 0,25; 1,00 e 3,00 µg/kg somados à média das determinações de dezoito replicatas independentes da amostra sem adição.

² n: número de observações após tratamento de outliers pelo teste de Grubbs.

³ DPR_r: desvio padrão relativo de repetibilidade.

⁴ DPR_R: desvio padrão relativo de reprodutibilidade (precisão intermediária no caso deste estudo intralaboratorial).

⁵ Horrat_r: razão entre o DPR_r do método e o DPR_r definido como 2/3 do desvio padrão relativo de reprodutibilidade obtido a partir das funções de Horwitz (1982) ou Thompson (2000).

⁶ Horrat_R: razão entre o DPR_R do método e o DPR_R obtido a partir das funções de Horwitz (1982) ou Thompson (2000).

⁷ Concentração total (nativa somada à adicionada) excedeu o limite superior da faixa linear.

⁸ Expresso como o somatório dos compostos benzo(b)fluoranteno e benzo(j)fluoranteno.

Nos níveis avaliados, os valores médios de porcentagem de recuperação obtidos para os dez HPAs variaram entre 87,08 e 111,28 %, atendendo ao critério de aceitabilidade utilizado como referência, entre 50 e 120 % (EU, 2011b). Tais critérios foram atendidos para todos os analitos, nos três níveis de concentração estudados, com exceção do pireno, mesmo se considerados os resultados individuais de porcentagem de recuperação (**Figuras 17 e 18**).

Para o analito pireno foram alcançados valores de DPR_r e DPR_R maiores que aqueles estimados para demais compostos, resultando em valores de HORRAT_r e HORRAT_R de até 1,62 e 1,52, respectivamente. Com exceção do referido composto, os

valores de DPR_r e DPR_R variaram entre 3,26 e 13,94 % e entre 3,29 e 16,46 %, respectivamente. As razões de Horrat_r foram estimadas entre 0,22 e 0,95, enquanto as de Horrat_R foram calculadas entre 0,15 e 0,75. Os resultados indicam que o método foi preciso na faixa estudada para os dez analitos considerados. De forma geral, os valores de Horrat obtidos foram menores que 1, ou seja, inferiores ao limite máximo aceitável, estabelecido em 2 (EU, 2011b).

Para os compostos fluoranteno e pireno as concentrações totais (nativa somada à adicionada) do maior nível estudado extrapolaram o limite superior da faixa de linear. Devido ao emprego de padrão interno, a diluição do extrato purificado, ficaria inviabilizada, visto que o padrão também seria diluído. Desta forma, a única alternativa seria repetir os ensaios com uma alíquota menor da amostra, o que alteraria a marcha analítica validada. As recuperações estimadas nestes casos também atenderam aos critérios de recuperação e precisão.

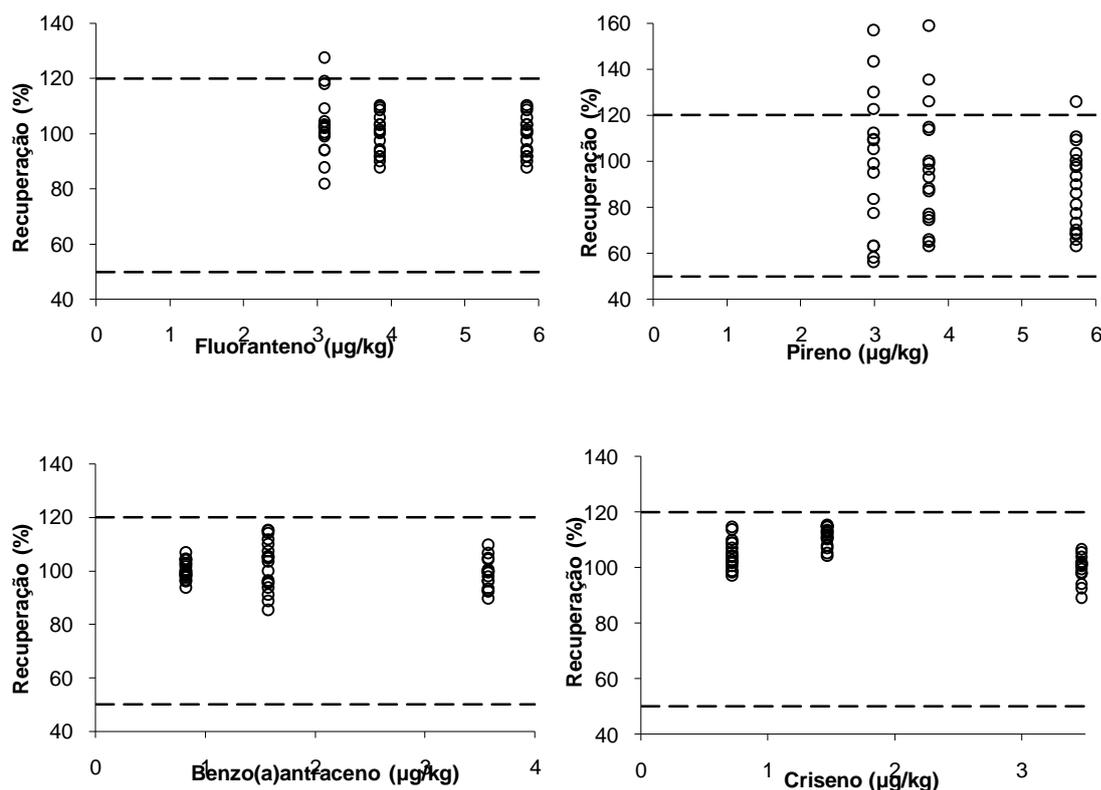


Figura 17 - Distribuição dos resultados individuais de porcentagem de recuperação obtidos para fluoranteno, pireno, benzo(a)antraceno e criseno, nos três níveis de concentração estudados.

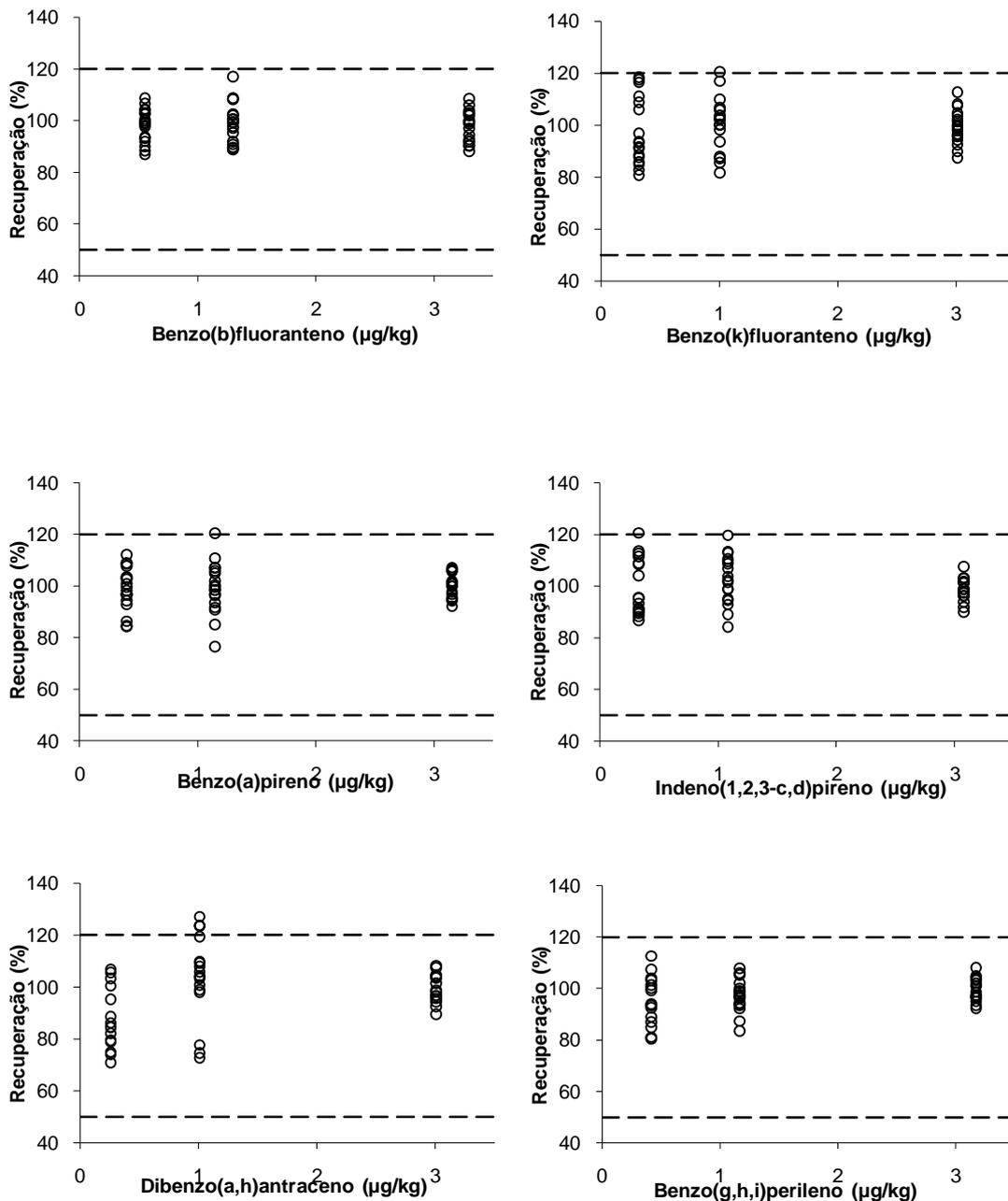


Figura 18 - Distribuição dos resultados individuais de porcentagem de recuperação obtidos para benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)-pireno, indeno(1,2,3-c,d)pireno, dibenzo(a,h)antraceno e benzo(g,h,i)perileno nos três níveis estudados.

Tfouni (2012) obteve valores de recuperação entre 66 e 87 % para amostras de café torrado adicionadas de quatro HPAs (benzo(a)pireno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno e benzo(a)antraceno), entre 1 e 3 µg/kg. Tais valores foram

obtidos em experimentos com 5 replicatas, sob condições de repetibilidade. Os DPR_r variaram entre 12 e 22 % para os diferentes HPAs.

Porcentagens de recuperação entre 76 e 116 % foram estimadas por Badolato (2006) para a mesma matriz e níveis de fortificação estudados por Tfouni (2012), embora neste caso apenas o benzo(a)pireno tenha sido estudado. Os experimentos foram realizados em triplicata. Apesar do autor não detalhar as condições de realização dos experimentos, presume-se que tenham sido conduzidos sob condições de repetibilidade. Os valores encontrados variaram entre 12 % (para o maior nível) e 18 % (para o menor nível).

Como não foi encontrado na literatura trabalho que emprega a técnica da diluição isotópica para determinação de HPAs na matriz café torrado, uma comparação de métodos que empregam essa técnica, mesmo em outras matrizes, torna-se pertinente. Considerando óleos comestíveis (ROSE *et al.*, 2007), os valores de porcentagem de recuperação, avaliados nos níveis 1 e 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$, para 27 HPAs, situaram-se entre 88 % para o benzo(k)fluoranteno e 102 % para o fluoranteno. O analito pireno foi o que apresentou maior DPR_R , 48 %, como observado no presente trabalho. O menor DPR_R foi de 3 %, obtido para o analito dibenzo(a,h)antraceno. O analito benzo(g,h,i)perileno não foi contemplado no estudo.

Em método para análise de alimentos (VEYRAND *et al.*, 2007) foram encontrados valores de recuperação entre 73,1 % (dibenzo(a,h)antraceno) e 113% (benzo(a)antraceno) obtidos pela análise de MRC de óleo. Os valores de precisão intermediária variaram entre 2,9 e 8,4 %.

Os resultados das porcentagens de recuperação do padrão interno, cujas médias variaram de 68,0 a 78,2%, estão apresentados na **Tabela 15**. Uma das vantagens do uso do padrão interno é que perdas parciais durante a extração são automaticamente corrigidas (SARGENT, HARTE & HARRINGTON, 2002). Veyrand *et al.* (2007) obtiveram cálculo da concentração final, com acurácia, mesmo com recuperações médias do padrão interno entre 30 e 70%. Outra vantagem do uso do padrão interno é o ganho de precisão (ROSE *et al.*, 2007; SARGENT, HARTE & HARRINGTON, 2002). Mesmo os elevados valores de DPR das recuperações do padrão interno foram, em parte, compensados, visto que resultaram em valores de DPR_R e DPR_r aceitáveis (**Tabela 14**).

Tabela 15 - Médias de recuperação, desvios padrão relativos obtidos para os padrões internos.

Analito	Recuperação Média (%)	DPR (%)
Fluoranteno- ¹³ C	68,01	28,10
Pireno- ¹³ C	74,07	26,21
Benzo(a)antraceno- ¹³ C	73,29	28,98
Criseño- ¹³ C	71,82	27,76
Benzo(b)fluoranteno- ¹³ C	74,75	30,36
Benzo(k)fluoranteno- ¹³ C	77,72	30,28
Benzo(a)pireno- ¹³ C	78,22	32,10
Indeno(1,2,3-c,d)pireno- ¹³ C	73,45	32,86
Dibenzo(a,h)antraceno- ¹³ C	69,85	35,50
Benzo(g,h,i)perileno- ¹³ C	74,27	29,63

Número de observações: 72.

5.2.4 Limites e incerteza

A injeção de diluições sucessivas de solução padrão, indicou um limite de detecção do equipamento em 5 pg injetados. Esta foi a menor massa de HPAs para a qual foi observado sinal ruído > 3. Considerando-se a marcha analítica do método otimizado e validado (alíquota de 10 g de amostra, volume final do extrato retomado para 50 µL e injeção de 1 µL) o limite de detecção do equipamento correspondeu a 0,025 µg/kg de café.

Os limites de detecção e quantificação teóricos, obtidos pela análise de 21 replicatas de brancos de reagentes, ou seja, realização de todo procedimento analítico, com omissão da matriz, estão apresentados na **Tabela 16**. Nesta Tabela também encontram-se reportados os limites de quantificação do método.

Os limites estimados atenderam aos critérios estabelecidos pelo regulamento UE/836/2011 (EU, 2011b), no qual são definidos valores máximos de 0,3 e 0,9 µg/kg para os limites de detecção e quantificação do método, respectivamente, exceto para os limites de quantificação do método dos analitos fluoranteno e pireno. Cumpre ressaltar que os critérios do regulamento aplicam-se aos compostos benzo(a)pireno, benzo(a)antraceno, criseño e benzo(b)fluoranteno.

Tabela 16 - Limites de detecção teóricos e de quantificação teóricos e do método estimados para os dez hidrocarbonetos policíclicos aromáticos

Analito	Limite de detecção (µg/kg)		Limite de quantificação (µg/kg)	
	Teórico (brancos de reagentes)	Teórico (brancos de reagentes)	Teórico (amostra de café torrado)	Do método
Fluoranteno	0,08	0,25	3,50	3,09
Pireno	0,18	0,59	4,50	2,99
Benzo(a)antraceno	0,05	0,16	0,54	0,83
Criseno	0,03	0,11	0,64	0,72
Benzo(b)fluoranteno	0,06	0,19	0,35	0,55
Benzo(k)fluoranteno	0,07	0,24	0,51	0,32
Benzo(a)pireno	0,07	0,23	0,33	0,40
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	0,04	0,12	0,39	0,33
Dibenzo(a,h)antraceno	0,07	0,24	0,22	0,26
Benzo(g,h,i)perileno	0,05	0,16	0,34	0,42

Na **Tabela 17** são apresentadas as estimativas de incerteza por nível de concentração. O analito pireno apresentou valor alto para incerteza, resultante do alto DVR_R . Este componente foi o que mais contribuiu para o valor da incerteza combinada. Para os demais HPAs foram obtidos valores de incerteza menores do que as incertezas de medição máximas aceitáveis (UE, 2011b), as quais variaram de 40,05 a 48,41 %. Destaca-se o fato de que os critérios aplicam-se somente aos compostos benzo(a)pireno, benzo(a)antraceno, criseno e benzo(b)fluoranteno.

As incertezas a serem associadas aos resultados de medição foram selecionadas como aquelas de maiores valores percentuais nas faixas estudadas.

Tabela 17 - Estimativas das incertezas de medição por nível estudado e respectivas incertezas máximas aceitáveis

Analito	U, k = 2						U a ser utilizada (%)	U _f , k=2 (%)
	N1		N2		N3			
	µg/kg	%	µg/kg	%	µg/kg	%		
Fluoranteno	0,08	22,88	0,17	15,83	0,69	22,32	22,88	48,41
Pireno	1,98	66,06	2,19	58,49	2,36	41,16	66,06	40,45
Benzo(a)antraceno	0,10	11,85	0,12	7,49	0,34	9,49	11,85	40,45
Criseno	0,19	26,22	0,51	34,47	0,71	20,38	34,47	40,05
Benzo(b)fluoranteno	0,08	14,08	0,17	13,19	0,46	13,81	14,08	41,46
Benzo(k)fluoranteno	0,10	30,76	0,24	23,56	0,41	13,65	30,76	45,59
Benzo(a)pireno	0,08	18,80	0,24	20,80	0,31	9,72	20,80	40,46
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	0,09	26,21	0,21	19,44	0,30	9,67	26,21	41,80
Dibenzo(a,h)antraceno	0,07	27,61	0,35	34,48	0,61	20,36	34,48	40,60
Benzo(g,h,i)perileno	0,11	26,85	0,16	13,98	0,31	9,87	26,85	41,73

Níveis de adição N1: 0,25 µg/kg; N2: 1,00 µg/kg e N3: 3,00 µg/kg somados à média das determinações de dezoito replicatas independentes da amostra sem adição.

U: incerteza expandida.

K: fator de abrangência

U_f: incerteza expandida máxima aceitável de acordo com critério UE (2011b).

5.3 APLICAÇÃO DO MÉTODO VALIDADO NA ANÁLISE DE AMOSTRAS COMERCIAIS

Na avaliação de amostras comerciais, para uma das três marcas analisadas, em todos os tipos, lotes e replicatas, foi constatada a presença dos seguintes HPAs em níveis maiores que o limite de quantificação do método: fluoranteno, pireno, benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno, benzo(g,h,i)perileno e benzo(a)pireno (**Tabela 18**).

Assim, dentre as oito amostras para as quais foram quantificados HPAs, três apresentaram resultados quantificáveis para um HPA, sendo duas amostras de denominação tradicional e uma amostra com denominação extra-forte. Em uma amostra extra-forte, foram quantificados dois HPAs. Em outras três amostras, duas extra-forte e uma tradicional, foram quantificados cinco HPAs. E em uma das amostras tipo tradicional foram quantificados seis HPAs. Tfouni *et al.* (2012) não encontraram relação entre o grau de torração e a presença dos HPAs. Já Houessou *et al.* (2007) mostraram que em temperaturas altas de torração, 250 a 260 °C, ocorreu maior formação dos compostos benzo(a)antraceno e criseno.

A amostra com maior nível de contaminação foi do tipo tradicional, com concentração para o somatório de HPAs de $11,29 \pm 2,33$ µg/kg. Considerando-se

apenas os quatro HPAs presentes no regulamento da legislação europeia, que trata sobre os limites máximos permitidos destes contaminantes em alimentos (EU, 2011a), o somatório foi de $3,87 \pm 0,61 \mu\text{g}/\text{kg}$. Na mesma amostra, o composto benzo(a)pireno contribuiu com $0,50 \pm 0,10 \mu\text{g}/\text{kg}$. Na legislação citada não são preconizados limites para a matriz café. Para fins de comparação, o limite adotado para o benzo(a)pireno varia de 1,00 a $6,00 \mu\text{g}/\text{kg}$ e para a soma dos 4 compostos descritos acima o limite varia de 1,00 a $35,00 \mu\text{g}/\text{kg}$, entre as matrizes regulamentadas (**Tabela 3**).

A classificação descrita pela ABIC utiliza os termos “tradicional”, “superior” e “gourmet” para caracterizar qualitativamente diferentes tipos de café (ABIC, 2013b). As amostras analisadas neste estudo enquadram-se na classificação “tradicional” da ABIC. A diferenciação entre as denominações ou tipos tradicional e extra-forte foi baseada na embalagem comercial do produto, acreditando-se ser o extra-forte um café originado de um processo de torração mais intenso. Entretanto, apenas uma das marcas, para a qual não foram determinados HPAs acima do limite de quantificação, apresentou a classificação de torração na embalagem - média.

Tabela 18. Resultados das concentrações dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e respectivas incertezas de medição, obtidas na avaliação de amostras comerciais para a marca que apresentou contaminação

Analito	Torra extra-forte				Torra tradicional			
	Lote 1		Lote 2		Lote 1		Lote 2	
	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2
	$\mu\text{g}/\text{kg}$							
Fluoranteno	$3,54 \pm 0,81$	$3,67 \pm 0,84$	$3,80 \pm 0,87$	< 3,09	$4,25 \pm 0,97$	$4,37 \pm 1,00$	< 3,09	< 3,09
Pireno	< 2,99	< 2,99	< 2,99	< 2,99	< 2,99	$3,05 \pm 2,01$	< 2,99	< 2,99
Benzo(a)antraceno	$1,06 \pm 0,12$	$0,91 \pm 0,11$	< 0,83	< 0,83	$0,99 \pm 0,12$	$1,00 \pm 0,12$	< 0,83	< 0,83
Criseno	$1,75 \pm 0,6$	$1,76 \pm 0,61$	$1,22 \pm 0,42$	$1,00 \pm 0,35$	$1,69 \pm 0,58$	$1,70 \pm 0,58$	$1,48 \pm 0,51$	$1,47 \pm 0,51$
Benzo(b)fluoranteno ¹	$0,67 \pm 0,09$	$0,64 \pm 0,09$	< 0,55	< 0,55	$0,62 \pm 0,09$	$0,67 \pm 0,10$	< 0,55	< 0,55
Benzo(k)fluoranteno	< 0,32	< 0,32	< 0,32	< 0,32	< 0,32	< 0,32	< 0,32	< 0,32
Benzo(a)pireno	$0,5 \pm 0,1$	$0,51 \pm 0,11$	< 0,40	< 0,40	$0,51 \pm 0,11$	$0,50 \pm 0,10$	< 0,40	< 0,40
Indeno(1,2,3-cd)pireno	< 0,33	< 0,33	< 0,33	< 0,33	< 0,33	< 0,33	< 0,33	< 0,33
Dibenzo(a,h)antraceno	< 0,26	< 0,26	< 0,26	< 0,26	< 0,26	< 0,26	< 0,26	< 0,26
Benzo(g,h,i)perileno	< 0,42	< 0,42	< 0,42	< 0,42	< 0,42	< 0,42	< 0,42	< 0,42
Σ HPAs	$7,52 \pm 1,03$	$7,5 \pm 1,05$	$5,02 \pm 0,97$	$1,00 \pm 0,35$	$8,06 \pm 1,15$	$11,29 \pm 2,33$	$1,48 \pm 0,51$	$1,47 \pm 0,51$
Σ HPAs ₄ ²	$3,98 \pm 0,63$	$3,83 \pm 0,63$	$1,22 \pm 0,42$	$1,00 \pm 0,35$	$3,81 \pm 0,61$	$3,87 \pm 0,61$	$1,48 \pm 0,51$	$1,47 \pm 0,51$

¹ Reportado como somatório dos compostos benzo(b)fluoranteno e benzo(j)fluoranteno.

² Somatório dos quatro HPAs presentes no regulamento europeu para alimentos (UE, 2011a).

O analito mais frequente foi o criseno, detectado em todas as amostras nas quais houve resultados quantificados. Isso mostra, que o monitoramento apenas do composto benzo(a)pireno como indicador de contaminação de HPAs pode levar a conclusões equivocadas, conforme já relatado na literatura (EC, 2002b).

O analito presente em maior nível foi o fluoranteno, $4,37 \pm 1,00 \mu\text{g}/\text{kg}$, seguido do pireno $3,05 \pm 2,01 \mu\text{g}/\text{kg}$. Estes também foram os compostos encontrados em maior concentração por Camargo & Toledo (2002b), 5,86 e 11,03 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectivamente. Os valores apresentados por estes autores são valores médios entre 18 amostras de três marcas diferentes. Ishizaki *et al.* (2010) reportaram a presença de pireno ($8,4 \pm 0,1 \mu\text{g}/\text{kg}$), criseno ($1,8 \pm 0,1 \mu\text{g}/\text{kg}$) e benzo(k)fluoranteno ($2,6 \pm 0,1 \mu\text{g}/\text{kg}$), entre outros HPAs em amostras de café torrado.

Devem ser realizados estudos subsequentes para a avaliação da transferência dos HPAs do pó de café para a bebida. Segundo Houessou *et al.* (2007), a taxa de transferência para a bebida por infusão é menor que 35 %, e torras severas levam a uma taxa de transferência menor. Em outro estudo (CAMARGO, 2002b) foi verificado que o processo de preparo da bebida tem influência significativa sobre a transferência dos HPAs. Enquanto que para o café coado, a taxa de transferência foi de cerca de 15 %, para o café fervido a transferência do pó para a bebida foi quase total.

6 CONCLUSÕES

A otimização do método levou a um aumento das recuperações para os HPAs de maior massa molecular pelo aumento do volume de rinsagem na ELP e redução do volume de hexano na partição líquido-líquido.

O uso do padrão interno permitiu que os critérios de desempenho do método, avaliados na validação, fossem atendidos. A ausência de efeito de matriz pode ser justificada pelo uso do padrão interno isotopicamente marcado.

A validação do método otimizado para análise de HPAs em café torrado demonstrou adequação ao propósito de uso para dez analitos, sendo estes de maior interesse (maior carcinogenicidade e menor volatilidade): fluoranteno, pireno, benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)-pireno, indeno(1,2,3-c,d)pireno, dibenzo(a,h)antraceno, benzo(g,h,i)perileno.

O método não apresentou seletividade para os analitos: naftaleno, acenaftileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno.

Contaminação por HPAs foi evidenciada em amostras de café torrado disponíveis no mercado de Belo Horizonte – MG. Os compostos e respectivos níveis de concentração quantificados na análise destas amostras comerciais justificam o desenvolvimento de trabalhos subsequentes para uma melhor investigação da contaminação do café torrado brasileiro por HPAs.

7 PERSPECTIVAS

Estudos de ampliação do escopo do método validado para a matriz bebida e outros produtos de café devem ser conduzidos.

Investigações futuras sobre a transferência dos HPAs presentes no café torrado para a bebida e outros produtos de café devem ser realizadas no sentido de permitir uma adequada avaliação de exposição e risco pela ingestão.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIC (Associação Brasileira da Indústria de Café) 2013. Disponível em: <<http://www.abic.com.br/publique/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=61#1910>>.

Acesso em: 22 mar. 2013. (a)

ABIC (Associação Brasileira da Indústria de Café). *Norma de qualidade recomendável e boas práticas de fabricação de cafés torrados em grão e cafés torrados e moídos*. Rev. 25, 2013. (b)

ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas) ISO (International Standard Organization). *ABNT NBR ISO/IEC 17025*. Requisitos gerais para a competência de laboratório de ensaio e calibração. Rio de Janeiro: ABNT, 2005. 31 p.

ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry). *Toxicological profile for polycyclic aromatic hydrocarbons*. Atlantac, GA, 1995. 487 p.

BADOLATO, E.S.G.; MARTINS M.S.; PIMENTEL, S.A.; ALABURDA, J.; KUMAGAI, E.E.; BAPTISTA, G.G.; ROSNETHAL, A. Systematic study of benzo[a]pyrene in coffee samples. *J. Braz. Chem. Soc.*, v. 17, n. 5, p. 989-993, 2006.

BELO, R.F.C.; NUNES, C.M.; SANTOS, E.V.; AUGUSTI, D.V.; PISSINATTI, R. Single laboratory validation of a SPE method for the determination of PAHs in edible oils by GC-MS. *Anal. Methods*, v. 4, p. 4068-4076, 2012.

BETTIN, S.M.; FRANCO, W. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em aguardentes. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, v. 25, n. 2, p. 234-238, 2005.

BORGES, M.L.A. *Efeito da torrefação em características físicas e químicas do café para diferentes qualidades de bebida*. Belo Horizonte: Faculdade de Engenharia Química da UFMG. 2003. 99 p. (Dissertação, Mestrado em Engenharia Química).

BOSTRÖM, C.; GERDE, P.; HANBERG, A.; JERNSTRÖM, B.; JOHANSSON, C.; KYRKLUND, T.; RANNUG, A.; TÖRNQVIST, M.; VICTORIN, K.; WESTERHOLM, R. Cancer risk assessment, indicators and guidelines for polycyclic aromatic hydrocarbons in the ambient air. *Environ. Health. Persp.*, v. 110, p. 451-488, 2002.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa número 42, de 20 de dezembro de 1999. Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em produtos de origem animal. *Diário Oficial da União*. Brasília, 20 dez. 1999.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Secretaria de Defesa Agropecuária. Coordenação-Geral de Apoio Laboratorial. *Manual da Garantia da Qualidade Analítica*. 1ª edição. Brasília. 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução da Diretoria Colegiada, RDC nº 281, de 06 de outubro de 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação Geral de Vigilância em Saúde Ambiental. Portaria nº 518, de 25 de março de 2004. *Diário Oficial da União*, 26 de março de 2004.

BRASIL. Resolução da Diretoria Colegiada, Ministério da Saúde, RDC nº 2, *Diário Oficial da União*, 17 de janeiro, 2007.

BRITO, C.F. *Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) em sedimentos. Avaliação da represa do Parque Pedroso – Santo André, SP*. São Paulo: IPEN. 2009. (Dissertação, Mestrado Ciências na Área de Tecnologia Nuclear – Materiais).

BRUCE, B.; MINKKINEN, P.; RIEKKOLA, M.L. Practical method validation: validation sufficient for an analysis method. *Mikrochim. Acta*, v. 128, p. 93-106, 1998.

BULDER, A.S.; HOOGENBOOM, L.A.P.; KAN, C.A.; RAAMSDONK, L.W.D.; VAN, TRAAG, W.A.; BOUWMEESTER, H. *Initial risk assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in feed (materials)*. Wageningen: RIKILT - Institute of Food Safety Report 2006.001, 2006. 43 p.

CAI, S.; STEVENSB, J.; SYAGEA, J.A. Ultra high performance liquid chromatography–atmospheric pressure photoionization-mass spectrometry for high-sensitivity analysis of US Environmental Protection Agency sixteen priority pollutant polynuclear aromatic hydrocarbons in oysters, *J. Chrom. A.*, v. 1227, p. 138-144, 2012.

- CAMARGO, M.C.R.; TOLEDO, M.C.F. Chá-mate e café como fontes de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) na dieta da população de campinas. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, v. 22, n. 1, p. 49-53, 2002. (b)
- CAMARGO, M.C.R.; TOLEDO, M.C.F. Polycyclic aromatic hydrocarbon contamination in different commodity groups. *Braz. J. Food Technol.*, v. 5, p. 19-26, 2002. (a)
- CAMARGO, M.C.R.; TOLEDO, M.C.F. Polycyclic aromatic hydrocarbons in Brazilian vegetables and fruits. *Food Control*, v. 14, p. 49-53, 2003.
- CCME. (Canadian Council of Ministers of the Environment). *Carcinogenic and other polycyclic aromatic hydrocarbons*. Environmental and human health effects. PN 1401, 2008, 229 p.
- CIECIERSKA, M.; OBIEDZINSKI, M. Influence of smoking process on the polycyclic aromatic hydrocarbons's content in meat products. *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.*, v. 6, n. 4, p. 17-20, 2007.
- CLARKE, R.J.; MACRAE, R. *Coffee: chemistry*. Cap 1: Chemistry. v. 1. Elsevier science publishers LTD., 1985.
- CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. Code of practice for the reduction of contamination of food with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) from smoking and direct drying processes. CAC/RCP 68, 2009, 10 p.
- CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. *Discussion paper on polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) contamination*. JOINT FAO/WHO Food Standards Programme Codex Committee on Food Additives and Contaminants. Thirty-seventh Session The Hague, the Netherlands, 25 - 29 April, 2005.
- CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento). Acompanhamento da Safra Brasileira de Café, Safra 2013 primeira estimativa, janeiro/2013. Brasília, 2013.
- DILETTI, G.; SCORTICHINI, G.; SCARPONE, R.; GATTI, G.; TORRETI, L.; MIGLIORATI, G. Isotope dilution determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in olive pomace oil by gas chromatography–mass spectrometry. *J. Chrom. A.*, v. 1062, p. 247-254, 2004.

EC (European Commission). Regulamento 2006/1881/CE da comissão, 19 de Dezembro de 2006. Fixa os teores máximos de certos contaminantes presentes nos géneros alimentícios. *Jornal Oficial da União Européia*. Bruxelas, 19 dez. 2006. L 364, p. 5-24.

EC (European Commission). Regulamento 2007333/CE da comissão, 28 de Março de 2007. Estabelece métodos de amostragem e de análise para o controlo oficial dos teores de chumbo, cádmio, mercúrio, estanho na forma inorgânica, 3-MCPD e benzo(a)pireno nos géneros alimentícios. *Jornal Oficial da União Européia*, Bruxelas, 29 mar. 2007. L 88, p. 29-38.

EC (European Commission). SCF (Scientific Committee on Food). *Opinion of the Scientific Committee on Food on the risks to human health of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in food (expressed on 4 December 2002)*, 2002 (b). Disponível em: <http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/contaminants/out153_en.pdf> Acesso em: 06 set. 2010.

EC (European Commission). Commission decision 2002/657/EC of 12 August 2002. Implementing Council Directive 96/23/EC concerning performance of analytical methods and the interpretation of results. *Official Journal of the European Communities*, 2002, L 221/8. (a)

EFSA (European Food Standard Agency). *Findings of the EFSA data collection on polycyclic aromatic hydrocarbons in food - a report from the unit of data collection and exposure on a request from the European Commission*. EFSA/DATEX/002 (revision 1), 2008. (a)

EFSA (European Food Standard Agency). Polycyclic aromatic hydrocarbons in food - scientific opinion of the panel on contaminants in the food chain. *The EFSA Journal*, v. 724, p. 1-114, 2008. (b)

EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária). Manual de Segurança e Qualidade para a Cultura do Café. (Qualidade e Segurança dos Alimentos). Brasília: EMBRAPA/SEDE, 2004. 83 p.

EPA (Environment Protection Agency). Method 1613. Tetra through octa-chlorinated dioxins and furans by isotope dilution HRGC/HRMS. U.S. Environmental Protection Agency, Revisão B, Outubro 1994.

- EPA (Environment Protection Agency). *Quality criteria for water 1986*. EPA 440/5-86-001. US Environmental Protection Agency, Washington, DC, 1986.
- ESTEBAN-DIEZ, I; GONZALES-SAIZ, J.M.; SAENZ-GONZALEZ, C.; PIZARRO, C. Coffee varietal differentiation based on near infrared spectroscopy. *Talanta*, v. 71, p. 221-229, 2007.
- EURACHEM. *The fitness for purpose of analytical methods, a laboratory guide to method validation and related topics*. Teddington: LGC, 1998. 61 p.
- EURACHEM/CITAC. *Quantifying uncertainty in analytical measurements*. Teddington: LGC, 2000. 120 p.
- GALINARO, C.A.; FRANCO, D.W. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) em cachaça, rum, uísque e álcool combustível. *Quim. Nova*, v. 32, n. 6, p. 1447-1451, 2009.
- GARCIA-FALCON, M.S., CANCHO-GRANDE, B.; SIMAL-GANDARA, J. Minimal clean-up and rapid determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in instant coffee. *Food Chem.*, v. 90, p. 643-647, 2005.
- GODINHO, A. *Detecção e quantificação de contaminantes em café torrado e moído*. Belo Horizonte: Faculdade de Engenharia Química da UFMG. 2003. 134 p. (Dissertação, Mestrado em Engenharia Química).
- GÓMEZ-RUIZ, J. A.; WENZL, T. Evaluation of gas chromatography columns for the analysis of the 15 + 1 EU-priority polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) *Anal. Bioanal. Chem.*, v. 393, p. 1697–1707, 2009.
- GOSETTI, F.; CHIUMINATTO, U.; MAZZUCCO, E.; ROBOTTI, E.; CALABRESE, G.; GENNARO, M. C.; MARENCO, E. Simultaneous determination of thirteen polycyclic aromatic hydrocarbons and twelve aldehydes in cooked food by an automated on-line solid phase extraction ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J. Chrom. A.*, v. 1218, p. 6308-6318, 2011.
- GREEN, J.M. A practical guide to analytical method validation. *Anal. Chem.*, v. 68, p. 305A-309A, 1996.

- HORWITZ, W. Evaluation of analytical methods used for regulation of food and drugs. *Anal. Chem.*, v. 54, p. 67A-76A, 1982.
- HOUESSOU, J.K.; BENAC, C.; DELTEIL, C.; CAMEL, V.C. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in coffee Brew using solid-phase extraction. *J. Agric. Food Chem.*, v. 53, p. 871-879, 2005.
- HOUESSOU, J.K.; DELTEIL, C.; CAMEL, V.C Investigation of sample treatment steps for the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in ground coffee. *J. Agric. Food Chem.*, v. 54, p. 7413-7421, 2006.
- HOUESSOU, J.K.; MALOUG, S.; LEVEQUE, A.S.; DELTEIL, C.; HEYD, B.; CAMEL, V. Effect of roasting conditions on the polycyclic aromatic hydrocarbon content in ground arabica coffee and coffee brew. *J. Agric. Food Chem.*, v. 55, p. 9719-9726, 2007.
- HUBER, L. Validation of analytical methods: review and strategy. *LC/GC Int.*, Feb., p. 96-105, 1998.
- HUND, E.; MASSART, D.L.; SMEYERS-VERBEKE, J. Inter-laboratory studies in analytical chemistry. *Anal. Chim. Acta*, v. 423, p. 145-165, 2000.
- IARC (International Agency for Research on Cancer). *Chemical agents and related occupations volume 100 F A review of human carcinogens. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans*; v. 100F. Lyon: International Agency for Research on Cancer. World Health Organization, p. 599, 2012.
- ILAC (International Laboratory Accreditation Conference). Disponível em: <<http://www.ilac.org>>. Acesso em: 30 ago. 2010.
- INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial). *DOQ-CGCRE-008. Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos*. Rio de Janeiro: INMETRO, 2010. 35 p.
- IPCS (International Programme on Chemical Safety). *Environmental Criteria 202. Selected Non-heterocyclic PAHs*, *World Health Organization*, Geneva. 1998. Disponível em < <file:///C:/Documents%20and%20Settings/User/Desktop/Projeto/IPCS%201998.htm>> Acesso em: 06 set. 2010.

- Ishizaki, A.; Saito, K.; Hanioka, N.; Narimatsu, S.; Kataoka, H. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in food samples by automated on-line in-tube solid-phase microextraction coupled with high-performance liquid chromatography-fluorescence detection. *J. Chrom. A.*, v. 1217, p. 5555-5563, 2010.
- ISO (International Standards Organization). *International vocabulary of basic and general terms in metrology - VIM*. Geneva: ISO, 1993. 59 p.
- ISO (International Standards Organization). *ISO 11095. Linear calibration using reference materials*. Geneva: ISO, 1996. 29 p.
- IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry). *A Guide to IUPAC Nomenclature of Organic Compounds (Recommendations 1993)*, Blackwell Scientific publications, 1993. Disponível em <http://www.acdlabs.com/iupac/nomenclature>>. Acesso em: 22 mar. 2013.
- JENKE, D.R. Chromatographic method validation: a review of current practices and procedures. I. General concepts and guidelines. *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.*, v. 19, p. 719-736, 1996.
- JIRA, W. A GC/MS method for the determination of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in smoked meat products and liquid smokes. *Eur. Food Res. Technol.*, v. 218, p. 208-212, 2004.
- KIM, J.H.; MOON, J.K.; LI, Q.X.; CHO, J.Y. One-step pressurized liquid extraction method for the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Anal. Chim. Acta* v. 498, p. 55–60, 2003.
- KONIECZKA, P.; WOLSKA, L.; NAMIESNIK, J. Quality problems in determination of organic compounds in environmental samples, such as PHAs and PCBs. *Trend. Anal. Chem.*, v. 29, n. 7, p. 706-717, 2010.
- LEE, K.; SHIN, H. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in commercial roasted coffee beans. *Food Sci. Biotechnol.* v.16, n.6, p.1435-1440, 2010.
- LEITE, N.F. *Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (hpas) e bifenilas policloradas (PCBs) em sedimentos: desenvolvimento analítico e diagnóstico ambiental*. Curitiba:

- Faculdade de Química da Universidade Federal do Paraná, 2008. 127 p. (Tese, Doutorado em Ciências).
- LIGUORI, L.; HEGGSTAD, K.; HOVE H.T; JULSHAMN, K. An automated extraction approach for isolation of 24 polyaromatic hydrocarbons (PAHs) from various marine matrixes. *Anal. Chim. Acta*, v. 573, p. 181-188, 2006.
- LIM, D; KIM, W; LEE, M; HEO, H.J.; CHUN, O. K.; Evidence for protective effects of coffees on oxidative stressinduced apoptosis through antioxidant capacity of phenolics. *Food Sci. Biotechnol*, v.21, p.6, p.1735-1744, 2012.
- LODOVICI, M.; DOLARA, P.; CASALINI, C.; CIAPPELLANO, S.; TESTOLIN, G. Polycyclic aromatic hydrocarbon contamination in the Italian diet. *Food Addit. Contam.*, v.12, p. 703-713, 1995.
- LUND, M.; DUEDAHL-OLESEN, L.; CHRISTENSEN, J.H. Extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from smoked fish using pressurized liquid extraction with integrated fat removal. *Talanta*, v. 79, p. 10–15, 2009.
- MAC NEIL, J.D.; PATTERSON, J.; MARTZ, V. Validation of analytical methods – Providing your method is “fit for purpose”. In: FAJGELJ, A.; AMBRUS, A. (Ed.) *Principles and practices of method validation*. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2000. p. 100-107.
- MANDALAKIS, M.; ZEBÜHR, Y.; GUSTAFSSON, G. Efficient isolation of polyaromatic fraction from aliphatic compounds in complex extracts using dimethylformamide-pentane partitioning. *J. Chrom. A.*, v. 1041, p. 111–117, 2004.
- MAPA (Ministério Da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). Informe Estatístico do café. Elaborado pela Coordenação Geral de Apoio ao Fundo de Defesa da Economia Cafeeira – CGFUNCAFÉ. 2013. Disponível em <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/estatisticas>>. Acesso em: 21 mar. 2013.
- MARQUES, A.C.; VALENTE, T.B.; ROSA, C.S. Formação de toxinas durante o processamento de alimentos e as possíveis consequências para o organismo humano. *Rev. Nutr.*, v. 22, n. 2, p. 283-293, 2009.

- MARTINEZ, E.; GROS, M.; LACORTE, S.; BARCELÓ, D. Simplified procedures for the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in water, sediments and mussels. *J. Chrom. A.*, v. 1047, p.181–188, 2004.
- MAURÍCIO, A.Q; LINS, E.S.; ALVARENGA, M.B.A. National Residue Control Plan from the analytical perspective - The Brazilian case. *Anal. Chim. Acta*, v. 637, p.333-336, 2009.
- MDIC (Ministério de Desenvolvimento Indústria e Comércio Exterior). Disponível em: <<http://www.mdic.gov.br/sitio/interna/interna.php?area=5&menu=746>>. Acesso em: 06 set. 2010.
- MECHLINSKA, A.; WOLSKA, L.; NAMIESNIK, J. Isotope-labeled substances in analysis of persistent organic pollutants in environmental samples. *Trend. Anal. Chem.*, v. 29, n. 8, p. 820-831, 2010.
- MEIRE, R.O.; AZERERDO, A.; MACHADO, J.P. Aspectos ecotoxicológicos de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. *Oecol. Bras.*, v. 11, n. 2, p. 188-201, 2007.
- MING-HO, Y. Volatile Organic Compounds. In: MING-HO, Y. Environmental toxicology: biological and health effects of pollutants. 2. Ed. Florida: CRC Press. p.171-184, 2005.
- MITRA, S. *Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry*. New Jersey: Wiley-Interscience, 2003, 472 p.
- MORAES, I.V.M. Dossiê técnico processamento de café. Rede de Tecnologia do Rio de Janeiro. Serviço Brasileiro de Respostas Técnicas – SBRT, 2006.
- MORET, S.; CONTE, L.; DEAN, D. Assessment of polycyclic aromatic hydrocarbon content of smoked fish by means of a fast HPLC/HPLC Method. *J. Agric. Food Chem.* v. 47, p. 1367-1371, 1999.
- MORET, S.; PURCARO, G.; MORRISON, P.; CONTE, L.S.; MARRIOTT, P.J. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in vegetable oils using solid-phase microextraction-comprehensive two-dimensional gas chromatography coupled with time-of-flight mass spectrometry. *J. Chrom. A.*, v. 1161, p. 284-291, 2007.

- MOURA, S.C.S.R.; VITALI, A.; ANJOS, V.D.A.; MORI, E.E.M.; NASCIMENTO, F.H ; SOLER, B. Obtenção de ciclos de torração de cafés brasileiros para guia prático de torrefações nacionais – parte I. II Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil, p. 1560-1567, 2001.
- NETTO, A.D.P.; DIAS, J.C.M.; ARBILLA, G.; OLIVEIRA, L.F.; BAREK, J. Avaliação da contaminação humana por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e seus derivados nitratos: Uma revisão metodológica. *Quim. Nova*, v. 23, n. 6, p.765-773, 2000.
- NIELSEN, T.; FEILBERG, A. BINDERUP, M.L. The variation of street air levels of PAH and other mutagenic PAC in relation to regulations of traffic emissions and the impact of atmospheric processes. *ESPR- Environ. Sci. & PoUut. Res.*, v .6, n. 3, p. 133-137, 1999.
- OLIVEIRA. L.S, FRANCA, A.S.; MENDONÇA, J.C.F.; BARROS-JÚNIOR, M.C.; Proximate composition and fatty acids profile of green and roasted defective coffee beans. *LWT*, v. 39, p. 235–239, 2006.
- ORECCHIO, S.; CIOTTI, V. P.; CULOTTA, L. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in coffee brew samples: analytical method by GC–MS, profile, levels and sources. *Food Chem. Toxicol.*, v. 47, p. 819-826, 2009.
- PINO-GARCÍA, R.; GONZÁLEZ-SANJOSÉ, M. L.; RIVERO-PÉREZ, M. D.; MUÑIZ, P. Influence of the degree of roasting on the antioxidant capacity and genoprotective effect of instant coffee: contribution of the melanoidin fraction. *Journal of Agricultural and Food Chem.*, v. 60, p. 10530–10539, 2012.
- POPP, P.; MOODER, K.M.; PASCHKE, A.; Thus, U. Application of accelerated solvent extraction followed by gas chromatography, high-performance liquid chromatography and gas chromatography–mass spectrometry for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons, chlorinated pesticides and polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans in solid wastes. *J. Chrom. A.*, v. 774, p. 203–211, 1997.
- POSTER, D.L. Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in environmental samples: a critical review of gas chromatographic (GC) methods. *Anal. Bioanal. Chem.*, v. 386, p.859-881, 2006.

- PURCARO, G.; MORET, S.; CONTE, L.S. Overview on polycyclic aromatic hydrocarbons: occurrence, legislation and innovative determination in foods. *Talanta*, v.105, p.292-305, 2013.
- REINATO, C.H.R. *Avaliação técnica, econômica e qualitativa do uso de lenha e GLP na secagem de café*. Lavras: Faculdade de Engenharia de Alimentos da UFLA. 2002. 126 p. (Dissertação, Mestrado em Ciência de Alimentos).
- RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G; COLLINS, C.H; JARDIM, I.C.F.; MELO, L.F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Quim. Nova*, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.
- ROSE, M; WHITE, S.; MACARTHUR, R.; PETCH, R.; HOLLAND, J.; DAMANT, A. Single-laboratory validation of a GC/MS method for the determination of 27 polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in oils and fats. *Food Addit. Contam.* v. 24, n. 6, p. 635-651, 2007.
- RSC (Royal Society of Chemistry). *Analytical Methods Committee Technical Brief: Is my calibration linear?*. RSC, 2005. 2 p.
- RSC (Royal Society of Chemistry). *Analytical Methods Committee Technical Brief: Terminology - the key to understanding the analytical science. Part 1: accuracy, precision and uncertainty*. RSC, 2003. 2 p.
- RSC (Royal Society of Chemistry). *Analytical Methods Committee Technical Brief: What should be done with results below the detection limit?* Mentioning the unmentionable. RSC, 2001. 2 p.
- RUFINO, J.L.S.; ARÊDES, A.F. *Mercados interno e externo do café brasileiro*. Brasília: EMBRAPA, 2009. 270 p.
- SANCO/10684/2009. Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed. Supersedes Document No. SANCO/3131/2007.
- SANTOS, E.A. *Avaliação da degradação de ocratoxina A em café durante a torrefação*. Belo Horizonte: Faculdade de Engenharia Química da UFMG. 2004. 72 p. (Dissertação, Mestrado em Engenharia Química).

- SARGENT, M.; HARTE, R.; HARRINGTON, C. *Guidelines for achieving high accuracy in isotope dilution mass spectrometry (IDMS)*. 1. ed. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2002. 34 p.
- SILVA, A.B. *Identificação de riscos e perigos no processode torra e moagem de café visando a obtenção de produtos seguros e de qualidade*. Rio de Janeiro: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. 2008. 78 p. (Dissertação, Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). (a)
- SILVA, J.B. *Otimização do processo de torração do café pelo monitoramento de parâmetros e propriedades físicas e sensoriais*. Lavras-MG: Universidade Federal de Lavras. 2008. 71 p. (Dissertação, Mestrado em Ciência dos Alimentos). (b)
- SIROTA, R.; GORELIK, S; KOHEN, R.; KANNER, J. Coffee polyphenols protect human plasma from postprandial carbonyl modifications. *Mol. Nutr. Food Res.*, v. 57, p. 916-919, 2013.
- SIVETZ, M.; FOOTE, H. E. *Coffee processing technology*. Westport: AVI. 1963. 2 v.
- SMOKER, M.; TRAN, K.; SMITH, R. E. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in shrimp. *J. Agric. Food Chem.*, v.58, p. 12101–12104, 2010.
- SNEDECOR, G.W.; COCHRAN, W.G. *Statistical methods*. Ames: Iowa State University, 1989. 503 p.
- SOUZA, S.V.C. *Procedimento para validação intralaboratorial de métodos de ensaio: delineamento e aplicabilidade em análises de alimentos*. Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia da UFMG. 2007. 296 p. (Tese, Doutorado em Ciência de Alimentos)
- SOUZA, S.V.C.; JUNQUEIRA, R.G. A procedure to assess linearity by ordinary least squares method. *Anal. Chim. Acta*, v. 552; p. 25-35, 2005.
- STANCIU, G.; DOBRINAS, S.; BIRGHILA, S.; POPESCU, M. Determination of organic compounds from different types of coffee by HPLC and GC-ECD analysis. *J. Environ. Eng.*, v. 7, n. 6, p. 661-666, 2008.

- TAVERNIERS, I.; DE LOOSE, M.; VAN BOCKSTAELE, E. Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance. *Trend. Anal. Chem.*, v. 23, p. 535-552, 2004.
- TEIXEIRA, V.H.; CASAL, S.; OLIVEIRA, M.B.P.P. PAHs content in sunflower, soybean and virgin olive oils: Evaluation in commercial samples and during refining process. *Food Chem.*, v. 104, p. 106-112, 2007.
- TFOUNI S. A.V.; SERRATE, C.S.; CARREIRO, L.B.; CAMARGO, M.C.R.; TELES, C.R.A.; CIPOLLI, K. M.V.A.B.; FURLANI, R.P.Z. Effect of roasting on chlorogenic acids, caffeine and polycyclic aromatic hydrocarbons levels in two *Coffea* cultivars: *Coffea arabica* cv. Catuaí Amarelo IAC-62 and *Coffea canephora* cv. Apatã IAC-2258. *Int. J. Food Sci. Tech.*, v. 47, p. 406-415, 2012.
- TFOUNI, S.A.V.; VITORINO, S.H.P.; TOLEDO, M.C.F. Efeito do processamento na contaminação de cana-de-açúcar e derivados por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, v. 27, n. 1, p. 76-82, 2007.
- THOMPSON, M. Recent trends in inter-laboratory precision at ppb and sub-ppb concentrations in relation to fitness for purpose criteria in proficiency testing. *Analyst*, v. 125, p. 385-386, 2000.
- THOMPSON, M.; ELLISON, S.L.R.; WOOD, R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. *Pure and Applied Chemistry*, v. 74, p. 835-855, 2002.
- TOBISZEWSKI, M.; MECHLINSKA, A.M.; ZYGMUNT, B.; NAMIESNIK, J. Green analytical chemistry in sample preparation for determination of trace organic pollutants. *Trend. Anal. Chem.*, v. 28, n. 8, p. 943-951, 2009.
- TURATTI, J.M. Extração e Caracterização de óleo de café. Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil. Vitória, ES. v. 2, p. 1533–1539, 2001.
- UE (União Européia). REGULAMENTO (UE) Nº 835/2011 DA COMISSÃO de 19 de Agosto de 2011 que altera o Regulamento (CE) n. o 1881/2006 no que diz respeito aos teores máximos de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos presentes nos géneros alimentícios. *Jornal Oficial da União Européia*, Bruxelas, 20 ago. 2011. L 215, p. 4-8 (a).

UE (União Europeia). REGULAMENTO (UE) Nº 836/2011 DA COMISSÃO de 19 de Agosto de 2011 que altera o Regulamento (CE) nº 333/2007 que estabelece métodos de amostragem e de análise para o controlo oficial dos teores de chumbo, cádmio, mercúrio, estanho na forma inorgânica, 3-MCPD e benzo(a)pireno nos géneros alimentícios. *Jornal Oficial da União Europeia*, Bruxelas, 20 ago. 2011. L 215, p. 9-16 (b).

USDA (United States Department of Agriculture). Production, Supply and Distribution Online. 2013. Disponível em: <<http://www.fas.usda.gov/psdonline/psdQuery.aspx>>. Acesso em: 21 mar. 2013.

VAN DER VOET, H.; VAN RHIJN, J.A.; VAN DE WIEL, H.J. Inter-laboratory, time, and fitness-for-purpose aspects of effective validation. *Anal. Chim. Acta*, v. 391, p. 159-171, 1999.

VEYRAND, B.; BROSSEAUD, A.; SARCHER, L.; VARLET, V.; MONTEAU, F.; MARCHAND, P.; ANDRE, F. LE BIZEC, B. Innovative method for determination of 19 polycyclic aromatic hydrocarbons in food and oil samples using gas chromatography coupled to tandem mass spectrometry based on an isotope dilution approach. *J. Chrom. A.*, v. 1149, p. 333-344, 2007.

WANG, W.; MENG, B.; LU, X.; LIU, Y.; TAO, S. Extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons and organochlorine pesticides from soils: A comparison between Soxhlet extraction, microwave-assisted extraction and accelerated solvent extraction techniques. *Anal. Chim. Acta*, v. 602, p. 211–222, 2007.

WEIßHAAR, R. Rapid determination of heavy polycyclic aromatic hydrocarbons in edible fats and oils. *Eur. J Lipid Sci. Technol.*, v. 104, p. 282-285, 2002.

WHO (World Health Organization). Evaluation of certain food contaminants - Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, 64th meeting, Rome, 8 to 17 February 2005, p. 1 and p. 61. WHO Technical Report Series, Nº. 930, 2006. Disponível em: <http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_930_eng.pdf>. Acesso em: 06 set. 2010.

WINDAL, L.; BOXUS, V.; HANOT, V. Validation of the analysis of the 15 + 1 European-priority polycyclic aromatic hydrocarbons by donor–acceptor complex

- chromatography and high-performance liquid chromatography-ultraviolet/fluorescence detection. *J. Chrom. A.*, v.1212, p.16-22, 2008.
- WOOD, R. How to validate analytical methods. *Trend. Anal. Chem.*, v. 18, p. 624-632, 1999.
- WRETLING, S.; ERIKSSON, A.; ESKHULT, G.A.; LARSSON, B. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in Swedish smoked meat and fish. *J. Food Compos. Anal.*, v. 23, p. 264-272, 2010.
- ZAMPERLINNI, C.M.G.; SIVA-SANTIAGO, M.; VILEGAS, W. Solid-phase extraction of sugar cane soot extract for analysis by gas chromatography with flame ionization and mass spectrometric detection. *J. Chromatography*, v. 889, p. 281-289, 2000.
- ZHENG, L.; ROMANOFF, L.C.; TRINIDAD, D.A.; HUSSAIN, N.; JONES, R.S. PORTER, E.N.; PATTERSON, D.G.; SJDIN, A. Measurement of urinary monohydroxy polycyclic aromatic hydrocarbons using automated liquid-liquid extraction and gas chromatography/isotope dilution high-resolution mass spectrometry. *Anal. Chem.*, v. 78, n. 16, p. 5744-5751, 2006.
- ZIEGENHALS, K.; SPEER, K.; JIRA, W. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in chocolate on the German market. *J. Verbr. Lebensm.*, v.4, p. 128-135, 2009.