

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

FACULDADE DE FARMÁCIA

RENATA FRANÇA CASSIMIRO BELO

**HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS
EM CACAU: desenvolvimento e validação de método
analítico e produção de material para ensaio de
proficiência**

Belo Horizonte, MG

2016

RENATA FRANÇA CASSIMIRO BELO

**HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS
EM CACAU: desenvolvimento e validação de método
analítico e produção de material para ensaio de
proficiência**

Tese 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 grau de Doutora em Ciência de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Gonçalves Junqueira

Co-orientador: Prof^a. Dr^a. Scheilla Vitorino Carvalho de Souza

Belo Horizonte, MG

2016

Doutoranda: Renata França Cassimiro Belo

Orientador: Roberto Gonçalves Junqueira

Co-Orientador: Scheilla Vitorino Carvalho de Souza

Linha de Pesquisa PPGCA:

QA – Qualidade de alimentos

Áreas de conhecimento (CNPq/CAPES):

5.00.00.00-4 CIÊNCIAS AGRÁRIAS

5.07.00.00-6 CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

5.07.01.00-2 Ciência de Alimentos

5.07.01.06-1 Avaliação e Controle de Qualidade de Alimentos

5.07.01.07-0 Padrões, Legislação e Fiscalização de Alimentos

1.06.04.00-6 Química analítica

2.10.07.00-4 Toxicologia

Instituições participantes:

- Laboratório de Dioxinas e PCB's (LDP) do Laboratório Nacional Agropecuário - Minas Gerais (LANAGRO-MG) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA).



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

PPCCA

FOLHA DE APROVAÇÃO

HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS EM CACAU:
DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO E PRODUÇÃO
DE MATERIAL PARA ENSAIO DE PROFICIÊNCIA

RENATA FRANÇA CASSIMIRO BELO

Tese submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA DE ALIMENTOS, como requisito para obtenção do grau de Doutor em CIÊNCIA DE ALIMENTOS, área de concentração CIÊNCIA DE ALIMENTOS.

Aprovada em 21 de novembro de 2016, pela banca constituída pelos membros:

Profa. Dra. Camila Argenta Fante
Faculdade de Farmácia - UFMG

Prof. Dr. Roberto Gonçalves Junqueira (Orientador)
Faculdade de Farmácia - UFMG

Profa. Dra. Scheilla Vitorino Carvalho de Souza (Coorientadora)
Faculdade de Farmácia - UFMG

Profa. Dra. Silvana da Motta
Faculdade de Farmácia - UFMG

Prof. Dr. Mauro Lúcio Gonçalves de Oliveira
Instituto Mineiro de Agropecuária - IMA

Prof. Dr. Amauri Gerardo de Souza
Universidade Federal de São João del Rei - UFSJ

Belo Horizonte, 21 de novembro de 2016.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida e por possibilitar esta conquista;

Aos professores Dr. Roberto Gonçalves Junqueira e Dr^a. Scheilla Vitorino Carvalho de Souza, pela orientação, inspiração, amizade e pelo incentivo durante a construção deste trabalho;

Ao Rafael Pissinatti, pelo apoio, confiança e troca de experiências;

A Carolina Mariana Nunes, pelo auxílio durante a execução dos experimentos e pela amizade valiosa;

Aos demais amigos do LDP, LP e da UICGEM, principalmente Eleonora, Daniella, Júlia, Daiane e Mauro, pelo grande auxílio durante a realização deste trabalho;

Aos amigos do LANAGRO-MG, pelo acolhimento e apoio;

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, pela contribuição em minha formação acadêmica;

Ao André, pelo afeto e compreensão;

Aos meus pais, irmã, tias e demais familiares, pelo imenso carinho e apoio incondicional;

Aos colegas alunos do Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, pela agradável convivência e troca de experiências;

A CAPES, pelo suporte financeiro;

A todos que, de uma maneira ou outra, contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

RESUMO

Foi desenvolvido e validado um método para a determinação de oito hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) em amêndoas de cacau por cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas. A faixa linear do método e a linearidade das curvas de calibração preparadas nos solventes e nas matrizes foram determinadas, estudando-se os efeitos de matriz. A precisão do método foi avaliada em condições de repetibilidade e reprodutibilidade parcial, assim como a robustez. A seletividade e a recuperação foram investigadas em ensaios de adição de padrões em amostras brancas. Foram determinados os limites de detecção, de quantificação, de decisão e a capacidade de detecção do método. Foi produzido um material teste para ensaio de proficiência de HPAs em amêndoas de cacau, a partir de amostras fortificadas com padrões. Após testes de homogeneidade e estabilidade em curto prazo do item de ensaio, foi conduzido um estudo de estabilidade após um mês e quatro meses de armazenamento refrigerado. Falta de homogeneidade foi detectada apenas para o composto dibenzo(a,h)antraceno. No caso da estabilidade em curto prazo, o lote foi considerado estável pelos critérios do teste de t para todos os analitos, porém nenhum dos analitos apresentaram estabilidade quando avaliados pelo critério do desvio de proficiência. Apenas o composto benzo(a)antraceno foi estável durante o período de um mês sob refrigeração. O material preparado de HPAs em amêndoas de cacau pode ser utilizado com o propósito de se realizar um ensaio de proficiência, desde que transportado e armazenado sob refrigeração.

Palavras-chave: Cacau. Espectrometria de massas. Controle de qualidade. Hidrocarbonetos cíclicos aromáticos. Testes de materiais.

ABSTRACT

A method for the determination of eight polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in cocoa beans by gas chromatography coupled to mass spectrometry was optimized and validated. The linear range of the method and the linearity of the calibration curves prepared in the solvents and in the matrices were determined by studying the matrix effects. The accuracy of the method was evaluated under conditions of repeatability and partial reproducibility, as well as robustness. Selectivity and recovery were investigated in standard addition assays on white samples. Limits of detection, quantification, decision and method detection were determined. A test material for assaying the proficiency of PAHs in cocoa beans was produced from spiked samples. After tests of homogeneity and short-term stability of the reference material, a stability study was conducted after one month and four months of refrigerated storage. Lack of homogeneity was detected only for the compound dibenz[a,h]anthracene. In the case of short-term stability, the batch was considered stable by the t-test criteria for all analytes, however no analytes showed stability when assessed by the proficiency deviation criteria. Only the benzo[a]anthracene compound was stable for one month under refrigeration. The PAHs prepared material in cocoa beans could be used for the purpose of conducting a proficiency test, since it is transported and stored under refrigeration.

Keywords: Cocoa. Mass spectrometry. Quality control. Cyclic aromatic hydrocarbons. Material testing.

LISTA DE FIGURAS

1	Cacaueiro da região da Bahia apresentando frutos ainda imaturos	25
2	Variações de coloração dos frutos do cacaueiro	26
3	(A) Fruto do cacaueiro aberto mostrando polpa e sementes. (B) Sementes de cacau	27
4	Fluxograma do beneficiamento do cacau	30
5	Fórmulas estruturais de dezesseis hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) considerados prioritários pela agência de proteção ambiental dos Estados Unidos EPA (Environment Protection Agency) ...	34
CAPÍTULO I		
I.1	Avaliação de efeitos de matriz (SOUZA, 2007)	74
I.2	Comparação entre as curvas de calibração tradicionais e matrizadas para oito analitos em amostras de amêndoas de cacau	83
CAPÍTULO II		
II.1	Diagramas de Pareto do efeito dos fatores estudados sobre a recuperação do benzo(a)antraceno (A), criseno (B), benzo(b)fluoranteno (C) e benzo(k)fluoranteno (D) nos experimentos com delineamento experimental do tipo Plackett-Burman	113
II.2	Diagramas de Pareto do efeito dos fatores estudados sobre a recuperação do benzo(a)pireno (A), indeno(1,2,3-cd)pireno (B), dibenzo(a,h)antraceno (C) e benzo(g,h,i)perileno (D) nos experimentos com delineamento experimental do tipo Plackett-Burman	114
II.3	Diagramas de Pareto do efeito dos fatores estudados sobre a recuperação do benzo(a)antraceno (A), criseno (B), benzo(b)fluoranteno (C) e benzo(k)fluoranteno (D) nos experimentos com delineamento experimental do tipo DCCR	119
II.4	Diagramas de Pareto do efeito dos fatores estudados sobre a recuperação do benzo(a)pireno (A), indeno(1,2,3-cd)pireno (B), dibenzo(a,h)antraceno (C) e benzo(g,h,i)perileno (D) nos experimentos com delineamento experimental do tipo DCCR	120
II.5	Gráficos de superfície de resposta e curvas de contorno dos analitos benzo(a)antraceno, criseno e benzo(b)fluoranteno	122
II.6	Gráficos de superfície de resposta e curvas de contorno dos analitos benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno e indeno(1,2,3-cd)pireno	123
II.7	Gráficos de superfície de resposta e curvas de contorno dos analitos dibenzo(a,h)antraceno e benzo(g,h,i)perileno	124

II.8	Curvas de calibração dos analitos benzo(a)antraceno (A), criseno (B), benzo(b)fluoranteno (C) e benzo(k)fluoranteno (D) obtidas durante a avaliação da linearidade	127
II.9	Curvas de calibração dos analitos benzo(a)pireno (A), indeno(1,2,3-cd)pireno (B), dibenzo(a,h)antraceno (C) e benzo(g,h,i)perileno (D) obtidas durante a avaliação da linearidade	128
II.10	Gráficos dos resíduos de regressão linear para oito HPAs estudados	130
II.11	Cromatogramas para avaliação de seletividade obtidos pela injeção de HPAs prioritários da União Europeia	134
CAPÍTULO III		
III.1	Fluxograma do procedimento piloto para avaliação da incorporação do padrão de HPAs	151
III.2	Fluxograma de preparo dos itens de ensaio	152
III.3	Fluxograma do estudo de estabilidade a curto prazo	154
III.4	Fluxograma do estudo de estabilidade a longo prazo	155
III.5	Amostras para ensaio de proficiência de HPAs em amêndoas de cacau moídas acondicionado em frascos de vidro âmbar de 50 mL com tampa de rosca	158

LISTA DE TABELAS

1	Efeito do armazenamento dos frutos (pré-condicionamento de polpa) e fermentação na composição centesimal de sementes de cacau	27
2	Níveis máximos permitidos de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos segundo o Regulamento 835/2011 (EU, 2011a)	44
3	Critérios de desempenho para métodos de análise de benzo(a)pireno (EU, 2011b)	45
CAPÍTULO I		
I.1	Condições cromatográficas para a detecção de HPAs em amostras de cacau	80
I.2	Comparação de inclinações e interceptos entre as curvas de calibração tradicional e matrizada para oito analitos	84
CAPÍTULO II		
II.1	Condições de extração do equipamento de ASE (PISSINATTI et al., 2015)	99
II.2	Níveis reais e codificados das variáveis estudadas no delineamento do tipo Plackett-Burman	102
II.3	Condições cromatográficas definidas para as análises de HPAs em amêndoas de cacau após testes preliminares	108
II.4	Limite de detecção do equipamento para cada HPA pesquisado	109
II.5	Matriz do delineamento experimental do tipo <i>Plackett-Burman</i> (valores codificados) e respostas em recuperação para quatro HPAs	111
II.6	Matriz do delineamento experimental do tipo Plackett-Burman (valores codificados) e respostas em recuperação para quatro HPAs	112
II.7	Níveis e variáveis do delineamento composto central rotacional (DCCR)	116
II.8	Matriz com valores codificados das variáveis independentes e resultados do DCCR, em recuperação (%), para o benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno e benzo(k)fluoranteno	117
II.9	Matriz com valores codificados das variáveis independentes e resultados do DCCR, em recuperação (%), para o benzo(a)pireno, indeno(1,2,3-cd)pireno, dibenzo(a,h)antraceno e benzo(g,h,i)perileno	118
II.10	Teor de lipídios totais (%) quantificado pela técnica de ASE	125

II.11	Resumo dos resultados da avaliação da linearidade de soluções padrão de HPAs segundo Souza e Junqueira (2005)	129
II.12	Intensidades relativas dos íons confirmatórios obtidas para soluções padrões e amostras adicionadas de HPAs, por analito, e respectivas variações	133
II.13	Médias de recuperação aparente, valores de HORRAT, desvios padrão relativos, sob condições de repetibilidade e reprodutibilidade, para cada analito adicionado a amostras de cacau em diferentes níveis de concentração	135
II.14	Estimação da incerteza expandida (U) para oito HPAs	138
II.15	Limites de detecção (LOD) e limites de quantificação (LOQ) teóricos para oito HPAs	139

CAPÍTULO III

III.1	Concentração de HPAs, em $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ de gordura, e porcentagem de recuperação do padrão das triplicatas de amostras de amêndoas de cacau analisadas durante o procedimento piloto	157
III.2	Resultado do estudo de homogeneidade do material teste de HPAs em amêndoas de cacau, segundo critérios da IUPAC e da ISO 13528, para os oito analitos pesquisados	159
III.3	Resultados do estudo de estabilidade em curto prazo, com armazenamento a $45 \pm 2^\circ\text{C}$ por zero, três, seis e nove dias	161
III.4	Avaliação da estabilidade em curto prazo do material teste produzido, segundo critérios do protocolo da IUPAC (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2006) para 0 e 3 dias de armazenamento a 45°C	163
III.5	Avaliação da estabilidade em curto prazo do material teste produzido, segundo critérios da ISO 13528 (ISO 13528, 2005) para 0 e 3 dias de armazenamento a 45°C	164
III.6	Avaliação da estabilidade em curto prazo do material teste produzido, segundo critérios do protocolo da IUPAC (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2006) para 0 e 6 dias de armazenamento a 45°C	165
III.7	Avaliação da estabilidade em curto prazo do material teste produzido, segundo critérios da ISO 13528 (ISO 13528, 2005) para 0 e 6 dias de armazenamento a 45°C	166
III.8	Avaliação da estabilidade em curto prazo do material teste produzido, segundo critérios do protocolo da IUPAC (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2006) para 0 e 9 dias de armazenamento a 45°C	167
III.9	Avaliação da estabilidade em curto prazo do material teste produzido, segundo critérios da ISO 13528 (ISO 13528, 2005) para 0 e 9 dias de armazenamento a 45°C	168

III.10	Avaliação da estabilidade em longo prazo do material teste produzido, segundo critérios do protocolo da IUPAC (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2006), após 4 meses	169
III.11	Avaliação da estabilidade em longo prazo do material teste produzido, segundo critérios da ISO 13528 (ISO 13528, 2005), após 4 meses	170
III.12	Avaliação da estabilidade em longo prazo do material teste produzido, segundo critérios do protocolo da IUPAC (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2006), após 1 mês	171
III.13	Avaliação da estabilidade em longo prazo do material teste produzido, segundo critérios da ISO 13528 (ISO 13528, 2005), após 1 mês	172

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

UFMG:	Universidade Federal de Minas Gerais
MG:	Minas Gerais
PPGCA:	Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos
CNPq:	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CAPES:	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
PCB:	Bifenilas policloradas
LDP:	Laboratório de Dioxinas e PCB's
LANAGRO:	Laboratório Nacional Agropecuário
FAO:	Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação
HPAs:	Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos
EPA:	Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos
OMS:	Organização Mundial da Saúde
SCF:	Comitê Científico de Alimentos da Comissão Européia
JECFA:	Comitê Misto FAO/OMS de Peritos em Aditivos para Alimentos
EFSA:	Autoridade Europeia em Segurança de Alimentos
HPNs:	Hidrocarbonetos aromáticos polinucleares
IARC:	International Agency for Research on Cancer
CLAE:	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
FL:	Detector de fluorescência
CG-EM:	Cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas
CG-DIEM:	Cromatografia a gás – diluição isotópica – espectrometria de massas
CG:	Cromatografia a Gás
DIEM:	Diluição isotópica – espectrometria de massas
MAPA:	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
ISO:	Organização Internacional para Padronização
ABNT:	Associação Brasileira de Normas Técnicas
INMETRO:	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial

IUPAC:	União Internacional de Química Pura e Aplicada
MR:	Material de Referência
MRC:	Material de Referência Certificado
AOAC:	<i>Association of Official Analytical Chemists</i>
PNCRC:	Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes
CEPLAC:	Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira
BaA:	Benzo(a)antraceno
Cris:	Criseno
BbF:	Benzo(b)fluoranteno
BkF:	Benzo(k)fluoranteno
BaP:	Benzo(a)pireno
Ind:	Indeno(1,2,3-cd)pireno
DahA:	Dibenzo(a,h)antraceno
BghiP:	Benzo(g,h,i)perileno
ASE:	Extração por solvente acelerada
EP:	Ensaio de proficiência
CPG:	Cromatografia de permeação em gel
EFS:	Extração em fase sólida
CG-EMAR:	Cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas de alta resolução
EAU:	Extração assistida por ultrassom
CL-EM:	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas
IE:	Impacto de elétrons
MEFS:	Microextração em fase sólida
ID:	Imersão direta
HS:	Headspace
CG-DIC:	Cromatografia a gás com detector de ionização de chama
EFS-D:	Extração em fase sólida dispersiva
FRR:	Fator de resposta relativo

LOD:	Limite de detecção
LOQ:	Limite de quantificação
CV:	Coeficiente de variação
DPP_r:	Desvio padrão de repetibilidade
DPP_R:	Desvio padrão de reprodutibilidade

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
2	OBJETIVOS	24
3	REVISÃO DE LITERATURA	25
3.1	O CACAU E A CACAUCULTURA NO BRASIL	25
3.1.1	Beneficiamento do cacau	30
3.2	HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS (HPAS) ...	32
3.2.1	HPAs em alimentos	35
3.2.2	Características físico-químicas	37
3.2.3	Toxicidade	38
3.2.4	Ocorrência em cacau e produtos de cacau	40
3.2.5	Métodos para determinação de HPAs em cacau	41
3.2.6	Legislação	43
3.3	VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS	46
3.3.1	Documentos orientativos	46
3.3.2	Parâmetros de validação	47
3.4	ENSAIO DE PROFICIÊNCIA	53
3.4.1	Importância	55
3.4.2	Documentos orientativos	56
3.4.3	Homogeneidade	57
3.4.4	Estabilidade	58
	CAPÍTULO I – AVALIAÇÃO DE EFEITOS DE MATRIZ EM ANÁLISE DE HPAs EM CACAU UTILIZANDO DILUIÇÃO ISOTÓPICA	60
	RESUMO	60
	ABSTRACT	61
1	INTRODUÇÃO	62
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	64

2.1	EFEITOS DE MATRIZ	64
2.2	EFEITOS DE MATRIZ EM PROTOCOLOS DE VALIDAÇÃO	65
2.3	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	65
2.4	ANÁLISE DE DADOS	66
2.5	ESTRATÉGIAS PARA COMPENSAÇÃO DE EFEITOS DE MATRIZ	68
2.5.1	Calibração externa	68
2.5.2	Calibração interna	69
2.5.2.1	Adição de padrão	69
2.5.2.2	Diluição isotópica – espectrometria de massas (DIEM)	70
3	MATERIAL E MÉTODOS	72
3.1	PROCEDIMENTO PROPOSTO	72
3.1.1	Delineamento experimental	72
3.1.2	Análise de dados	73
3.2	MATERIAL	78
3.2.1	Padrões	78
3.2.2	Solventes, reagentes e outros materiais	78
3.2.3	Amostras	79
3.2.4	Equipamento	79
3.2.5	Procedimento analítico	80
3.2.6	Avaliação de efeitos de matriz	81
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	82
5	CONCLUSÃO	89
	CAPÍTULO II – VALIDAÇÃO INTRALABORATORIAL DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE HPAs EM AMÊNDOAS DE CACAU USANDO EXTRAÇÃO POR SOLVENTE ACELERADA E DETECÇÃO POR CROMATOGRAFIA A GÁS ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS	90
	RESUMO	90
	ABSTRACT	91
1	INTRODUÇÃO	92

2	MATERIAL E MÉTODOS	96
2.1	DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO .	96
2.1.1	Material	96
2.1.1.1	Amostras	96
2.1.1.2	Solventes e reagentes	96
2.1.1.3	Padrões	97
2.1.1.4	Equipamentos	97
2.1.2	Método	98
2.1.2.1	Extração de HPAs	98
2.1.2.2	Determinação de HPAs	100
2.1.3	Desenvolvimento e otimização	100
2.1.3.1	Definição das condições cromatográficas	100
2.1.3.2	Limite de detecção do equipamento	100
2.1.3.3	Definição de condições de extração e purificação	101
2.1.3.4	Determinação de lipídios totais pelo método de extração por solvente acelerada (ASE)	102
2.1.4	Validação de método	103
2.1.4.1	Preparo das amostras	103
2.1.4.2	Linearidade sem interferência da matriz	103
2.1.4.3	Efeitos de matriz	104
2.1.4.4	Seletividade	104
2.1.4.5	Veracidade e recuperação	104
2.1.4.6	Repetibilidade e reprodutibilidade intralaboratorial	105
2.1.4.7	Limite de detecção do método de análise (LOD)	105
2.1.4.8	Limite de Quantificação (LOQ)	106
2.1.4.9	Incerteza de medição	106
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	108
3.1	DEFINIÇÃO DAS CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS	108
3.2	LIMITE DE DETECÇÃO DO EQUIPAMENTO	109

3.3	DEFINIÇÃO DAS CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO	109
3.3.1	Delineamento Plackett-Burman	109
3.3.2	Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR)	116
3.4	DETERMINAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE LIPÍDIOS TOTAIS PELO MÉTODO DE EXTRAÇÃO POR SOLVENTE ACELERADA (ASE)	124
3.5	VALIDAÇÃO DE MÉTODOS	126
3.5.1	Linearidade sem interferência da matriz	126
3.5.2	Efeito de matriz	132
3.5.3	Seletividade	133
3.5.4	Precisão intralaboratorial e recuperação	134
3.5.5	Incerteza de medição	137
3.5.6	Limites	138
3.5.7	Aplicação do método	139
4	CONCLUSÃO	141
	CAPÍTULO III – PRODUÇÃO DE MATERIAL PARA ENSAIO DE PROFICIÊNCIA DE HPAs EM AMÊNDOAS DE CACAU	142
	RESUMO	142
	ABSTRACT	143
1	INTRODUÇÃO	144
2	MATERIAL E MÉTODOS	147
2.1	MATERIAL TESTE PARA ENSAIO DE PROFICIÊNCIA	147
2.1.1	Material	147
2.1.1.1	Amostras	147
2.1.1.2	Padrões	147
2.1.1.3	Equipamentos	147
2.1.1.4	Vidrarias e outros insumos	148
2.1.1.5	Solventes e reagentes	149
2.1.2	Métodos	149
2.1.2.1	Elaboração dos itens de ensaio	149

2.1.2.1.1	Procedimento piloto	149
2.1.2.1.2	Preparação dos itens de ensaio	152
2.1.2.2	Teste de homogeneidade	153
2.1.2.3	Teste de estabilidade	153
2.1.2.3.1	Estabilidade em curto prazo	153
2.1.2.3.2	Estabilidade em longo prazo	154
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	156
3.1	MATERIAL PARA ENSAIO DE PROFICIÊNCIA	156
3.1.1	Procedimento piloto	156
3.1.2	Preparação do material teste para ensaio de proficiência e estudo de homogeneidade	157
3.1.3	Estabilidade em curto prazo	160
3.1.4	Estabilidade em longo prazo	168
4	CONCLUSÃO	175
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	177
	APÊNDICE A - Materiais teste para ensaio de proficiência para hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em alimentos disponibilizados por provedores internacionais	198

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é um importante país exportador de alimentos, com participação crescente no mercado internacional. Em 2008, a participação de suas exportações agrícolas no comércio mundial é quase o dobro da verificada no início da década de 1990, enquanto a participação dos demais produtos tem mostrado certo declínio (SILVA; CARVALHO, 2008). Em 2014, o produto interno bruto (PIB) do agronegócio brasileiro cresceu 1,60 % em comparação com o desempenho de 2013. Esse resultado, embora inferior ao crescimento apresentado pelo setor em 2013, é expressivo tendo em vista que a prévia do PIB nacional indicou retração de 0,15% em 2014 (BOLETIM PIB, 2015). O agronegócio, portanto, é um setor estratégico para a economia brasileira que, mesmo em períodos de estagnação econômica, ainda demonstra crescimento relevante.

No ano de 2005, o Brasil configurava como o quinto maior produtor de cacau do mundo (FAO, 2014), entretanto, desde a década de 1980 até o início de 2000, a produtividade e as exportações brasileiras desse produto vêm mostrando expressivo declínio. A crise vivenciada pela cacauicultura brasileira deveu-se a uma gama de fatores, cabendo destacar: a redução acentuada dos preços no mercado internacional, em virtude do aumento da produção e da exportação por países africanos, principalmente a Costa do Marfim, e dos elevados estoques internacionais; a intensa devastação causada pela doença “vassoura-de-bruxa” nos cacauais brasileiros; a política cambial adotada no Brasil em 1999, resultando na elevação nos preços de defensivos agrícolas, reduzindo as ações de combate à “vassoura-de-bruxa”; e a má distribuição pluviométrica na principal região produtora (BAHIA, 2006).

Devido a ações implantadas pela Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (CEPLAC) e pelo governo federal, o Brasil tenta recuperar a sua participação no mercado internacional do cacau. Entretanto, para alcançar tal objetivo, há necessidade de se garantir a qualidade sanitária desses produtos a serem exportados, principalmente no que diz respeito ao nível de resíduos e contaminantes. Nos últimos anos, nota-se uma crescente demanda por alimentos mais seguros para atender consumidores cada vez mais exigentes. Esse aumento da preocupação dos consumidores, particularmente os europeus e norte-americanos, com relação à

segurança e à qualidade dos produtos agroalimentares, pode levar a restrições comerciais pela imposição de regulamentações sanitárias, que muitas vezes representam barreiras não-tarifárias para alimentos (SPERS, 2003).

Dentre os contaminantes de alimentos, os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), também denominados hidrocarbonetos aromáticos polinucleares (HPNs) ou poliarenos, constituem uma classe de compostos amplamente distribuídos no ambiente. A presença dessas substâncias em alimentos deve-se, principalmente, à formação durante alguns tipos de processamento como a defumação, a torrefação e a secagem direta com madeira ou queima de combustíveis, à poluição do ar e da água, à sua presença em solos terrestres e marinhos e, em quantidades menores, do material de embalagem contaminado (TFOUNI; VITORINO; TOLEDO, 2007). Assim, os HPAs têm sido encontrados nos mais diferentes tipos de alimentos, incluindo óleos vegetais, margarinas, maionese, produtos lácteos, frutas, vegetais, produtos defumados, chá, café, açúcar, cereais, água, alimentos de origem marinha, alimentos grelhados, assados, bebidas alcoólicas, entre outros (AZEREDO *et al.*, 2006; BETTIN; FRANCO, 2005; CAMARGO *et al.*, 2006; CAMARGO; TOLEDO, 1998; CAMARGO; TOLEDO, 2003; CARUSO; ALABURDA, 2008; GALINARO; FRANCO, 2009; PALMA, 2008; TFOUNI; VITORINO; TOLEDO, 2007). A manteiga de cacau contém teores mais elevados de HPAs do que outros óleos e gorduras vegetais. Esses níveis de contaminação elevados que se somam à contaminação ambiental e outras fontes são resultantes de práticas inadequadas de secagem das amêndoas e do fato de que a manteiga de cacau não pode ser refinada (EU, 2011a).

A presença desses resíduos representa um perigo potencial para a saúde humana, segundo a *International Agency for Research on Cancer* (IARC). A exposição aos HPAs aumenta o risco de câncer em humanos. A carcinogenicidade dos HPAs está associada com a complexidade da molécula, isto é, com o número crescente de anéis benzênicos, e com a ativação metabólica para reativar intermediários e sua subsequente ligação covalente a alvos críticos no DNA humano (BOSTRÖM *et al.*, 2002).

Assim, a crescente preocupação com esses efeitos dos HPAs levou vários países, dentre eles o Brasil, a implantar um programa de controle destes compostos. Para monitorar os níveis desses contaminantes nos alimentos, o primeiro passo na

obtenção de resultados analíticos confiáveis é a validação do método de ensaio escolhido (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002).

Um monitoramento efetivo dos níveis de HPAs nos alimentos, com obtenção de resultados analíticos confiáveis, passa essencialmente por processos de validação dos métodos de ensaio. Incontáveis medições analíticas são efetuadas diariamente em milhares de laboratórios ao redor do mundo e uma grande quantidade de dados analíticos é gerada. Há, então, a necessidade de produção de dados comparáveis e consistentes. Assim, para reconhecimento mútuo de resultados em escala internacional, processos de reconhecimento de competência de laboratórios para execução de ensaios específicos – acreditação – têm sido estruturados, tendo como base os requisitos da NBR ISO/IEC 17025 (2005). Dentre esses requisitos é destacada a importância da validação de métodos analíticos e a documentação do trabalho de validação, para a obtenção de resultados confiáveis e adequados ao uso pretendido (MAGNUSSON; ÖRNEMARK, 2014; THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002).

Ensaio de Proficiência (EP) envolve o uso de comparações interlaboratoriais para a determinação do desempenho de um laboratório em relação a critérios pré-estabelecidos (ISO, 2010). Para tanto, é indispensável a produção de um item de ensaio de proficiência, que consiste em uma amostra que será distribuída aos laboratórios participantes do EP (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2006). Esse item deve ser similar ao tipo de amostra que é analisada rotineiramente pelos laboratórios, em relação à composição da matriz e à faixa de concentração, quantidade ou nível da substância química de interesse. Deve ser garantida a homogeneidade e estabilidade do material, para assegurar que todos os laboratórios recebam unidades que não se diferem entre si no que diz respeito à concentração média do analito (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2006). Atualmente, ainda não existem itens de ensaio de proficiência disponíveis comercialmente para todas as análises químicas realizadas em laboratórios, especialmente no caso dos HPAs em que esses materiais cobrem alguns analitos em determinadas matrizes e os programas de EP atuais ainda não são suficientes, uma vez que não abrangem todos os principais produtos alimentares de alto risco de contaminação por HPAs (OMS, 2006). A preparação de material é um tema de grande importância para o avanço da metrologia química e da gestão da qualidade analítica no Brasil e no mundo (RODRIGUES *et al.*, 2009).

Portanto, devido à necessidade de monitoramento dos níveis de HPAs em amêndoas de cacau, visto que tais compostos são potencialmente cancerígenos e que, para tal monitoramento, deve-se dispor de um método analítico adequadamente desenvolvido e validado, além de um item para ensaio de proficiência, justifica-se o estudo em questão.

2 OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi desenvolver e validar um método adequado para a determinação de HPAs em produtos de cacau, e caracterizar um candidato a item de ensaio de proficiência para esse escopo analítico.

Os objetivos específicos foram:

- desenvolver um método para a determinação de oito HPAs considerados carcinogênicos ou genotóxicos e que podem ser encontrados em amostras de cacau;
- estudar a necessidade da aplicação de ensaios de efeito de matriz quando se utiliza a técnica da diluição isotópica com padrões internos de analitos isotopicamente marcados;
- validar o método otimizado, em processo intralaboratorial, de acordo com protocolos aceitos internacionalmente;
- preparar um material teste para a análise de HPAs em cacau, incluindo testes de homogeneidade e estabilidade em modelo isócrono e clássico.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 O CACAU E CACAUCULTURA NO BRASIL

Segundo estudo realizado por ISAE/FGV (2003), o cacau é um produto nobre e tradicional da agricultura brasileira cuja cultura atravessa um processo recente de recuperação, após um prolongado período de crise da segunda metade da década de 80 até meados da década de 90, originária da conjugação de conjunturas externa e interna altamente desfavoráveis.

Originário da América Central e do Sul, o cacaeiro (*Theobroma cacao* L.) é uma árvore tropical e de clima úmido, que atinge entre 5 e 8 metros de altura e entre 4 a 6 metros de diâmetro de copa, quando proveniente de semente (SILVA NETO *et al.*, 2001) (Figura 1).

Figura 1 – Cacaueiro da região da Bahia apresentando frutos ainda imaturos.



Fonte: LUCIANA NASCIMENTO MOREIRA, 2015, “Não publicado”.

Suas flores surgem sob a forma de almofadas florais no tronco ou nos ramos lenhosos, num volume de até mais de cem mil, mas apenas cerca de 0,1% delas se transformam em frutos (ISAE/FGV, 2003). Os frutos de cacau normalmente apresentam coloração verde ou roxa (vermelho-vinho) na fase de desenvolvimento, e amarela ou alaranjada no período de maturação (**Figura 2**), forma alongada e apresenta sulcos longitudinais no pericarpo, com 15 até 20 cm de comprimento em seu maior eixo (MARTINI, 2004). O cacaeiro inicia a produção de frutos no terceiro ano após o plantio, porém, produtividade adequada só é alcançada após o oitavo ano (GOMES, 1972). A árvore produz anualmente de 0,5 a 2 kg de sementes, já fermentadas e secas, denominadas amêndoas (BELITZ; GROSCH, 1999; ICCO, 2008). As sementes (**Figura 3**) apresentam 2 a 3 cm de comprimento e contêm polpa, testa e cotilédones. A polpa constitui-se por um parênquima de células esponjosas mucilaginosas sendo composta por água, frutose, glicose, sacarose, pentosanas, ácido cítrico, proteínas e vários sais inorgânicos. A testa (revestimento da semente) secreta mucilagens e atua como via de transporte entre os cotilédones e a polpa mucilaginosa. Os cotilédones apresentam células contendo reservas protéicas, lípidios, amido e células polifenólicas (MARTINI, 2004).

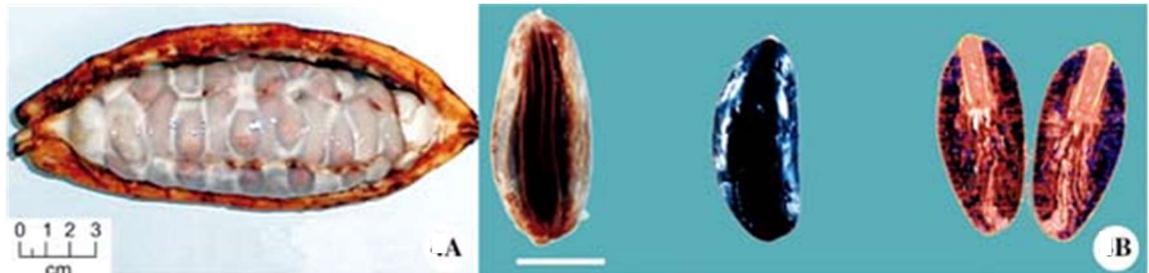
Figura 2 – Variações de coloração dos frutos do cacaeiro.



Fonte: GRAZIELLE, 2012

Figura 3 - (A) Fruto do cacau aberto mostrando polpa e sementes. (B)

Sementes de cacau



Fonte: MARTINI *et al.*, 2008

Quando se considera a composição química das sementes de cacau, fermentadas e não fermentadas, observa-se que os lipídios são a principal fonte de reserva dessas sementes, com valores acima de 50 % (AFOAKWA *et al.*, 2013; CARPENTER *et al.*, 1994). Na **Tabela 1** está descrita a composição centesimal de sementes de cacau, de acordo com o tempo de armazenamento e a condição de fermentação.

Tabela 1 – Efeito do armazenamento dos frutos (pré-condicionamento de polpa) e fermentação na composição centesimal de sementes de cacau

Armazenamento do fruto (dias)	Condição de fermentação	Umidade (%)	Proteína (%)	Lipídios (%)	Cinzas (%)	Carboidrato (%)
0	Não fermentadas	4,2 ± 0,02	21,6 ± 0,83	55,2 ± 0,10	3,5 ± 0,11	15,5 ± 0,63
	Fermentadas	4,0 ± 0,02	18,8 ± 0,56	53,4 ± 0,63	2,8 ± 0,07	21,0 ± 0,08
7	Não fermentadas	4,4 ± 0,04	20,8 ± 0,05	53,3 ± 1,5	2,9 ± 0,05	18,6 ± 0,72
	Fermentadas	4,3 ± 0,09	18,2 ± 0,13	52,2 ± 0,05	2,3 ± 0,04	23,1 ± 0,54
14	Não fermentadas	4,2 ± 0,02	19,7 ± 0,06	52,5 ± 0,04	3,1 ± 0,01	20,5 ± 0,24
	Fermentadas	4,5 ± 0,03	17,6 ± 0,60	50,5 ± 0,15	2,7 ± 0,18	24,7 ± 0,31
21	Não fermentadas	4,9 ± 0,01	20,4 ± 0,48	52,3 ± 0,07	3,3 ± 0,05	19,1 ± 0,09
	Fermentadas	3,8 ± 0,04	17,9 ± 0,07	50,4 ± 0,05	2,9 ± 0,09	24,9 ± 0,11

Fonte: AFOAKWA *et al.*, 2013

A cacauicultura foi introduzida no Brasil, no estado da Bahia, a partir do século XVIII por iniciativa da Coroa portuguesa, mas só foi realmente desenvolvida após a implantação de variedades mais produtivas a partir de 1907 (GUIMARÃES, 2001; WILLUMSEN; DUTT, 1991). Entre os anos de 1896 a 1930, a produção brasileira de cacau cresceu 400 %, configurando o Brasil e o Equador como os maiores produtores mundiais. Entretanto, essa expansão recorde ocorreu em terras com baixa produtividade e, além disso, devido à ocorrência da Grande Depressão e dos primeiros anos da Segunda Guerra Mundial, uma grave crise no setor foi instalada. Essa crise levou à criação, pelo governo brasileiro, da Comissão Executiva para o Planejamento da Lavoura Cacaueira (CEPLAC), uma agência com autonomia para conduzir pesquisas, promover assistência técnica e financeira aos cacauicultores, além de facilitar a aquisição de insumos agrícolas. A recuperação do setor cacaueiro resultou em aumentos na produção e, também, na qualidade do produto, gerando uma colheita recorde em 1984 e a expansão da cultura até uma nova fronteira agrícola, o estado de Rondônia (WILLUMSEN; DUTT, 1991). O Brasil participa no comércio internacional exportando cacau em amêndoas desde 1961, mas, a partir de 1992, passou a ser, também, importador acumulando até 2002 mais de 336 mil toneladas (CUENCA; NAZÁRIO, 2004).

No período de 1970 a 1990, devido às metas de expansão da lavoura cacaueira e ao aumento na demanda por sementes, os plantios de sementes híbridas – cruzamentos entre cacau-comum e cacau trinitário, selecionado em Trinidad – prevaleceram na região sul da Bahia, o que resultou em cacauais muito suscetíveis à vassoura-de-bruxa (YAMADA *et al.*, 2001).

A partir da década de 1990, visto que houve expressivo declínio da produção e exportação de cacau ocasionada pelo avanço da vassoura-de-bruxa, adotou-se o plantio de clones resistentes a essa doença. Muitos desses clones consistiram em seleções locais, feitas em condições de fazenda pelos agricultores, extensionistas e pesquisadores de instituições governamentais dessa região (LOPES *et al.*, 2004).

A produção anual de cacau no Brasil aproxima-se 200 mil toneladas anuais: em 2014 foram produzidas 273.793 toneladas de cacau em amêndoa, e em 2015, estimou-se que a produção atingisse cerca de 255.000 toneladas, segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2015).

De acordo com dados da ISAE/FGV (2003), a produção nacional de cacau em amêndoas está concentrada no sul da Bahia (83% da oferta brasileira, especialmente

nos municípios de Itabuna, Camacã e Ilhéus), seguida, em escala bem inferior, pelo Pará (9,9% da oferta brasileira, focalizada nos municípios de Medicilândia, Uruará, Altamira e Tomé-Açú) e por Rondônia (5,4% da produção brasileira, concentrada nos municípios ao longo da rodovia BR-364 ou Transamazônica).

3.1.1 Beneficiamento do cacau

O processamento do cacau fornece três produtos intermediários: o cacau comercial que é processado para a obtenção da manteiga de cacau e de cacau em pó. Esses dois últimos subprodutos são posteriormente recombinados para a fabricação de chocolate para o qual são necessárias outras matérias-primas tais como o leite e o açúcar (ORLANDI, 2011). O seguinte fluxograma representa as etapas principais para a obtenção do cacau comercial (**Figura 4**).

Figura 4 – Fluxograma do beneficiamento do cacau.



A colheita constitui a primeira etapa do beneficiamento das sementes, ou pré-processamento, e é realizada manualmente, com auxílio de uma ferramenta denominada podão, ou com facão, tesoura ou instrumento similar para colher frutos de fácil acesso. Nessa etapa são colhidos apenas os frutos maduros, os quais permitem extração mais fácil das sementes e contêm açúcar em quantidade adequada para que se consiga uma fermentação eficaz (SILVA NETO *et al.*, 2001; VERÍSSIMO, 2012).

A etapa de quebra manual é realizada após a colheita e consiste na abertura dos frutos com auxílio de cutelo e retirada das sementes. O período entre a colheita e a quebra, varia de acordo com a região de cultivo e a época do ano, porém, considera-se que esse período pode ser realizado até o quinto dia após a colheita. Esse período de descanso anteriormente à quebra é necessário para que haja a concentração dos açúcares e outros compostos que são importantes para a fermentação (MARTINS *et al.*, 2012; SILVA NETO, 2001; VERÍSSIMO, 2012).

A fase mais importante no processo de beneficiamento do cacau é a fermentação. A fermentação objetiva a eliminação da polpa do fruto e a melhora das características sensoriais do produto (GOMES, 1972). Esse processo consiste em uma fermentação ao nível da polpa, realizada por bactérias e leveduras, durante a qual se produz etanol, ácido acético e calor, levando à morte da semente. Após essa etapa, desencadeia-se uma série de transformações nos cotilédones (fermentação interna ou cura), a maior parte das quais catalisadas por enzimas. O período entre a quebra e o início da fermentação não deve ultrapassar 24 horas para que não ocorram reações químicas indesejáveis (VERÍSSIMO, 2012). Essa etapa do beneficiamento é realizada em cochos especiais e compreende um período de seis a sete dias. Durante esse processo, a temperatura pode alcançar 40° C e as amêndoas são revolvidas pelo menos uma vez por dia (GOMES, 1972).

A obtenção de produtos derivados do cacau envolve, também, uma etapa de secagem das sementes já fermentadas (amêndoas) que objetiva reduzir o teor de umidade para menos do que 8%, para garantir a conservação do produto. A secagem do cacau é realizada pelo sol ou por desidratação (RODRIGUEZ-CAMPOS *et al.*, 2011) e deve ser iniciada imediatamente após a fermentação. Essa etapa pode ocorrer mediante dois processos distintos:

a) uso de estufas ou secadores aquecidos a fogo de lenha. Quando a colheita dos frutos coincide com uma estação chuvosa do ano, a secagem é realizada de modo artificial (GOMES, 1972). Tradicionalmente, na região produtora de cacau no estado da Bahia, a desidratação é feita através de um secador tubular, construído em alvenaria tendo uma câmara de calor, no interior da qual um tubo de ferro transmite para as amêndoas o calor produzido pela queima de lenha em uma fornalha, sendo mantida uma temperatura de 50° C, por aproximadamente de 40 horas (MARTINS *et al.*, 2012; SILVA NETO *et al.*, 2001);

b) secagem natural, ao sol, com o uso de “barcaças”: esse processo é o mais utilizado no Brasil. As “barcaças” são grandes áreas com piso de madeira sobre pilares de alvenaria, cobertas por um telhado móvel feito de chapa de alumínio corrugado ou de zinco, em que este é removido de dia e recolocado à noite e quando chove. As amêndoas são espalhadas sobre o piso em uma camada com cerca de 5 cm de espessura que é revolvida constantemente com rodo de madeira, com o objetivo de evitar aglomerados (OETTERER *et al.*, 2006). Dependendo das condições climáticas, a secagem natural ocorre no período de 8 a 12 dias (MARTINS *et al.*, 2012).

É possível ainda utilizar, uma combinação dos dois processos de secagem mencionados acima: inicialmente, as amêndoas de cacau são secas ao sol, por um período de dois a três dias, com o processo sendo complementado, em secador artificial, por um período de quinze a vinte horas (SILVA NETO *et al.*, 2001).

Em 1994, Jinap, Thien e Yap observaram que não havia diferenças significativas ($p \geq 0,05$) entre amostras de amêndoas de cacau que foram secas ao sol ou desidratadas por circulação de ar forçada em relação ao perfil de ácidos graxos voláteis (C₃-C₅) e à acidez. De maneira análoga, Oke e Omotayo (2012) verificaram que a desidratação por circulação de ar forçada é adequada para a secagem de sementes de cacau para um teor de umidade seguro (7 %) em um período de 2 a 5 dias, dependendo da temperatura do desidratador (35 a 55° C). Os atributos de qualidade essenciais das amêndoas (teor de ácidos graxos livres, ácido acético, pH, sabor e cor) são comparáveis com o produto do sistema tradicional de secagem ao sol (OKE; OMOTAYO, 2012).

Na última etapa do beneficiamento, as amêndoas de cacau são ensacadas ou conservadas a granel, em armazéns secos e bem ventilados (GOMES, 1972). Anteriormente ao armazenamento, as amêndoas são limpas por sistema manual (escovas) ou mecânico (vácuo) (VERÍSSIMO, 2012).

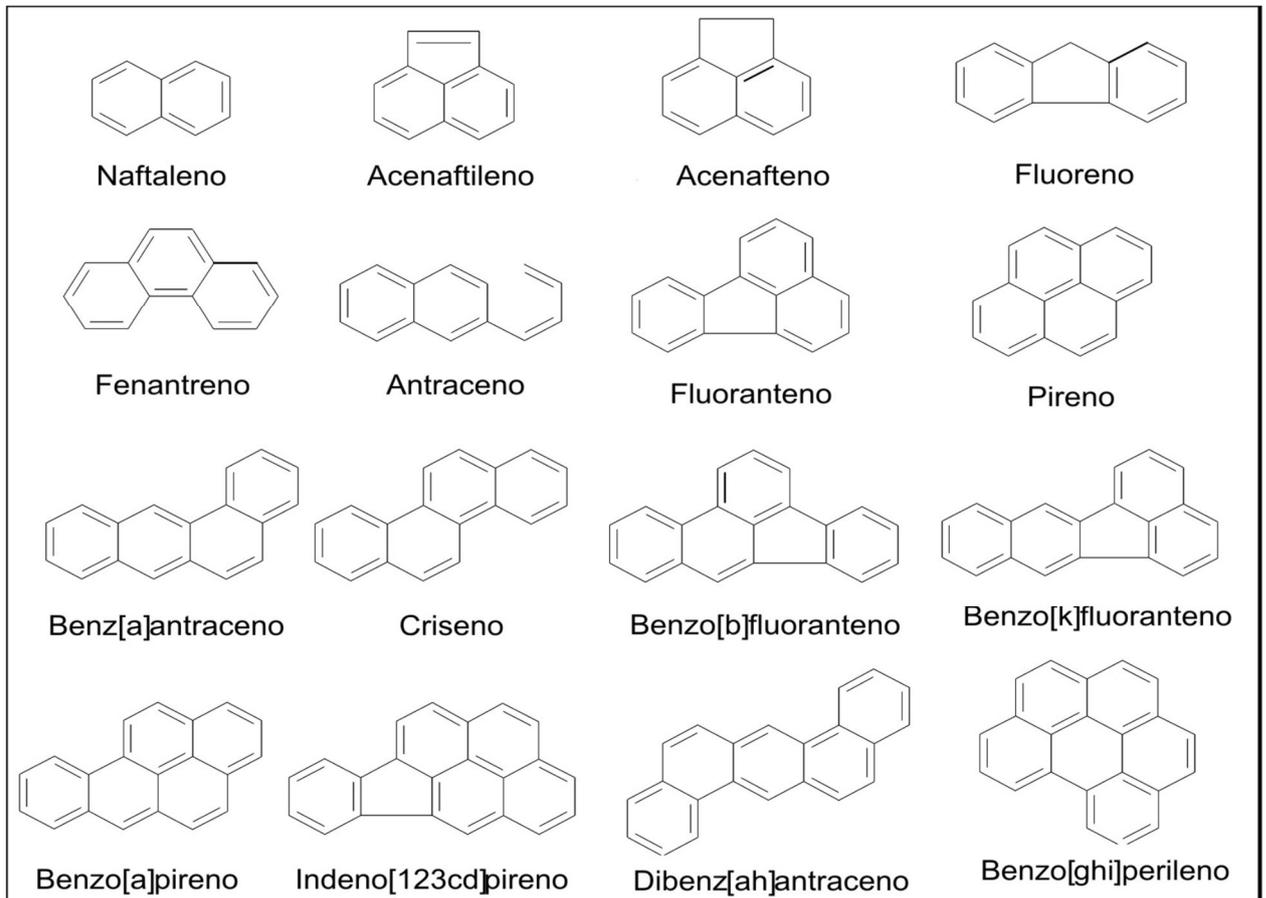
3.2 HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS (HPAS)

Compostos policíclicos aromáticos incluem diferentes grupos de substâncias que possuem dois ou mais anéis benzênicos em sua estrutura e vários grupos funcionais que podem conter diversos elementos (MARCÉ; BORRULL, 2000). Um grupo importante de compostos policíclicos aromáticos são os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) os quais apresentam dois ou mais anéis benzênicos fundidos, que podem ou não possuir grupos substituintes ligados a um ou mais anéis, e nenhum outro elemento que não seja carbono e hidrogênio. Esses compostos variam de dois anéis (naftaleno) até sete anéis (coroneno) (NEVES, 2006). Os HPAs constituem um grupo que engloba cerca de 10.000 compostos, dos quais, alguns são encontrados em quantidades consideráveis no ambiente e em alimentos (WENZL *et al.*, 2006).

Essas substâncias, bem como seus derivados nitrados e oxigenados (PEREIRA NETO *et al.*, 2000), encontram-se amplamente distribuídas no ambiente, sendo consideradas poluentes orgânicos prioritários ambientais. Seres humanos são expostos aos HPAs pelo ar e pela ingestão de água, porém, a exposição ocorre, na maioria das vezes, pela ingestão de alimentos contaminados (WENZL *et al.*, 2006).

De acordo com a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA – *Environment Protection Agency*) 16 hidrocarbonetos poliaromáticos são considerados particularmente importantes no monitoramento ambiental de poluentes orgânicos prioritários (EPA, 1987): acenafteno acenaftileno, antraceno, benzo(a)antraceno (BaA), benzo(a)pireno (BaP), benzo(b)fluoranteno (BbF), benzo(g,h,i)perileno (BghiP), benzo(k)fluoranteno (BkF), criseno (Cris), dibenzo(a,h)antraceno (DahA), fenantreno, fluoranteno, fluoreno, indeno(1,2,3-cd)pireno (Ind), naftaleno e pireno (**Figura 5**).

Figura 5 – Fórmulas estruturais de dezesseis hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) considerados prioritários pela agência de proteção ambiental dos Estados Unidos EPA (*Environment Protection Agency*).



Fonte: MEIRE; AZEREDO; TORRES, 2007.

Os HPAs são formados durante a combustão incompleta de material orgânico, como a queima de óleo, petróleo e seus derivados, escapamentos de veículos, fumaça de cigarro, calefação, queima de carvão ou madeira, incineração de rejeitos, entre outros. A contribuição de fontes naturais é muito limitada, restringindo-se praticamente à queima espontânea de florestas e emissões vulcânicas (MAGALHÃES *et al.*, 2007), contribuindo com pequenas quantidades de HPAs. Contudo, as fontes antropogênicas representam o principal processo de emissão destes compostos (CARUSO; ALABURDA, 2008). A quantidade e a composição dos HPAs produzidos dependem das condições de reação, temperatura e quantidade de ar, sendo a formação favorecida pela queima da matéria orgânica em temperaturas variando de 500 a 900°C, principalmente acima de 700°C (CAMARGO *et al.*, 2006).

Para indivíduos não-fumantes, a exposição aos HPAs ocorre, principalmente, pela inalação do ar e pela ingestão de alimentos (SCF, 2002). Outras rotas de exposição, possivelmente menores, são a ingestão de poeira e solo, ingestão de água potável, absorção pela pele do solo e da água, e uso de produtos contaminados com HPAs (como preparações contendo alcatrão) (SCF, 2002).

3.2.1 HPAs em alimentos

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos podem ser encontrados na fumaça usada para processo de defumação e podem se depositar na superfície, e migrar para dentro do alimento que está sendo defumado. Vários fatores no processo de defumação podem influenciar a composição da fumaça e a absorção de HPAs pelo alimento, podendo ser destacada a temperatura de combustão durante a geração da fumaça, a qual aparenta ser particularmente crítica. A formação de HPAs na fumaça aumenta linearmente com a elevação da temperatura de combustão na faixa de temperaturas de 400 a 1000° C (WRETLING *et al.*, 2010).

Inúmeras são as vias de contaminação dos alimentos por HPAs. Essa contaminação pode ter sua origem tanto na poluição ambiental, como ocorre com frutas, hortaliças e grãos cultivados em regiões próximas às industriais, e, também, durante o processamento, destacando-se nesse caso a defumação, a torrefação e a secagem direta com madeira (CAMARGO; TOLEDO, 1998; TFOUNI *et al.*, 2007). Desse modo, os HPAs têm sido encontrados em diversos tipos de alimentos, incluindo óleos vegetais, margarinas, maionese, produtos lácteos, frutas, vegetais, carnes e peixes defumados, chá-mate, café, açúcar, cereais, água, peixes e crustáceos, carnes grelhadas e assadas, cacau, chocolate, etc (CARUSO; ALABURDA, 2008).

No caso dos óleos vegetais, destacam-se, como fontes de contaminação, a poluição do ar com deposição de partículas sobre plantas oleaginosas, a absorção por plantas a partir de solos contaminados, a secagem direta de grãos por meio de fumaça aquecida pela queima de madeiras ou com fogo direto e a absorção de solventes à base de petróleo usados no processo de extração do óleo (CAMARGO; TOLEDO, 1998; COSTOPOULOU *et al.*, 2010).

Em carnes, os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos formam-se durante o assamento, a tostagem e a defumação, se na superfície do produto as temperaturas atingem de 400 a 1000°C em placas ou grelhas e, ainda, se a chama incide diretamente no assado (PALMA, 2008).

Em frutas e hortaliças, a presença dos HPAs é atribuída, principalmente, à deposição de partículas do ar poluído em suas superfícies. Os teores encontrados vão depender da localização do cultivo e do produto em si, dado amostras que são cultivadas em áreas altamente industrializadas ou próximas a estradas e vias expressas geralmente apresentam níveis mais altos de HPAs do que aquelas cultivadas em áreas rurais. Por conseguinte, as concentrações dos HPAs são frequentemente maiores nas superfícies dos vegetais, 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 onde há deposição de partículas do ar poluído são especialmente encontrados em vegetais com uma grande área superficial exposta, por exemplo, alface, couve e espinafre (CAMARGO; TOLEDO, 2003).

A contaminação de sementes de cacau com HPAs pode ocorrer pela secagem do cacau em asfalto, em betume no sol, usando processos de secagem diretos e, também, durante a estocagem e transporte em sacos de juta ou sisal que tenham sido tratados com óleo mineral (ZIEGENHALS *et al.*, 2009). A desidratação incorreta das sementes com controle ineficiente do fogo pode causar a contaminação dessas com HPAs pela fumaça. Quando as sementes são secadas somente com defumação, o teor de benzo(a)pireno encontrado é significativamente elevado (WANDAN; ELLEINGAND; NDOUBA, 2011). Além disso, o uso de desidratadores com madeira como combustível mostra um risco de contaminação mais elevado quando comparado com o uso de querosene e óleo diesel industrial (MISNAWI, 2012).

A cachaça e o rum podem sofrer contaminação por HPAs pela queima da cana-de-açúcar na colheita, pela adição de caramelo (utilizado para a correção da coloração), no produto final ou durante o período de maturação (envelhecimento) em tonéis de madeira que foram submetidos à queima durante sua confecção. Em bebidas preparadas a partir do malte, como o uísque escocês, a contaminação pode ocorrer durante a secagem dos maltes germinados da cevada pelo processo de

defumação e, também, durante a estocagem em barris de madeira, cujo interior foi submetido ao processo de queima (GALINARO; FRANCO, 2009).

A cada ano são derramados nos mares de todo o mundo cerca de 5 milhões de toneladas de petróleo, uma conhecida fonte de HPAs. No ambiente marinho, os HPAs são compostos persistentes, devido à sua baixa solubilidade em água e à tendência de se associarem com material particulado, sendo ainda biodisponíveis para as espécies marinhas via cadeia alimentar, como compostos transportados pela água ou sedimentos contaminados (AZEREDO *et al.*, 2006; RAMALHOSA *et al.*, 2009). Como os HPAs são compostos lipofílicos, eles podem facilmente atravessar membranas e têm o potencial para bioacumular em organismos aquáticos, como peixes e crustáceos (CARUSO; ALABURDA, 2008).

3.2.2 Características físico-químicas

Os HPAs são constituídos por anéis aromáticos fundidos e não contêm heteroátomos ou carregam substituintes. Os compostos que contêm de dois a três anéis benzênicos fundidos são conhecidos como HPAs de baixo peso molecular e aqueles que contêm mais do que quatro anéis benzênicos são chamados HPAs de alto peso molecular. Suas propriedades físicas e químicas estão relacionadas com a massa molecular (WENZL *et al.*, 2006).

Essas substâncias são pouco solúveis em água e, em geral, sua solubilidade diminui com o aumento do número de anéis. Além disso, os HPAs apresentam, também, coeficientes de partição octanol/água superiores a 1000, demonstrando grande afinidade lipofílica que aumenta com a massa molecular, ou seja, com o número de anéis aromáticos da molécula. Por outro lado, a volatilidade destes compostos diminui com o aumento do peso molecular e, portanto, HPAs de baixos pesos moleculares são mais voláteis e apresentam maiores pressões de vapor que os mais pesados. Portanto, os HPAs podem ser encontrados na natureza tanto na fase gasosa quanto adsorvidos em material particulado. A concentração de cada componente em ambas as fases é função de sua volatilidade e de sua afinidade pelas superfícies das partículas atmosféricas (PEREIRA NETO *et al.*, 2000). Entretanto, segundo CARUSO; ALABURDA (2008), à temperatura ambiente todos os HPAs são

sólidos e apresentam, comumente, altas temperaturas de fusão e ebulição, baixas pressão de vapor e solubilidade em água.

Com relação à sua característica lipofílica, os HPAs tendem a se acumular em tecidos lipídicos de plantas e animais. Com relação às plantas, esses compostos concentram-se mais na superfície (cascas e folhas) do que nos tecidos internos (CARUSO; ALABURDA, 2008). Apesar da pouca solubilidade em água, os mesmos podem ser transportados em meios aquáticos, adsorvidos em partículas em suspensão, ficando posteriormente, depositados nos sedimentos.

Os HPAs são praticamente inertes quimicamente, mas podem reagir com óxidos de nitrogênio, ácido nítrico, óxidos de enxofre, ácido sulfúrico, ozônio e radical hidroxila. São degradados lentamente, sob condições aeróbicas, e são estáveis à hidrólise (PINTO, 2008).

3.2.3 Toxicidade

O primeiro indício de carcinogenicidade química de produtos de combustão orgânica foi publicado em 1775, quando foi observada uma maior incidência de cânceres em limpadores de chaminés, entretanto, somente muitos anos depois dessa publicação tal atividade carcinogênica foi atribuída à presença de benzo(a)pireno nas amostras (PEREIRA NETO *et al.*, 2000).

Os HPAs de baixo peso molecular apresentam toxicidade aguda significativa para os organismos aquáticos enquanto os de alto peso molecular podem ser carcinogênicos e estão amplamente distribuídos no meio ambiente (NEVES, 2006).

Muitos dos HPAs são considerados compostos tóxicos, mesmo em pequenas concentrações, apresentando a seguinte regra geral: compostos de baixo peso molecular formados por 2 ou 3 anéis (ex. naftaleno, fenantreno e antraceno) possuem elevada toxicidade aguda, mas baixo (ou nenhum) potencial carcinogênico; compostos de maior peso molecular contendo 4, 5 ou 6 anéis (ex. benzo(a)pireno, benzo(c)fenantreno) possuem baixa toxicidade aguda, mas apresentam um maior potencial carcinogênico (BARBOSA, 2005).

O Comitê Científico de Alimentos (SCF) da Comissão Europeia, em 2002, identificou 15 HPAs como carcinógenos genotóxicos: benzo(a)antraceno, benzo(b)fluoranteno, benzo(j)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, benzo(g,h,i)perileno, criseno, ciclopenta(c,d)pireno, dibenzo(a,h)antraceno, dibenzo(a,e)pireno, dibenzo(a,h)pireno, dibenzo(a,i)pireno, dibenzo(a,l)pireno, indeno(1,2,3-cd)pireno e 5-metilcriseno. Para o benzo(g,h,i)perileno, entretanto, evidência clara foi encontrada para efeitos genotóxicos, porém, não carcinogênicos (SCF, 2002). Em 2005, o JECFA (*Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*) indicou um décimo sexto composto, benzo(c)fluoreno, para ser observado em alimentos.

De acordo com o SCF, o benzo(a)pireno pode ser usado como marcador para a ocorrência e efeito de HPAs carcinogênicos em alimentos (WRETLING *et al.*, 2010). Em 2008, entretanto, a EFSA (*European Food Safety Authority*) concluiu que somente o benzo(a)pireno não é um indicador apropriado para a ocorrência e toxicidade de HPAs em alimentos e os oito HPAs especificados (HPA 8 = benzo(a)pireno, benzo(a)antraceno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(g,h,i)perileno, criseno, dibenzo(a,h)antraceno e indeno(1,2,3-cd)pireno), para os quais dados de carcinogenicidade oral estão disponíveis, e/ou um subgrupo deles (HPA 4 = benzo(a)pireno, criseno, benzo(a)antraceno e benzo(b)fluoranteno) foram indicados como marcadores mais adequados para serem monitorados.

Os HPAs são substâncias que pertencem à classe dos pró-carcinogênicos, isto é, necessitam sofrer ativação metabólica preliminar para formar o carcinógeno ativo e tornarem-se capazes de reagir com o DNA e outras moléculas (GALINARO ; FRANCO, 2009). São metabolizados pelas enzimas hepáticas em diol-epóxidos, ligando-se covalentemente às macromoléculas celulares (incluindo o DNA) e causando erros de replicação e mutações. Além disso, há evidências de que outras reações intermediárias também sejam geradas por um processo de oxidação, o que pode resultar em instabilidade química na alquilação do DNA, levando ao processo mutagênico (MARQUES *et al.*, 2009).

De acordo com NEVES (2006), estudos *in vitro* mostram que o benzo(a)pireno induz danos em células procarióticas, eucarióticas e células de mamíferos, produzindo efeitos genotóxicos variados, incluindo mutações genéticas em células somáticas, formação de adutos de DNA, síntese de DNA não programada, entre outros. Estudos

epidemiológicos associam a exposição de misturas de HPAs contendo benzo(a)pireno ao risco aumentado de produzir câncer de pulmão e outros tumores, sendo, também, observada maior frequência de câncer de estômago em populações que consomem tradicionalmente grandes quantidades de produtos cárneos defumados. Além disso, animais de experimentação expostos ao benzo(a)pireno, por diferentes vias de introdução e administração, incluindo a dieta por via oral, têm desenvolvido papilomas e carcinomas gástricos (MARQUES *et al.*, 2009).

3.2.4 Ocorrência de HPAs em cacau e produtos de cacau

Em estudo realizado por Wieczorek *et al.* (2002), os níveis de HPAs mais elevados foram encontrados em amostras de bebida preparada com cacau, cuja concentração foi igual a $0,82 \text{ mg.L}^{-1}$ da bebida. O conteúdo de HPAs em cacau foi várias vezes superior ao conteúdo desses mesmos compostos na infusão de café natural sem filtração.

Ziegenhals *et al.* (2009) analisaram 40 amostras de vários tipos de chocolate com diferentes teores de cacau e verificaram que o conteúdo de benzo(a)pireno se situou na faixa de $0,07$ a $0,63 \text{ } \mu\text{g.kg}^{-1}$. Os níveis mais altos foram encontrados para a soma de criseno e trifenileno ($0,83$ a $2,09 \text{ } \mu\text{g.kg}^{-1}$), assim como os níveis de benzo(a)antraceno e benzo(c)fluoreno que se encontravam na mesma magnitude.

Em 2011 na Costa do Marfim, sementes de cacau foram submetidas a diversas condições de secagem e o teor de benzo(a)pireno de cada amostra foi determinado. Os autores observaram que nenhum benzo(a)pireno foi detectado nas amostras que sofreram secagem natural somente, entretanto, as amostras que foram defumadas apresentaram teores variáveis de acordo com o tempo de defumação. A combinação das técnicas de secagem natural (ao sol) e defumação originaram amêndoas com teores na faixa de $7,698$ a $3709,25 \text{ } \mu\text{g.kg}^{-1}$ (WANDAN; ELLEINGAND; NDOUBA, 2011).

O trabalho de Raters e Matissek (2014) teve como objetivo analisar um conjunto de 218 amostras composto por manteiga de cacau, massa de cacau, cacau cru (bruto), além de amostras de monitoramento de produtos de cacau acabados e chocolate do mercado alemão. Dentre todos os produtos analisados, foi encontrado

um nível de contaminação por HPAs relativamente baixo, dentro dos limites permitidos pela legislação europeia, excetuando-se apenas duas amostras: uma manteiga de cacau coletada em 1999, apresentando a soma de 4 HPAs [benzo(a)antraceno, benzo(a)pireno, benzo(b)fluoranteno e criseno] igual a $92,53 \mu\text{g.kg}^{-1}$ em base de gordura; uma amostra de cacau cru (bruto) coletada em 2007, apresentando a soma de 4 HPAs igual a $44,28 \mu\text{g.kg}^{-1}$ em base de gordura (RATERS; MATISSEK, 2014).

Sadowska-Rociek; Surma; Cieślik (2015) analisaram 10 amostras de cacau disponíveis no mercado polonês em 2014. A soma total dos HPAs encontrava-se na faixa de 102,58 a $174,14 \mu\text{g.kg}^{-1}$, entretanto, a maior quantidade era devido a hidrocarbonetos mais leves, de três anéis aromáticos. HPAs potencialmente carcinogênicos, como criseno e benzo(k)fluoranteno foram detectados em duas amostras apenas ($10,19 \mu\text{g.kg}^{-1}$ e $2,95 \mu\text{g.kg}^{-1}$, respectivamente) (SADOWSKA-ROCIK; SURMA; CIEŚLIK, 2015), não ultrapassando os limites impostos pela legislação europeia vigente (EU, 2011a).

3.2.5 Métodos para determinação de HPAs em cacau

Na literatura, há poucos relatos de métodos utilizados para a determinação de HPAs em cacau e produtos de cacau, entretanto, dentre os estudos disponíveis verifica-se a aplicação de uma variedade de técnicas de extração e purificação, como descrito a seguir:

Ziegenhals *et al.* (2009) aplicaram a técnica de extração acelerada por solvente (ASE) e cromatografia de permeação em gel (CPG) seguida de purificação por extração em fase sólida (EFS) em sistema ASPEC[®] modificado e separação e detecção por cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas de alta resolução (CG-EMAR). Esses autores, também, fizeram uso de diluição isotópica como ferramenta de auxílio na identificação e quantificação de HPAs em chocolate.

Em 2010, Wang e Guo realizaram a análise de uma amostra de EP de 4 HPAs em manteiga de cacau utilizando um método previamente validado para óleos vegetais. O método desenvolvido por esses autores consistia em extração por ultrassom seguida de cromatografia de permeação em gel (CPG) e análise final por CG-EM (WANG; GUO, 2010).

Wandan; Elleingand; Ndouba (2011) utilizaram da extração por Soxhlet e purificação com coluna de sílica gel para a determinação de benzo(a)pireno em amêndoas granuladas de cacau. Após extração e purificação do eluato, a análise final foi realizada por CG-EM.

Em 2013, foi publicado um estudo que objetivou o desenvolvimento de uma técnica de extração rápida e sensível para a determinação de 16 HPAs em amostras de chocolate pela aplicação de microextração em fase sólida (MEFS) em modo de imersão direta (ID) ou *headspace* (HS) e detecção por CG-EM ou cromatografia gasosa com detector de ionização de chama (CG-DIC) (KUMARI *et al.*, 2013).

Raters e Matissek (2014) desenvolveram e adaptaram um método de cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência (CLAE-FL) para a determinação de 4 HPAs em amostras de cacau e chocolate. A extração foi realizada por remoção prévia da gordura por centrifugação, seguida de saponificação e purificação por extração em fase sólida (EFS) com cartucho Strata EPH Giga Tube (sílica).

Já em estudo publicado por Sadowska-Rociek; Surma; Cieślik (2015), foi usada a técnica de QuEChERS baseada em extração em fase sólida dispersiva (EFS-D) com diferentes adsorventes (Florisil, Bond Elut ENV e C₁₈) seguida de extração líquido-líquido para determinação de 13 HPAs em amostras de cacau, usando CG-EM para separação e detecção dos analitos.

3.2.6 Legislação

Níveis máximos de benzo(a)pireno e soma de 4 HPAs – benzo(a)pireno, benzo(a)antraceno, benzo(b)fluoranteno e criseno – em uma gama de matrizes alimentares estão especificados em um Regulamento da Comissão das Comunidades Europeias nº 835/2011 (EU, 2011a). Esses níveis estão apresentados na **Tabela 2**.

Já o regulamento nº 836/2011 (EU, 2011b) da Comissão das Comunidades Europeias diz respeito aos métodos de amostragem e análise para o controle oficial dos níveis de chumbo, cádmio, mercúrio, estanho inorgânico, 3-MCPD e benzo(a)pireno em produtos alimentares. Neste documento são destacados os critérios de desempenho para métodos de análise de benzo(a)pireno (**Tabela 3**).

Tabela 2 – Níveis máximos permitidos de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos segundo o Regulamento 835/2011

Tipos de alimentos	Níveis máximos ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)	
	Benzo(a)pireno	Soma de benzo(a)pireno, benzo(a)antraceno, benzo(b)fluoranteno e criseno.
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 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ de gordura a partir de 01/04/2013	35,0 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ de gordura a partir de 01/04/2013 até 31/03/2015 30,0 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ 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 3 – Critérios de desempenho para métodos de análise de benzo(a)pireno

Parâmetro	Valor/Comentário
Aplicabilidade	Alimentos especificados no Regulamento (UE) nº 835/2011
Limite de detecção	Menor do que 0,3 µg.kg ⁻¹
Limite de quantificação	Menor do que 0,9 µg.kg ⁻¹
Precisão	Valores HORRAT _r ou HORRAT _R menores do que 2
Recuperação	50 a 120%
Especificidade	Livre de interferências de matriz ou espectrais, verificação de detecção positiva

Fonte: EU, 2011b

Atualmente, há apenas um regulamento técnico vigente no Brasil quanto aos níveis de benzo(a)pireno em aromas de fumaça. A RDC nº 2, de 15 de janeiro de 2007 (BRASIL, 2007) estabelece que os aromas de fumaça não devem transferir mais que 0,03 µg.kg⁻¹ de 3,4-benzopireno ao alimento final. Além disso, em 2010, o Ministério da Agricultura elaborou a Instrução Normativa nº 8, de 29 de abril de 2010 (BRASIL, 2010) que aprova os Programas de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC) em carnes, leite, mel, ovos e pescado para o exercício de 2010. Dentre os contaminantes monitorados no pescado (cultivo e captura) encontravam-se oito HPAs (benzo(a)pireno, benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, indeno(1,2,3-cd)pireno, dibenzo(a,h)antraceno e benzo(g,h,i)perileno). Nessa Instrução Normativa foi estabelecido limite de referência de 2 µg.kg⁻¹ para cada HPA relacionado, o mesmo limite preconizado pelo Regulamento (EC) 1881/2006 das Comunidades Europeias. As análises foram realizadas em laboratórios oficiais e credenciados pertencentes à Rede Nacional de Laboratórios Agropecuários do Sistema Unificado de Atenção à Sanidade Agropecuária. Entretanto, após publicação de novo regulamento europeu em 2011 (EU 2011a), o pescado foi retirado do escopo do monitoramento do PNCRC.

3.3 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

O bom desempenho de qualquer técnica analítica depende crucialmente de dois parâmetros: a qualidade das medidas instrumentais e a confiabilidade estatística dos cálculos envolvidos no seu processamento. Uma maneira de assegurar a aplicabilidade e o alcance de um método durante as operações de rotina de um laboratório é estabelecendo os limites destes parâmetros por meio da estimativa das figuras de mérito, numa etapa conhecida como validação (RIBEIRO *et al.*, 2008).

A validação é a confirmação por exame e fornecimento de evidência objetiva de que os requisitos específicos para um determinado uso pretendido são atendidos (ISO/IEC 17025, 2005). É um processo contínuo que começa no planejamento da estratégia analítica e continua ao longo de todo o seu desenvolvimento e transferência.

3.3.1 Documentos orientativos

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e o Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Instrumental (INMETRO) publicaram guias e documentos de caráter orientativo que dizem respeito à validação de métodos de ensaio (BRASIL, 2003; BRASIL, 2009; INMETRO, 2010).

A Resolução - RE nº 899, de 29 de maio de 2003, da ANVISA, possui como anexo o “Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos” o qual apresenta as características a serem consideradas durante a validação de procedimentos analíticos (BRASIL, 2003).

O INMETRO (2010) publicou o DOQ-CGCRE-008, cujo título é “Orientação sobre Validação de Métodos Analíticos”, um documento de caráter orientativo que está em sua terceira revisão, de Fevereiro de 2010. Esse documento tem como objetivo auxiliar os laboratórios em demonstrar que um método analítico tem as características necessárias para a obtenção de resultados com a qualidade exigida, nas condições em que é praticado.

A Instrução Normativa nº 24 (BRASIL, 2009), publicada pelo MAPA, aprova um “Guia para Validação de Métodos Analíticos e Controle de Qualidade Interna das Análises de Monitoramento do Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes – PNCRC” em forma de anexo. Os procedimentos e parâmetros descritos nesse documento devem ser seguidos por todos os laboratórios pertencentes à Rede Nacional de Laboratórios Agropecuários, credenciados para análise de resíduos e contaminantes, participantes do PNCRC.

Diferentes organismos internacionais como EURACHEM (MAGNUSSON; ÖRNEMARK, 2014); Comissão das Comunidades Europeias (EC, 2002); *Association of Official Analytical Chemists (AOAC International)*, *International Standards Organization (ISO)* e *International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC)* (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002) também possuem documentos para orientar processos de validação intralaboratorial de métodos.

O guia harmonizado pela AOAC Internacional, ISO e IUPAC (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002) para validação intralaboratorial de métodos constitui a referência que representa um consenso internacional neste assunto.

A Comissão das Comunidades Europeias descrevem as técnicas analíticas a serem utilizadas na análise de amostras oficiais e os critérios comuns para a interpretação dos resultados analíticos dos laboratórios através da Decisão da Comissão nº 2002/657/CE (EC, 2002).

3.3.2 Parâmetros de validação

Parâmetros de desempenho típicos na validação de métodos intralaboratorial incluem aplicabilidade, seletividade, linearidade da curva de calibração, faixa linear, faixa de aplicação ou de trabalho, efeitos de matriz, veracidade, precisão, limites, sensibilidade e robustez (EC, 2002; THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002).

A aplicabilidade inclui especificações sobre a faixa de concentração coberta pela validação, tipos de matriz, equipamentos, reagentes e procedimentos analíticos, protocolos de calibração e precauções com a segurança (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002).

A matriz da amostra a ser validada pode conter componentes que interferem no desempenho da medição, sendo que, tais interferentes podem causar variações na análise, aumentando ou reduzindo o sinal (INMETRO, 2010). Os termos especificidade e seletividade, embora não muito bem definidos, são relativos ao grau com que um método responde unicamente ao analito exigido. A seletividade é a capacidade do método de determinar exata e especificamente o analito de interesse na presença de outros componentes da matriz sob condições de teste determinadas (MAGNUSSON;ÖRNEMARK, 2014). De acordo com Silva e Alves (2006), a especificidade e a seletividade estão relacionadas à detecção. A especificidade refere-se a um método que é específico apenas para um único analito e a seletividade refere-se a um método aplicado para vários analitos, com capacidade de distinguir entre eles. Desde que há poucos métodos cromatográficos que respondem a apenas uma substância, o termo seletividade é mais apropriado, conforme sugerido pela IUPAC (VESSMAN *et al.*, 2001).

A linearidade de um método expressa a faixa na qual o sinal analítico, denominado variável dependente y_i , é linearmente proporcional à sua concentração, denominada variável independente x_i , e a equação matemática que descreve esta dependência é conhecida como curva analítica ou curva de calibração (RIBEIRO *et al.*, 2008). A ANVISA (BRASIL, 2003) define esse parâmetro como sendo a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado. Para qualquer método quantitativo, é necessário determinar a faixa de concentração do analito na qual o método pode ser aplicado, e verificar, dentro desta faixa de aplicação, se existe uma resposta linear. A relação entre a resposta do instrumento e a concentração não necessita ser perfeitamente linear para que um método seja eficaz, mas deve haver repetibilidade da curva em dias diferentes (MAGNUSSON;ÖRNEMARK, 2014). Para evitar problemas de falta de ajuste durante a modelagem, faz-se necessária a análise cuidadosa do gráfico dos resíduos do sinal analítico e a aplicação de testes para determinar a faixa na qual a curva de calibração apresenta um comportamento linear (RIBEIRO *et al.*, 2008). O método pode ser considerado como livre de tendências (*unbiased*) se o intervalo de confiança da reta de regressão linear contiver a origem (SILVA; ALVES, 2006). O método de avaliação da linearidade proposto por SOUZA & JUNQUEIRA (2005) estabelece: (i) definição

da faixa de interesse, considerando que a concentração esperada na amostra deve estar no centro da faixa; (ii) preparação de soluções de calibração em solvente ou matriz, dependendo dos resultados dos estudos de efeitos de matriz, em pelo menos seis níveis de concentração, igualmente espaçados, em três replicatas independentes e um nível zero, preparado como uma ferramenta de controle para ajuste do zero instrumental; (iii) medida da resposta das soluções de calibração em uma ordem aleatória.

A faixa de aplicação, também chamada de faixa de trabalho ou intervalo, corresponde ao intervalo entre o valor superior e inferior do analito, que atenda aos requisitos de precisão, veracidade e linearidade. Normalmente é derivada do estudo de linearidade e depende da aplicação pretendida do método (BRASIL, 2003) e é expressa dentro das mesmas unidades dos resultados dos testes obtidos pelo método analítico (HUBER, 1998). Qualquer método de análise quantitativo apresenta uma determinada faixa de concentração do analito na qual o método pode ser aplicado. No limite inferior dessa faixa, o fator limitante é o limite de quantificação (LOQ), e, no limite superior, os fatores limitantes vão depender da resposta do instrumento utilizado para medição. Nessa faixa de aplicação pode existir uma faixa de resposta que seja linear, ou seja, uma faixa dentro da qual a resposta do sinal apresentará uma relação linear com o analito. A extensão dessa faixa linear pode ser estabelecida durante a avaliação da faixa de trabalho (INMETRO, 2010).

A investigação do efeito de matriz é um importante parâmetro a ser avaliado durante o desenvolvimento e validação de um método analítico. Esse fenômeno sugere que compostos presentes na matriz podem interferir na medida dos analitos, o que pode ocasionar perda ou acréscimo do sinal cromatográfico, influenciando a quantificação dos compostos de interesse. Os efeitos de matriz de diferentes tipos de amostras, extratos e concentrações da matriz podem exibir valores diferentes. Uma matriz representativa pode ser usada para calibrar vários tipos de amostras (BRUCE *et al.*, 1998). Quando os efeitos de matriz apresentam-se como não significativos, o processo de validação é simplificado, pois os padrões dos analitos podem ser preparados diretamente no solvente (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002).

A veracidade do método analítico é o grau de concordância entre o valor médio obtido de uma série de resultados e o valor de referência aceito (BARROS, 2002). Pode também ser definida como a extensão na qual os resultados gerados por um

método e os valores verdadeiros concordam (HUBER, 1998). A veracidade pode ser calculada como a porcentagem de recuperação da quantidade conhecida do analito que foi adicionado à amostra, ou como a diferença percentual entre as médias e o valor verdadeiro, somados os intervalos de confiança (SILVA; ALVES, 2006). É declarada quantitativamente em termos de tendência (bias) ou erro sistemático, com pequenas tendências indicando veracidade (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002). Os processos que são rotineiramente utilizados para avaliar a veracidade de um método são, entre outros: uso de materiais de referência (MR) e materiais de referência certificados (MRC), uso do método de referência de incerteza conhecida, participação em comparações interlaboratoriais e realização de ensaios de recuperação com adição de padrões. Na ausência de materiais de referência, a veracidade pode ser investigada por meio de experimentos de adição de padrões, mas esta técnica pode ser fortemente influenciada por erros de observação. Embora uma boa recuperação não seja uma garantia absoluta de veracidade, certamente uma recuperação pobre é uma indicação de falta de veracidade (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002).

A precisão é o parâmetro que indica o grau de dispersão de diversos valores individuais em torno do valor mais provável. Ela depende somente da distribuição de erros aleatórios e não é relacionada ao valor verdadeiro, sendo habitualmente representada em termos de desvio padrão ou desvio padrão relativo. As duas medidas de precisão mais comuns são a repetibilidade e a reprodutibilidade. A repetibilidade expressa a precisão nas mesmas condições de operação (mesmo equipamento, mesmo analista, mesmos reagentes, mesmo dia e mesmo ambiente) em um pequeno período de tempo. A avaliação de tal parâmetro envolve a realização de várias medições da mesma amostra, em diferentes preparações e é, algumas vezes, denominada precisão intra-ensaio ou intra-corrída e pode ser expressa através da estimativa do desvio padrão relativo (RSD) (RIBANI *et al.*, 2004). Segundo a Resolução – RE nº 899, de 29 de maio de 2003, da ANVISA (BRASIL, 2003), a reprodutibilidade ou precisão interlaboratorial expressa a concordância entre os resultados obtidos em laboratórios diferentes como em estudos colaborativos, geralmente aplicados à padronização de metodologia analítica. O termo define a precisão dos resultados obtidos para uma determinada análise realizada por laboratórios diferentes, mas seguindo a mesma metodologia. Nesse caso, a precisão

de um método analítico deve incluir a estimativa do desvio padrão absoluto, estimativa do desvio padrão relativo e intervalo de confiança de uma série de medidas. Embora a reprodutibilidade não seja um componente de validação de método executado por um único laboratório, é considerada importante quando um laboratório busca a verificação do desempenho dos seus métodos em relação aos dados de validação obtidos por meio de comparação interlaboratorial (INMETRO, 2010). A partir do desvio padrão obtido sob condições de reprodutibilidade é possível calcular o limite de reprodutibilidade (R), o qual permite ao analista decidir se a diferença entre os valores da duplicata das amostras analisadas sob condições de reprodutibilidade é significativa (INMETRO, 2010). Tanto a repetibilidade quanto a reprodutibilidade são geralmente dependentes da concentração do analito (MAGNUSSON; ÖRNEMARK, 2014). Existe ainda a condição de precisão intermediária ou reprodutibilidade parcial para definir a avaliação da precisão sobre a mesma amostra, amostras idênticas ou padrões, utilizando o mesmo método, no mesmo laboratório, quando se definem exatamente quais as condições a variar, como: diferentes analistas, diferentes equipamentos ou diferentes dias (EC, 2002). A precisão intermediária é reconhecida como a mais representativa da variabilidade dos resultados em um único laboratório e, como tal, mais aconselhável de ser adotada em processos intralaboratoriais. O objetivo da validação da precisão intermediária é verificar que no mesmo laboratório o método fornecerá os mesmos resultados (RIBANI *et al.*, 2004).

Em uma situação em que são realizadas medições em amostras com baixos níveis de concentração do analito ou de uma propriedade, como por exemplo, análise de traços, é relevante conhecer o menor valor de concentração do analito ou da propriedade que pode ser detectado pelo método (INMETRO, 2010). O limite de detecção (LOD) é a menor quantidade da substância a ser medida presente em uma amostra que pode ser detectada, porém não necessariamente quantificada, sob as condições experimentais estabelecidas. Em termos gerais, o limite de detecção é a menor quantidade ou concentração do analito que pode ser significativamente distinguida de zero. No caso de métodos instrumentais, como cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), cromatografia a gás (CG) e absorção atômica, a estimativa do LOD pode ser feita com base na relação de 3 vezes o ruído da linha de base (SILVA; ALVES, 2006).

O limite de quantificação (LOQ) é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e veracidade aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas (BRASIL, 2003). O limite de quantificação, algumas vezes determinado “limite de determinação” é estabelecido por meio da análise de soluções contendo concentrações decrescentes do analito até o menor nível determinável com precisão e veracidade aceitáveis. O LOQ refere-se à concentração do analito correspondente ao valor da média das amostras brancas (sem o analito) mais 5, 6 ou 10 desvios padrão ou pode corresponder ao padrão de calibração de menor concentração descontando o branco (SILVA; ALVES, 2006). Todavia, a maneira mais realista é determinar o LOQ experimentalmente, com base em critérios de aceitação pré-definidos (INMETRO, 2010). Esse limite, após ter sido obtido, deve ser testado com amostras independentes, para conferir se a tendência e a precisão conseguidas são adequadas ao propósito (INMETRO, 2010). É indicada, ainda, outra opção de determinação baseada em cálculo dos limites de detecção e de quantificação, pelo uso do desvio padrão da resposta (s) e a inclinação da curva de calibração (b) construída em níveis próximos dos limites (BARROS, 2002).

A sensibilidade corresponde à habilidade do método de detectar variações leves da concentração do analito. Indica a capacidade do método de discriminar, com uma fidelidade estabelecida, concentrações próximas de um analito. Segundo NATA (1997), a sensibilidade é a inclinação da função de calibração. A sensibilidade do método depende da natureza do analito e da técnica de detecção utilizada.

A robustez de um método analítico expressa a sensibilidade que este apresenta em face de pequenas variações. Um método é considerado robusto se for praticamente insensível a pequenas variações que possam acontecer quando é executado (SILVA; ALVES, 2006). A determinação da robustez consiste em fazer variações deliberadas no método e investigar seus efeitos. É possível, então, identificar as variáveis que têm um efeito mais significativo e garantir que, quando o método for utilizado, estas sejam controladas (MAGNUSSON; ÖRNEMARK, 2014). Testes de robustez examinam o efeito dos parâmetros operacionais nos resultados de análise. Se a influência do parâmetro estiver dentro de uma tolerância previamente especificada, é dito que o parâmetro está dentro da robustez do método. Dados obtidos nestes efeitos permitirão avaliar se um método precisa ser revalidado quando um ou mais destes parâmetros são alterados (HUBER, 1998). De acordo com a

Resolução - RE nº 899, de 29/05/2003 (BRASIL, 2003), os fatores que devem ser considerados na determinação da robustez do método analítico durante o preparo de amostras são a estabilidade das soluções analíticas e o tempo de extração. Enquanto que, durante a análise por CG, as variações produzidas por diferentes lotes ou fabricantes de colunas, pela temperatura e pela velocidade do gás de arraste devem ser, também, consideradas. Quando se verificar que um fator influencia significativamente os resultados das medições, devem ser feitas mais experiências para decidir quanto aos limites de aceitabilidade deste fator. O INMETRO (2010) indica o teste de Youden para determinar a robustez de um método analítico, que permite, ainda, ordenar a magnitude da influência de cada uma das variações nos resultados.

3.4 ENSAIO DE PROFICIÊNCIA

Em princípio, a validação do método e o controle de qualidade interno, realizado pela análise rotineira de um ou mais materiais de controle, são suficientes para assegurar a veracidade. Entretanto, na prática, a confiabilidade nesses processos não é ideal, por conseguinte o ensaio de proficiência (EP) consiste em uma ferramenta que assegura que esses dois procedimentos intralaboratoriais estão funcionando satisfatoriamente (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2006). De acordo com a ISO 13528 (2005), o EP por comparações laboratoriais é usado para determinar a performance individual de laboratórios para testes e medições específicas e para monitorar a performance continuada desses laboratórios.

Os EPs compreendem um esquema de comparações interlaboratoriais com o intuito de testar a veracidade dos resultados que os laboratórios participantes do esquema podem alcançar (THOMPSON, 2005). Em sua forma mais usual, os organizadores do esquema distribuem porções de um material homogêneo a cada um dos laboratórios, que analisam o material de acordo com os seus próprios métodos analíticos validados e relatam o resultado das análises aos organizadores. Esses organizadores realizam a compilação dos resultados de todos os laboratórios e produzem um relatório final, informando os participantes do resultado, geralmente sob a forma de uma pontuação relativa à veracidade do resultado (THOMPSON, 2005).

A maioria dos esquemas de EP converte o resultado de cada participante em *z-score*, o qual avalia a veracidade do resultado, considerando a diferença entre o resultado do laboratório e o valor atribuído ao item de ensaio de proficiência (Equação 1) (THOMPSON, ELLISON, WOOD, 2006):

$$Z = \frac{(x-x_a)}{\sigma_p} \quad \text{Equação 1}$$

em que

Z = *z-score*

x = resultado do participante;

x_a = valor atribuído, a melhor estimativa do provedor de EP do valor do analito (o valor real da concentração do analito no material para EP);

σ_p = “desvio padrão para avaliação de proficiência” (THOMPSON, ELLISON, WOOD, 2006).

Os *z-scores* devem ser interpretados da seguinte maneira:

- um *z-score* igual a zero significa um resultado perfeito, entretanto, essa situação vai ocorrer raramente, mesmo se tratando de laboratórios perfeitamente competentes;
- *z-scores* entre -2 e +2 indicam que o laboratório cumpre o critério de adequação para o propósito do esquema de EP. É esperado que o laboratório produza um valor um pouco fora dessa faixa, ocasionalmente, numa probabilidade de 1 para 20, portanto, um evento isolado como esse não deve ser alarmante. Os sinais (- ou +) do *z-score* indicam um erro negativo e positivo, respectivamente;
- *z-scores* fora do limite de -3 e +3 são muito incomuns para um laboratório que opera sob os critérios de adequação ao propósito e indicam que as causas de tais resultados devem ser investigadas e corrigidas (THOMPSON, 2005).

3.4.1 Importância

Dados analíticos confiáveis são requeridos por ambos analistas de alimentos e usuários dos dados. A padronização da metodologia analítica e o desenvolvimento de um sistema de controle de qualidade em um laboratório podem ajudar a garantir a validade da medição analítica e aumentar a qualidade e a confiabilidade dos dados. Assim, qualquer medição, particularmente qualquer análise química quantitativa, deverá empregar elementos de referência para assegurar a rastreabilidade das grandezas básicas relevantes (ABNT, 2000). Esta é uma condição essencial para a comprovação da veracidade dos resultados.

O controle de qualidade interno é uma das ferramentas fundamentais para a garantia da qualidade dos resultados no âmbito de sistemas de gestão a qualidade de laboratórios (ISO/IEC 17025, 2005). Os principais objetivos deste tipo de controle são: i) monitorar a estabilidade dos parâmetros de desempenho de um método previamente validado durante seu uso em atividades de rotina; ii) manter um controle estatístico do processo de medição (VAN DER VOET; VAN RHIJN; VAN DE WIEL, 1999); e iii) indicar aceitação ou rejeição de um grupo de resultados, com necessidade de repetição dos ensaios (THOMPSON & WOOD, 1995). Assim, o controle de qualidade interno é requerido para fornecer evidências do desempenho do método durante sua aplicação (HILL; REYNOLDS, 1999), devendo ser realizado com frequência estabelecida para demonstrar o desempenho do método validado ao longo do tempo (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002).

O ensaio de proficiência (EP) é uma ferramenta que pode garantir que esses processos dentro do laboratório estão funcionando de forma satisfatória, pois podem haver influências desconhecidas na validação do método que podem interferir no processo de medição e, na maioria das vezes, materiais de referência certificados (MRC) não estão disponíveis para auxiliar na rastreabilidade de tais erros. Os laboratórios sem nenhuma referência externa poderiam operar por longos períodos com erros ou variações aleatórias de grande magnitude, para tanto, o EP é um meio de detectar e iniciar a correção de tais problemas (THOMPSON, ELLISON, WOOD, 2006).

Nesse sentido, objetivo principal do EP é auxiliar a detecção e correção de qualquer falta de veracidade inaceitavelmente grande nos resultados relatados pelos

laboratórios participantes. Em outro sentido, o esquema de EP é projetado como um sistema de “auto-ajuda” para indicar aos participantes se é necessário ou não modificar seus procedimentos (THOMPSON, 2005). De acordo com a ISO/IEC 17043 (2010), comparações interlaboratoriais como os EP, ainda são utilizadas para os seguintes propósitos:

- estabelecer a efetividade e comparabilidade de métodos analíticos;
- prover confiança adicional aos clientes dos laboratórios participantes;
- identificar diferenças entre os laboratórios;
- educar os laboratórios participantes baseando-se nos resultados do EP;
- validar a incerteza declarada.

3.4.2 Documentos orientativos

Os documentos orientativos referentes aos métodos estatísticos e aos requisitos gerais para ensaio de proficiência são publicados pela Organização Internacional para Padronização (ISO).

A norma ISO/IEC 17043 (2010) “Avaliação de conformidade – requisitos gerais para ensaios de proficiência” especifica uma série requisitos gerais para a competência de provedores de ensaio de proficiência e, também, para o desenvolvimento e a realização de esquemas de EP. Nesse documento são descritos requisitos técnicos e de gestão aplicáveis aos provedores de ensaios de proficiência. Dentre os requisitos técnicos, pode ser destacado: o delineamento dos esquemas de EP, que envolve a preparação dos itens de ensaio, os quais devem corresponder, em termos de matriz, analitos e concentrações, tão similarmente quanto possível, do tipo de itens ou materiais encontrados em testes de rotina ou calibração. Além disso, é preconizado que devem ser estabelecidos critérios de homogeneidade e estabilidade adequados e esses devem ser baseados no efeito que a falta de homogeneidade e estabilidade terão na avaliação do desempenho dos participantes; no caso de não haver material suficientemente homogêneo e estável disponível, tal item pode ainda ser útil em EP, desde que as incertezas dos valores atribuídos ou a avaliação dos resultados tenham levado em conta esse fato (ABNT, 2011).

Já a norma ISO 13528 (2005) pode ser considerada como um documento complementar à ISO/IEC 17043 (2010) cujo escopo abrange o fornecimento de descrições detalhadas de métodos estatísticos usados para analisar os dados obtidos de esquemas de EP e recomendações sobre a utilização prática desses métodos por participantes de tais esquemas e órgãos de acreditação. Nesse documento são descritos métodos para determinação do valor atribuído, o qual consiste no valor atribuído a uma determinada quantidade e aceito, às vezes por convenção, como tendo uma incerteza adequada para um determinado fim. Além disso, são concedidas informações sobre procedimentos para determinação do desvio padrão para avaliação da proficiência, para cálculo das estatísticas de desempenho dos laboratórios participantes do EP, para avaliação da homogeneidade e estabilidade dos itens de ensaio (ISSO 13528, 2005).

Além dos documentos normativos da ISO, podem ser citados o protocolo harmonizado da IUPAC para ensaio de proficiência de laboratórios de química analítica, publicado por Thompson; Ellison; Wood (2006) e o documento da Eurachem, publicado em 2011, que tem o propósito de servir como um guia para os laboratórios na seleção e na interpretação dos resultados de um esquema de EP (EURACHEM, 2011).

3.4.3 Homogeneidade

O produtor de MR, assim como o provedor de EP, deve executar uma avaliação da homogeneidade de qualquer candidato a material de referência ou item de EP e, na maioria dos casos, isso envolve a análise de um número representativo de unidades escolhidas aleatoriamente, sistematicamente ou aleatoriamente estratificadas (ISO, 2009).

No teste de homogeneidade há dois tipos importantes de homogeneidade. Primeiramente, há a homogeneidade dentro de cada unidade que determina o consumo mínimo de amostra, para o qual a incerteza estabelecida ainda é válida e, em segundo lugar, há a homogeneidade entre unidades, a qual lida com a variação de unidade para unidade (LINSINGER *et al.*, 2001). O elemento comum em ambos os tipos de experimentos é que a separação entre o efeito (homogeneidade) e a

variabilidade de medição devem ser estabelecidas (LINSINGER *et al.*, 2001). A fim de fazê-lo, é mais vantajoso executar um estudo de homogeneidade dentro de cada unidade com uma quantidade de amostra muito pequena, de modo que o efeito entre porções possa ser quantificado (LINSINGER *et al.*, 2001).

Os estudos de homogeneidade devem ser delineados e realizados em concordância com a ISO 13528 (2005). O delineamento experimental envolve o uso de g unidades do material na sua forma final embalada, selecionadas aleatoriamente, em que $g \geq 10$. Devem ser preparadas duas porções de teste de cada amostra utilizando técnicas apropriadas ao material de teste para minimizar as diferenças entre essas porções. As medidas devem ser realizadas em condições de repetibilidade.

O protocolo harmonizado sobre ensaios de proficiência em laboratórios de ensaios químicos detalha aspectos importantes sobre o preparo do material, como delineamento experimental e estatísticas aplicadas aos testes para avaliação da homogeneidade e estabilidade (FEARN; THOMPSON, 2001; THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2006; THOMPSON; LOWTHIAN, 1996).

3.4.4 Estabilidade

O teste de estabilidade, juntamente com o teste de homogeneidade, é essencial para o processo de avaliação e certificação de um material de referência, assim como para a preparação de um item de ensaio de proficiência. A concentração do analito em um material deve ser constante durante todo período de validade desse. Outro requisito a ser considerado é que, durante o transporte, sob condições a serem especificadas, a estabilidade do material deve ser garantida pelo produtor (VAN DER VEEN *et al.*, 2001). As propriedades de interesse do candidato a material de referência ou item de ensaio devem ser avaliadas para a condição de armazenamento adotada, isto é, efeitos da luz, umidade e temperatura devem ser avaliados em função do tempo, para estimar uma “vida-de-prateleira” do material (ISO, 2009).

Quando se considera que os alimentos são misturas complexas, a estabilidade dos analitos e as propriedades dos componentes da matriz devem ser levadas em conta durante a preparação, armazenamento, transporte e análise do material. Geralmente, os materiais são secos para evitar alterações químicas e microbiológicas,

sendo o procedimento de secagem selecionado de acordo com a volatilidade dos analitos e dos compostos da matriz (MAIER *et al.*, 1993). Alguns materiais podem ser esterilizados por irradiação, mas deve-se considerar que a irradiação pode vir a destruir algumas substâncias orgânicas, tais como pesticidas. O congelamento é simples e fácil, mas não é muito prático devido à dificuldade de transporte (MAIER *et al.*, 1993).

Segundo LINSINGER *et al.* (2001), dois tipos de ensaios de estabilidade devem ser realizados: um estudo a temperatura elevada para elucidar eventual degradação durante o transporte e um segundo estudo deve ser realizado a temperatura de armazenamento para obter informações sobre a estabilidade durante o armazenamento.

Por conseguinte, há diversos parâmetros a serem considerados quando se assegura a qualidade do material a ser usado em um ensaio de proficiência e, notoriamente, os participantes do estudo interlaboratorial terão maior confiança nos itens de ensaio se o provedor garantir a homogeneidade e, também, estabilidade dessas amostras (ILAC, 2008).

CAPÍTULO I – AVALIAÇÃO DE EFEITOS DE MATRIZ EM ANÁLISE DE HPAs EM CACAU UTILIZANDO DILUIÇÃO ISOTÓPICA

RESUMO

Um procedimento para avaliar efeitos de matriz foi sistematizado e aplicado à análise de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos em amêndoas de cacau. O método analítico baseou-se em cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massa com diluição isotópica (CG-DIEM). Uma vez que as premissas da regressão foram confirmadas, as inclinações e os interceptos obtidos para as curvas de calibração tradicional e matrizada foram comparados pelo teste de t , com ou sem variâncias combinadas, dependendo do perfil das variâncias dos resíduos. Efeitos de matriz foram considerados quando as inclinações e/ou os interceptos diferiram significativamente. Foram observados efeitos de matriz significativos para as amêndoas de cacau. Esses resultados servem como advertência às práticas atuais em validação de métodos que envolvem DIEM e destacam a importância da avaliação de efeitos de matriz, mesmo quando se utiliza uma abordagem de diluição isotópica.

Palavras-chave: Calibração. Efeitos translacionais e rotacionais. Validação de métodos. Espectrometria de massas. Hidrocarbonetos poliaromáticos.

ABSTRACT

A procedure to evaluate matrix effects was systematized and applied to the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in cocoa beans. The analytical method relied on gas chromatography coupled to mass spectrometry with isotope dilution (GC-IDMS). Once the regression assumptions were confirmed, the slopes and intercepts obtained for traditional and matrix-matched calibration curves were compared by the t-test, with or without combined variances, depending on the profile of the residual variances. Matrix effects were considered when the slopes and/or intercepts differed significantly. Significant matrix effects were observed for cocoa beans. These results serve as a warning to current practices in validation of methods that involve IDMS and highlight the importance of the matrix effect evaluation, even when using an isotope dilution approach.

Keywords: Calibration. Translational and rotational effects. Method validation. Mass spectrometry. Polyaromatic hydrocarbons.

1 INTRODUÇÃO

A seletividade é um parâmetro de desempenho relacionado com a capacidade de um método para detectar um componente particular, na presença de outros componentes de comportamento químico semelhante sob condições determinadas (VESSMAN *et al.*, 2001). Esse atributo é essencialmente uma função do sistema de medição (VIM, 2012), mas pode variar de acordo com o tipo de analito alvo ou matriz (EC, 2002). A investigação da seletividade é particularmente importante em análise de gêneros alimentícios, os quais são considerados matrizes complexas (WOOD; THOMPSON, 1996).

Um método analítico é enormemente simplificado quando as curvas de calibração tradicionais, preparadas como soluções simples dos analitos-alvo, são utilizadas. No entanto, os efeitos de possíveis interferências da matriz devem ser avaliados durante a validação do método, se essa estratégia é adotada (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002). Embora a investigação desses efeitos seja relevante, alguns protocolos sobre validação de métodos, não consideram esse parâmetro (EC, 2002; MAGNUSSON; ÖRNEMARK, 2014) ou não apresentam um procedimento detalhado por sua avaliação (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002). Esse fato tem gerado um número substancial de publicações relacionadas com métodos analíticos que negligenciam o estudo desse parâmetro importante.

Algumas estratégias para corrigir os efeitos de matriz são propostas na literatura, incluindo ajustar os passos analíticos, tais como a preparação da amostra, a extração, a limpeza, separação e detecção (BRUCE; MINKKINEN; RIEKKOLA, 1998), resultando no desenvolvimento de um novo método analítico e consequente revalidação. As curvas de calibração externas ajustadas em função da matriz, a calibração interna (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002) ou a estimativa de uma função de correção (CUADROS-RODRÍGUEZ *et al.*, 2003) também são recomendadas.

Outra abordagem reconhecida para compensar os efeitos da matriz é a diluição isotópica-espectrometria de massas (DIEM) com padrões internos isotopicamente marcados (SARGENT; HARTE; HARRINGTON, 2002; PIHLSTRÖM; FERNÁNDEZ-ALBA, 2013). O pressuposto básico dessa técnica é que as respostas relativas entre

o analito alvo e o análogo marcado permanecem constantes durante todo o procedimento analítico, o que elimina presumivelmente a necessidade de curvas de calibração ajustadas em função da matriz quando DIEM é utilizada (HEWAVITHARANA, 2011).

Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) constituem uma classe de compostos que são amplamente distribuídos no ambiente. HPAs são formados através da combustão incompleta ou de pirólise de matéria orgânica (BADOLATO *et al.*, 2006). Sua presença nos alimentos é devido à contaminação ambiental (poluição atmosférica e aquática) e processos, tais como secagem, torrefação, fritura ou defumação (CARUSO; ALABURDA, 2008).

HPAs são quantificados em amostras de alimentos, principalmente por meio de cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) no modo de monitorização seletiva de íons (SIM) ou cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fluorescência (CLAE-FL) (WENZL *et al.*, 2006). No entanto, vários autores não apresentam dados sobre a avaliação dos efeitos de matriz durante a validação de métodos ao usar DIEM; em vez disso, eles empregaram curvas calibrações tradicionais para analisar HPAs em alimentos (VEYRAND *et al.*, 2007; SÁNCHEZ-BRUNETE; MIGUEL; TADEO, 2007; DILETTI *et al.*, 2005).

Em 2002, o Comitê Científico da Alimentação Humana (SCF) da Comissão Europeia identificou 15 HPAs como genotóxicos ou carcinogênicos (SCF, 2002). Em 2005, o Comitê Misto FAO/OMS de Peritos em Aditivos Alimentares (JECFA) indicou um décimo sexto composto, benzo(c)fluoreno, a ser monitorado em alimentos. Relatórios publicados pela Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA) indicou que o cacau é uma matriz importante em que os HPAs devem ser monitorados (EFSA, 2008). No processo de fabricação do chocolate, há algumas etapas críticas (secagem e torrefação, principalmente) durante as quais o cacau pode ser contaminado com HPAs e, como consequência, o próprio produto final, pode, também, estar contaminado com esses compostos (ZIEGENHALS *et al.*, 2009).

Considerando a complexidade e a importância da matriz de cacau e da ampla utilização de diluição isotópica na análise de HPAs, este estudo apresenta: i) um procedimento adequado e detalhado para avaliar os efeitos de matriz durante a validação de métodos, ii) a aplicação do processo na determinação de HPAs nessa

matriz utilizando CG-DIEM, e iii) uma análise crítica relacionada com a necessidade da avaliação de efeitos de matriz, mesmo quando se trata de diluição isotópica.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 EFEITOS DE MATRIZ

O uso de soluções padrão simples para o preparo curvas-padrão (curvas de calibração) tradicionais sem primeiramente avaliar os efeitos de matriz assume que esses efeitos não existem. Em várias áreas de pesquisa, essa suposição é frequentemente inválida (MILLER; MILLER, 2010), especialmente em análises de alimentos. Prática contrária também pode ser adotada, ou seja, o uso de curvas de calibração de matrizadas sem avaliar previamente os efeitos de matriz e assumindo que existem esses efeitos. Embora nessa situação, o impacto sobre a confiabilidade dos resultados não é esperado; a compensação desses efeitos seria desnecessária.

Nos ensaios de alta seletividade, como CG-EM em modo SIM, é menos provável que os picos co-eluídos irão interferir diretamente na quantificação do analito. No entanto, compostos co-eluídos não monitorados a partir da matriz podem perturbar a detecção de algumas substâncias (BANSAL; DESTEFANO, 2007). Dependendo de como a identidade do analito é estabelecida, interferências, podem inibir a sua detecção ou podem aumentar o seu sinal (MAGNUSSON; ÖRNEMARK, 2014; FAJGELJ; AMBRUS, 2000).

Os efeitos de matriz podem ser classificados como rotacionais e translacionais. Um efeito rotacional ocorre quando outros constituintes na solução de teste afetam o tamanho do sinal obtido a partir do padrão. A extensão desse efeito para uma dada matriz é tipicamente proporcional ao sinal; altera a inclinação da função de calibração mas não o seu intercepto. Um efeito translacional emerge a partir de um sinal produzido pelas substâncias concomitantes presentes na solução teste, mas não a grandeza mensurada. É, por conseguinte, independente da concentração do analito e afeta o intercepto de uma função de calibração mas não a sua inclinação (ELLISON; THOMPSON, 2008). Erros sistemáticos proporcionais na quantificação são introduzidos, afetando a inclinação da curva de calibração, enquanto que os erros sistemáticos constantes são verificados quando a matriz afeta o intercepto (GONZÁLEZ *et al.*, 2002). O efeito de ambos esses erros podem também estar presentes simultaneamente (BRUCE; MINKKINEN; RIEKKOLA, 1998).

2.2 EFEITOS DE MATRIZ EM PROTOCOLOS DE VALIDAÇÃO

Uma avaliação dos efeitos de matriz é recomendada pelo protocolo harmonizado da Organização Internacional para Padronização / União Internacional de Química Pura e Aplicada / Associação de Químicos Analíticos Oficiais (ISO/IUPAC/AOAC) (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002). O Guia EURACHEM (MAGNUSSON; ÖRNEMARK, 2014) discute como interferências normalmente afetam a inclinação e o intercepto da curva de calibração diferentemente do analito de interesse. Além disso, esse guia considera que as faixas de trabalho e lineares são diferentes para diferentes matrizes de acordo com o efeito de interferências que surgem a partir da matriz. A decisão da Comissão Europeia (CE) 657/2002 (EC, 2002) recomenda a investigação de interferências de componentes da matriz. No entanto, a avaliação dos efeitos de matriz não é considerado um parâmetro de validação nos documentos da EURACHEM (MAGNUSSON; ÖRNEMARK, 2014) e EC / 657/2002 (EC, 2002).

2.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O delineamento experimental para avaliação de efeitos de matriz consiste em preparar curvas de calibração tradicionais e curvas de calibração ajustadas em função da matriz, utilizando materiais de referência da matriz, amostras em branco (amostras livres de analitos alvo) adicionadas de solução padrão ou amostras com quantidades traço conhecidas de analitos. Um teste geral para efeitos de matriz consiste em adicionar padrão a uma solução de teste derivada de uma amostra típica em concentrações idênticas ou dentro da mesma faixa de concentrações da curva de calibração tradicional (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002; BRUCE; MINKKINEN; RIEKKOLA, 1998). Essas etapas asseguram que as quantidades e características dos interferentes presentes no extrato final de uma amostra são reproduzidas nas curvas. Esses experimentos avaliam as interferências a partir de materiais, reagentes e soluções utilizadas durante a preparação da amostra, além das interferências da própria matriz (SOUZA, 2007).

Vários aspectos relevantes para o delineamento experimental para a avaliação os efeitos de matriz não são mencionados na literatura referente à validação

intralaboratorial. Em primeiro lugar, há exigência de que a preparação e a análise de curvas de calibração tradicionais e matrizadas tem de ser executadas na mesma batelada analítica ou em bateladas diferentes de análise sob condições pareadas. Embora essa consideração possa restringir o número de níveis de concentração ou repetições, devido a limitações técnicas, assegura que os experimentos de efeitos de matriz são realizados independentemente do conhecimento sobre a estabilidade das curvas de calibração em bateladas analíticas diferentes (SOUZA, 2007).

O segundo aspecto está relacionado com o fato de que a solução de teste obtida não pode ser fortificada ao final do processo em certas análises de alimentos, por exemplo, quando é necessária uma etapa de derivatização prévia, e, portanto, pode ser difícil de se obter padrões de produtos de reação da derivatização. Nesses casos, analitos são adicionados à amostra durante os passos iniciais ou intermediários da análise, assumindo que os efeitos sobre as respostas não são relevantes. No entanto, nessa situação, as perdas de analito durante as etapas de análise intermediárias poderiam ser interpretadas como efeitos de matriz (SOUZA, 2007).

O terceiro aspecto que deve ser considerado é que a adição de um volume excessivo de analito à solução de teste derivado de uma amostra típica deve ser evitada, porque a diluição pode comprometer a detecção de efeitos de matriz (SOUZA, 2007).

2.4 ANÁLISE DE DADOS

Um teste de t é recomendado para comparar as médias dos valores obtidos nos ensaios de padrões de calibração com ou sem matriz em cada nível de concentração estudado (BRUCE; MINKKINEN; RIEKKOLA, 1998). Esse teste assume que os dados seguem uma distribuição normal; por conseguinte, a verificação de um pressuposto de normalidade é recomendada (ARMITAGE; BERRY, 2002). O teste de t pode ser aplicado usando as variâncias das amostras de cada grupo ou utilizando uma combinação das variâncias de ambos os grupos. Nesse último caso, a premissa relacionada com a homogeneidade das variâncias dos grupos deve ser verificada (SNEDECOR; COCHRAN, 1989). No entanto, em casos de pequeno tamanho da amostra (normalmente $n = 3$ para as curvas de calibração), a confiabilidade dos

ensaios de homogeneidade de variância é comprometida devido à alta correlação entre desvios dentro do mesmo grupo (SOUZA, 2007). Vários testes de t podem ser usado para fazer cada comparação desejada; no entanto, o risco de inflar muito a probabilidade de se obter um ou mais erros tipo I deve ser considerado.

Quando o intervalo de concentrações estudado é relativamente estreito ou o erro analítico devido à concentração é considerado negligenciável, o teste de t pareado é recomendado. Esse teste apresenta a vantagem de envolver todos os níveis de concentração estudados (CUADROS-RODRÍGUEZ *et al.*, 2003), embora também requer a verificação da normalidade e homoscedasticidade (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002).

Outra abordagem é uma comparação entre as inclinações estimadas para as curvas de calibração tradicional e matrizada (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002; BRUCE; MINKKINEN; RIEKKOLA, 1998; SOUZA; PINTO; JUNQUEIRA, 2007). Essa análise estatística é baseada no fato de que as interferências da matriz pode afetar a estimativa dos parâmetros de regressão. O teste de t é recomendado para comparação das inclinações e interceptos (ARMITAGE; BERRY, 2002; ANDRADE; ESTÉVEZ-PÉREZ, 2014). Essa abordagem apresenta a vantagem de avaliar todos os níveis estudados em conjunto. No entanto, além da premissa de normalidade, todas as premissas de regressão devem ser consideradas, incluindo o ensaio de falta de ajuste porque a comparação das inclinações e dos interceptos só pode ser aplicada a modelos lineares (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002; MAGNUSSON; ÖRNEMARK, 2014). Se a calibração é não-linear, métodos mais complexos são necessários para um teste de significância, ou a avaliação será limitada a uma comparação visual das curvas (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002).

Em 2003, Cuadros-Rodríguez *et al.* propuseram a verificação da presença de efeitos de matriz, comparando as curvas de calibração tradicionais e matrizadas para identificar quaisquer diferenças significativas entre as inclinações e os interceptos por análise de covariância (ANCOVA). No caso positivo, uma função de correção foi calculada a partir das curvas de calibração para simplificar o processo analítico. A aplicação dessa função com a curva de calibração tradicional permite a determinação dos valores de concentração corrigidos e evita a necessidade de calibrar, na presença de uma matriz em análises de rotina (CUADROS-RODRÍGUEZ *et al.*, 2003). Esse

estudo representa o único registro na literatura relacionado à comparação de interceptos para avaliar efeitos de matriz.

Inclinações e interceptos devem ser comparados para determinar se duas ou mais curvas de regressão são significativamente diferentes. Se as inclinações são significativamente diferentes, por conseguinte um efeito rotacional irá aparecer devido a um erro sistemático proporcional. Em contraste, se somente os interceptos comparados são significativamente diferentes, conseqüentemente o efeito de matriz só produz um erro sistemático constante que resulta em um efeito translacional. Quando inclinações e interceptos não são significativamente diferentes, o efeito de matriz não é relevante e não é necessário corrigir os resultados obtidos a partir da curva de calibração tradicional (ELLISON; THOMPSON, 2008).

2.5 ESTRATÉGIAS PARA COMPENSAÇÃO DE EFEITOS DE MATRIZ

2.5.1 Calibração externa

A calibração externa é o tipo mais comum de calibração e consiste em preparar e analisar padrões de calibração separadamente à amostra (CUADROS-RODRÍGUEZ et al., 2007). Os padrões de calibração devem ser preparados em uma solução que corresponda à composição da solução da amostra, o tanto quanto possível (EC, 2002).

Quando não há efeitos de matriz significativos presentes, é aceitável se construir uma curva de calibração externa tradicional, sem a matriz. No entanto, se o efeito de matriz é significativo, então a curva de calibração externa deve ser matrizada (CUADROS-RODRÍGUEZ et al., 2003). Tal procedimento requer a disponibilidade de uma amostra branca típica (STÜBER; REEMTSMA, 2004; ZROSTLÍKOVÁ *et al.*, 2002), o que não é comum em análise de alimentos, principalmente quando se lida com analitos nativos. No entanto, essa abordagem não vai corrigir interferências cromatográficas causadas pela sobreposição ou picos não resolvidos de compostos co-extraídos. Além disso, quando os efeitos de matriz podem variar entre amostras, combinando os padrões de calibração com a matriz de todas as amostras se torna

pouco prático, e como resultado, uma calibração de adição de padrão é requerida (CUADROS-RODRÍGUEZ *et al.*, 2007).

2.5.2 Calibração interna

A calibração interna consiste em preparar e analisar padrões de calibração que incluem a amostra (CUADROS-RODRÍGUEZ *et al.*, 2007).

2.5.2.1 Adição de padrão

A adição padrão é uma técnica de calibração utilizada para superar os problemas derivados de efeitos de matriz. Essa técnica utiliza padrões de calibração preparados com os analitos alvo e adicionados à amostra. Ela baseia-se na análise de várias porções teste da amostra preparada por adição de quantidades crescentes de soluções padrão (CUADROS-RODRÍGUEZ *et al.*, 2007). No entanto, esse método só é eficaz para corrigir os efeitos de matriz rotacionais; efeitos translacionais devem ser removidos antes da aplicação da técnica de adição de padrão (ELLISON; THOMPSON, 2008). Apesar das suas limitações, esse método pode ser aplicado para as matrizes que contêm os analitos alvo (ZROSTLÍKOVÁ *et al.*, 2002). Em 2008, Ellison e Thompson estudaram o comportamento do método de adição de padrão sob uma condições diversas. Os melhores resultados foram obtidos com um único nível de analito adicionado no alto extremo da faixa linear. Além disso, esses autores sugerem que, para matrizes que contêm os analitos alvo, o padrão deve ser adicionado, pelo menos, quatro vezes a concentração nativa dos analitos na amostra (ELLISON; THOMPSON, 2008). A principal desvantagem desse método é que a calibração é necessária para cada amostra (CUADROS-RODRÍGUEZ *et al.*, 2007), o que aumenta o trabalho analítico de rotina, incluindo o tempo, os custos, e a produção de resíduos.

2.5.2.2 Diluição isotópica – espectrometria de massas (DIEM)

A diluição isotópica é uma técnica que se baseia na diluição de um padrão interno isotopicamente marcado com o seu isótopo natural (analito) na amostra (FASSETT, 1995). A consequente razão das quantidades de ambos os isótopos é medida em uma porção da amostra, utilizando um espectrômetro de massas, em posse desse resultado, a concentração analito é então calculada (SARGENT; HARTE; HARRINGTON, 2002). A quantidade de analito é calculada a partir da alteração na razão isotópica induzida pela adição de uma quantidade conhecida de padrão isotopicamente marcado, que é quimicamente idêntico ao analito (HENRION, 1994).

Espera-se que o padrão marcado com o isótopo elua ao mesmo tempo de retenção que o analito, por conseguinte, poderá experimentar a mesma supressão ou aumento de sinal (HEWAVITHARANA, 2011). Esse comportamento particular permite que o analista use a diluição isotópica para compensar os efeitos de matriz, tornando-se uma justificativa para não avaliar esses efeitos durante a validação do método.

A literatura disponível sobre esse assunto relata que quando o padrão isotopicamente marcado é adicionado à amostra no começo da extração, a substância marcada irá experimentar todas as alterações experimentadas pelo analito. Portanto, é utilizado não apenas para auxiliar na identificação dos picos cromatográficos, mas também para se determinar a eficiência de extração de compostos da amostra (HEWAVITHARANA, 2011), compensar as perdas de analitos durante determinadas fases do procedimento analítico (WANG; GUO, 2010). A principal vantagem dessa abordagem é a precisão superior que pode ser alcançada.

Alguns autores indicam o uso de DIEM como uma ferramenta que compensa interferências. De acordo com Ellerbe *et al.* (1989), a DIEM fornece independência em relação à recuperação da amostra e compensa a presença de tendências e interferências. Considerando a abordagem de Hewavitharana (2011), espera-se que a preparação de padrões de calibração em uma matriz e as subsequentes etapas de extração complexas são desnecessárias quando se usam padrões marcados.

A avaliação dos efeitos de matriz quando se usa de DIEM é pouco frequente na literatura (DU *et al.*, 2012; LI *et al.*, 2014). A maioria dos estudos tende a aceitar

que a abordagem DIEM é suficiente para cancelar os efeitos de matriz sem avaliar esse parâmetro importante.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 PROCEDIMENTO PROPOSTO

3.1.1 Delineamento experimental

O delineamento experimental para a avaliação dos efeitos de matriz para cada combinação analito-matriz ou para analitos e matrizes eleitos como representantes baseia-se na preparação de duas curvas de calibração como segue (HORWITZ, 2003; SOUZA; JUNQUEIRA, 2005)

- i) uma curva de calibração tradicional (curva do analito em solvente, sem a matriz);
- ii) uma curva de calibração matrizada (curva do analito em uma matriz, produzido a partir de soluções de teste adicionadas de soluções padrão de calibração).

Cada curva deve ser preparada, pelo menos, em seis níveis de concentração igualmente espaçados com pelo menos dois, mas preferencialmente três repetições, independentes de cada nível (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002). A faixa deve corresponder àquela em que a linearidade foi verificada. Quando não é possível preparar soluções em níveis igualmente espaçados, a presença de pontos de *leverage* deve ser avaliada antes da análise. O nível zero deve ser incluído apenas como uma ferramenta de controle de qualidade para a avaliação do ruído e como um ajuste instrumental zero. Esse ponto não está incluído na análise de regressão.

A preparação e a análise de cada nível de concentração de ambas as curvas têm de ser realizadas em ordem aleatória com condições instrumentais controladas para evitar a contaminação cruzada. O ideal seria que a preparação e análise das curvas tradicionais e matrizadas devessem ser executadas na mesma batelada analítica (corrida). Quando isso não for possível, as soluções de calibração podem ser analisadas em diferentes bateladas analíticas sob condições pareadas (SOUZA, 2007).

Para a determinação simultânea de múltiplos analitos, a seletividade deve ser garantida. Em seguida, as condições analíticas e instrumentais para a separação, a detecção e quantificação desses compostos devem ser previamente ajustadas de modo que um dos analitos não comprometa a detecção e quantificação dos outros (SOUZA, 2007).

3.1.2 Análise de dados

O segundo passo para a avaliação de efeitos de matriz inclui a análise de dados, apresentada na **Figura I.1** (HORWITZ, 2003).

Os dados experimentais obtidos para as curvas de calibração tradicional e matrizada são analisados pelo MMQO (método dos mínimos quadrados ordinários), com a verificação anterior das premissas de normalidade de resíduos (teste de Ryan-Joiner), homocedasticidade (teste de Brown-Forsythe), independência de resíduos (teste de Durbin-Watson) e ajuste ao modelo linear (ANOVA), como descrito por Souza e Junqueira (2005). Uma vez que essas premissas não são confirmadas, conseqüentemente são recomendadas estatísticas não paramétricas ou uma restrição à comparação visual das curvas (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002).

Quando as premissas são confirmadas, um teste de F bilateral (SNEDECOR; COCHRAN, 1989) é usado para avaliar a homogeneidade das variâncias dos resíduos da regressão, comparando a hipótese nula em que as variâncias dos resíduos não diferem com a hipótese alternativa de que as variâncias dos resíduos são diferentes. Supõe-se que a razão entre as variâncias das curvas segue a distribuição de F (Equação 2) (SNEDECOR; COCHRAN, 1989):

$$F = \frac{S_{res_1}^2}{S_{res_2}^2}$$

Equação 2

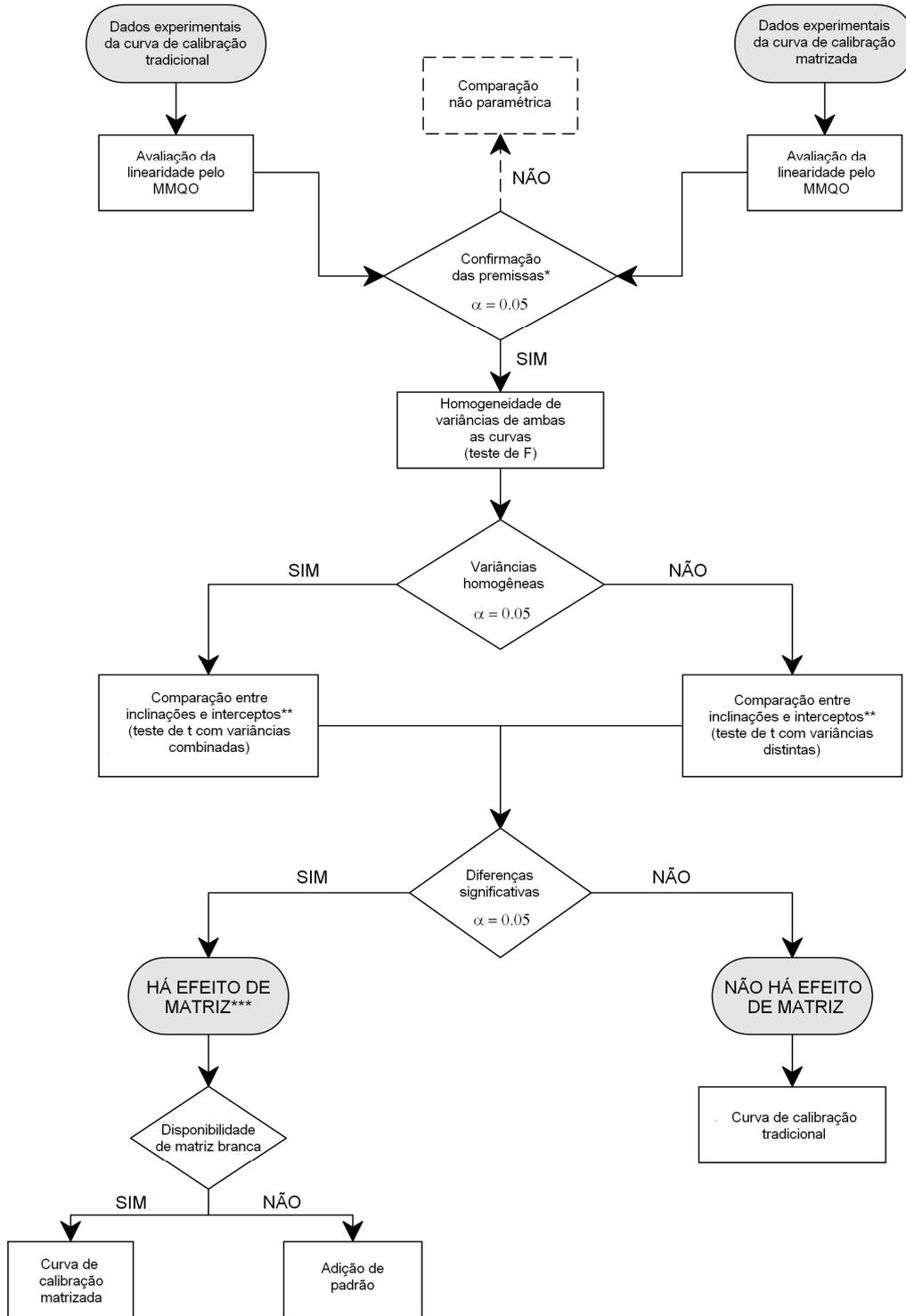
em que

s_{res1}^2 = variância dos resíduos da curva 1;

s_{res2}^2 = variância dos resíduos da curva 2;

F = estatística do teste.

Figura I.1 – Avaliação de efeitos de matriz



Fonte: SOUZA, 2007. * As premissas de normalidade, homoscedasticidade e independência dos resíduos de regressão e o ajuste do modelo linear são requeridas. ** Diferenças significativas entre interceptos podem ser consideradas se a curva de calibração matrizada foi preparada com amostras conhecidamente brancas e correção do branco ou reagentes foi realizada.*** Para inclinações e interceptos significativamente diferentes, o uso de curvas de calibração matrizadas ou o método de adição de padrão nas etapas de validação subsequentes ou nas análises de rotina é recomendado. Linhas pontilhadas indicam etapas não consideradas pelo procedimento.

Quando o teste indica a homogeneidade de variância, as inclinações e interceptos das curvas tradicional e matrizada são comparadas utilizando o teste de t com variâncias combinadas (Equações 3 e 4). Esse teste compara a hipótese nula em que inclinações ou interceptos não diferem com a hipótese alternativa de que inclinações e interceptos são diferentes. A hipótese nula é rejeitada quando o t_b ou o t_a calculados são maiores do que o valor crítico $t_{(1-\alpha/2, n_1+n_2-4)}$ (ARMITAGE; BERRY, 2002):

$$t_b = \frac{|b_1 - b_2|}{\sqrt{\frac{n_1 s_p^2}{n_1 \sum X_{i1}^2 - (\sum X_{i1})^2} + \frac{n_2 s_p^2}{n_2 \sum X_{i2}^2 - (\sum X_{i2})^2}}} \quad \text{Equação 3}$$

$$t_a = \frac{|a_1 - a_2|}{\sqrt{\frac{s_p^2 \sum X_{i1}^2}{n_1 \sum X_{i1}^2 - (\sum X_{i1})^2} + \frac{s_p^2 \sum X_{i2}^2}{n_2 \sum X_{i2}^2 - (\sum X_{i2})^2}}} \quad \text{Equação 4}$$

em que

b_1 = inclinação da curva 1 (tradicional);

b_2 = inclinação da curva 2 (matrizada);

a_1 = intercepto da curva 1 (tradicional);

a_2 = intercepto da curva 2 (matrizada);

n_1 = número de observações da curva 1 (tradicional);

n_2 = número de observações da curva 2 (matrizada);

X_{i1} = níveis de concentração da curva 1 (tradicional);

X_{i2} = níveis de concentração da curva 2 (matrizada);

s_p^2 = variância combinada.

A Equação 5 é aplicada para estimar a variância combinada s_p^2 :

$$s_p^2 = \frac{(n_1 - 2)s_{res_1}^2 + (n_2 - 2)s_{res_2}^2}{n_1 + n_2 - 4} \quad \text{Equação 5}$$

Se a homogeneidade de variâncias não é observada, em seguida, o teste de t é empregado utilizando variâncias distintas, isto é, as variâncias amostrais de cada curva (Equações 6 e 7). As estatísticas de teste incluem as estatísticas t para contrastes entre inclinações t'_b e as estatísticas t para contrastes entre interceptos t'_a , como se segue:

$$t'_b = \frac{|b_1 - b_2|}{\sqrt{\frac{n_1 s_{res_1}^2}{n_1 \sum X_{i1}^2 - (\sum X_{i1})^2} + \frac{n_2 s_{res_2}^2}{n_2 \sum X_{i2}^2 - (\sum X_{i2})^2}}} \quad \text{Equação 6}$$

$$t'_a = \frac{|a_1 - a_2|}{\sqrt{\frac{s_{res_1}^2 \sum X_{i1}^2}{n_1 \sum X_{i1}^2 - (\sum X_{i1})^2} + \frac{s_{res_2}^2 \sum X_{i2}^2}{n_2 \sum X_{i2}^2 - (\sum X_{i2})^2}}} \quad \text{Equação 7}$$

A hipótese nula em que inclinações ou interceptos não diferem é comparada com a hipótese alternativa em que inclinações ou interceptos são diferentes, rejeitando a hipótese nula quando as estatísticas calculadas são maiores do que o valor crítico, conforme definido pela Equação 8.

$$v = \frac{\left(\frac{s_{res_1}^2}{n_1} + \frac{s_{res_2}^2}{n_2} \right)^2}{\frac{s_{res_1}^4}{n_1^2 (n_1 - 2)} + \frac{s_{res_2}^4}{n_2^2 (n_2 - 2)}} \quad \text{Equação 8}$$

Quando as diferenças não são significativas, conclui-se que não há efeitos de matriz e uma curva de calibração tradicional pode ser aplicada. Se houver indicação de que as inclinações ou os interceptos são significativamente diferentes, há efeitos de matriz e a curva de calibração matrizada (calibração externa) ou a calibração interna deve ser empregada durante as etapas de validação subsequentes e na análise de rotina.

Os efeitos de matriz relacionados com diferenças entre interceptos devem ser considerados se a amostra usada para obter a curva de calibração matrizada é conhecida por ser livre de analitos alvo ou, se é possível efetuar uma correção exata do conteúdo nativo de analito.

3.2 MATERIAL

3.2.1 Padrões

- Padrão de HPAs contendo uma mistura de 16 compostos prioritários pela EPA (*Environmental Protection Agency* Estados Unidos) (Accustandard, EUA) em uma concentração de 2 mg.mL⁻¹ de cada composto: naftaleno, acenafteno, acenaftileno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k) fluoranteno, benzo(a)pireno, indeno(1,2,3-cd)pireno, dibenzo(a, h)antraceno e benzo(g, h, i)perileno;
- Padrão interno isotopicamente marcado com ¹³C (Cambridge Isotope Laboratories, Reino Unido) contendo os mesmos 16 HPAs, em uma concentração de 5 µg.mL⁻¹;
- Padrão de seringa ¹³C-PCB-202 (Cambridge Isotope Laboratories, Reino Unido) em uma concentração de 40 mg.mL⁻¹, adicionado ao fim da extração.

As soluções padrão de trabalho foram preparadas por diluição desses padrões com nonano (Sigma Aldrich, Alemanha) e em seguida foram armazenadas a -18 ° C.

3.2.2 Solventes, reagentes e outros materiais

- Hexano, grau para análise de dioxinas, PCBs e furanos (Fluka, Suíça);
- Diclorometano grau Absolv (Tedia, EUA);
- Dimetilformamida grau UV/CLAE (Vetec, Brasil)
- Nonano grau espectrometria de massas (Sigma Aldrich, Alemanha).
- Cloreto de sódio, grau P.A. (Vetec, Brasil);
- Sílica gel, 70-230 mesh (Macherey-Nagel, Alemanha);
- Terra diatomácea (Dionex, EUA).

3.2.3 Amostras

Amostras de amêndoas de cacau (*Theobroma cacao* L.) secas naturalmente ao sol foram fornecidas pelo *Mars Center of Cocoa Science* (MCCS) no Brasil. Essas amostras foram trituradas em moinho de rotor de alta velocidade, modelo ultracentrífugo ZM 200 (Retsch, Alemanha), e tamisadas para um tamanho de partícula menor ou igual a 500 µm, utilizando peneiras de teste de 1000 e 500 µm (Retsch, Alemanha). Posteriormente, as amostras moídas foram homogeneizadas durante 4 horas em um misturador do tipo *drum* Marconi MA 160 (Marconi, Brasil), envasadas e mantidos sob a proteção da luz à temperatura ambiente.

3.2.4. Equipamento

As amostras foram extraídas e purificadas em equipamento de extração por solvente acelerada (ASE 350®; Dionex, EUA). As condições de extração nesse equipamento foram as seguintes: 100 ° C temperatura do forno, dois ciclos de tempo estático 5 min, volume de enxaguamento 100 %, 50 s de tempo de purga e uma célula de extração 66 mL. Essas condições foram estabelecidas com base em estudo realizado por Pissinatti *et al.* (2015). Terra diatomácea foi adicionada a 2,0 g de amostras de amêndoas de cacau na célula de extração – em quantidade suficiente para preencher o volume restante da célula –, atuando como um agente dispersante e de secagem. As condições cromatográficas para determinação quantitativa dos HPAs estão representadas na **Tabela I.1**.

Tabela I.1 – Condições cromatográficas para a detecção de HPAs em amostras de cacau

Condições	
Cromatógrafo	Focus GC (ThermoScientific, USA)
Amostrador	AS3000 auto sampler (Thermo Scientific, USA), 1.0 µL em injeção por <i>splitless</i>
Gás de arraste	Hélio (pureza superior a 99.999 %), fluxo constante de 1.2 mL/min
Injetor	300 °C <i>splitless</i> , 2 min <i>splitless time</i>
Liner	3 mm i.d., <i>liner single taper</i> de vidro para <i>splitless</i> preenchido com um <i>plug</i> de CarboFrit™ (Restek, USA)
Coluna	Coluna de sílica fundida de 20 m x 0.18 mm i.d. x 0.14 mm DB-EUPAH (Agilent, USA)
Rampa de temperatura	45 °C (0.8 min) até 200 °C (45 °C/min), 2.5 °C/min até 225 °C, 3 °C/min até 266 °C, 5 °C/min até 300 °C, 10 °C/min até 310 °C (11 min)
Deteção	Espectrômetro de massas Polaris Q (Thermo Scientific, USA) fonte de íons de impacto de elétrons (70 eV) a 250 °C, linha de transferência a 280 °C, modo <i>Single Ion Monitoring</i> (SIM)

3.2.5. Procedimento analítico

O procedimento de extração adotado tomou como base o estudo realizado por Pissinatti *et al.* em 2015, com algumas adaptações. O procedimento básico consistiu em combinar a amostra com uma quantidade conhecida de sílica gel e uma solução de hexano: diclorometano (85:15, v/v) foi utilizada como solvente de extração em uma célula de ASE. Em seguida, duas extrações líquido-líquido foram realizadas com uma solução de dimetilformamida (90 %, v/v), solução de cloreto de sódio (1%, m / v) e hexano, seguidas por uma etapa de clean up em coluna de sílica gel. Posteriormente, o extrato final foi concentrado sob uma corrente de nitrogênio, sendo adicionados 50 µL de uma solução padrão de HPAs isotopicamente marcados a uma concentração

de 200 ng.mL⁻¹ e 50 µL de uma solução de 200 ng.mL⁻¹ do padrão de seringa (PCB 202 ¹³C).

3.2.6. Avaliação de efeitos de matriz

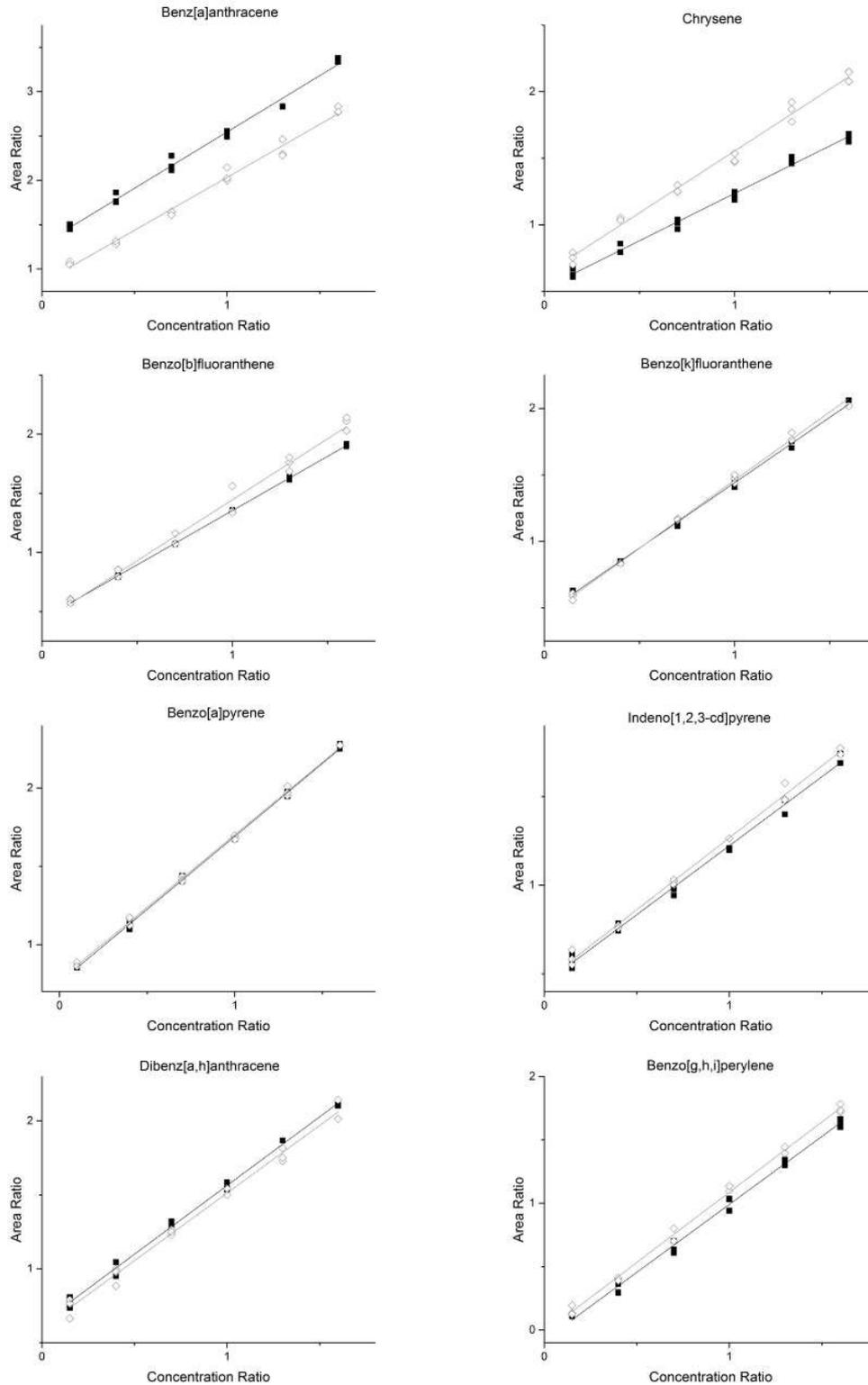
O procedimento proposto foi aplicado para avaliar os efeitos da matriz na análise de HPAs em amêndoas de cacau. Duas curvas de calibração externas de HPAs (uma curva calibração tradicional e uma curva de calibração ajustada em função da matriz de amêndoas de cacau) foram preparadas pela diluição das soluções de trabalho nas seguintes concentrações: 0,5, 0,75, 2,00, 3,50, 5,00, 6,50 e 8,00 µg.kg⁻¹ de amostra. O nível de concentração de 0,5 µg.kg⁻¹ foi usado somente para a construção da curva de calibração do composto benzo(a)pireno, em substituição ao nível 0,75 µg.kg⁻¹. A linearidade das curvas de calibração externas foi verificada de acordo com a Souza e Junqueira (2005), para cada HPA.

A avaliação de efeitos de matriz só foi aplicada para oito HPAs de maior peso molecular (isto é, benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, indeno(1,2,3-cd)pireno, dibenzo(a,h)antraceno e benzo(g,h,i)perileno). Esses oito compostos foram selecionados de acordo com as recomendações do SCF e da EFSA sobre os HPAs que devem ser monitorado em amostras de alimentos (EFSA, 2008; SCF, 2002). As curvas de calibração externas foram preparadas pela diluição das soluções padrão de HPAs. As concentrações foram selecionadas com o objetivo de cobrir o nível máximo de benzo(a)pireno permitido em produtos de cacau (5,00 µg.kg⁻¹) (EU, 2011a). Os padrões internos marcados com ¹³C e o padrão de seringa foram adicionados a cada nível, a uma concentração de 5,0 µg.kg⁻¹. Essas alíquotas dos padrões marcados representam concentrações intermediárias na curva de calibração. A curva de calibração ajustada em função da matriz foi preparada por adição de padrões nos extratos de amostra finais. Os níveis de concentração foram preparados em triplicata para cada combinação matriz-analito. A preparação da curva de calibração e a determinação por CG-EM foram realizadas na mesma batelada analítica (mesmos dias), em ordem aleatória.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As curvas de calibração tradicionais e matrizadas obtidas durante os ensaios de efeito de matriz de amostras de cacau são apresentadas na **Figura I.2**. Durante a avaliação da linearidade, as premissas de regressão (SOUZA; JUNQUEIRA, 2005) foram confirmadas para todos os analitos. Os resíduos da regressão seguiram uma distribuição normal ($p > 0,10$), foram homocedásticos ($p > 0,05$) e eram independentes ($p > 0,10$). A regressão foi significativa ($p < 0,001$) e não foi observada falta de ajuste ao modelo linear ($p > 0,05$).

Figura I.2 – Comparação entre as curvas de calibração tradicionais e matrizadas para oito analitos em amostras de amêndoas de cacau.



(-■-) Curvas de calibração tradicionais preparadas com o analito em solvente, sem a matriz. (-◇-) Curvas de calibração matrizadas preparadas com o analito em soluções teste derivadas de amostras de amêndoas de cacau.

Os analitos criseno ($p < 0,001$) e benzo(b)fluoranteno ($p < 0,01$) apresentaram inclinações significativamente diferentes quando se comparam as curvas de calibração tradicionais e matrizadas (**Tabela I.2**). Esses resultados indicaram que para ambos os analitos, os compostos co-eluídos a partir da matriz provavelmente produziram um efeito de aumento que foi proporcional ao tamanho do sinal. Os valores de t_b calculados foram maiores do que os valores tabelados (t) a um nível de confiança de 95%. Teoricamente, não eram esperados efeitos rotacionais quando se usa DIEM, porque o tamanho do sinal do analito e do seu isótopo marcado correspondente seriam igualmente afetados pelos constituintes da solução teste.

Tabela I.2 – Comparação de inclinações e interceptos entre as curvas de calibração tradicional e matrizada para oito analitos

Estatística	Analito							
	BaA	Chr	BbF	BkF	BaP	Ind	DahA	BghiP
<i>Homoscedasticidade</i>								
F	1,046	2,494*	145,771***	1,565	1,211	4,062**	2,359	1,239
<i>Inclinação</i>								
$t_{(b)}$	1,796	7,431***	4,989***	1,915	0,483	1,762	0,484	1,690
<i>Intercepto</i>								
$t_{(a)}$	10,527***	3,510**	0,763	1,192	1,229	0,571	1,288	2,150*

BaA = benzo(a)antraceno; Chr = criseno; BbF = benzo(b)fluoranteno; BkF = benzo(k)fluoranteno; BaP = benzo(a)pireno; Ind = indeno[1,2,3-cd]pireno; DahA = dibenz(a,h)antraceno; BghiP = benzo(g,h,i)perileno; $t_{(a)}$ = estatística de t para contraste entre interceptos; $t_{(b)}$ = estatística de t para contraste entre inclinações; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Criseno, benzo(a)antraceno e benzo(g,h,i)perileno ($p < 0,05$) apresentaram interceptos significativamente diferentes sobre o respectivo intervalo de concentração, esses dados poderiam ser atribuídos a possíveis efeitos de matriz translacionais. A coluna cromatográfica DB-EUPAH é conhecida por promover a separação entre os isômeros benzo(b)fluoranteno e benzo(j)fluoranteno, entretanto falta informação na separação entre os picos de trifenileno e criseno (BORDAJANDI *et al.*, 2008; PLAZA-BOLAÑOS; FRENICH; MARTÍNEZ VIDAL, 2010). Portanto, a presença de trifenileno pode ter sido responsável pela diferença nos interceptos das curvas de calibração do criseno, mas não pela diferença nas inclinações, pois é esperado que a presença de trifenileno possa originar um efeito translacional e constante, mas não um efeito rotacional. Em CG-EM, o aumento do sinal dos íons também pode resultar a partir de

compostos da matriz que bloqueiam os locais ativos do silanol no injetor ou coluna, resultando em menos moléculas do composto alvo adsorvidas, aumentando assim o seu sinal (ERNEY *et al.*, 1993).

Ao comparar as curvas tradicionais e matrizadas de benzo(a)antraceno (**Figura I.2**), pode-se verificar que a matriz suprimiu a resposta do analito. De acordo com Hajšlová e Čajka (2007), o "efeito de diminuição induzido pela matriz" é devido ao aumento do número de novos sítos ativos do silanol devido à acumulação gradual de compostos não voláteis da matriz na parte do injetor do cromatógrafo a gás e no início da coluna cromatográfica. O procedimento proposto e o uso de DIEM não podem lidar com os efeitos de matriz translacionais, os quais devem ser tratados separadamente. Cardone (1986) demonstrou que as correções em branco poderiam ser realizadas com base na determinação da verdadeira amostra em branco segundo procedimento proposto por Youden em 1947. A regressão linear é derivada da resposta de amostra, em seguida, estatísticas de intercepto e inclinação são adquiridas em que o intercepto, chamado Branco Total de Youden (TYB) ou amostra em branco verdadeira, representa o erro constante do método extrapolado para o nível da amostra zero. A resposta da amostra é então corrigida usando o TYB (CARDONE, 1986). Essa técnica pode ser utilizada como uma estratégia para subtrair a influência dos efeitos de matriz translacionais.

Embora a literatura sobre as medidas de composições isotópicas por espectrometria de massa molecular não é profusa e os fatores que interferem com a precisão das medições de distribuição molecular de isótopos não foram ainda devidamente identificados (ALONSO; RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ, 2013) alguns aspectos podem ser discutidos. Li *et al.* (2014), trabalhando com a técnica de CL-EM para determinação de cloranfenicol em leite em pó, que, embora tenha discutido que DIEM pode compensar os efeitos de matriz em certas situações, a matriz, a instrumentação e outros fatores ainda pode afetar a razão de área de pico entre analito e seu isótopo, conseqüentemente, levando a um resultado tendencioso. De acordo com Sargent, Harte e Harrington (2002), a corrente de íons dentro de um espectrômetro de massas não resulta de uma única espécie iônica, em muitas situações; íons de uma proporção semelhante de massa-carga podem representar uma interferência e têm a capacidade de aumentar o sinal. Quando um sinal de íons de um analito natural, sobrepõe-se com um íon de um análogo isotópico, as

determinações por DIEM podem estar sujeitas a uma tendência significativa. Outras fontes de erro na diluição isotópica incluem equilíbrio isotópico incompleto e discriminação isotópica (por exemplo, fracionamento de massa e erro de massa) (SARGENT; HARTE; HARRINGTON, 2002).

Neste estudo, a matriz de cacau foi submetida a etapas de preparação da amostra, de extração e limpeza, e os extratos foram misturados, no final do procedimento, garantindo tempo suficiente para equilíbrio e minimizar ou evitar o fracionamento de massa. Além disso, a calibração externa compensa o erro de massa (SARGENT; HARTE; HARRINGTON, 2002). Por conseguinte, os íons presentes nos extratos de cacau, provavelmente são responsáveis pelo fracasso da DIEM para compensar os efeitos de matriz. Interferências espectrais são desenvolvidas pela presença de contribuições de outras substâncias que não sejam o analito mensuradas na m/z de interesse, e elas foram descritas quando a fonte de ionização por impacto de elétrons (IE) foi usada (RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ *et al.* 2005; GONZÁLEZ-GAGO *et al.* 2011). Essas interferências podem afetar a precisão nas medições de razão isotópica e poderiam ser responsáveis por erros na aplicação da técnica de DIEM. Portanto, se um pico desconhecido a partir da matriz gera íons de mesma m/z que os padrões de HPAs ou seus isótopos marcados durante o processo de ionização por IE, a identificação ou a quantificação pode ser afetada e provocar a falha da DIEM. Mais estudos são necessários para elucidar completamente o mecanismo desse tipo de erro no CG-EM.

Como neste estudo, Li *et al.* (2014) encontraram diferentes perfis de efeitos de matriz quando estudaram diferentes marcas de leite em pó contendo compostos endógenos distintos. Estes resultados, também, estão de acordo com os achados de Belo *et al.* (2012), que observaram efeitos de matriz em um método para determinar sete HPAs em óleos comestíveis por CG-EM usando diluição isotópica, embora os autores não discutiram possíveis causas para esses efeitos. Yarita, Aoyagi e Otake (2015), utilizado CG-DIEM para a quantificação de pesticidas, também, verificaram que a presença da matriz na solução de calibração influenciou a razão de intensidades dos picos de medição, resultando em variações na inclinação da curva de calibração. Esses autores argumentaram que era necessário curva de calibração matrizada para a quantificação exata, mesmo se forem utilizados padrões internos marcados com isótopos para a calibração (YARITA; AOYAGI; OTAKE, 2015).

Além disso, o desvio dos efeitos de matriz em diferentes instrumentos de cromatografia líquida de alta eficiência acoplados a detectores de espectrometria de massas (CL-EM) com diferentes fontes de ionização foi verificado (LI *et al.*, 2014). No presente estudo, foram utilizados instrumentos de CG-EM diferentes para o cacau e em relação à análise de amostras de café executadas por Pissinatti *et al.* (2015) cujo estudo não demonstrou efeitos de matriz, mesmo utilizando métodos de extração similares. Entretanto, as fontes de ionização e os analisadores de massas apresentaram o mesmo projeto (IE e *ion trap*). As bombas de vácuo (difusão vs. bomba turbo) constituem a única diferença notável entre os instrumentos de CG-EM e é improvável que sejam considerados como fatores que influenciam o desempenho analítico da DIEM. O que pode ser considerado, é uma provável contaminação da fonte de íons com compostos da matriz que não são retidos na coluna cromatográfica e poderiam conduzir a uma variação da resposta entre essas matrizes.

Algumas publicações sobre DIEM não apresentaram dados sobre a avaliação dos efeitos de matriz durante a validação de método e empregaram uma curva de calibração tradicional. Em 2005, Dilletti *et al.* desenvolveram um método de CG-EM para a determinação de oito HPAs no óleo de bagaço de azeitona com padrões internos deuterados. O procedimento para a validação do método incluiu a avaliação da veracidade com um material certificado (óleo de coco), os limites de detecção, a precisão intra-dia (repetibilidade) e linearidade. Em 2010, Wang e Guo validaram um método analítico para a determinação de HPAs poluentes prioritários da EPA em óleo comestível por DIEM, utilizando três HPAs deuterados como padrões internos para a quantificação e controle de qualidade analítico. Esse método só foi validado para linearidade, limites de quantificação, veracidade e precisão. Em 2012, Yu *et al.* desenvolveram um método de DIEM para a quantificação de 16 HPAs em ervas medicinais utilizadas como aditivos em suplementos alimentares. Curvas de calibração tradicionais foram construídas, e os autores argumentaram que não houve efeitos de matriz porque os tempos de retenção de cada padrão e seu isótopo foram consistentes nos cromatogramas do total de íons de uma matriz em branco fortificada. Esse método foi aplicado para a análise de sete ervas medicinais chinesas tradicionais diferentes sem levar em conta os efeitos de matriz. Além dos estudos acima mencionados, Veyrand *et al.* (2007) avaliaram o desempenho de um método para a determinação de 19 HPAs em amostras de alimentos e de óleos com base em uma

abordagem de diluição isotópica, e não deixou claro como as curvas de calibração foram preparadas.

5 CONCLUSÃO

Efeitos de matriz foram evidenciados para amostras de amêndoas de cacau, mesmo quando se utiliza CG-DIEM, demonstrando que, omitir tais ensaios quando se utiliza uma abordagem de diluição isotópica não é uma estratégia segura e pode comprometer a confiabilidade dos resultados. Caso não seja determinada a magnitude desses efeitos de matriz, o uso de uma curva de calibração tradicional durante uma análise de alimentos pode levar à rejeição de uma amostra apropriada para o consumo ou à aceitação de uma amostra imprópria. Esses resultados tendenciosos contribuem para o desenvolvimento de erros generalizados na determinação de HPAs em alimentos, o que poderá impactar significativamente a segurança alimentar e, portanto, a saúde do consumidor, pois esses compostos são potencialmente carcinogênicos e genotóxicos.

Um número considerável de publicações que apresentam a validação de métodos para determinação de HPAs nos alimentos utilizando CG-DIEM não levam em conta o estudo dos efeitos de matriz, assumindo que esses não existem ou são inteiramente compensados pela utilização da diluição isotópica. No entanto, algumas interferências, como as interferências espectrais advindas de um pico cromatográfico desconhecido a partir da matriz, poderiam ser responsáveis por erros na DIEM, levando a resultados tendenciosos e contribuindo para o desenvolvimento de erros generalizados nessa área. Mais estudos são necessários para elucidar completamente o mecanismo dessas interferências em CG-DIEM.

CAPÍTULO II – VALIDAÇÃO INTRALABORATORIAL DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE HPAs EM AMÊNDOAS DE CACAU

RESUMO

Um procedimento envolvendo extração acelerada por solvente com cromatografia a gás-espectrometria de massas foi otimizado para determinação de oito hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) prioritários em amêndoas de cacau. Os resultados dos delineamentos Plackett-Burman e Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) mostraram que três variáveis afetaram as recuperações dos HPAs durante as etapas de extração e purificação (tempo de agitação na segunda partição líquido-líquido, massa de sílica gel na coluna e volume de hexano para eluição de HPAs da coluna). Depois de obter condições otimizadas, uma validação intralaboratorial de método foi realizada. Linearidade foi obtida na faixa de concentrações de 0,5 a 8,0 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ de amostra, correspondendo a 1.25 to 20.0 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ de cacau em base de gordura para benzo(a)pireno. Para os outros analitos, linearidade foi observada em 0,75 a 8,0 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ de amostra (1,88 a 20,0 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ de cacau em base de gordura). Efeitos de matriz foram significativos para criseno e benzo(b)fluoranteno. A precisão do método foi verificada, com desvios padrão relativos na faixa de 2,57 a 14,13 % e de 4,36 a 19,77 % em condições de repetibilidade e precisão intermediária, respectivamente. Recuperações médias dos oito HPAs se situaram na faixa de 74,99 a 109,73 %. Esses parâmetros, limites e incertezas de medição se adequaram ao critério de performance estabelecido pela legislação da União Europeia, exceto para o limite de detecção teórico do criseno. O método foi aplicado para a análise de oito amostras de amêndoas de cacau brasileiras e somente uma delas apresentou teor de HPAs acima do limite máximo definido por regulamento europeu. O método otimizado e validado é pretendido para uso como parte do programa oficial de monitoramento para contaminantes e resíduos em alimentos no Brasil.

Palavras-chave: Cacau. Hidrocarbonetos poliaromáticos. Validação de métodos. Extração por solvente acelerada. Espectrometria de massas.

ABSTRACT

An accelerated solvent extraction procedure with gas chromatography-mass spectrometry was optimized for determination for eight priority polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in cocoa beans. Plackett-Burman and Rotatable Central Composite Design (RCCD) showed that three variables affected the recoveries of PAHs during extraction and purification steps (time of agitation in the second liquid-liquid partition, weight of silica gel in the column and volume of hexane for PAHs elution from column). After obtaining optimal conditions, a single laboratory method validation was carried out. Linearity was obtained in the concentration range from 0.5 to 8.0 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ of sample, corresponding to 1.25 to 20.0 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ of cocoa in fat basis, for benzo[a]pyrene. For the other analytes, linearity was observed from 0.75 to 8.0 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ of sample (1.88 to 20.0 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ of cocoa in fat basis). Matrix effects were significant for chrysene and benzo[b]fluoranthene. Precision of the method was verified with relative standard deviations ranging from 2.57 to 14.13 % and from 4.36 to 19.77 % under repeatability and intermediate precision conditions, respectively. Average recoveries of the eight PAHs ranged between 74.99 to 109.73 %. These parameters, limits and uncertainties of measurements met the performance criteria established by European Union regulations, except for the chrysene theoretical limit of detection. The method was applied to the analysis of eight samples of Brazilian cocoa beans and only one of them presented PAHs content above the maximum limit defined by the European Union legislation. The optimized and validated method is intended to be used as part of the Brazilian official monitoring program for contaminants and residues in food.

Keywords: Cocoa. Polyaromatic hydrocarbons. Method validation. Accelerated solvent extraction. Mass spectrometry.

1 INTRODUÇÃO

O cacauero (*Theobroma cacao* L.) é uma espécie originária da América do Sul e é uma árvore tropical de um clima chuvoso, que cresce entre cinco e oito metros de altura e quatro a seis metros de diâmetro de copa (SILVA NETO *et al.*, 2001). As sementes de cacau apresentam grande relevância econômica, pois o seu principal produto, o chocolate, cujo mercado está aumentando enormemente, é considerado um dos alimentos mais preferidos dentre os consumidores, principalmente crianças (KUMARI *et al.*, 2012; KUMARI *et al.*, 2013). Entre os anos de 2011 e 2012, o Brasil foi o quinto maior produtor mundial de cacau e o primeiro em seu continente (ICCO, 2014). Entretanto, desde a década de 1980 até o início de 2000, a produtividade e a exportação brasileiras de cacau e produtos derivados mostraram uma redução expressiva. A crise no cultivo brasileiro de cacau pode ser atribuída a uma variedade de fatores, incluindo a extensa devastação causada pela doença da vassoura-de-bruxa (*Crinipellis perniciosa*) que afetou os cacaueros (FIORAVANTI; VELHO, 2011). Ações implantadas pela Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (CEPLAC) têm reestabelecido a participação brasileira no mercado internacional do cacau. Porém, a qualidade desses produtos é de importância fundamental, especialmente em relação aos níveis de resíduos e contaminantes.

O processo de obtenção de produtos derivados de cacau envolve uma etapa de secagem dos grãos fermentados (amêndoas) cujo objetivo é a conservação do produto pela redução do teor de umidade. A secagem do cacau é realizada por um dos seguintes métodos ou pela combinação de ambos (RODRIGUEZ-CAMPOS *et al.*, 2011): i) secagem natural sob o sol em esteiras, bandejas, chãos de concreto ou barcaças (plataformas de madeira achatadas, lisas e horizontais com telhados móveis) (ICCO, 2015; OETTERER; REGITANO-D'ARCE; SPOTO, 2006); ii) secagem artificial usando estufas ou secadores artificiais aquecidos por madeira ou material vegetal queimados, usados apenas durante a temporada chuvosa (LOWOR *et al.*, 2012). Após a secagem, as amêndoas de cacau são geralmente envasadas e estão prontas para transporte até a planta de produção de chocolate (SALTINI; AKKERMAN; FROSCH, 2013).

A contaminação de amêndoas de cacau por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) é favorecida quando a secagem é realizada no asfalto ou betumem no sol, em secadores artificiais que usam lenha queimada ou combustíveis fósseis (querosene ou óleo diesel) e, também, durante o armazenamento e transporte em sacos de juta ou sisal que tenham sido tratados com óleo mineral (ZIEGENHALS; SPEER; JIRA, 2009; MISNAWI, 2012;). A contaminação de produtos de cacau, portanto, resulta de práticas inadequadas de secagem de amêndoas e o fato de que a manteiga de cacau não é geralmente refinada como outros óleos e gorduras vegetais (EU, 2011a).

Dentre os contaminantes orgânicos de alimentos, HPAs constituem uma classe de compostos importante, largamente distribuídos no meio ambiente. Os humanos são expostos aos HPAs pelo ar e ingestão de água, mas, a exposição ocorre com maior frequência por alimentos contaminados (WENZL *et al.*, 2006). Essa contaminação pode vir de ambos poluição ambiental, a qual ocorre em frutas, hortaliças e grãos cultivados em regiões industriais, e de etapas de processamento, como defumação, torrefação, grelhagem, fritura e secagem, as quais permitem contato direto entre alimentos e produtos de combustão (PLAZA-BOLAÑOS; FRENICH; MARTÍNEZ VIDAL, 2010; CAMARGO; ANTONIOLLI; VICENTE, 2011;).

A presença desses contaminantes representa um risco potencial à saúde humana porque os HPAs aumentam o risco de câncer em humanos. A carcinogenicidade dos HPAs está associada com a complexidade da molécula, ou seja, com o aumento do número de anéis aromáticos e com a ativação metabólica para reativar intermediários e sua subsequente ligação covalente a alvos críticos no DNA humano (BOSTRÖM *et al.*, 2002). Em 2002, o Comitê Científico em Alimentos (SCF) da Comissão Europeia identificou 15 HPAs como genotóxicos e carcinógenos a serem monitorados em alimentos e em 2005, a Junta FAO/OMS do Comitê de Experts em Aditivos de Alimentos (JECFA) indicaram um décimo sexto composto (EFSA, 2008). Atualmente, 16 HPAs são, também, incluídos na lista de poluentes prioritários da Agência de Proteção Ambiental (EPA) americana (2014). Oito desses compostos são comuns à lista de prioritários da União Europeia e, portanto, atraem grande preocupação com relação à saúde. Com o objetivo de minimizar a exposição humana, a União Europeia regula um nível máximo de benzo(a)pireno em amêndoas de cacau e produtos derivados de cacau de $5,0 \mu\text{g.kg}^{-1}$ em base de gordura. Níveis

máximos para a soma de benzo(a)pireno, benzo(b)fluoranteno e criseno foram estabelecidos em $30,0 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ em base de gordura (EU, 2011a).

Pesquisas publicadas pela Autoridade Europeia em Segurança de Alimentos (EFSA) destacaram o cacau como uma matriz importante na qual HPAs devem ser monitorados (EFSA, 2008). Entretanto, publicações relacionadas aos métodos analíticos para determinação em amêndoas de cacau estão restritas aos trabalhos publicados por Wandan, Elleingand e Ndouba (2011) and Raters e Matissek (2014). Em ambos os trabalhos, o método de análise e sua performance não foram o objeto principal de estudo. O primeiro estudou a formação de um único HPA, benzo(a)pireno, durante a secagem pela aplicação de diferentes métodos. O método de análise consistiu em uma extração por Soxhlet com diclorometano seguida de purificação com coluna de sílica gel e determinação por cromatografia a gás-espectrometria de massas (CG-EM) (WANDAN; ELLEINGAND; NDOUBA, 2011). Raters e Matissek (RATERS; MATISSEK, 2014) investigaram HPAs em vários produtos de cacau e chocolate, incluindo amêndoas de cacau, porém o escopo analítico foi restringido para os quatro compostos citados na legislação europeia (EU, 2011a): benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno e benzo(a)pireno. O método proposto envolvia um procedimento de extração em fase sólida (EFS) para extração e purificação e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) acoplada a detector de fluorescência (FL) para a separação e determinação desses quatro HPAs (RATERS; MATISSEK, 2014).

Quando se considera os produtos de cacau, outras abordagens analíticas foram propostas. Extração líquido-líquido com volumes reduzidos de n-hexano e purificação subsequente com coluna de sílica gel foi reportada para determinar HPAs em doces de chocolate por Kumari *et al.* (2012). Em 2013, esses autores propuseram um método baseado em microextração em fase sólida (MEFS) para o mesmo escopo analítico (KUMARI *et al.*, 2013). Um método utilizando extração assistida por ultrassom (EAU) com acetonitrila, seguida de cromatografia de permeação em gel (CPG) foi publicado por Wang e Guo (2010) com o objetivo de se quantificar HPAs em óleos comestíveis, incluindo manteiga de cacau. Em 2009, Ziegenhals *et al.* (2009) aplicaram a técnica de extração acelerada por solvente (ASE) com o propósito de extrair HPAs de amostras de chocolate com CPG subsequente e EFS, embora nenhum adsorvente foi adicionado na célula de ASE. O uso de ASE fornece uma série

de vantagens como automação e redução do tempo de extração, permitindo uma etapa de purificação simultânea (VEYRAND *et al.*, 2007).

CG-EM foi usado para separação e determinação de HPAs em produtos de cacau (KUMARI *et al.*, 2012, 2013; WANG; GUO, 2010; ZIEGENHALS *et al.*, 2009). Cromatografia líquida (acoplamento LC-LC) equipada com FL foi também descrita como método de separação e detecção em estudos cujo objetivo principal foi identificar fontes de contaminação em cacau e produtos de cacau (LOWOR *et al.*, 2012; MISNAWI, 2012). As técnicas de espectrometria de massas (EM) são bastante sensíveis para a análise de HPAs devido à projeção de picos de grandes íons moleculares ou à pouca fragmentação em fontes de ionização comuns. Além disso, CG-EM é, muitas vezes, mais precisa do que métodos convencionais de detecção para a quantificação dos HPAs, pois as interferências de compostos coeluídos são minimizadas pela natureza seletiva do detector (POSTER *et al.*, 2006).

Portanto, dada a necessidade de monitorar os níveis de HPAs em amêndoas de cacau, usando um método otimizado e confiável, como uma ação de promoção da segurança alimentar baseando-se nessa cadeia produtiva, os objetivos desse estudo foram: i) otimizar e validar um método com extração e purificação simultâneas por ASE e determinação por CG-EM de oito HPAs de alto peso molecular nessa matriz alimentar; ii) aplicar o método proposto em uma pesquisa preliminar da contaminação do cacau brasileiro, subsidiando a expansão de programas oficiais de monitoramento do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA).

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO

2.1.1 Material

2.1.1.1 Amostras

A amostra de amêndoas de cacau usada na etapa de validação do método, previamente fermentada e seca naturalmente, foi fornecida pela empresa *Mars Brasil*, uma divisão da *Mars Incorporated*, situada no estado da Bahia. As amêndoas foram moídas em moinho ultracentrífugo Retsch, modelo ZM200 (Restch GmbH, Haan, Alemanha), equipado com peneira de furos trapezoidais de 2,00 mm. O pó resultante da moagem foi então tamisado em peneira de aço inox de 500 µm (Restch GmbH, Haan, Alemanha), homogeneizado em misturador *drum* Marconi MA 160/4 (Marconi, Brasil) por um período de 4 horas e posteriormente acondicionado em sacos plásticos de polietileno e armazenado em temperatura ambiente ao abrigo da luz. Essa amostra foi considerada branca após análise, não apresentando teor detectável de HPAs.

Em relação às amostras utilizadas para o estudo de aplicação do método, essas foram adquiridas comercialmente, em quantidade mínima de 250 g, oriundas de diferentes fornecedores de cacau do estado da Bahia.

2.1.1.2 Solventes e reagentes

Todos os solventes e reagentes utilizados apresentaram grau de pureza adequado, ou seja, foram usados apenas solventes e reagentes destinados à cromatografia gasosa (grau CG) ou à análise de resíduos (grau para análise de resíduos - PAR) ou, ainda, à espectrometria de massas e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Os solventes e reagentes utilizados, de acordo com o método proposto estão relacionados abaixo:

- Hexano grau HPLC/Spectro ou grau para análise de dioxinas, PCBs e furanos (Tedia Company Inc., EUA; Fluka, Alemanha) ;
- Dimetilformamida grau UV/HPLC (Vetec, Brasil);

- Terra diatomácea (Dionex, EUA);
- Cloreto de sódio grau PA ACS (Vetec, Brasil);
- Sílica gel 60 para Cromatografia em Coluna 0,063-0,2 mm (Macherey-Nagel, Alemanha);
- Diclorometano grau Absolv (Tedia Company Inc., EUA).

2.1.1.3 Padrões

Foram adquiridos padrões de HPAs de concentração e pureza adequadas para análise em CG-EM. Os padrões certificados adquiridos foram os padrões dos 16 HPAs considerados prioritários pela EPA (*Environmental Protection Agency*), sendo eles: acenafteno; acenaftileno; antraceno; benzo(a)antraceno; benzo(b)fluoranteno; benzo(k)fluoranteno; benzo(a)pireno; benzo(g,h,i)perileno; criseno; dibenzo(a,h)antraceno; fenantreno; fluoranteno; fluoreno; indeno (1,2,3-cd)pireno; naftaleno; pireno. Entretanto, somente 8 dos 16 HPAs citados acima foram objetos desse estudo, sendo eles: benzo(a)antraceno; benzo(b)fluoranteno; benzo(k)fluoranteno; benzo(a)pireno; benzo(g,h,i)perileno; criseno; dibenzo(a,h)antraceno; indeno (1,2,3-cd)pireno (Accustandard, EUA).

Foram, ainda, adquiridos padrões certificados dos compostos acima citados, porém, marcados com carbono-13 para serem usados como padrões internos de acordo com o método da diluição isotópica (Cambridge Isotope Laboratories, Reino Unido). O padrão ^{13}C -PCB-202 (Cambridge Isotope Laboratories, Reino) foi usado como o padrão de seringa (concentração de $40 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) o qual foi adicionado ao final da extração. As soluções de uso foram preparadas por diluição em nonano (Sigma Aldrich, Alemanha) e armazenadas sob congelamento a -18°C .

2.1.1.4 Equipamentos

A extração dos HPAs das amostras de amêndoas de cacau foi realizada por extração por solvente acelerada (ASE) em equipamento ASE, modelo 350® (Dionex, USA).

Os equipamentos utilizados para a evaporação de solventes e consequente concentração de volumes dos extratos foram o evaporador rotatório Multivapor™ P-6 (BÜCHI Labortechnik AG, Alemanha), o sistema de evaporação automática TurboVap® II (Biotage, Suécia) que utiliza banho-maria com temperatura controlada e fluxo de nitrogênio direcional com pressão controlada e o Reacti-Vap™ (Thermo Scientific, EUA), que consiste em uma placa de metal aquecida a temperatura controlada e fluxo de nitrogênio direcional.

A separação e análise dos HPAs das amostras estudadas foram realizadas em CG-EM com analisador do tipo *ion-trap* instalado na unidade de Pedro Leopoldo do Laboratório Nacional Agropecuário (LANAGRO-MG), na Unidade Instrumental II CG-EM.

2.1.2 Método

2.1.2.1 Extração de HPAs

A metodologia de extração de HPAs das amêndoas de cacau foi baseada no estudo de Pissinatti *et al.* (2015), o qual desenvolveu um método de extração por solvente acelerada (ASE) para a determinação de HPAs em café torrado.

A amostra foi pesada em celas de extração do equipamento de ASE, acima de uma camada de adsorvente (sílica gel ativada). Foi adicionada quantidade apropriada de uma mistura de padrões internos de HPAs marcados com ¹³C ou de padrões nativos, quando necessário. Acima da amostra, foi adicionada quantidade suficiente de terra diatomácea para ocupar espaço restante na cela de extração. Nas duas extremidades da cela de extração foram colocadas camadas de papel de filtro qualitativo, para evitar a migração de sólidos para o extrato.

A cela de extração foi transferida ao equipamento de ASE (Dionex, USA) e os HPAs das amostras foram extraídos com solução de hexano:diclorometano (85:15), de acordo com condições previamente determinadas por Pissinatti *et al.* (2015), apresentadas na **Tabela II.1**.

Tabela II.1. Condições de extração do equipamento de ASE (PISSINATTI *et al.*, 2015)

Parâmetros	Condições de extração ASE
Temperatura	100° C
Tempo estático de extração	5 min
Volume de rinsagem	100 %
Tempo de purga	50 s
Ciclos de extração	2

Após essa etapa, o extrato foi coletado em frascos adequados para uso no equipamento, acoplados com tampa e septo de borracha. Transferiu-se o extrato para frascos de multivapor, lavando-se as paredes das garrafas extratoras, e submeteu-se à evaporação do solvente até o volume aproximado de 50 mL. Esse volume foi transferido para provetas de 100 mL, lavando-se, novamente, as paredes do frasco. O volume medido foi destacado na proveta e transferido para funil de separação de 250 mL. O mesmo volume de dimetilformamida 90 % v/v foi transferido para o funil de separação e a partição foi realizada, agitando-se vigorosamente o funil.

Posteriormente, a camada inferior foi recolhida e a superior, correspondente ao hexano, foi descartada. Novamente, transferiu-se a camada inferior para o funil, juntamente com o mesmo volume de solução de cloreto de sódio 1 % m/v. Adicionou-se 50 mL de hexano e agitou-se vigorosamente mais uma vez, por tempo determinado. A camada inferior foi desprezada e a camada superior foi recolhida em frascos de multivapor.

O excesso de solvente foi evaporado em evaporador rotatório até o volume aproximado de 5 mL. Esse volume foi transferido para coluna de vidro, montada com

lã de vidro, papel de filtro e sílica gel 10 % hidratada. Procedeu-se à purificação do extrato e à eluição do HPAs com volume determinado de hexano. Finalmente, o extrato foi recolhido em frascos de Turbo Vap e concentrado sob fluxo de nitrogênio até o volume aproximado de 50 uL. Após concentração, adicionou-se volume apropriado de padrão de seringa e injetou-se no CG-EM. O padrão de seringa foi utilizado como controle para verificação das condições cromatográficas e para o cálculo de recuperação do padrão isotopicamente marcado.

2.1.2.2 Determinação de HPAs

Os HPAs foram detectados e quantificados por CG-EM, sob as condições definidas nos experimentos de otimização do método. A coluna cromatográfica utilizada foi uma coluna DB-EUPAH de 20 m de comprimento, 0,18 mm de diâmetro interno e 0,14 mm de espessura do filme (Agilent, EUA). O hélio foi utilizado como gás de arraste. As temperaturas da fonte de ionização, do injetor, da linha de transferência, o fluxo de gás hélio e a rampa de temperaturas foram otimizadas durante os experimentos.

2.1.3 Desenvolvimento e otimização

2.1.3.1 Definição das condições cromatográficas

Foram preparadas soluções padrões dos HPAs a serem estudados e, em seguida, foram avaliados os perfis dos cromatogramas por CG-EM, resolução e altura dos picos sob diferentes condições. Foi estabelecida a resolução ótima para cada composto para o máximo de sinal do analito. Dessas análises, foram definidas as condições cromatográficas ideais.

Foram, também, avaliados o perfil dos íons característicos do(s) analito(s) pesquisado(s) e o fator de resposta relativo (FRR) quando da utilização de compostos isotopicamente marcados como padrões internos.

2.1.3.2 Limite de detecção do equipamento

O procedimento para estabelecer o limite de detecção envolveu a preparação de soluções padrões dos 8 HPAs a serem estudados, em concentrações diferentes. Essas soluções foram injetadas em concentrações cada vez menores, em duplicata, e a solução de menor concentração detectável foi identificada. A massa injetada da solução de menor concentração foi considerada como limite de detecção do equipamento.

No caso do método objeto de estudo desse trabalho, que analisa mais de um composto (8 HPAs), o limite de detecção do equipamento foi definido para cada composto pesquisado, individualmente.

2.1.3.3 Definição de condições de extração e purificação

Este experimento consistiu em avaliar a recuperação dos analitos, adicionados às amostras brancas, nas várias etapas do procedimento, variando condições experimentais da extração e purificação.

O delineamento experimental inicial compreendeu um esquema do tipo fatorial fracionado, *Plackett-Burman*, incluindo sete variáveis independentes (massa da amostra, massa de sílica na cela de extração, tempos de agitação do funil de separação, massa de sílica na coluna de vidro, volume de condicionamento da coluna e volume de eluição), sendo testadas em diferentes níveis (**Tabela II.2**), com doze ensaios mais quatro repetições do ponto central. Todos os reagentes utilizados nos experimentos se encontravam armazenados e foram utilizados em temperatura ambiente ($23 \pm 3^\circ \text{C}$).

Após definição dos fatores que mais influenciavam os resultados, foi utilizado o delineamento com compostos centrais rotacionais (DCCR), para se definir as condições experimentais mais ideais, que originavam maior recuperação dos analitos. O nível de significância adotado foi $\alpha = 0,05$. Os resultados obtidos nos planejamentos *Plackett-Burman* e DCCR foram analisados utilizando-se o programa STATISTICA 10 (Statsoft Inc., Tulsa, OK, EUA).

Tabela II.2 – Níveis reais e codificados das variáveis estudadas no delineamento do tipo *Plackett-Burman*

Variáveis	Níveis		
	-1	0	1
Massa de sílica na cela de extração (g) – X ₁	16	18	20
Massa da amostra (g) – X ₂	2	3	4
Tempo de agitação 1 - do funil de separação (min) – X ₃	1	2	3
Tempo de agitação 2 - do funil de separação (min) – X ₄	1	2	3
Massa de sílica na coluna de vidro (g) – X ₅	5	7,5	10
Volume de condicionamento (mL) – X ₆	10	15	20
Volume de eluição (mL) – X ₇	50	75	100

2.1.3.4 Determinação de lipídios totais pelo método de extração por solvente acelerada (ASE)

A determinação de lipídios totais da amêndoa de cacau foi realizada pela técnica de extração por solvente acelerada (ASE), visto que o resultado final da quantificação de HPAs nesse tipo de amostra deve ser expresso em µg por kg de gordura, de acordo com o regulamento 835/2011 (EU, 2011a). O método de extração baseou-se em estudo publicado por DIONEX (2004) que objetivou a determinação de lipídios totais em amostras de pó de cacau, e, para se estabelecer as condições do equipamento durante a extração por solvente acelerada, utilizou-se o mesmo método de extração de HPAs de café torrado (PISSINATTI *et al.*, 2015). Pesou-se exatamente cerca de 2 g de amostra em uma cela de extração de volume igual a 33 mL, onde foram colocados anteriormente, 2 tiras de papel de filtro qualitativo em sua extremidade inferior. Pesou-se, também, a mesma massa de terra diatomácea, que

funciona como agente secante e dispersante. O conteúdo da cela foi homogeneizado com uma espátula e, antes do fechamento da mesma, foram colocadas 2 outras tiras de papel de filtro qualitativo em sua extremidade superior. As condições de extração foram as mesmas apresentadas na **Tabela II.1**.

2.1.4 Validação de método

2.1.4.1 Preparo das amostras

A solução padrão preparada com 16 HPAs prioritários segundo a EPA (EPA, 2014) incluindo 8 HPAs a serem monitorados em alimentos de acordo com a União Europeia (EFSA, 2008) foi adicionada às amostras brancas de amêndoas de cacau. Os níveis de concentração estudados foram estabelecidos considerando o limite de detecção do equipamento para os compostos pesquisados, o limite de desempenho do método segundo legislação (EC, 2007; EU 2011b) e os limites permitidos dos compostos – teores máximos de benzo(a)pireno (EU, 2011a)

2.1.4.2 Linearidade sem interferência da matriz

A linearidade do método analítico foi avaliada durante ensaios com curvas de calibração dos analitos, conforme procedimento proposto por Souza e Junqueira (2005). Após a definição da faixa de interesse, soluções dos analitos foram preparadas em 7 níveis de concentração, incluindo o nível máximo permitido de benzo(a)pireno ($5,0 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$), de acordo com o Regulamento (EU) 835/2011 (EU, 2011a). Os níveis testados foram igualmente espaçados (exceto pelo nível $0,75 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ que foi preparado no caso do nível $0,5 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ não mostrasse resultados satisfatórios), sendo três replicatas verdadeiras e independentes de cada nível, preparadas e lidas em ordem aleatória. Brancos de solvente foram preparados, em triplicata, para todas as curvas como ferramenta de controle de qualidade interno e ajuste do zero do equipamento. Primeiramente, os *outliers* foram detectados pelo teste de Jacknife e os parâmetros das curvas foram estimados pelo método dos mínimos quadrados ordinários, sendo verificadas as premissas de normalidade (teste de Ryan & Joiner), homoscedasticidade (teste de Brown & Forsythe), independência dos

resíduos da regressão (teste de Durbin & Watson), significância da regressão e adequação do ajuste ao modelo linear (ANOVA).

2.1.4.3 Efeitos de matriz

Para avaliar os efeitos de matriz, o método de adição de padrão foi utilizado. Duas curvas de calibração foram preparadas, com mesmas concentrações dos analitos, em triplicatas verdadeiras (três alíquotas independentes), sendo uma curva preparada com o solvente (curva tradicional) e a outra em extratos de amêndoas de cacau (curva matrizada). As curvas foram, também, avaliadas como foi descrito para o estudo da linearidade.

Para avaliar o efeito de matriz, as inclinações das duas curvas de calibração, obtidas em um mesmo dia, foram comparadas utilizando o teste t de *Student* (SNEDECOR & COCHRAN, 1989; SOUZA, 2007; THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002). Conforme procedimento descrito no Capítulo I deste trabalho.

2.1.4.4 Seletividade

Para avaliar a seletividade do método, os seguintes aspectos foram verificados de acordo com Thompson; Ellison; Wood (2002):

(a) a capacidade do método de determinar e diferenciar compostos quimicamente similares aos 8 HPAs estudados, sendo realizada pela adição concomitante de outros HPAs não-prioritários da EPA e que podem ser encontrados em alimentos (EFSA, 2008);

(b) a análise de um número adequado de amostras brancas (em número total de 21), verificando possíveis interferências na região de eluição dos HPAs (EC, 2002).

2.1.4.5 Veracidade e recuperação

Não houve disponibilidade de MRC para avaliar a veracidade dos 8 HPAs nas amostras de amêndoas de cacau. Foram utilizadas amostras adicionadas de padrão para avaliação da recuperação.

Os 8 HPAs estudados foram adicionados à amostra branca de modo a obter concentrações em 3 níveis que continham o limite permitido de benzo(a)pireno e/ou, de preferência os níveis equivalentes a 0,5, 1 e 1,5 vezes esse limite. Foram estudados, portanto, os níveis 2,5; 5,0 e 7,5 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$.

Foram preparadas e analisadas 6 replicatas dessas amostras adicionadas de padrão e a concentração detectada foi calculada. Posteriormente, foram realizados o cálculo da porcentagem de recuperação, tratamento de valores extremos (teste de Grubbs), cálculo da recuperação média, do desvio padrão e do coeficiente de variação (CV) em cada nível de fortificação (EC, 2002; SOUZA, 2007). A média das recuperações deve estar de acordo com o Regulamento 836/2011 (EU, 2011).

2.1.4.6 Repetibilidade e reprodutibilidade intralaboratorial

Os 8 HPAs estudados foram adicionados a amostra branca de modo a obter concentrações em 3 níveis que continham o limite permitido de benzo(a)pireno e/ou, de preferência os níveis equivalentes a 0,5, 1 e 1,5 vezes esse limite. Foram preparadas e analisadas 6 replicatas dessas amostras, sob condições de repetibilidade, e a concentração detectada foi calculada (EC, 2002).

O procedimento descrito para avaliação da repetibilidade foi repetido mais duas vezes para a determinação da reprodutibilidade intralaboratorial, sob condições de reprodutibilidade intralaboratorial (dias diferentes, utilizando soluções padrão e reagentes diferentes, operadores diferentes, representando as condições de aplicação do método) (EC, 2002).

A repetibilidade e reprodutibilidade foram avaliadas pela comparação dos valores de CV obtidos, por análise de variância (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002), com os descritos nos Regulamentos (EC) 333/2007 e (EU) 836/2011 (EC, 2007; EU, 2011b) e com o previsto pela equação de Horwitz (HORWITZ, 1980).

2.1.4.7 Limite de detecção do método de análise (LOD)

O procedimento para estabelecer o limite de detecção (LOD) foi realizado pela análise de no mínimo 20 amostras de amêndoas brancas, sendo estabelecido o limite de detecção teórico, que é numericamente igual à média das leituras somado de três vezes o desvio-padrão da média desses ensaios.

2.1.4.8 Limite de Quantificação (LOQ)

A obtenção do limite de quantificação (LOQ) foi realizada de duas maneiras: (a) pela análise de no mínimo 20 amostras de amêndoas de cacau brancas, sendo estabelecido o LOQ teórico, que é numericamente igual à média das leituras somado de seis ou dez vezes o desvio-padrão da média desses ensaios; (b) foi considerado como LOQ real o menor nível de adição em que o analito pesquisado for detectado pelo equipamento, que atenda aos requisitos de % de recuperação e CV descritos como aceitáveis nos Regulamentos 333/2007 e 836/2011 (EC, 2007; EU, 2011b).

2.1.4.9 Incerteza de medição

Para calcular a incerteza da curva de calibração, a seguinte equação (Equação 9) foi utilizada:

$$u_{calib} = \sqrt{\frac{u_{RIamostra}^2 + u_a^2 + c_{analCC}^2 u_b^2 + 2c_{analCC} \text{cov}(a,b)}{b^2}} \quad \text{Equação 9}$$

Em que:

- $u_{RIamostra}$ é a resposta instrumental para a amostra;
- $u_a = s_a$ OU s_{aw} é a incerteza do intercepto;
- $u_b = s_b$ OU s_{bw} é a incerteza da inclinação

- $\text{cov}(a,b)$ ou $\text{cov}(a_w,b_w)$, covariância entre o intercepto e a inclinação da reta de calibração

Foi realizada uma avaliação de quais fontes de incerteza deveriam ser consideradas e se haveria necessidade de incluir outra fonte. As incertezas foram somadas para se obter a incerteza combinada final.

Como critério para avaliação da incerteza calculada, foi utilizada uma abordagem adequada para uso para avaliar se o método de análise é adequado. Métodos adequados devem produzir resultados com incertezas de medidas padrão menores do que a incerteza de medida padrão máxima.

Para expressão final do resultado da medição, foi utilizada a incerteza expandida (U). A incerteza expandida é obtida multiplicando-se a incerteza combinada (u_c) pelo fator de abrangência, k ($k=2$, $\alpha=0,05$) (ELLISON; WILLIAMS, 2012) (Equação 10).

$$U = k \times u_c$$

Equação 10

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 DEFINIÇÃO DAS CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS

As condições cromatográficas definidas para o estudo foram baseadas em nota técnica publicada por Smith e Lynam (2010) que utilizaram a mesma coluna cromatográfica específica para os HPAs prioritários em alimentos pela União Europeia. Algumas condições foram adaptadas e otimizadas, de acordo com os valores de área e a resolução dos picos cromatográficos. As condições cromatográficas definidas para as análises de HPAs em amêndoas de cacau estão representadas na **Tabela II.3**.

Tabela II.3 – Condições cromatográficas definidas para as análises de HPAs em amêndoas de cacau após testes preliminares

Condições Cromatográficas	
Cromatógrafo a gás:	Focus GC (ThermoScientific, USA)
Injetor automático:	AS3000 auto sampler (Thermo Scientific, USA), volume de injeção de 1,0 µL no modo <i>splitless</i>
Gás de arraste:	Hélio (pureza maior que 99.999%), fluxo constante a 1,2 mL/min
Condições do injetor:	Temperatura de 300° C, tempo de <i>splitless</i> de 2 min
Liner do injetor:	<i>Liner</i> de vidro para <i>splitless</i> de 3 mm de diâmetro interno, com afunilamento único com um <i>plug</i> de CarboFrit™ (Restek, USA) em seu interior
Coluna cromatográfica:	Coluna de sílica fundida de 20 m de comprimento x 0,18 mm de diâmetro interno x 0,14 mm de espessura do filme DB-EUPAH (Agilent, USA)
Rampa de temperaturas:	45° C (0,8 min) até 200° C (45° C/min), 2.5° C/min até 225° C, 3° C/min até 266° C, 5° C/min até 300° C, 10° C/min até 310° C (11 min)
Deteção:	Espectrômetro de massas Polaris Q (Thermo Scientific, USA), fonte de impacto de elétrons (70 eV) a uma temperatura de 250° C, linha de transferência a 280° C, modo de detecção <i>Single Ion Monitoring</i> (SIM), analisador de massas do tipo <i>ion trap</i>

3.2 LIMITE DE DETECÇÃO DO EQUIPAMENTO

Na **Tabela II.4**, estão representados os LODs do equipamento para cada um dos oito HPAs estudados, obtidos através de diluições sucessivas de soluções padrão. Foi considerado o menor nível detectado aquele que produzia picos cromatográficos de relação sinal/ruído maior ou igual a 3.

Tabela II.4 – Limite de detecção do equipamento para cada HPA pesquisado

Analito	Limite de detecção do equipamento (pg)
Benzo(a)antraceno	20
Criseno	20
Benzo(b)fluoranteno	20
Benzo(k)fluoranteno	20
Benzo(a)pireno	20
Indeno(1,2,3-cd)pireno	27
Dibenzo(a,h)antraceno	27
Benzo(g,h,i)perileno	20

3.3 DEFINIÇÃO DAS CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO

3.3.1 Delineamento *Plackett-Burman*

A matriz com os valores codificados das variáveis independentes e os resultados do delineamento experimental do tipo *Plackett-Burman* para as respostas dos oito HPAs estudados estão apresentadas nas **Tabelas II.5 e II.6** (respostas = recuperação). Anteriormente à extração, as amostras foram adicionadas de padrão de HPAs no nível de concentração de $5 \mu\text{g.kg}^{-1}$. Foram preparadas soluções de calibração no mesmo nível de concentração, em triplicata, para cálculo das recuperações. As recuperações dos HPAs nesse experimento foram calculadas de acordo com a resposta do padrão de seringa nas amostras e na solução de calibração, como se segue (Equação 11):

$$\text{Rec}_P = \frac{A_{Pa} \times A_{Sc}}{A_{Sa} \times A_{PC}} \times 100$$

Equação 11

sendo,

Rec_P = recuperação do padrão de HPAs (%)

A_{Pa} = área do padrão de HPAs na amostra

A_{Sc} = área do padrão de seringa na solução de calibração

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

A_{PC} = área do padrão de HPAs na solução de calibração

(EPA, 1994; ROSE *et al.*, 2007)

Tabela II.5 – Matriz do delineamento experimental do tipo *Plackett-Burman* (valores codificados) e respostas em recuperação para quatro HPAs

Ensaio	Variáveis independentes							Recuperação (%)			
	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	BaA	Cris	BbF	BkF
1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	66,72	69,93	63,70	66,17
2	1	1	-1	1	-1	-1	-1	67,01	80,51	72,40	66,68
3	-1	1	1	-1	1	-1	-1	0,60	1,21	0,28	0,49
4	1	-1	1	1	-1	1	-1	74,67	79,42	68,07	78,10
5	1	1	-1	1	1	-1	1	62,59	81,70	72,07	66,56
6	1	1	1	-1	1	1	-1	0,35	1,42	0,36	0,33
7	-1	1	1	1	-1	1	1	71,25	87,53	79,77	73,99
8	-1	-1	1	1	1	-1	1	78,06	86,32	76,34	78,14
9	-1	-1	-1	1	1	1	-1	9,95	9,44	0,62	0,55
10	1	-1	-1	-1	1	1	1	57,23	68,18	58,18	58,85
11	-1	1	-1	-1	-1	1	1	48,68	58,72	51,56	53,39
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	69,91	75,62	68,15	67,34
13	0	0	0	0	0	0	0	69,91	75,62	68,15	67,34
14	0	0	0	0	0	0	0	60,95	60,74	56,76	64,67
15	0	0	0	0	0	0	0	63,74	74,81	65,66	72,28
16	0	0	0	0	0	0	0	66,44	72,88	71,18	73,37

X1: massa de sílica na cela de extração (g); **X2:** massa da amostra (g); **X3:** tempo de agitação 1 - do funil de separação (min); **X4:** tempo de agitação 2 - do funil de separação (min); **X5:** massa de sílica na coluna de vidro (g); **X6:** volume de condicionamento (mL); **X7:** volume de eluição (mL); **BaA:** benzo(a)antraceno; **Cris:** criseno; **BbF:** benzo(b)fluoranteno; **BkF:** benzo(k)fluoranteno.

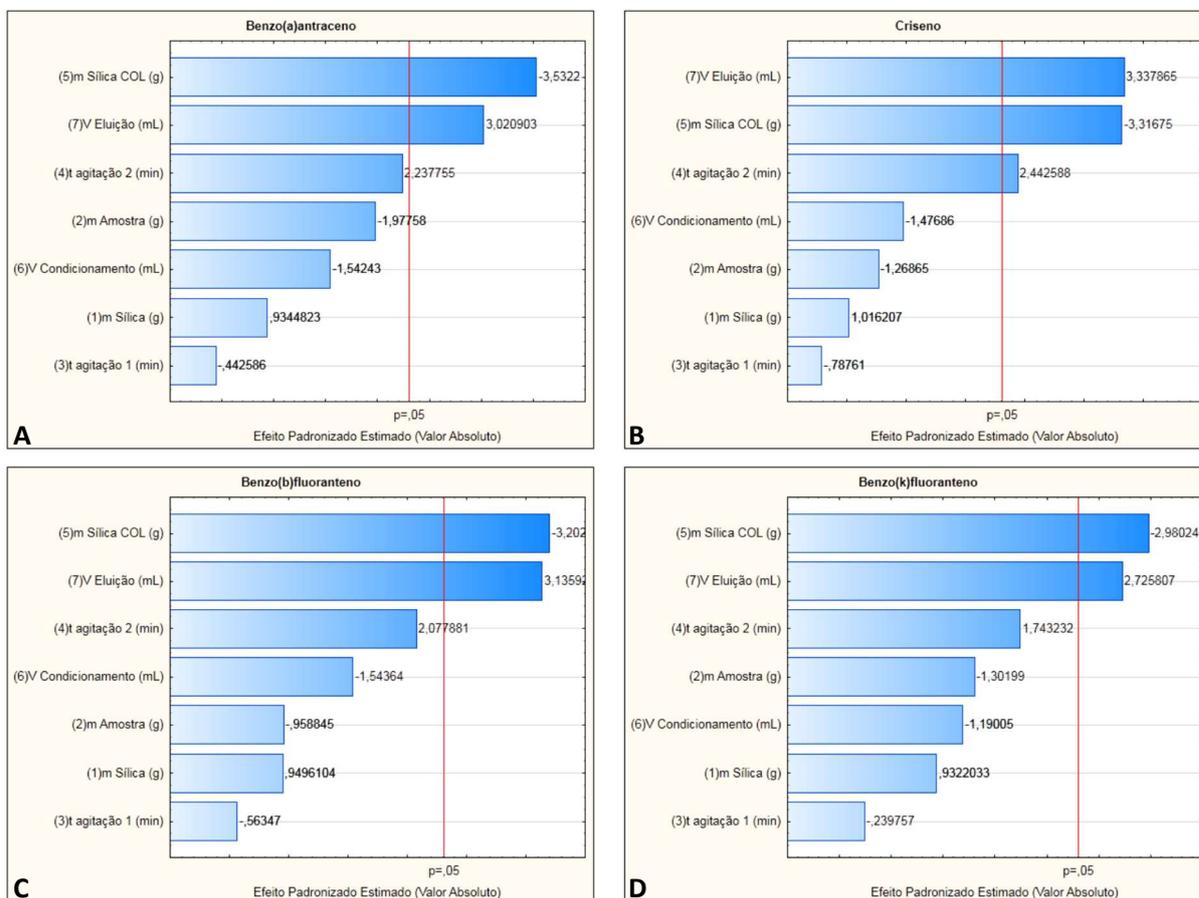
Tabela II.6 – Matriz do delineamento experimental do tipo *Plackett-Burman* (valores codificados) e respostas em recuperação para quatro HPAs

Ensaio	Variáveis independentes							Recuperação (%)			
	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	BaP	Ind	DahA	BghiP
1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	63,11	57,39	62,96	59,92
2	1	1	-1	1	-1	-1	-1	68,63	72,95	22,02	72,24
3	-1	1	1	-1	1	-1	-1	0,42	0,47	0,70	1,67
4	1	-1	1	1	-1	1	-1	70,16	60,96	33,15	68,30
5	1	1	-1	1	1	-1	1	63,24	64,38	69,98	66,98
6	1	1	1	-1	1	1	-1	0,39	0,38	3,05	0,55
7	-1	1	1	1	-1	1	1	75,01	74,74	81,85	84,10
8	-1	-1	1	1	1	-1	1	75,31	87,41	73,29	78,00
9	-1	-1	-1	1	1	1	-1	4,91	1,13	2,80	1,30
10	1	-1	-1	-1	1	1	1	55,89	44,66	52,96	53,62
11	-1	1	-1	-1	-1	1	1	50,22	43,80	35,12	43,88
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	64,64	68,87	57,93	60,90
13	0	0	0	0	0	0	0	64,64	68,87	57,93	60,90
14	0	0	0	0	0	0	0	58,91	55,18	59,64	59,04
15	0	0	0	0	0	0	0	64,39	62,05	69,22	70,05
16	0	0	0	0	0	0	0	69,53	67,93	69,46	69,57

X1: massa de sílica na cela de extração (g); **X2:** massa da amostra (g); **X3:** tempo de agitação 1 - do funil de separação (min); **X4:** tempo de agitação 2 - do funil de separação (min); **X5:** massa de sílica na coluna de vidro (g); **X6:** volume de condicionamento (mL); **X7:** volume de eluição (mL); **BaP:** benzo(a)pireno; **Ind:** indeno(1,2,3-cd)pireno; **DahA:** dibenzo(a,h)antraceno; **BghiP:** benzo(g,h,i)perileno.

Analisando os resultados das **Tabelas II.5 e II.6**, foi possível calcular o efeito das sete variáveis estudadas na recuperação dos oito HPAs, os quais estão apresentados nos diagramas de Pareto das **Figuras II.1 e II.2**.

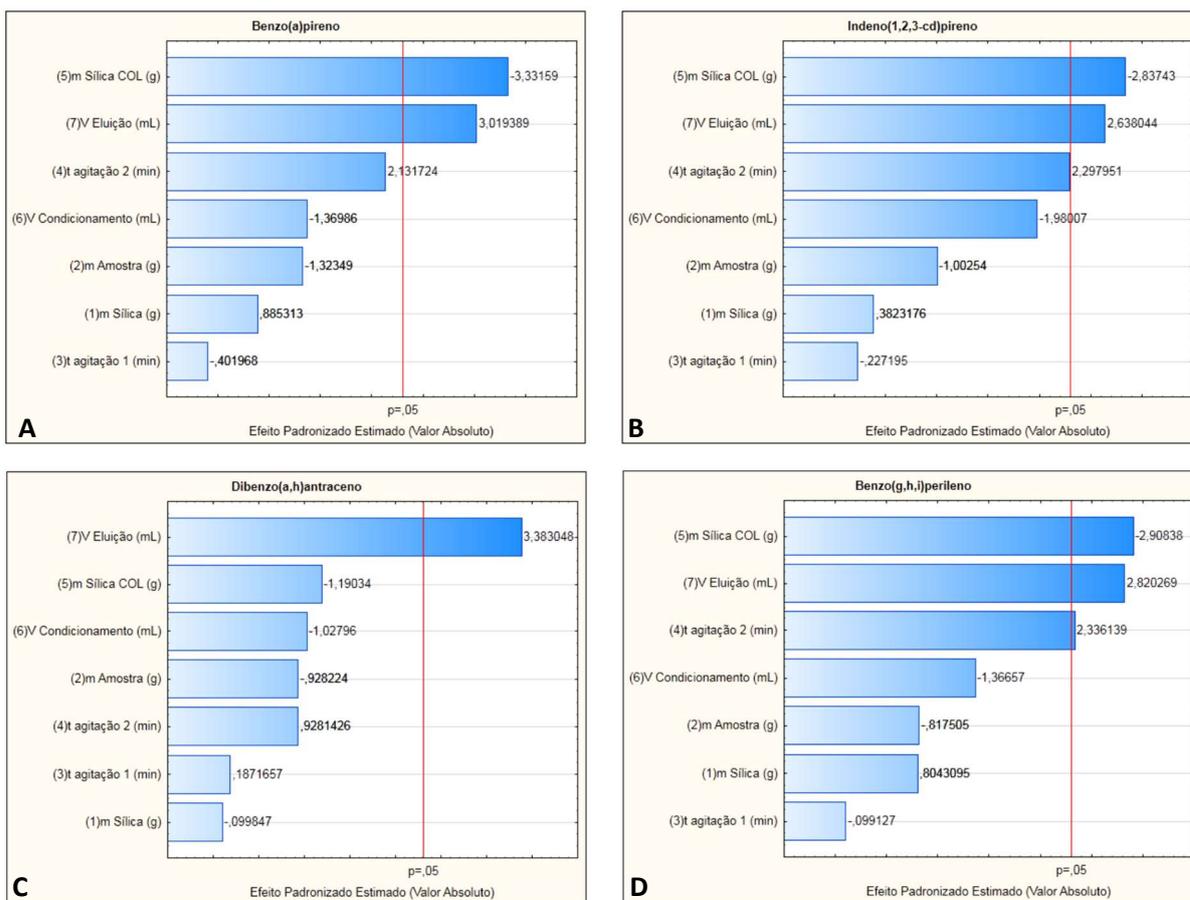
Figura II.1 – Diagramas de Pareto do efeito dos fatores estudados sobre a recuperação do benzo(a)antraceno (A), criseno (B), benzo(b)fluoranteno (C) e benzo(k)fluoranteno (D) nos experimentos com delineamento experimental do tipo *Plackett-Burman*.



A **Figura II.1** permite a observação de que três variáveis apresentaram efeitos estatisticamente significativos ($p \leq 0,05$) sobre a recuperação do criseno, sendo elas: massa de sílica na coluna de vidro (g), o volume de hexano para eluição dos HPAs na coluna de vidro (mL) e o segundo tempo de agitação do funil de separação (min). Entretanto, para os demais analitos representados, apenas as duas primeiras variáveis (massa de sílica e volume de eluição) apresentaram efeitos estatisticamente significativos ($p \leq 0,05$). Em todos os casos, a massa de sílica apresentou efeito com sinal negativo e o volume de eluição, sinal positivo. Esse fenômeno pode ser explicado pela capacidade aumentada de retenção de HPAs pela sílica quando se usam massas maiores, entretanto, quando se usam maiores volumes de solvente, os HPAs são mais facilmente eluídos. O tempo da segunda agitação do funil de separação (em minutos), durante a partição entre a solução de dimetilformamida 90 % v/v, a solução de cloreto

de sódio 1 % m/v e o solvente hexano, influenciou positivamente o resultado da recuperação do composto criseno.

Figura II.2 – Diagramas de Pareto do efeito dos fatores estudados sobre a recuperação do benzo(a)pireno (A), indeno(1,2,3-cd)pireno (B), dibenzo(a,h)antraceno (C) e benzo(g,h,i)perileno (D) nos experimentos com delineamento experimental do tipo *Plackett-Burman*.



Pela observação dos diagramas de Pareto da **Figura II.2**, verifica-se que os perfis de significância dos efeitos não diferiram muito dos analitos representados na **Figura II.1**. Novamente, três variáveis apresentaram efeitos significativos ($p \leq 0,05$) sobre a recuperação do benzo(g,h,i)perileno, duas sobre benzo(a)pireno e indeno(1,2,3-cd)pireno e apenas uma variável com efeitos significativos sobre a recuperação do dibenzo(a,h)antraceno.

Esse resultado significa que o criseno e o benzo(g,h,i)perileno foram os compostos que apresentaram mais dificuldade em serem extraídos pela fase orgânica (hexano) da partição, apresentando, talvez uma afinidade maior pela fase aquosa do que o restante dos HPAs analisados.

Por conseguinte, as variáveis independentes selecionadas para a realização da segunda etapa do delineamento experimental foram: tempo de agitação 2 do funil de separação (X4), massa de sílica na coluna de vidro (X5) e volume de eluição (X7), pois foram as únicas que apresentaram resultado estatisticamente significativo.

As condições das variáveis restantes foram estabelecidas analisando as informações obtidas pelos diagramas de Pareto (**Figuras II.1 e II.2**) e as recuperações dos ensaios individualmente. A massa da amostra (X2) foi fixada em 2 g, visto que durante os experimentos, quando se utilizou uma massa superior a esse valor foi observada uma tendência de formação de emulsão durante a partição com a solução de dimetilformamida 90 % v/v, o que torna a análise mais demorada.

Já a massa de sílica na cela do equipamento de ASE (X1), por se verificar influencia positiva e negativa nos resultados, foi consolidada em 16 g, o menor nível, pois houve preocupação com a recuperação do dibenzo(a,h)antraceno, que se apresentou um pouco maior nos ensaios em que se utilizou a massa de 16 g (**Figura II.2**). Além disso, essa variável foi uma das que menos influenciou os resultados, portanto a escolha de qualquer um dos níveis poderia ser justificada. Essa pequena influência pode ser verificada pela simples observação dos diagramas de Pareto (**Figuras II.1 e II.2**).

Assim como a massa de sílica, o tempo de agitação (X3) da partição entre a solução de hexano:diclorometano (85:15) e a solução de dimetilformamida 90 % v/v, também, apresentou pequena influência sobre os resultados (**Figuras II.1 e II.2**), sendo fixado o maior valor, 3 minutos, pelo mesmo motivo anteriormente apresentado: os valores de recuperação do dibenzo(a,h)antraceno (**Figura II.2**).

O volume de condicionamento da sílica na coluna de vidro (X6) estabelecido foi o nível intermediário, do ponto central, de 15 mL. Durante os experimentos foi observado que um volume inferior a 15 mL não era suficiente para passar por toda a

camada de sílica presente na coluna e ainda originar um pequeno volume adicional acima da camada, para onde as amostras são transferidas.

3.3.2 Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR)

A segunda etapa do delineamento consistiu na construção de um delineamento do tipo composto central rotacional com as três variáveis significativas (X_4 , X_5 e X_7) selecionadas após a análise dos resultados do delineamento *Plackett-Burman*. Nessa etapa, além dos níveis superiores e inferiores (+1, -1) apresentados na matriz do delineamento fracionado, foram incluídos os níveis axiais ($+\alpha$, $-\alpha$), conforme mostrado na **Tabela II.7**, para obtenção da curva do máximo absoluto. Abaixo dos valores calculados para os níveis axiais, em parênteses, estão colocados os níveis reais utilizados durante o experimento por questões de limitações práticas.

Tabela II.7 – Níveis e variáveis do delineamento composto central rotacional (DCCR)

Variáveis	Níveis				
	-1,68179	-1	0	+1	+1,68179
Tempo de agitação 2 - do funil de separação (min) – X_4	0,318207 (0,5)*	1	2	3	3,681793 (4,0)*
Massa de sílica na coluna de vidro (g) – X_5	3,29552 (3,30)*	5	7,5	10	11,70448 (11,70)*
Volume de eluição (mL) – X_7	32,9552 (35)*	50	75	100	117,0448 (120)*

*Níveis reais utilizados durante os experimentos.

Ao todo, foram realizados dezoito ensaios incluindo os três fatores (X_4 , X_5 e X_7), em único bloco, com quatro pontos centrais. A análise foi feita em ordem aleatória. A matriz com os valores codificados das variáveis independentes e os resultados do DCCR para as respostas dos oito HPAs estudados estão apresentadas nas **Tabelas II.8 e II.9**. As recuperações variaram de 2,16 % (dibenzo(a,h)antraceno) a 107,02 % (benzo(k)fluoranteno).

Tabela II.8 – Matriz com valores codificados das variáveis independentes e resultados do DCCR, em recuperação (%), para o benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno e benzo(k)fluoranteno

Ensaio	Variáveis independentes			Recuperação (%)			
	X4	X5	X7	BaA	Cris	BbF	BkF
1	-1	-1	-1	78,12	83,72	89,96	98,15
2	-1	-1	1	83,40	94,69	102,57	107,02
3	-1	1	-1	66,53	69,85	23,11	31,25
4	-1	1	1	89,89	86,10	87,63	92,07
5	1	-1	-1	80,60	87,31	84,43	93,86
6	1	-1	1	79,29	84,42	82,05	89,37
7	1	1	-1	54,80	55,09	17,49	24,64
8	1	1	1	77,04	87,08	91,60	80,84
9	-1,68179	0	0	72,00	80,59	76,34	80,08
10	1,68179	0	0	79,83	86,09	88,61	92,48
11	0	-1,68179	0	79,52	87,54	77,96	86,11
12	0	1,68179	0	73,69	76,93	62,11	72,55
13	0	0	-1,68179	70,53	70,82	51,25	55,44
14	0	0	1,68179	86,00	91,83	90,51	97,20
15	0	0	0	83,34	86,97	92,79	96,31
16	0	0	0	72,09	82,11	74,39	82,34
17	0	0	0	82,06	88,24	94,17	83,67
18	0	0	0	68,52	80,27	67,20	72,60

X4: tempo de agitação 2 - do funil de separação (min); **X5:** massa de sílica na coluna de vidro (g); **X7:** volume de eluição (mL); **BaA:** benzo(a)antraceno; **Cris:** criseno; **BbF:** benzo(b)fluoranteno; **BkF:** benzo(k)fluoranteno.

Tabela II.9 – Matriz com valores codificados das variáveis independentes e resultados do DCCR, em recuperação (%), para o benzo(a)pireno, indeno(1,2,3-cd)pireno, dibenzo(a,h)antraceno e benzo(g,h,i)perileno

Ensaio	Variáveis independentes			Recuperação (%)			
	X4	X5	X7	BaP	Ind	DahA	BghiP
1	-1	-1	-1	86,92	75,01	81,74	90,80
2	-1	-1	1	99,00	92,27	102,94	102,26
3	-1	1	-1	59,17	9,93	2,16	39,57
4	-1	1	1	85,93	72,96	78,31	90,71
5	1	-1	-1	85,12	78,53	81,59	81,72
6	1	-1	1	80,54	71,52	80,10	78,80
7	1	1	-1	43,41	7,95	3,70	26,72
8	1	1	1	78,42	74,91	73,71	76,22
9	-1,68179	0	0	74,83	69,48	67,63	71,62
10	1,68179	0	0	89,38	79,15	79,08	94,83
11	0	-1,68179	0	76,30	79,81	70,82	73,97
12	0	1,68179	0	76,14	58,70	3,31	74,95
13	0	0	-1,68179	76,11	34,23	4,06	65,84
14	0	0	1,68179	86,48	83,30	90,75	85,57
15	0	0	0	93,19	86,85	93,57	99,04
16	0	0	0	73,82	64,92	66,29	72,76
17	0	0	0	86,47	82,97	90,48	83,36
18	0	0	0	61,73	59,59	65,67	65,81

X4: tempo de agitação 2 - do funil de separação (min); **X5:** massa de sílica na coluna de vidro (g); **X7:** volume de eluição (mL); **BaP:** benzo(a)pireno; **Ind:** indeno(1,2,3-cd)pireno; **DahA:** dibenzo(a,h)antraceno; **BghiP:** benzo(g,h,i)perileno.

Os diagramas de Pareto a seguir (**Figuras II.3 e II.4**) ilustram graficamente a influência das variáveis independentes (tempo de agitação 2, massa de sílica na coluna de vidro e volume de eluição) sobre os valores de recuperação dos HPAs analisado, considerando-se significativas aquelas cujas barras horizontais ultrapassam as linhas em vermelho, representativas para intervalo de confiança de

95 % ($p < 0,05$), sendo os termos lineares associados à letra L e os termos quadráticos com Q.

Figura II.3 – Diagramas de Pareto do efeito dos fatores estudados sobre a recuperação do benzo(a)antraceno (A), criseno (B), benzo(b)fluoranteno (C) e benzo(k)fluoranteno (D) nos experimentos com delineamento experimental do tipo DCCR.

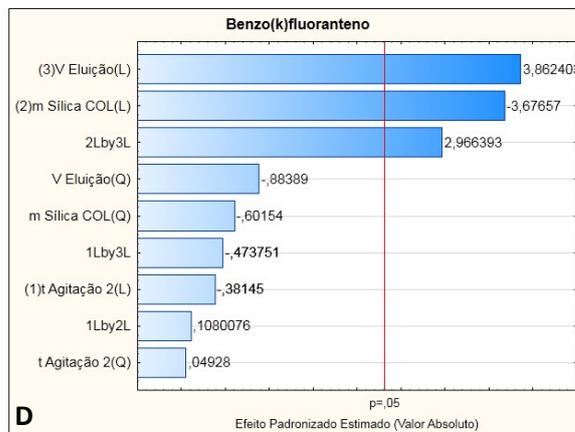
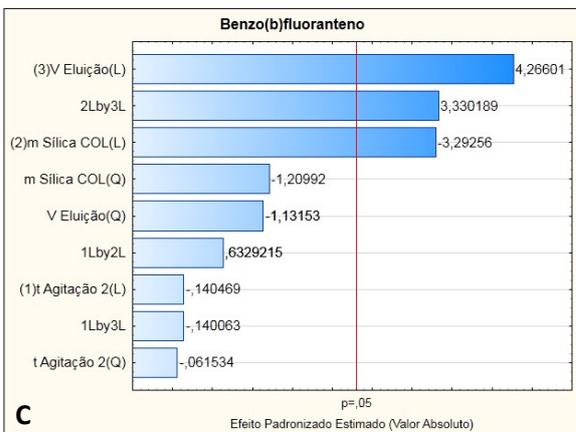
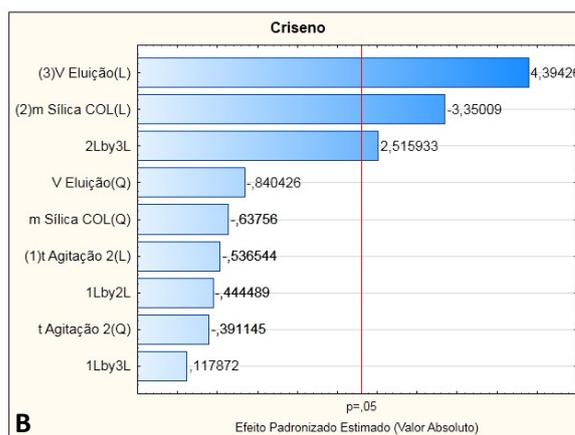
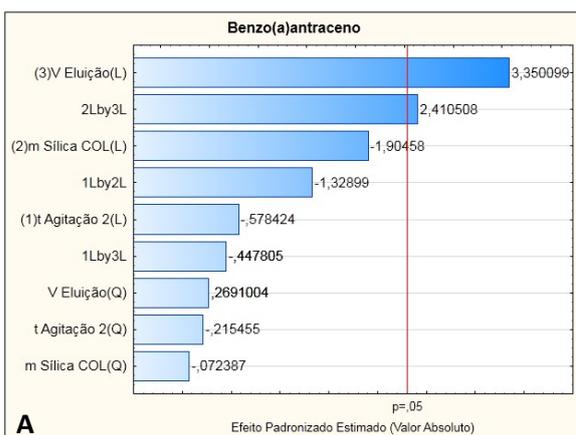
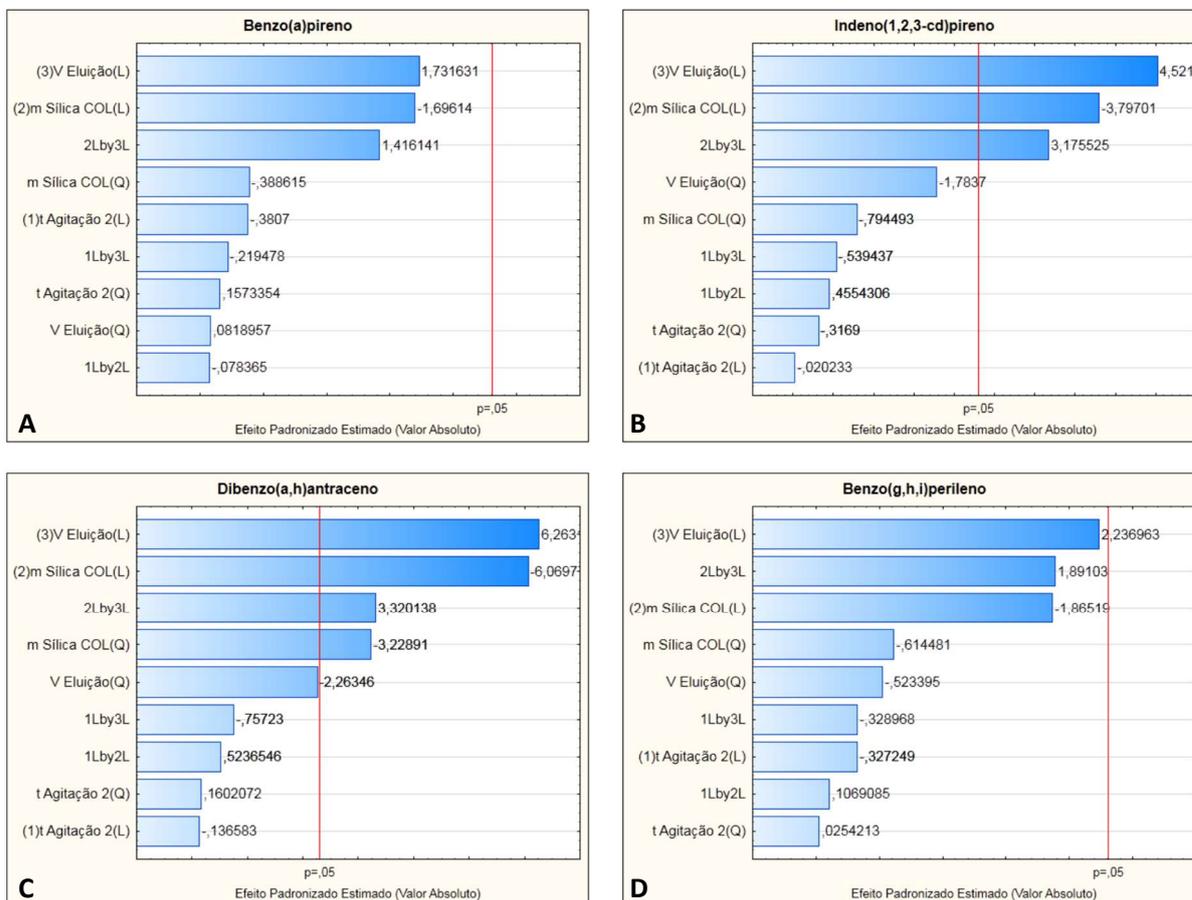


Figura II.4 – Diagramas de Pareto do efeito dos fatores estudados sobre a recuperação do benzo(a)pireno (A), indeno(1,2,3-cd)pireno (B), dibenzo(a,h)antraceno (C) e benzo(g,h,i)perileno (D) nos experimentos com delineamento experimental do tipo DCCR.



Através da observação dos perfis dos diagramas de Pareto para cada analito, verifica-se que o tempo de agitação do funil de separação, durante a partição entre a solução de dimetilformamida 90 % v/v, a solução de cloreto de sódio 1 % m/v e o solvente hexano (tempo de agitação 2 – X4) não apresentou influência significativa sobre a recuperação dos HPAs, tanto na forma quadrática (Q), quanto na forma linear (L). Portanto, por razões práticas, esse tempo de agitação foi fixado em 3 minutos. Entretanto, a massa de sílica na coluna de vidro (X5), em sua forma linear, apresentou efeito significativo para cinco analitos, exceto benzo(a)antraceno, benzo(a)pireno e benzo(g,h,i)perileno. Em todos os casos, a influência dessa variável foi negativa para a recuperação dos analitos, ou seja, quanto menor a massa de sílica, menor a retenção dos analitos por esse adsorvente. Já o volume de hexano para eluição da coluna de sílica (X7), na forma linear (L), apresentou influência significativa e positiva

sobre o resultado de seis analitos, exceto benzo(a)pireno e benzo(g,h,i)perileno, que não foram afetados por essa variável significativamente. Da mesma maneira, a interação “2Lby3L”, que indica a interação entre as variáveis X5 e X7, na forma linear, influencia significativamente a recuperação de seis analitos, exceto benzo(a)pireno e benzo(g,h,i)perileno. O efeito significativo dessa interação já era esperado, pois, quando se utilizam menores massas de sílica dentro da coluna de vidro, mais fácil é a eluição dos analitos com menor volume de solvente, sendo o oposto, também, verdadeiro. Os coeficientes lineares, quadráticos e suas interações fazem parte do modelo para compor as superfícies de resposta e as curvas de contorno representadas nas **Figuras II.5 a II.7**.

As superfícies de resposta e as curvas de contorno (**Figuras II.5 a II.7**) exibem a interação entre a massa de sílica e o volume de eluição e sua influência sobre a recuperação dos analitos. Verificam-se vários perfis de resposta semelhantes, exceto no caso do dibenzo(a,h)antraceno, que apresentou um perfil de contorno um pouco distinto dos demais (**Figura II.7**). Observa-se que a recuperação dos HPAs foi menor utilizando-se 10 g de sílica e 50 mL de hexano em todos os casos.

Nas curvas de contorno e superfícies de resposta, analisando analito por analito, a interação dos fatores massa de sílica na coluna de vidro (X5) e volume de eluição (X7) dá origem a maiores valores de recuperação dos analitos (>50 %) na região do ponto central (7,5 g de sílica e 120 mL de hexano), cujos parâmetros foram escolhidos para constituir o método a ser validado.

Figura II.5 – Gráficos de superfície de resposta e curvas de contorno dos analitos benzo(a)antraceno, criseno e benzo(b)fluoranteno

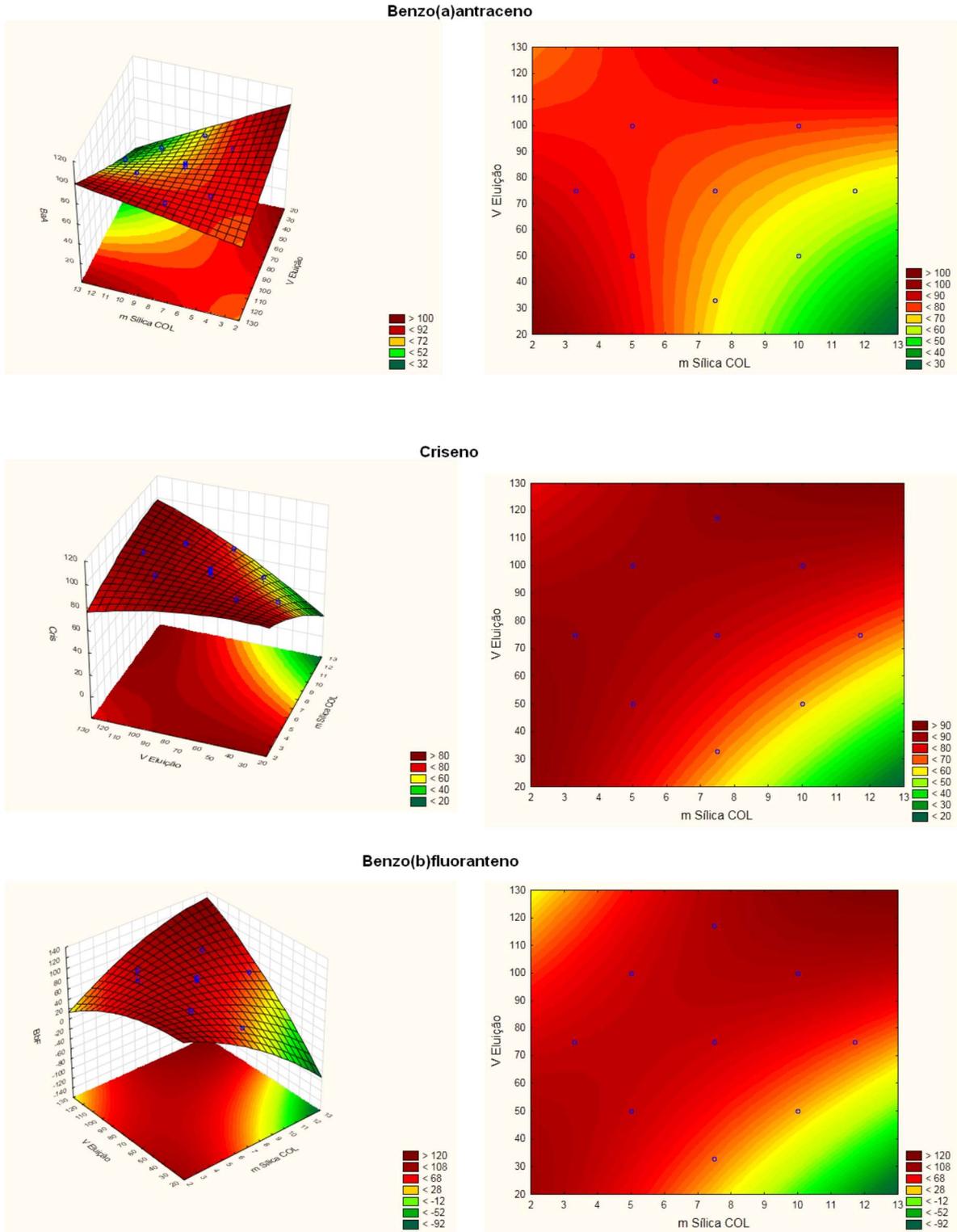
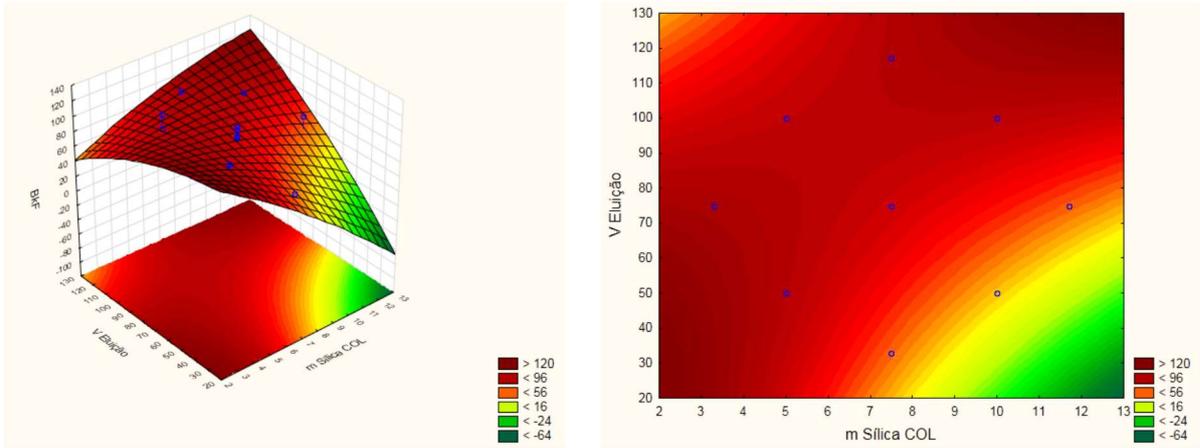
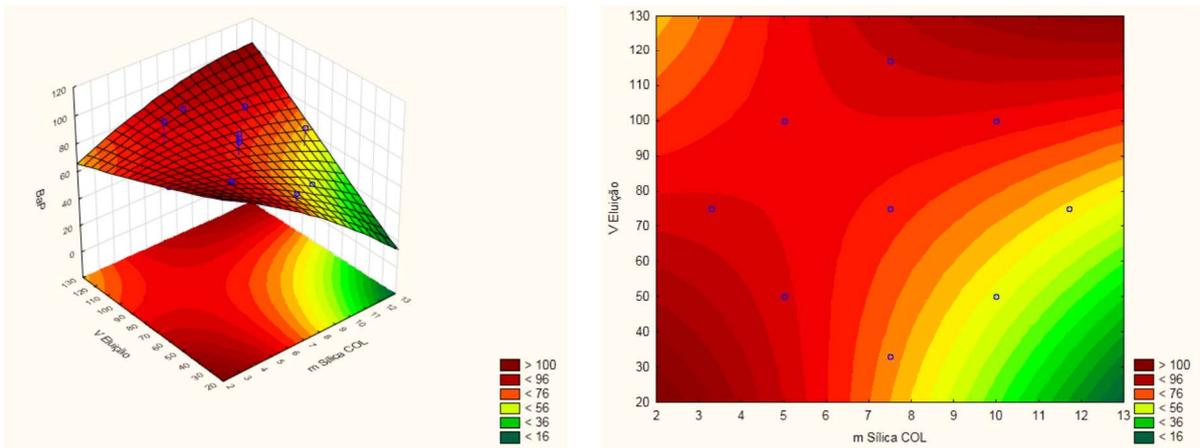


Figura II.6 – Gráficos de superfície de resposta e curvas de contorno dos analitos benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno e indeno(1,2,3-cd)pireno

Benzo(k)fluoranteno



Benzo(a)pireno



Indeno(1,2,3-cd)pireno

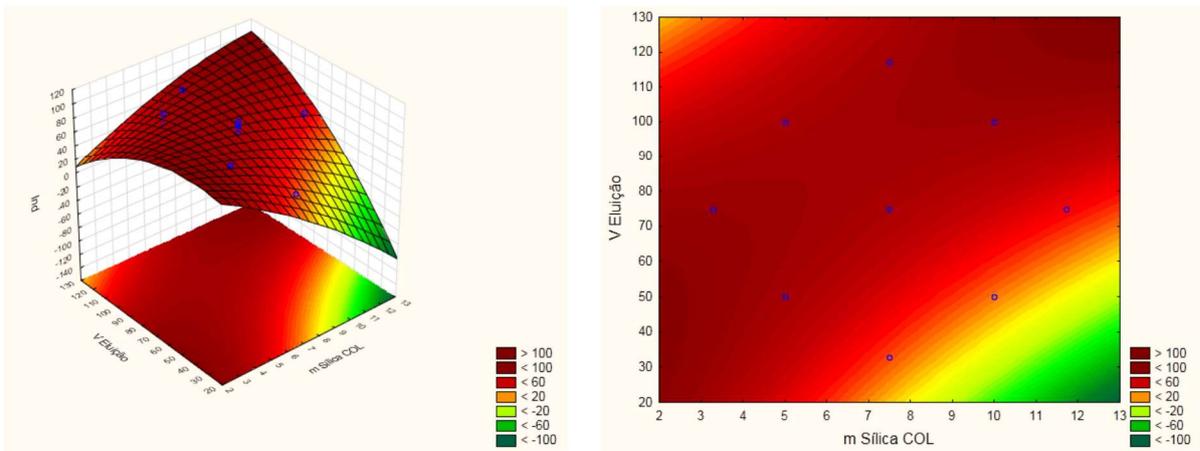
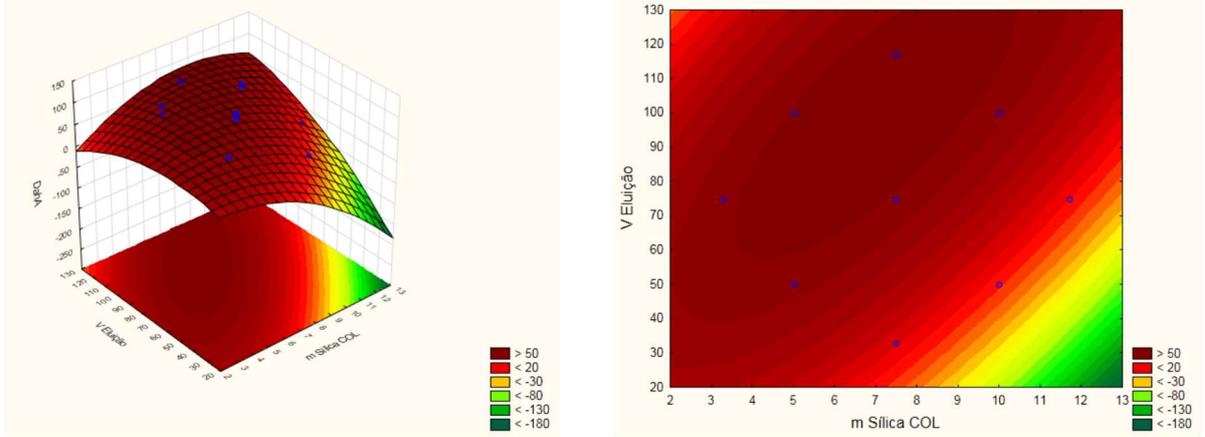
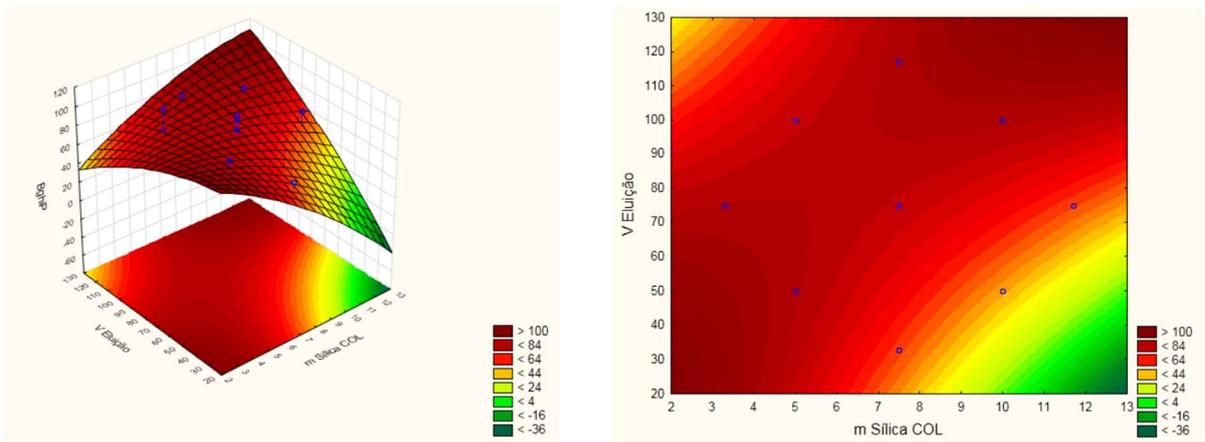


Figura II.7 – Gráficos de superfície de resposta e curvas de contorno dos analitos dibenzo(a,h)antraceno e benzo(g,h,i)perileno

Dibenzo(a,h)antraceno



Benzo(g,h,i)perileno



3.4 DETERMINAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE LIPÍDIOS TOTAIS PELO MÉTODO DE EXTRAÇÃO POR SOLVENTE ACELERADA (ASE)

Os resultados da determinação da quantidade de lipídios totais extraídos pela técnica de ASE estão apresentados na **Tabela II.10**. A amostra utilizada para o estudo foi a mesma amostra branca utilizada para a validação de métodos. Foram feitas 6 replicatas da amostra e o teor de lipídios foi determinado gravimetricamente conforme método descrito anteriormente.

Tabela II.10 – Teor de lipídios totais (%) quantificado pela técnica de ASE

Replicata	Massa da amostra (g)	Massa do recipiente (g)	Massa do recipiente + extrato do ASE® (g)	Massa de lipídios totais (g)	Teor de lipídios totais (%)
1	2,083	167,520	168,344	0,824	39,56
2	2,043	168,533	169,335	0,802	39,26
3	2,062	167,829	168,640	0,811	39,33
4	2,062	167,721	168,531	0,810	39,28
5	2,002	167,594	168,383	0,789	39,41
6	2,057	167,787	168,597	0,810	39,38
				Média (%)	39,37
				Desvio Padrão (%)	0,11
				Desvio Padrão Relativo (%)	0,28

Pela observação dos resultados, verifica-se que o método utilizado determina, em média, 39,37 % de lipídios totais, portanto, para se expressar o resultado da quantificação de HPAs em base de gordura, leva-se em conta essa quantidade de lipídios totais extraída pelo método.

O conteúdo total de lipídios da amêndoa de cacau integral em base seca é aproximadamente 50 % (WATSON; PREEDY; ZIBADI, 2013). Segundo Steinberg; Bearden; Keen (2003), 50 a 57 % do peso seco de amêndoas de cacau é devido à

manteiga de cacau. Em estudo realizado por EFRAIM *et al.* (2010), o teor de lipídios totais de amêndoas de cacau variou de 54,08 a 55,78 %, sendo determinado pelo método 963.15, item 31.4.02 (HORWITZ, 2005). Já Dharmaputra; Retnowati; Ambarwati (2000) obtiveram teores de lipídios na faixa de 46,58 a 47,16 % para amêndoas de cacau fermentadas, usando o método de Soxhlet com solvente hexano e hidrólise prévia.

Para tanto, deve ser destacado que, mesmo que o método de ASE possibilite a extração de menores quantidades de lipídios, a quantidade de lipídios totais extraída pelo método deve ser conhecida, pois representa a parcela de lipídios em que será realizada a análise. Em suma, toda amostra de amêndoa de cacau de procedência desconhecida, deve ter seu teor de lipídios determinado pelo método de ASE anteriormente à análise de HPAs, para que o resultado da concentração dos analitos seja expresso em base de gordura, como preconiza a legislação atual (EU, 2011a).

3.5 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS

3.5.1 Linearidade sem interferência da matriz

As curvas analíticas elaboradas com diluições sucessivas de solução padrão com os HPAs a serem estudados estão representadas nas **Figuras II.8 e II.9**, incluindo a equação da reta e o coeficiente de determinação (R^2) correspondente a cada analito. A faixa de concentrações determinada compreendeu o intervalo entre 0,75 a 8,0 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ de amêndoas de cacau, abrangendo 6 níveis de concentração, em triplicata, incluindo o limite máximo permitido para benzo(a)pireno (EU, 2011a). Somente o analito benzo(a)pireno apresentou desvio de linearidade ($p < 0,05$) nessa faixa de concentração, sendo necessário substituir o nível de concentração de 0,75 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ por 0,5 $\mu\text{g.kg}^{-1}$. Foi realizada, também, a preparação de um nível de concentração no limite superior de 9,5 $\mu\text{g.kg}^{-1}$, porém, verificou-se falta de ajuste ao modelo linear e o mesmo não foi empregado na construção das curvas de calibração. No presente estudo, o modelo linear de regressão foi avaliado segundo procedimento proposto por Souza e Junqueira (2005). A **Tabela II.11** apresenta um resumo das premissas avaliadas para cada analito estudado.

Figura II.8 – Curvas de calibração dos analitos benzo(a)antraceno (A), criseno (B), benzo(b)fluoranteno (C) e benzo(k)fluoranteno (D) obtidas durante a avaliação da linearidade

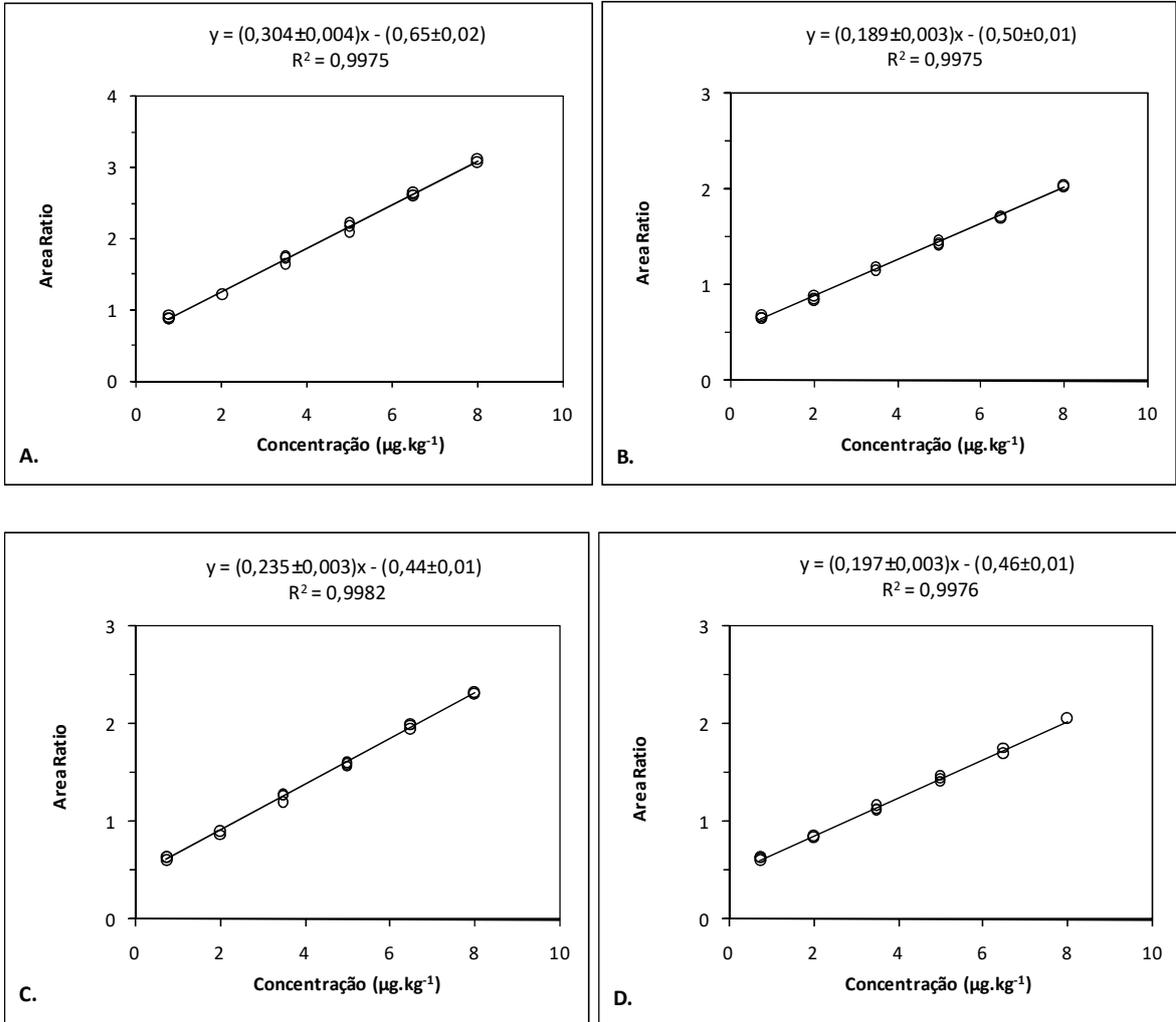


Figura II.9 – Curvas de calibração dos analitos benzo(a)pireno (A), indeno(1,2,3-cd)pireno (B), dibenzo(a,h)antraceno (C) e benzo(g,h,i)perileno (D) obtidas durante a avaliação da linearidade

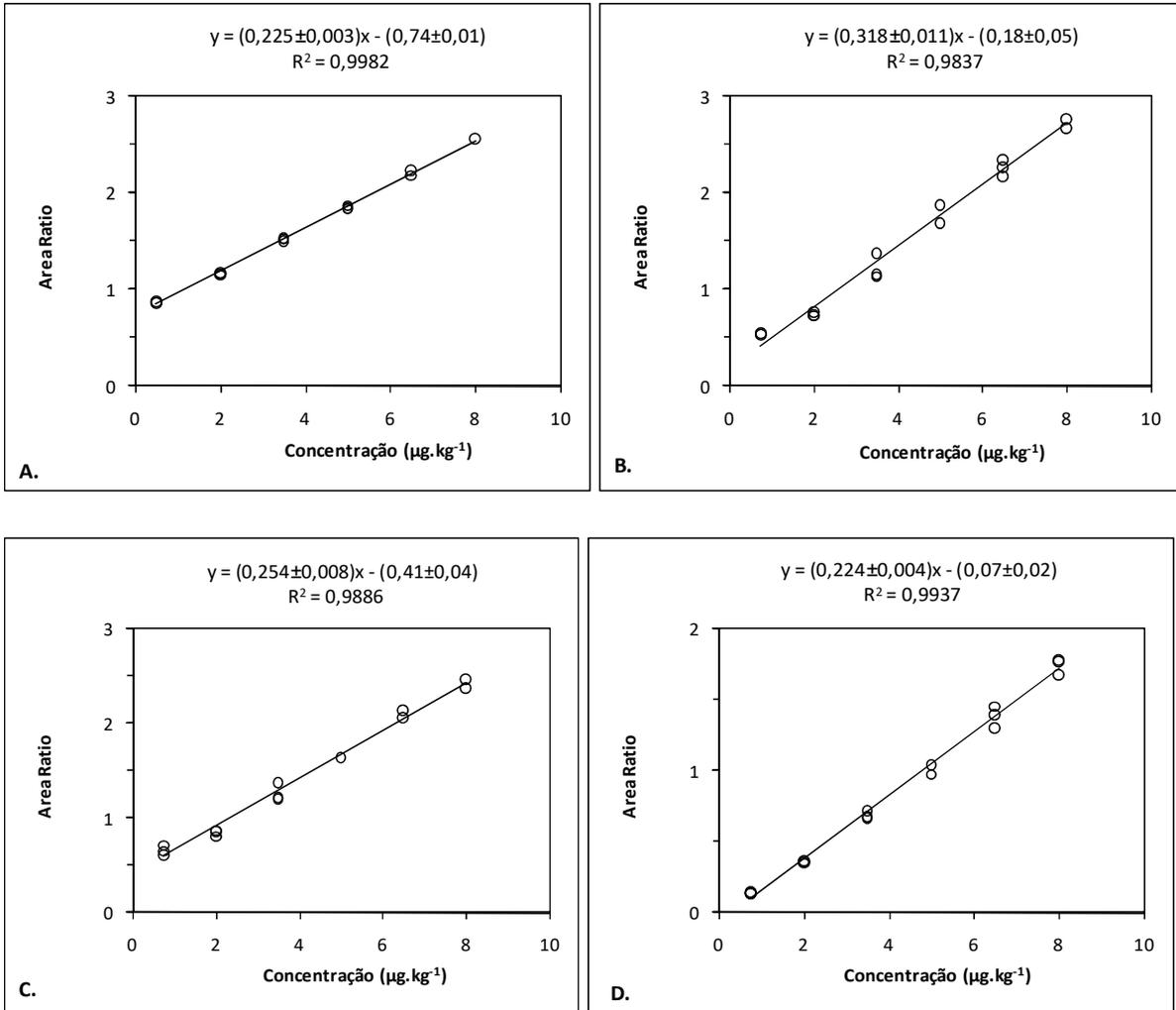


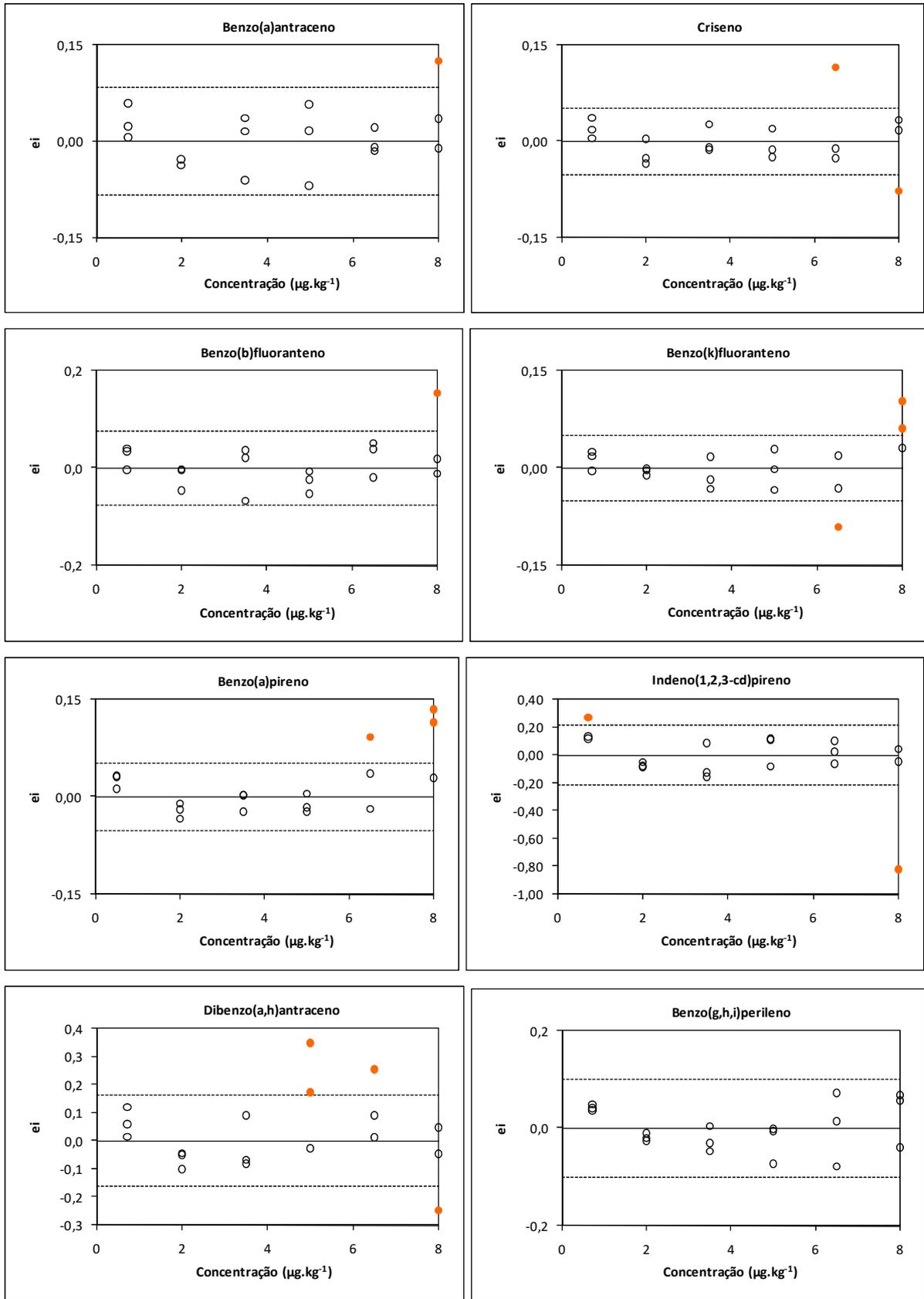
Tabela II.11 – Resumo dos resultados da avaliação da linearidade de soluções padrão de HPAs segundo Souza e Junqueira (2005)

Analito (Faixa de concentrações)	Estatística					
	n	R	d	t _L	F _{Regressão}	F _{FaltaAjuste}
Benzo(a)antraceno (0,75 a 8,0 µg.kg ⁻¹)	17	0,9884	1,978	0,405	5915,93	0,917
Criseno (0,75 a 8,0 µg.kg ⁻¹)	16	0,9771	2,158	-0,316	5481,03	3,029
Benzo(b)fluoranteno (0,75 a 8,0 µg.kg ⁻¹)	17	0,9812	2,383	0,185	7372,63	1,387
Benzo(k)fluoranteno (0,75 a 8,0 µg.kg ⁻¹)	15	0,9687	2,487	-1,461	5332,39	0,925
Benzo(a)pireno (0,5 a 8,0 µg.kg ⁻¹)	15	0,9665	1,762	-0,403	7019,86	3,579
Indeno(1,2,3-cd)pireno (0,75 a 8,0 µg.kg ⁻¹)	16	0,9593	1,386	0,855	845,54	2,186
Dibenzo(a,h)antraceno (0,75 a 8,0 µg.kg ⁻¹)	14	0,9816	1,710	0,722	1043,00	1,993
Benzo(g,h,i)perileno (0,75 a 8,0 µg.kg ⁻¹)	18	0,9877	1,692	-1,336	2526,60	1,637

n: número de pontos de seis níveis em três repetições, depois da retirada de dados dispersos identificados pelo resíduo Jackknife ($p < 0,05$); R: coeficiente de correlação de Ryan-Joiner para desvio de normalidade ($p > 0,10$); d: coeficiente de Durbin-Watson para teste de auto-correlação de resíduos ($p > 0,10$); t_L: t para o teste de Levene/Brown-Forsythe de homogeneidade de variâncias ($p > 0,05$); F_{Regressão}: razão entre variâncias para o teste de linearidade ($p < 0,001$); F_{FaltaAjuste}: razão entre variâncias para o teste de falta de ajuste ($p > 0,05$).

Na **Figura II.10**, estão representados os gráficos de resíduos da regressão linear para os oito HPAs estudados, nos quais se evidenciam os *outliers* que foram diagnosticados pelo teste de resíduos padronizados de Jackknife e removidos (não ultrapassando 22,2 % de $n = 18$) anteriormente à obtenção das equações de regressão. Como observado, também, na **Tabela II.11**, o número máximo de *outliers* deletados foi igual a 4 (22,2 %) para o composto dibenzo(a,h)antraceno. Houve detecção de *outliers* para todos os HPAs, exceto benzo(g,h,i)perileno.

Figura II.10 – Gráficos dos resíduos de regressão linear para oito HPAs estudados



-o-: outliers (valores extremos) detectados pelo teste de Jackife

Na literatura, são encontrados vários registros de avaliação de linearidade durante a validação de métodos para análise de HPAs em amostras de alimentos, entretanto, nenhum procedimento adequado é seguido. Serpe *et al.* (2010) apresentam um estudo de validação de métodos para quantificação de HPAs em mexilhões, mas o procedimento não incluiu o preparo de replicatas verdadeiras das soluções padrão. Já Purcaro *et al.* (2007) testam a linearidade em nove diferentes níveis de concentração preparados em triplicata, porém, só verificam a premissa de homogeneidade de variâncias e baseiam sua conclusão do teste apenas no valor do coeficiente de determinação (R^2). Esse último estudo descrito objetivou a validação de um método para determinação de benzo(a)pireno em óleos vegetais. O R^2 , também, é utilizado como único parâmetro de avaliação do ajuste linear nos estudos de Aguinaga *et al.* (2007), Veyrand *et al.* (2007), Danyi *et al.* (2009), Ishizaki *et al.* (2010) que validaram métodos de quantificação de HPAs em diversas matrizes.

Todos os estudos anteriormente publicados sobre HPAs em cacau negligenciaram o fato de que R^2 não é, por si, uma indicação de significância de regressão e, portanto, vários outros testes devem ser realizados, conforme observado por Souza & Junqueira (2005) e Raposo (2016). Wandan; Elleingard; Ndouba (2011) não realizaram ensaios de validação de métodos. Raters e Matissek (2014) descreveram um método para analisar quatro HPAs que foi linear em uma faixa de calibração de 0,02 a 15,57 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ para benzo(a)antraceno ($R^2 > 0,999$); 0,02 a 9,45 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ para criseno ($R^2 > 0,999$); 0,13 a 36,32 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ para benzo(b)fluoranteno ($R^2 > 0,999$) e 0,17 a 67,33 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ para benzo(a)pireno ($R^2 > 0,999$). Em outro estudo realizado para a determinação de dezesseis HPAs em doces de chocolate (KUMARI *et al.*, 2012), as amostras foram fortificadas individualmente com HPAs a concentrações dentro da faixa de 0,01 a 0,05 $\mu\text{g.g}^{-1}$ para construção das curvas de calibração. De acordo com os autores, relações lineares foram obtidas com coeficientes de correlação na faixa de 0,9109 a 0,9952. Kumari *et al.* (2013) reportaram que a linearidade do método foi avaliada pela fortificação de amostras de chocolate com concentrações crescentes, dentro da faixa de 0,3 a 184 $\mu\text{g.kg}^{-1}$). Esses autores alegaram que o método demonstrou “boa linearidade” dentro da faixa estudada, com coeficientes de correlação de 0,991 a 0,9984. Wang e Guo (2010) relataram que realizaram testes de linearidade, porém nenhum resultado foi apresentado.

3.5.2 Efeito de matriz

Os resultados do ensaio de efeito de matriz, assim como as curvas de calibração dos analitos em solvente puro e na matriz obtidas durante os ensaios para avaliação de efeito de matriz foram demonstrados e analisados no Capítulo 1 deste trabalho.

Os resultados da avaliação do efeito de matriz em amêndoas de cacau indicam que os analitos criseno e benzo(b)fluoranteno apresentaram inclinações estatisticamente diferentes ($p < 0,01$; $p < 0,001$) em relação às curvas de analitos em solvente puro e em matriz. As curvas de calibração correspondentes ao criseno e ao benzo(b)fluoranteno, também, demonstraram diferenças significativas quando se comparam os interceptos ($p < 0,001$), indicando um erro sistemático constante, assim como benzo(a)antraceno e benzo(g,h,i)perileno ($p < 0,001$; $p < 0,05$), na faixa de concentrações correspondente. Portanto, foi possível concluir que soluções padrão de criseno e benzo(b)fluoranteno, quando preparadas em solvente (nonano), forneceram respostas que diferiram daquelas obtidas para amostras de amêndoas de cacau contendo concentrações correspondentes. Consequentemente, curvas de analitos em matriz foram utilizadas nas etapas subseqüentes da validação para estimar as concentrações dos oito HPAs em amostras de amêndoas de cacau.

Esses resultados estão de acordo com Belo *et al.* (2012) que observaram efeitos de matriz em um método desenvolvido para quantificar sete HPAs em óleos comestíveis (soja, girassol e oliva) por CG-EM, usando diluição isotópica.

Estudos de efeito de matriz são constantemente ignorados durante a validação de métodos para determinação de HPAs em amostras de alimentos (PURCARO *et al.*, 2007; SERPE *et al.*, 2010) e em produtos de cacau (KUMARI *et al.*, 2012; MISNAWI, 2012; ZIEGENHALS *et al.*, 2009; WANDAN; ELLEINGAND; NDOUBA, 2011; RATERS; MATISSEK, 2014). Entretanto, Wang e Guo (2010) afirmam que efeitos de matriz podem ser evitados quando se executam operações diárias que se utilizam de controles de qualidade internos, como: (i) uso de uma matriz branca, (ii) uso de amostras brancas fortificadas e, por último (iii) preparação e análise de curva de calibração todos os dias ($R^2 > 0,99$). Além disso, Kumari *et al.* (2013) declaram que, no seu estudo, as recuperações de HPAs foram aceitáveis, portanto o método otimizado não foi fortemente afetado pela matriz. Deve-se destacar que, a avaliação de efeitos de matriz, quando executada para elucidar essas interferências na detecção

de HPAs em produtos de cacau, não tem sido conduzida adequadamente (SOUZA; PINTO; JUNQUEIRA, 2007).

3.5.3 Seletividade

A avaliação da variação entre as intensidades relativas dos íons confirmatórios para os oito HPAs estudados, obtidas para padrões e amostras adicionadas desses analitos, está representada na **Tabela II.12**. A seletividade do método foi demonstrada para todos os analitos, pois as variações ficaram abaixo do máximo de 10 % (EC, 2002).

Tabela II.12 – Intensidades relativas dos íons confirmatórios obtidas para soluções padrões e amostras adicionadas de HPAs, por analito, e respectivas variações

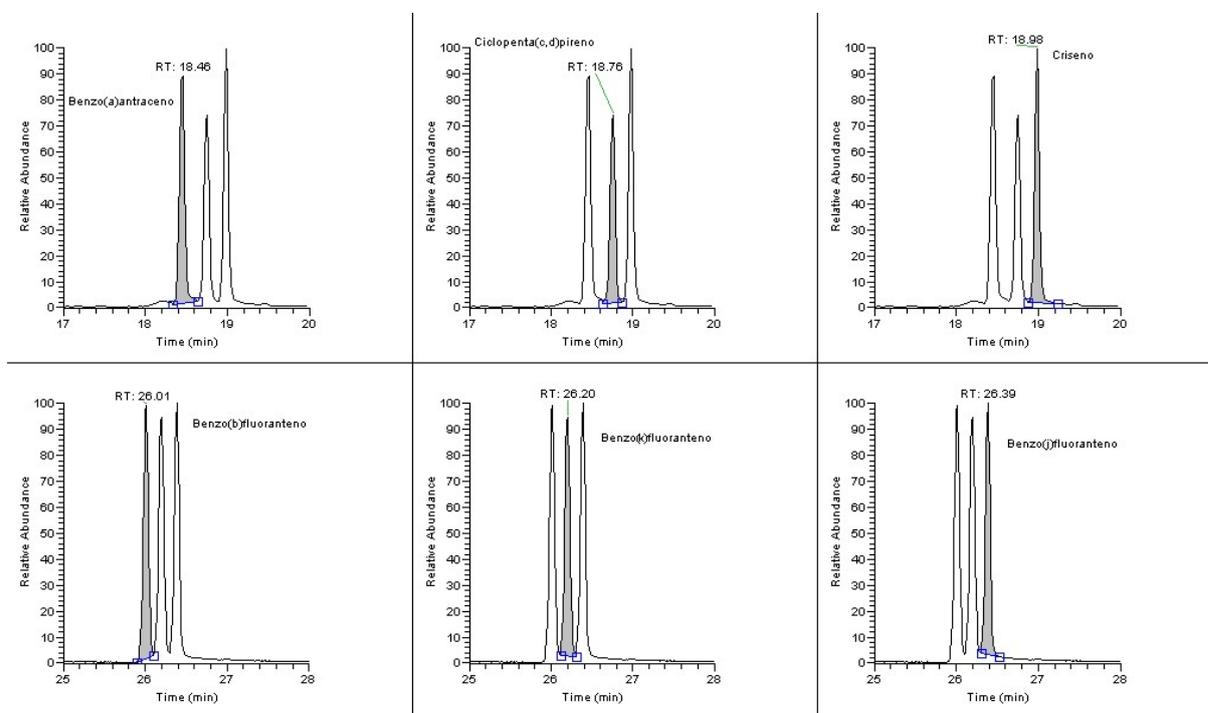
Analito	Íons* (m/z)	Intensidade Relativa Média – padrões (%)	Intensidade Relativa Média – amostras (%)	Variação** (%)	Variação máxima (%)
Benzo(a)antraceno	226, <u>228</u>	77,02 ± 13,39	84,05 ± 8,29	9,1	10
Criseno	226, <u>228</u>	82,86 ± 13,36	86,59 ± 10,04	4,5	10
Benzo(b)fluoranteno	250, <u>252</u>	76,81 ± 14,17	80,74 ± 6,28	5,1	10
Benzo(k)fluoranteno	250, <u>252</u>	74,93 ± 13,16	80,19 ± 6,13	7,0	10
Benzo(a)pireno	250, <u>252</u>	77,94 ± 9,52	78,65 ± 5,11	0,9	10
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	<u>276</u> , 277	43,08 ± 9,50	42,24 ± 15,13	1,9	10
Dibenzo(a,h)antraceno	<u>278</u> , 279	42,57 ± 6,19	42,52 ± 9,72	0,1	10
Benzo(g,h,i)perileno	<u>276</u> , 277	52,78 ± 18,51	50,61 ± 18,39	4,1	10

* 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.

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

A seletividade, também, foi avaliada pela injeção de solução padrão dos HPAs prioritários da União Europeia (EFSA, 2008; SCF, 2002). A coluna cromatográfica utilizada para separação (DB-EUPAH), permitiu a separação de dois analitos, ciclopenta(c,d)pireno e benzo(j)fluoranteno, em relação aos seus isômeros adjacentes. Tais analitos não eluíram com os HPAs adjacentes, portanto, eliminando a possibilidade de interferirem na análise, como demonstrado pelos cromatogramas da **Figura II.11**. Entretanto, esses analitos não foram cobertos pelo escopo da validação, por não possuírem análogos isotopicamente marcados.

Figura II.11 – Cromatogramas para avaliação de seletividade obtidos pela injeção de HPAs prioritários da União Europeia



3.5.4 Precisão intralaboratorial e recuperação

Na **Tabela II.13** estão representados os desvios padrão relativos para repetibilidade (DPR_r) e reprodutibilidade (DPR_R) intralaboratoriais, assim como os valores de HORRAT para cada analito.

Tabela II.13 – Médias de recuperação aparente, valores de HORRAT, desvios padrão relativos, sob condições de repetibilidade e reprodutibilidade, para cada analito adicionado a amostras de cacau em diferentes níveis de concentração

Analito	Concentração ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)	N	Recuperação média (%)	DPR _r (%)	HORRAT _r	DPR _R (%)	HORRAT _R
Benzo(a)antraceno	0,75	18	96,92	13,16	0,90	15,98	0,73
	2,5	17	91,15	9,49	0,65	10,51	0,48
	5,0	18	107,43	10,14	0,69	10,14	0,46
	7,5	18	102,69	9,41	0,64	9,50	0,43
Criseno	0,75						
	2,5	17	98,52	12,11	0,83	12,40	0,56
	5,0	17	103,67	4,84	0,33	12,98	0,59
	7,5	18	103,37	4,21	0,29	6,03	0,27
Benzo(b)fluoranteno	0,75						
	2,5	15	92,45	12,71	0,87	12,71	0,58
	5,0	18	98,88	6,68	0,46	7,50	0,32
	7,5	18	101,89	5,45	0,37	6,48	0,29
Benzo(k)fluoranteno	0,75	18	101,59	13,01	0,89	19,43	0,88
	2,5	14	105,01	3,71	0,25	3,71	0,17
	5,0	18	106,96	7,43	0,51	8,79	0,40
	7,5	18	104,69	5,41	0,37	7,36	0,33
Benzo(a)pireno	0,75						
	2,5	17	100,28	8,67	0,59	11,72	0,53
	5,0	18	107,96	4,75	0,32	6,66	0,30
	7,5	18	109,72	2,57	0,18	5,62	0,26
Indeno(1,2,3-cd)pireno	0,75						
	2,5	15	100,28	10,16	0,69	11,94	0,54
	5,0	17	107,96	7,96	0,54	10,11	0,46
	7,5	18	109,72	4,56	0,31	8,86	0,40
Dibenzo(a,h)antraceno	0,75	18	99,95	12,93	0,88	16,82	0,76
	2,5	15	105,23	6,69	0,46	7,46	0,34
	5,0	14	110,60	8,61	0,59	10,92	0,50
	7,5	18	107,66	4,65	0,32	4,65	0,21
Benzo(g,h,i)perileno	0,75						
	2,5	17	105,87	10,52	0,72	10,52	0,48
	5,0	18	104,37	5,34	0,36	6,16	0,28
	7,5	18	103,18	3,72	0,25	3,81	0,17

N = número de observações após tratamento de *outliers* pelo método de Grubbs; DPR_r = desvio padrão relativo de repetibilidade; HORRAT_r = valor de HORRAT calculado para repetibilidade; DPR_R = desvio padrão relativo de reprodutibilidade; HORRAT_R = valor de HORRAT calculado para reprodutibilidade

Valores extremos foram detectados pelo teste de Grubbs ($p > 0,05$) para todos os analitos, exceto para o nível de concentração (nível de adição) de $7,5 \mu\text{g.kg}^{-1}$, em todas as situações. As médias de recuperação aparente variaram de 91,15 a 110,60 % para todos os analitos, obedecendo a faixa de 50 a 120 % preconizada pela legislação europeia (EU, 2011b) para os analitos benzo(a)pireno, benzo(a)antraceno, criseno e benzo(k)fluoranteno. Os valores de DPR_r se situaram na faixa de 2,57 a 12,71, abaixo do valor máximo calculado (14,67) de acordo com os critérios de aceitabilidade de Horwitz em função do nível de concentração do analito. Não foram detectados valores de HORRAT_r superiores a 2, indicando que os critérios de repetibilidade foram aceitos de acordo com a legislação europeia vigente (EU, 2011b). De maneira análoga, os valores de DPR_R variaram de 3,71 a 12,98, abaixo do valor

máximo calculado (22,00) e, também, não foram detectados valores de $HORRAT_R$ superiores a 2 (EU, 2011b). Esses resultados indicam que houve precisão adequada do método, sob condições de repetibilidade e reprodutibilidade, na faixa de concentrações de 2,5 a 7,5 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ e as médias de recuperação do método se situaram dentro da faixa aceitável de 50 a 120 % (EU, 2011b).

A maioria dos estudos disponíveis na literatura atual demonstra que utilizaram critérios da União Europeia durante a avaliação da precisão e recuperação dos métodos analíticos, mas não há informações sobre os níveis de concentração estudados, tornando-se difícil verificar a adequação dos métodos em relação à precisão e ao LOQ. Em regra, as condições de teste empregadas nos experimentos de precisão não foram descritas, impossibilitando determinar se a precisão foi avaliada sob condições extremas (repetibilidade e precisão intermediária). Kumari et al. (2012) calculou a precisão do método em termos de desvio padrão relativo (DPR), determinado para 3 diferentes faixas de fortificação: 4 a 44,8 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$, 8 a 89,6 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ e 16 a 179,2 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$, para diferentes compostos, os quais foram analisados seis vezes. Esses autores não diferenciaram repetibilidade de reprodutibilidade e o critério para aceitação do DPR não estava completamente elucidado, os autores apenas citam um limite máximo de 3%. Nesse estudo, as recuperações percentuais foram obtidas para os mesmos níveis de concentração e avaliadas usando ANOVA two-way ($p < 0,05$ indicando uma diferença significativa). Além disso, Raters e Matissek, em 2014, realizaram estudos de precisão no mesmo dia e entre os dias, usando 12 replicatas de uma amostra branca de manteiga de cacau, entretanto, esses autores não declararam os níveis de concentração testados, mas somente os valores $HORRAT_R$ abaixo de 2. Os resultados desse estudo exibiram um DPR abaixo de 20 % e os autores concluíram que os dados eram totalmente compatíveis com os requerimentos da União Europeia. As recuperações foram, também, calculadas por Wang e Guo (2010) para as mesmas replicatas de amostras de óleo de milho e mostraram resultados na faixa de 81 a 96 %. A veracidade, nesse estudo, foi avaliada por um ensaio de proficiência interlaboratorial com amostras de manteiga de cacau e todos os quatro HPAs pesquisados (benzo(a)pireno, indeno(1,2,3-cd)pireno, benzo(a)antraceno e benzo(g,h,i)perileno) originaram valores de z-score ≤ 2 . De acordo com esses autores, o método analítico demonstrou “alta precisão” para a análise de HPAs.

3.5.5 Incerteza de medição

Os resultados das incertezas de medição obtidos para os oito HPAs analisados estão representados na **Tabela II.14**. Dentre os analitos pesquisados, apenas dois – criseno e indeno(1,2,3-cd)pireno – apresentaram resultados de incerteza de medição acima da incerteza máxima aceitável, considerando-se o nível de concentração igual a $0,75 \mu\text{g.kg}^{-1}$ de amostra de cacau. Entretanto, quando se leva em conta a incerteza de medição acima do nível de $0,75 \mu\text{g.kg}^{-1}$, o qual está muito próximo aos limites de quantificação do método, percebe-se que os resultados da estimativa da incerteza são adequados em todos os casos. Pode-se afirmar, portanto, que a incerteza de medição é adequada para os níveis de concentração acima de $0,75 \mu\text{g.kg}^{-1}$ para todos os HPAs estudados, abrangendo-se, também, o limite máximo permitido de benzo(a)pireno (EU, 2011a) dentro dessa faixa.

Esse estudo é o primeiro registro de um método analítico para a determinação de HPAs em amêndoas de cacau que realiza uma avaliação da incerteza de medição uma vez que esse parâmetro não é considerado na literatura disponível (KUMARI *et al.*, 2012, 2013; RATERS; MATISSEK, 2014; WANG; GUO, 2010; ZIEGENHALS *et al.*, 2009).

Tabela II.14 – Estimação da incerteza expandida (U) para oito HPAs

Analito	U, k = 2									U _f , k=2
	L1		L2		L3		L4		U	
	µg.kg ⁻¹	%	(%)							
BaP	0,30	40,21	0,55	22,06	1,03	20,53	1,44	19,15	40,21	40,80
Cris	0,43	57,23	0,72	28,75	1,34	26,73	0,98	13,13	57,23	57,30
BbF	0,44	58,67	0,75	29,95	0,80	15,91	1,06	14,15	58,67*	44,00
BkF	0,40	53,90	0,39	15,56	0,94	18,80	1,16	15,51	53,90	56,00
BaP	0,22	28,89	0,60	24,06	0,68	13,61	0,86	11,44	28,89	40,40
Ind	0,50	66,03	0,73	29,21	1,09	21,79	1,41	18,75	66,03*	40,00
DahA	0,42	56,20	0,53	21,30	1,16	23,12	0,82	10,98	56,20	56,20
BghiP	0,36	48,30	0,59	23,71	0,67	13,41	0,64	8,55	48,30	54,67

BaA: benzo(a)antraceno; Cris: criseno; BbF: benzo(b)fluoranteno; BkF: benzo(k)fluoranteno; BaP: benzo(a)pireno; Ind: indeno(1,2,3-cd)pireno; DahA: dibenzo(a,h)antraceno; BghiP: benzo(g,h,i)perileno; U_f: incerteza máxima aceitável; k: fator de cobertura; L1: nível 1 (0.75 µg.kg⁻¹); L2: nível 2 (2.50 µg.kg⁻¹); L3: nível 3 (5.00 µg.kg⁻¹); L4: nível 4 (7.50 µg.kg⁻¹) *Resultados de incerteza inaceitáveis (U>U_f).

3.5.6 Limites

Os limites de detecção (LOD) e limites de quantificação (LOQ) teóricos, calculados de acordo com o regulamento da Comissão Europeia (EC, 2002) estão listados na **Tabela II.15**.

Tabela II.15 – Limites de detecção (LOD) e limites de quantificação (LOQ) teóricos para oito HPAs

Analito	LOD_{teórico} ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)	LOQ_{teórico} ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)
Benzo(a)antraceno	0,20	0,59
Criseno	0,31*	0,89
Benzo(b)fluoranteno	0,14	0,42
Benzo(k)fluoranteno	0,29	0,77
Benzo(a)pireno	0,14	0,40
Indeno(1,2,3-cd)pireno	0,01	0,04
Dibenzo(a,h)antraceno	0,30	0,87
Benzo(g,h,i)perileno	0,28	0,64

*LOD inaceitável ($>0,30 \mu\text{g.kg}^{-1}$) (EU, 2011b)

Dentre os oito HPAs pesquisados, apenas o criseno apresentou LOD teórico acima do aceitável ($0,30 \mu\text{g.kg}^{-1}$) de acordo com regulamento da União europeia (EU, 2011b). Todos os HPAs apresentaram LOQ teóricos abaixo do máximo permitido ($0,90 \mu\text{g.kg}^{-1}$) (EU, 2011b), entretanto, por motivos práticos, foi considerado como limite de quantificação real o nível de concentração mais baixo da curva de calibração, $0,75 \mu\text{g.kg}^{-1}$.

3.5.7 Aplicação do método

Apenas uma das oito amostras analisadas apresentou teor de HPAs acima do LOQ do método. O conteúdo de HPAs nessa amostra foi obtido como se segue: $11,05 \mu\text{g.kg}^{-1}$ de benzo(a)antraceno, $20,90 \mu\text{g.kg}^{-1}$ de criseno, $8,95 \mu\text{g.kg}^{-1}$ de benzo(b)fluoranteno, $2,10 \mu\text{g.kg}^{-1}$ de benzo(k)fluoranteno, $9,06 \mu\text{g.kg}^{-1}$ de benzo(a)pireno, $7,18 \mu\text{g.kg}^{-1}$ de indeno(1,2,3-cd)pireno e $4,06 \mu\text{g.kg}^{-1}$ de benzo(g,h,i)perileno, calculado em base de gordura, considerando um teor médio de lipídios extraídos de 36,5 %. Dibenzo(a,h)antraceno não foi detectado em nenhuma das amostras analisadas. O nível de benzo(a)pireno ($9,06 \mu\text{g.kg}^{-1}$ de gordura) na amostra contaminada está acima do limite máximo permitido ($5,0 \mu\text{g.kg}^{-1}$ de gordura), de acordo com a legislação europeia (EU, 2011a). A soma de benzo(a)antraceno, benzo(a)pireno, benzo(b)fluoranteno e criseno ($49,96 \mu\text{g.kg}^{-1}$ de gordura) está,

também, acima do limite máximo de $30,0 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ de gordura (EU, 2011a). As outras sete amostras originaram resultados abaixo do LOD e abaixo do LOQ.

Conseqüentemente, dentre as oito amostras analisadas nesse trabalho, apenas uma (12,5 %) não estava adequada para o consumo de acordo com a legislação da União Europeia. Os resultados encontrados para o teor de HPAs em amostras de amêndoas de cacau neste estudo preliminar sugerem a necessidade de inclusão dessa matriz no escopo analítico do programa oficial de monitoramento, do Brasil.

4 CONCLUSÃO

Foi desenvolvido e validado um método de CG-EM para monitorizar a contaminação de amêndoas de cacau por HPAs. Esse método analítico foi baseado em uma extração por ASE, seguida de purificação com coluna de sílica gel, exibindo uma precisão aceitável e recuperação adequada para oito HPAs de alto peso molecular. Além disso, foram obtidos resultados de incerteza adequados para níveis de concentração superiores a $0,75 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ de amostra, os quais abrangem os níveis máximos permitidos de acordo com a regulamentação europeia.

O objetivo principal deste estudo foi otimizar e validar oito HPAs incluindo criseno, no entanto, resultados aceitáveis durante ensaios de LODs não puderam ser alcançados por este composto. Os resultados da análise de recuperação e de incerteza de medição fornecem evidência para a adequação do método descrito.

Este estudo representa o primeiro relato de um método analítico para a quantificação de HPAs em amêndoas de cacau que avalia a incerteza de medição. A análise de HPAs em amostras de amêndoas de cacau do Brasil forneceu uma base para a aplicação desse método como parte dos programas de monitoramento do governo brasileiro.

CAPÍTULO III – PRODUÇÃO DE MATERIAL PARA ENSAIO DE PROFICIÊNCIA DE HPAs EM AMÊNDOAS DE CACAU

RESUMO

Um material teste para ensaio de proficiência de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em amêndoas de cacau foi preparado e ensaios de homogeneidade e estabilidade para verificação da adequação do material foram realizados. Foi realizado um procedimento piloto para se determinar a melhor condição para incorporação da solução padrão ao material. O material teste foi preparado pela moagem e tamisação da amostra previamente congelada em nitrogênio líquido, a solução padrão de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos foi incorporada ao material por solubilização em nonano e posteriormente o material foi homogeneizado em misturador do tipo “V” por 12 h. O ensaio de homogeneidade foi conduzido e verificou-se falta de homogeneidade apenas para o composto dibenzo(a,h)antraceno. O ensaio isócrono de estabilidade indicou que apenas benzo(a)antraceno e benzo(b)fluoranteno não sofreram variações significativas em sua concentração devido ao armazenamento a 45° C. Posteriormente, o ensaio de estabilidade em longo prazo evidenciou que apenas benzo(a)antraceno mostrou estabilidade em um período de um mês de armazenamento refrigerado. O material de amêndoas de cacau em questão pode ser utilizado como material teste em ensaio de proficiência para todos os analitos pesquisados desde que adequadamente transportado sob refrigeração.

Palavras-chave: Hidrocarbonetos poliaromáticos. Controle de qualidade interno e externo. Cacau. Estabilidade. Homogeneidade.

ABSTRACT

A test material for proficiency study of polycyclic aromatic hydrocarbon in cocoa beans was prepared and homogeneity and stability assays to verify the suitability of the material were performed. A pilot procedure was performed to determine the best conditions for incorporation of the standard solution to the material. The test material was prepared by grinding and sieving the previously frozen sample in liquid nitrogen, the polycyclic aromatic hydrocarbon standard solution was incorporated to the material solubilizing nonane and then the material was homogenized in the mixer of the "V" for 12 h. The homogeneity test was conducted and it was found inhomogeneity only the dibenzo(a, h)anthracene compound. The isochronous stability test indicated that only benzo(a)anthracene and benzo(b)fluoranthene showed no significant variations in its concentration due to storage at 45°C. Subsequently, the long-term stability test showed that only benzo(a)anthracene was stable in a period of a month of cold storage. The cocoa beans material in question can be used as material test proficiency test for all analytes surveyed if properly transported under refrigeration.

Keywords: Polyaromatic hydrocarbons. Internal and external quality control. Cocoa. Stability. Homogeneity.

1 INTRODUÇÃO

O ensaio de proficiência (EP) é uma ferramenta prevista na norma ISO/IEC 17025 (2005) que deve ser utilizada pelos laboratórios de ensaio com o intuito de verificar a confiabilidade dos seus resultados, quando comparados a resultados de outros laboratórios. A realização de um EP envolve, primeiramente, a preparação de itens de teste idênticos, denominados materiais de teste. Os materiais de teste a serem distribuídos durante um EP devem ser similares ao tipo de amostras que são rotineiramente analisadas pelo laboratório que as recebe, no que se diz respeito a composição da matriz e faixa de concentração, quantidade ou nível do analito (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2006).

Durante a preparação de um material de teste, o provedor do EP ou o subcontratado deve garantir a homogeneidade e a estabilidade suficientes do lote, considerando-se cada analito, para assegurar que todos os laboratórios participantes do ensaio recebam unidades de distribuição que não se diferem de modo relevante em relação à concentração média do analito (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2006). Um conjunto homogêneo de amostras, que é estável ao longo do período de comparação interlaboratorial é necessário para assegurar que qualquer diferença entre os resultados dos testes dos participantes não ocorra devido a alterações nas propriedades inerentes do material ou devido a diferenças entre as amostras distribuídas (ROEBBEN *et al.*, 2013). Para tanto, é necessária a execução de testes de homogeneidade e de estabilidade.

Durante o teste de homogeneidade, devem ser levados em conta dois tipos relevantes de homogeneidade: primeiramente, há a homogeneidade dentro dos frascos, que determina a retirada mínima de amostra, para a qual a incerteza estabelecida é ainda válida; em segundo lugar, há a homogeneidade entre os frascos, que lida com a variação frasco-a-frasco (em linhas gerais, unidade-a-unidade) (LINSINGER *et al.*, 2001). Para se realizar um estudo de homogeneidade, deve-se estimar os componentes da variância representando a variação “entre frascos” e “dentro dos frascos” no contexto de uma ANOVA de efeitos aleatórios (VAN DER VEEN *et al.*, 2001).

Para o estudo da estabilidade, dois tipos de testes devem ser executados: um estudo à temperatura elevada para elucidar se alguma degradação deve ser esperada durante o transporte do material. Esse estudo deve ser conduzido em período de curta duração, não mais do que 4 semanas. Com base nos resultados obtidos nesse estudo, devem ser escolhidas as melhores condições de transporte (LINSINGER *et al.*, 2001). Um outro estudo deve ser executado à temperatura de armazenamento, no intuito de se obter informações sobre a estabilidade durante o armazenamento (LINSINGER *et al.*, 2001), o qual é conduzido em longo prazo, usualmente em 24 meses de armazenamento.

Na tabela do **Apêndice A** estão relacionados os materiais teste preparados para ensaio de proficiência realizados por provedores internacionais, incluindo um material teste de manteiga de cacau, produzido pela *European Commission – Joint Research Centre - Institute for Reference Materials and Measurements (EC-JRC-IRMM)*, produzido para a análise de quatro analitos, sendo eles, benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno e benzo(a)pireno, incluindo a soma desses HPAs. Além desse, pode ser destacado, também, o material teste de chocolate amargo, produzido pelo mesmo provedor de EP, para análise individual e soma dos quatro HPAs anteriormente citados. Os outros materiais teste produzidos incluem óleos comestíveis, moluscos, suplementos alimentares, carnes e peixes (**Apêndice A**). Não há material para EP produzido com amêndoa de cacau fermentada e seca, e considerando as outras matrizes alimentares produzidas com cacau, o escopo de analitos dos EPs realizados foi para 4 HPAs e não 8 HPAs, como o que foi desenvolvido pelo estudo em questão. Além disso, para esses dois materiais teste mencionados, os valores atribuídos corresponderam a níveis inferiores ao limite permitido de HPAs pela legislação europeia (EU, 2011a). Ambos materiais para EP foram armazenados em frascos de vidro âmbar, entretanto, com quantidades distintas: 20 mL para a manteiga de cacau e 30 g para o chocolate amargo.

Segundo o provedor de EP (EC-JRC-IRMM, 2012), o material teste de manteiga de cacau foi preparado a partir de 4 kg de manteiga de cacau comercial, a qual foi fundida em banho-maria a 60° C e homogeneizada *overnight*. O material de chocolate foi adquirido comercialmente, 5 kg de chocolate amargo foram adquiridos e moídos em moinho criogênico. As partículas foram homogeneizadas por agitação e aplicação repetitiva de um divisor de amostras (EC-JRC-IRMM, 2012).

A homogeneidade dos materiais teste de manteiga de cacau e chocolate amargo foi avaliada segundo a ISO 13528, com a diferença de que um laboratório externo foi contratado para realizar a análise da manteiga de cacau. Dez unidades de cada material foram selecionadas aleatoriamente e analisadas por cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas (CG-EM). O método de extração e purificação utilizado no estudo não foi especificado. Os materiais teste foram suficientemente homogêneos. Já os testes de estabilidade foram executados após o prazo para reportar os resultados do EP. Não foram encontradas diferenças significativas nos teores dos analitos antes do envio do material e após o vencimento do prazo, sendo, portanto, considerado estável (EC-JRC-IRMM, 2012).

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAL TESTE PARA ENSAIO DE PROFICIÊNCIA

2.1.1 Material

2.1.1.1 Amostras

As amostras utilizadas na elaboração e produção dos itens de ensaio foram amêndoas de cacau comercialmente disponíveis, originárias do estado da Bahia, que não continham teor detectável de nenhum dos oito HPAs estudados, sendo, portanto, comprovadamente brancas, analisadas pelo método validado no capítulo 2.

2.1.1.2 Padrões

Foi adicionada solução estoque de HPAs, de concentração igual a 40 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ às amostras, contendo os 16 considerados prioritários pela EPA, sendo eles: acenafteno; acenaftileno; antraceno; benzo(a)antraceno; benzo(b)fluoranteno; benzo(k)fluoranteno; benzo(a)pireno; benzo(g,h,i)perileno; criseno; dibenzo(a,h)antraceno; fenantreno; fluoranteno; fluoreno; indeno (1,2,3-cd)pireno; naftaleno; pireno (Accustandard, EUA). Entretanto, somente oito dos 16 HPAs citados acima foram objetos deste estudo – benzo(a)antraceno; benzo(b)fluoranteno; benzo(k)fluoranteno; benzo(a)pireno; benzo(g,h,i)perileno; criseno; dibenzo(a,h)antraceno; indeno (1,2,3-cd)pireno – os quais foram os analitos previamente validados.

2.1.1.3 Equipamentos

- Balança analítica com resolução 0,0001 g e capacidade máxima de 220,0000 g, calibrada (Shimadzu, AUX 220).
- Agitador de tubos tipo Vortex (Ika, MS 3 basic).
- Misturador Drum (Marconi, MA 160/4).

- Conjunto de peneiras Retsch nas granulometrias de 500 μm e 1 mm (Restch GmbH, Haan, Alemanha).
- Moinho ultracentrífugo Retsch, modelo ZM200 (Restch GmbH, Haan, Alemanha).
- Estufa para secagem (Heraeus Vacutherm, VT 6000).
- Homogeneizador tipo V (Engendrar, tipo V).
- Micropipeta automática de 10 a 100 μL calibrada (Nichiryo, Nichipet Ex).
- Refrigerador (Electrolux, DFF37 Premium).
- Termômetros digitais tipo cabo sensor, com memória de máxima e mínima, calibrados (Incotherm).

2.1.1.4 Vidrarias e outros insumos

- Béqueres de 500 e 1000 mL.
- Ponteiras de 200 μL para micropipeta automática.
- Frascos de vidro transparente tipo Reacti-Vial com capacidade para 3,0 mL (Thermo Scientific, EUA).
- Frascos de vidro para misturador drum com capacidades de 500 e 1000 mL.
- Bandejas de aço inox.
- Espátulas de aço inox.
- Sacos plásticos de polietileno.
- Luvas de nitrila descartáveis.
- Funil de vidro transparente.
- Pipeta de Pasteur.
- Pera de borracha adaptável à pipeta de Pasteur.

2.1.1.5 Solventes e reagentes

- Nonano grau p.a.r. (Sigma Aldrich, Alemanha).
- Hexano grau HPLC/Spectro (Tedia Company Inc., EUA)

2.1.2 Métodos

2.1.2.1 Elaboração dos itens de ensaio

2.1.2.1.1 Procedimento piloto

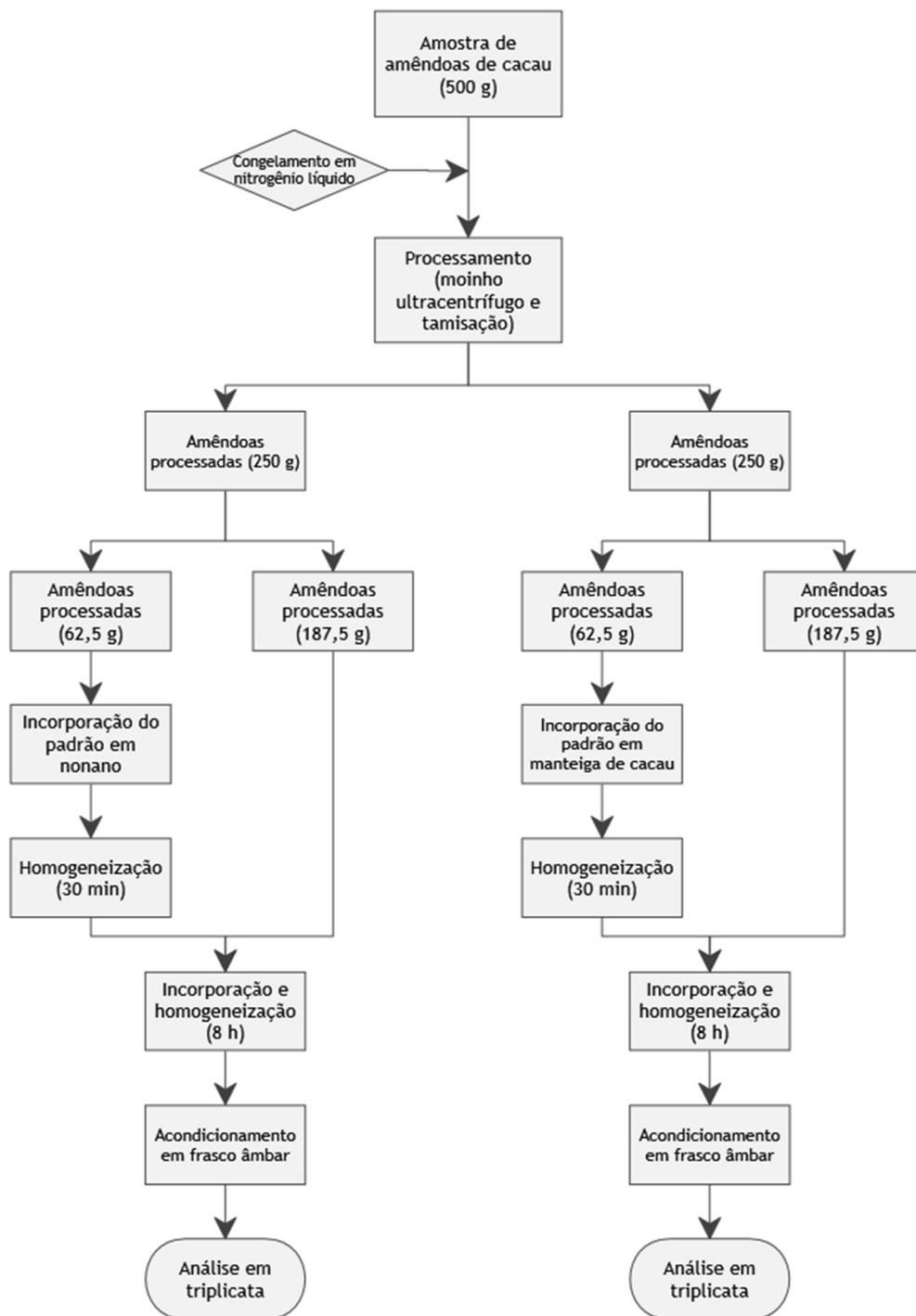
Durante a execução do procedimento piloto, o objetivo principal foi avaliar a melhor condição de adição dos padrões de HPAs à amostra disponível de amêndoas de cacau. Em um primeiro momento, foi investigada a presença de conteúdo nativo de HPAs na amostra, o que não foi encontrado acima do limite de quantificação do método, ou seja, a amostra utilizada para a produção do material de referência foi considerada branca. Portanto, era necessária a adição dos padrões. Duas condições de incorporação dos padrões às amostras de cacau foram avaliadas: i) padrão solubilizado em nonano; ii) padrão solubilizado em manteiga de cacau previamente fundida a 40° C.

A amostra de amêndoas de cacau foi congelada com nitrogênio líquido e reduzida de tamanho em moinho ultracentrífugo Retsch, modelo ZM200 (Restch GmbH, Haan, Alemanha), equipado com peneira de furos trapezoidais de 2,00 mm. O pó resultante da moagem foi então tamisado em peneira de aço inox de 500 µm (Restch GmbH, Haan, Alemanha). A amostra foi, portanto, dividida em duas porções de 250 g, sendo que um quarto de cada porção foi separado em béquer de 500 mL. Ao primeiro béquer foram adicionados 81,5 µL da solução estoque de HPAs (40 µg.mL⁻¹) previamente solubilizada em, aproximadamente, 2,50 mL de nonano. Ao segundo béquer foi adicionado o mesmo volume de solução padrão, entretanto, com a solução padrão previamente solubilizada no mesmo volume de manteiga de cacau fundida.

As alíquotas fortificadas foram submetidas à homogeneização em misturador *drum* Marconi MA 160/4 (Marconi, Brasil) por um período aproximado de 30 minutos. A seguir, foram adicionadas às suas respectivas porções as quais foram homogeneizadas no mesmo misturador por um período aproximado de 8 h.

Foram retiradas três replicatas de cada porção do material e analisadas pelo método descrito previamente neste trabalho, para avaliação da capacidade de incorporação, ou seja, recuperação média, em um total de 6 ensaios, conforme fluxograma da **Figura III.1**.

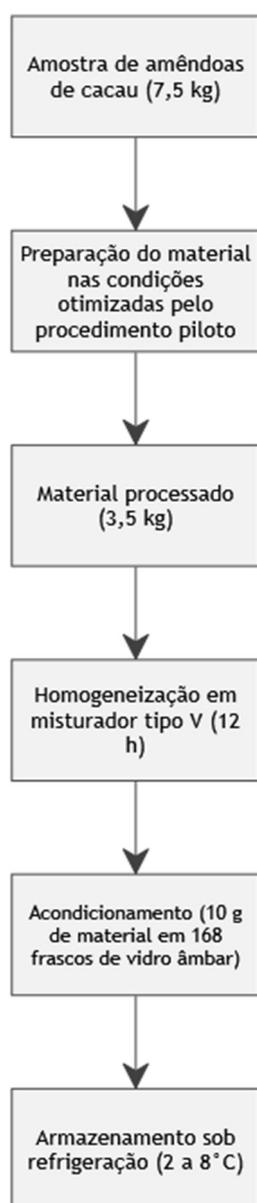
Figura III.1 – Fluxograma do procedimento piloto para avaliação da incorporação do padrão de HPAs



2.1.2.1.2 Preparação dos itens de ensaio

As amostras de amêndoas de cacau (7,5 kg) foram reduzidas de tamanho e tamisadas de acordo com o procedimento piloto, posteriormente, foi retirada uma alíquota equivalente a 3 kg do material moído e tamisado para se realizar a incorporação do padrão de HPAs. O material, após homogeneização em misturador em “V” (Engendrar, tipo V), por um período equivalente a 12 h, foi acondicionado em 168 frascos âmbar de 50 mL, totalizando 10 g de material em cada frasco, os quais foram armazenados sob refrigeração (2 a 8° C) (**Figura III.2**).

Figura III.2 – Fluxograma de preparo dos itens de ensaio



2.1.2.2 Teste de homogeneidade

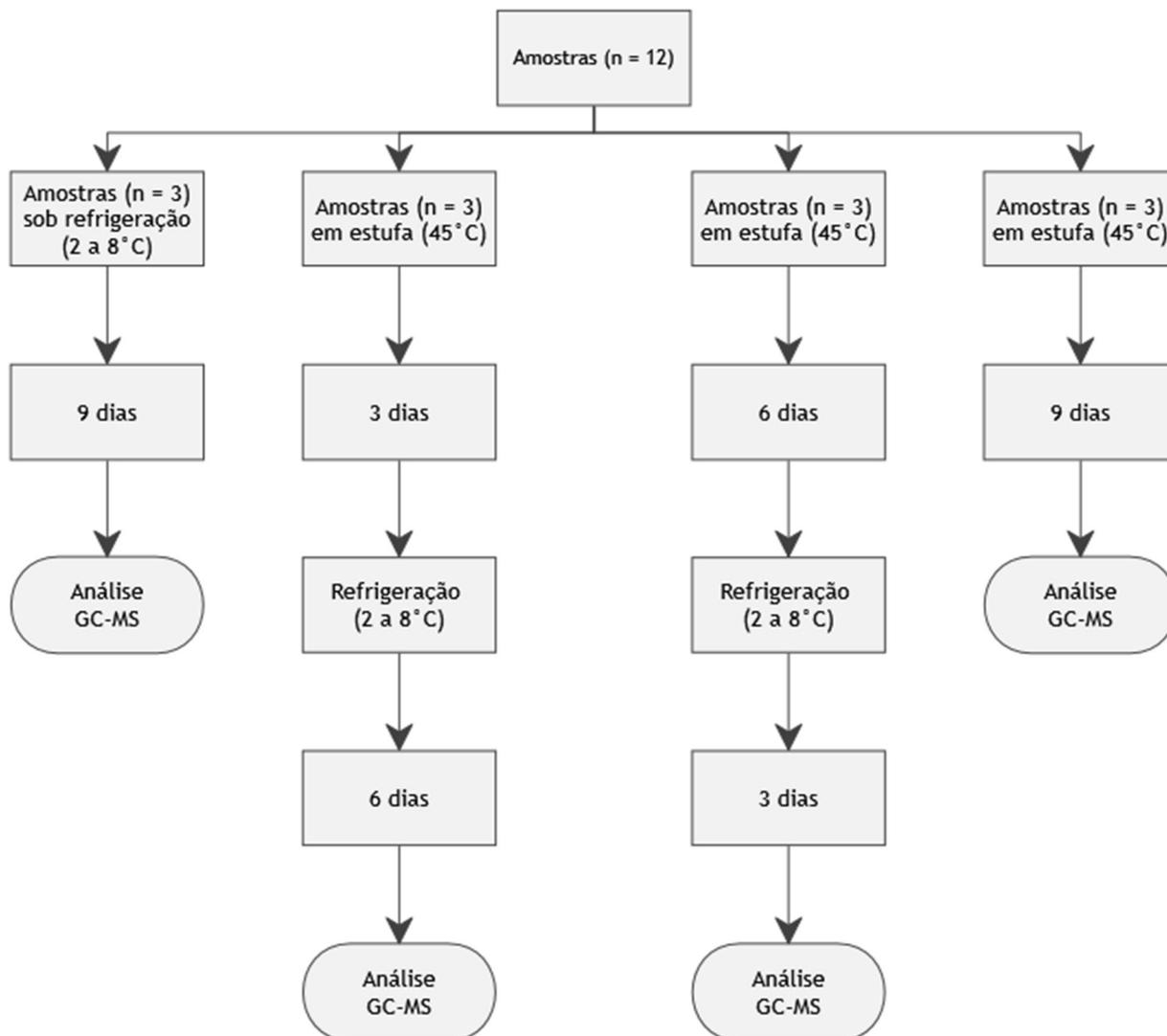
Foram retiradas, aleatoriamente, dez unidades do lote produzido e analisadas em duplicata pelo método validado no capítulo 2 ($n = 20$). A sequência de injeções no CG-EM foi organizada, também, em ordem aleatória. A avaliação da incerteza padrão do lote foi executada pela aplicação da análise de variância (ANOVA), para cada um dos oito analitos pesquisados (ABNT, 2012). Os dados do teste de homogeneidade foram analisados segundo critérios das normas ISO 13528 (2005), IUPAC (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2006). O desvio padrão do ensaio foi estimado de acordo com o proposto por Horwitz (1982).

2.1.2.3 Teste de estabilidade

2.1.2.3.1 Estabilidade em curto prazo

Foi realizado teste de estabilidade em curto prazo seguindo-se doze dias consecutivos em que três unidades do lote produzido foram mantidas em ambiente refrigerado (2 a 8°C), considerando-se esta a temperatura de referência, e outras nove unidades, também aleatoriamente escolhidas, foram levadas à estufa à $45^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. A cada três dias, foram retiradas três unidades da estufa e submetidas novamente à refrigeração até que se completasse o período de nove dias. As unidades foram analisadas em duplicata ($n = 24$) conforme método validado anteriormente (**Figura III.3**).

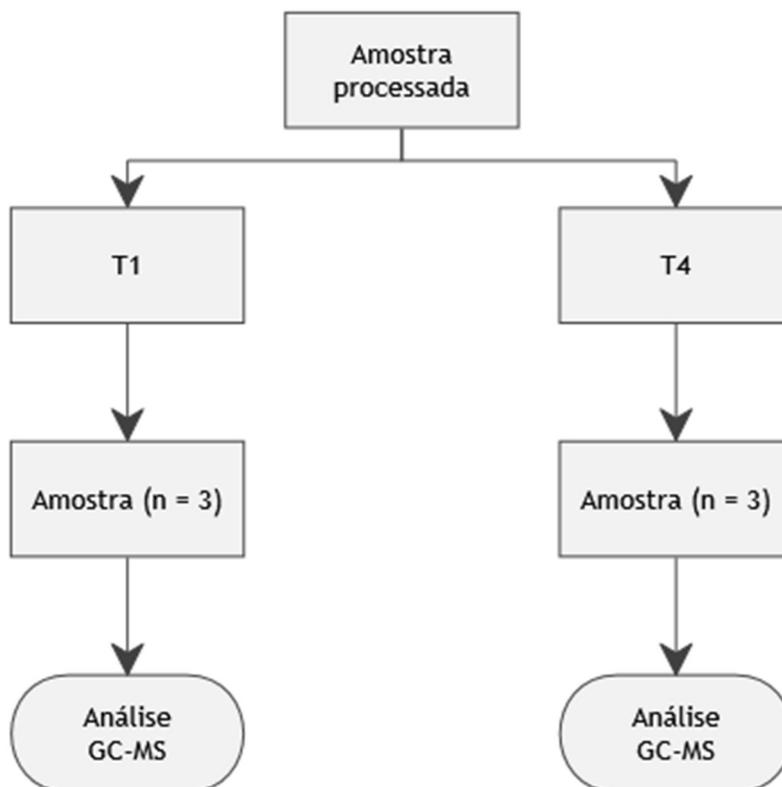
Figura III.3 – Fluxograma do estudo de estabilidade a curto prazo



O teste de estabilidade foi realizado, para os oito analitos, por ANOVA e teste de Tukey para a comparação dos dados dos tratamentos 0, 3, 6 e 9 dias, com nível de significância igual a 0,05, de acordo com a ISO 35 (ABNT, 2012).

2.1.2.3.2 Estabilidade em longo prazo

Foram retiradas, aleatoriamente, três unidades do lote produzido em intervalo de um (T1) e quatro meses (T4) após o ensaio de homogeneidade (T0) e analisadas em duplicata pelo método anteriormente validado ($n = 6$), conforme ilustrado no fluxograma da **Figura III.4**.

Figura III.4 – Fluxograma do estudo de estabilidade a longo prazo

T1: tempo de 1 mês após o ensaio de homogeneidade; T4: tempo de 4 meses após o ensaio de homogeneidade.

A estabilidade em longo prazo foi avaliada para os oito analitos, pela comparação de médias entre os períodos de armazenamento, conforme modelo proposto segundo critérios da norma ISO 13528 (ISO 13528, 2005) e IUPAC (THOMPSON et al., 2006).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 MATERIAL PARA ENSAIO DE PROFICIÊNCIA

3.1.1 Procedimento piloto

Os dados obtidos durante o procedimento piloto estão relacionados na **Tabela III.1**. Os teores de HPAs das replicatas analisadas cuja incorporação de padrão foi realizada pela solubilização na manteiga de cacau fundida variaram de 0,00 a 5,90 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ de gordura, considerando uma recuperação máxima de 33,1 %. Já no caso da incorporação de padrão realizada pela solubilização em nonano, maiores teores de HPAs foram encontrados pela análise das replicatas: 16,72 a 35,3 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ de gordura, com recuperação superior a 93,9 %. A menor recuperação do padrão adicionado à manteiga de cacau fundida pode ser explicada pela dificuldade em se realizar a homogeneização, considerando-se a maior viscosidade da manteiga, portanto, também, maior dificuldade de transferência do padrão solubilizado aos itens de ensaio. Dada a maior recuperação dos ensaios realizados pela incorporação de padrão com nonano, essa condição foi escolhida para se executar as etapas posteriores de preparação do material.

Tabela III.1 – Concentração de HPAs, em $\mu\text{g.kg}^{-1}$ de gordura, e porcentagem de recuperação do padrão das triplicatas de amostras de amêndoas de cacau analisadas durante o procedimento piloto

Analito	Incorporação de padrão com manteiga de cacau - replicatas						Incorporação de padrão com nonano - replicatas					
	1		2		3		1		2		3	
	c	%	c	%	c	%	c	%	c	%	C	%
BaA	5,90	33,1	2,76	15,5	4,99	28,0	21,42	120,3	25,56	143,5	24,14	135,6
Cris	3,26	18,3	1,56	8,8	2,70	15,2	17,78	99,8	21,31	119,6	17,03	95,6
BbF	0,00	0,0	2,47	13,9	1,77	10,0	19,32	108,5	29,64	166,4	16,72	93,9
BkF	0,00	0,0	0,83	4,7	1,86	10,5	18,40	103,3	35,34	198,4	18,24	102,4
BaP	2,42	13,6	0,81	4,5	1,13	6,3	17,87	100,3	26,74	150,2	18,30	102,8
Ind	0,00	0,0	0,79	4,4	3,97	22,3	19,72	110,7	29,43	165,3	23,78	133,5
DahA	0,00	0,0	2,01	11,3	1,65	9,3	17,31	97,2	17,77	99,8	18,23	102,4
BghiP	2,95	16,6	2,13	11,9	2,46	13,8	20,86	117,1	32,44	182,2	19,92	111,9

c = concentração em $\mu\text{g.kg}^{-1}$ de gordura; % = recuperação

3.1.2 Preparação do material teste para ensaio de proficiência e estudo de homogeneidade

Na **Figura III.5** está ilustrado o material teste já preparado (moído, tamisado, fortificado e homogeneizado), devidamente embalado e identificado de acordo com procedimento padrão do LANAGRO-MG.

Figura III.5 – Amostras para ensaio de proficiência de HPAs em amêndoas de cacau moídas acondicionado em frascos de vidro âmbar de 50 mL com tampa de rosca



A média da concentração de HPAs em base de gordura variou de 8,03 a 12,72 $\mu\text{g}.\text{kg}^{-1}$, valores superiores ao limite máximo permitido de BaP preconizado pela legislação europeia (EU, 2011a) e a soma dos analitos BaA, Cris, BbF e BaP foi igual a 40,97 $\mu\text{g}.\text{kg}^{-1}$, também, superior ao valor máximo preconizado pela mesma legislação, sendo o material teste adequado para avaliação da capacidade do método de detectar concentrações acima do limite máximo permitido.

Nenhum *outlier* foi detectado pelo teste de Cochran ($p > 0,05$) em nenhum dos analitos estudados. O critério para a repetibilidade foi aceitável para, também, todos os analitos estudados (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2006).

Durante a preparação dos itens de ensaio houve indicação de falta de homogeneidade para apenas um analito (DahA) quando se levam em conta os critérios adotados pela ISO 13528 (ISO 13528, 2005). Entretanto, para os critérios da IUPAC (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2006), o mesmo analito indicou homogeneidade, revelando que há divergência de critérios de aceitação entre os resultados dos testes utilizados. Destaca-se que os critérios adotados pela IUPAC (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2006), são menos rigorosos do que os da ISO 13528 (ISO 13528, 2005), pois, além de permitir a retirada de *outliers*, o primeiro

considera apenas erros do tipo I (rejeição de um material satisfatório) argumentando que a homogeneidade suficiente é uma premissa válida e há altos custos para a realização do referido teste (FEARN & THOMPSON, 2001). Para efeitos práticos, declarou-se, portanto, que para o analito DahA houve falta de homogeneidade. Como a etapa de homogeneização em misturador tipo “V” não foi otimizada, é possível que tal etapa tenha influenciado o resultado da falta de homogeneidade do composto nesse material. Deve-se destacar que a alíquota utilizada para o teste foi equivalente a 2,000 g ($\pm 0,100$ g), por conseguinte, a homogeneidade do material teste não está assegurada em relação aos outros HPAs para alíquotas abaixo desse valor (**Tabela III.2**).

Tabela III.2 – Resultado do estudo de homogeneidade do material teste de HPAs em amêndoas de cacau, segundo critérios da IUPAC e da ISO 13528, para os oito analitos pesquisados

Analito	Média ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)*	IUPAC			ISO 13528	σ_p	Parecer
		S^2_{an}	s^2_{sam}	c	S_s		
BaA	10,95	0,1303	0,00000	0,2626	0,107	0,8796	Homogêneo
Cris	12,72	0,2210	0,05950	0,3997	0,244	1,0213	Homogêneo
BbF	8,03	0,1019	0,00000	0,1733	0,189	0,6451	Homogêneo
BkF	8,74	0,1169	0,00000	0,2014	0,136	0,7015	Homogêneo
BaP	9,27	0,0919	0,03613	0,1866	0,190	0,7447	Homogêneo
Ind	8,45	0,0546	0,00000	0,1330	0,107	0,6785	Homogêneo
DahA	9,58	0,1461	0,22037	0,2478	0,469**	0,7693	Não Homogêneo
BghiP	8,20	0,0632	0,00025	0,1371	0,016	0,6582	Homogêneo

*Média dos resultados calculados em base de gordura. ** De acordo com o critério da norma ISO 13528, o material apresentou falta de homogeneidade para o analito DahA.

De maneira análoga, Sykes *et al.* (2013) submeteram vários materiais teste (óleo de oliva, óleo de palma, manteiga de cacau, carne de salsicha, peixe defumado e fórmula infantil desidratada fortificados com padrão de HPAs, se necessário) a ensaio de homogeneidade de acordo com procedimento de Fearn e Thompson (2001). Os autores verificaram que todas as combinações matriz-analito

demonstraram homogeneidade suficiente, porém esses dados não foram utilizados no cálculo dos valores designados. Os analitos estudados por Sykes *et al.* (2013) incluíam apenas benzo(a)pireno, benzo(a)antraceno, benzo(b)fluoranteno e criseno.

Por outro lado, Simon *et al.* (2008) não conduziram testes de homogeneidade em materiais preparados para ensaio de proficiência (HPAs em óleo de girassol, milho e oliva), assumindo que os materiais teste eram líquidos e como tal eram considerados soluções reais, os quais, por definição, eram homogêneos.

Hackenberg e Stachel (2013) testaram a homogeneidade de material teste de de um pó à base de cereais para *baby food* instantânea adicionado de HPAs usando dois protocolos: ISO 15328 (2005) e o IUPAC (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2006). Doze amostras foram tomadas aleatoriamente e analisadas em duplicata e o material teste provou ser suficientemente homogêneo para todos os analitos – benzo(a)antraceno, benzo(a)pireno, benzo(a)fluoranteno, criseno –, quando assumido um desvio padrão alvo de 22% (HACKENBERG; STACHEL, 2013).

Em relação a matriz cacau e produtos derivados, este estudo em questão representa o único relato publicado na literatura em que a homogeneidade de um material teste para oito HPAs em amêndoas de cacau foi avaliada para itens de ensaio de proficiência.

3.1.3 Estabilidade em curto prazo

Os dados referentes ao ensaio de estabilidade em curto prazo estão relacionados na **Tabela III.3**. Não foi observada diferença significativa ($p > 0,05$) para todos os oito analitos pesquisados, portanto, é possível inferir que a exposição do material de referência a uma temperatura equivalente a $45^{\circ} \pm 2^{\circ} \text{C}$ por um período máximo de nove dias, não afeta a estabilidade ou a qualidade desse material. Entretanto, destaca-se que o analito DahA não apresentou homogeneidade quando previamente testado, portanto, seu resultado de estabilidade, embora positivo, deve ser considerado com cautela.

Tabela III.3 – Resultados do estudo de estabilidade em curto prazo, com armazenamento a $45 \pm 2^{\circ} \text{C}$ por zero, três, seis e nove dias

Analito	Médias ($\mu\text{g.kg}^{-1}$ de gordura) dos tratamentos (dias)				F	p
	0	3	6	9		
BaA	10,84	11,06	9,91	10,92	0,237	0,869
Cris	13,60	12,15	13,64	12,11	0,521	0,673
BbF	14,02	11,55	16,51	11,46	1,023	0,404
BkF	11,50	11,75	12,18	10,45	0,382	0,767
BaP	13,02	12,73	19,31	12,26	0,847	0,484
Ind	12,77	11,22	13,00	10,85	1,739	0,191
DahA	12,93	12,68	12,96	11,62	0,267	0,849
BghiP	12,67	11,23	13,04	10,53	0,886	0,465

Sykes *et al.* (2013) descreveram apenas que os materiais teste foram submetidos a ensaio de homogeneidade previamente ao envio para EP, assim como Simon *et al.* (2008). Diferentemente de Hackenberg e Stachel (2013), os quais declaram que testaram a estabilidade do material teste e não encontraram evidência de decomposição dos analitos, porém, não descreveram em quais condições o teste foi realizado e nem relacionaram mais detalhes do resultado.

Este estudo, novamente, representa o único relato publicado na literatura em que a estabilidade a curto prazo foi investigada para oito HPAs em amêndoas de cacau, com o objetivo de se produzir um material teste para ensaio de proficiência.

Pela observação dos dados obtidos no estudo de estabilidade em curto prazo do candidato a material teste para ensaio de proficiência pode ser recomendado o transporte à temperatura ambiente, visto que todos oito os analitos pesquisados apresentaram estabilidade à temperatura de $45 \pm 2^\circ \text{C}$.

Entretanto, quando aplicado o modelo de análise pelos critérios da ISO 13528 (ISO 13528, 2005) e da IUPAC (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2006), cujos resultados são apresentados nas **Tabelas III.4 a III.9**, verifica-se que todos os compostos apresentaram falta de estabilidade a 45°C (para três, seis e nove dias de armazenamento), quando considerados os critérios do teste σ_p . Entretanto, quando se levam em conta os resultados do teste de t, todos os analitos apresentaram lotes estáveis para os três períodos de armazenamento, o que corrobora os resultados da ANOVA e do teste de Tukey. Os perfis de estabilidade segundo critérios da ISO 13528 (ISO 13528, 2005) se diferiram entre os dias de armazenamento, podendo ser destacado que somente os analitos benzo(a)antraceno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno e dibenzo(a,h)antraceno foram estáveis em armazenamento à temperatura de 45°C durante três dias, essa tendência não foi confirmada para o período de seis dias, entretanto, em nove dias de armazenamento, benzo(a)antraceno e benzo(a)pireno apresentaram estabilidade.

Tabela III.4 – Avaliação da estabilidade em curto prazo do material teste produzido, segundo critérios do protocolo da IUPAC (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2006) para 0 e 3 dias de armazenamento a 45° C

Analito	Estatística							
	\bar{X}_c	\bar{X}_e	$ \bar{X}_c - \bar{X}_e $	Critério teste de t*			Critério σ_p **	
				t	p	Conclusão	0,1 σ_p	Conclusão
BaA	10,84	11,06	0,217	-0,13	0,899	Lote estável	-0,022	Lote não estável
Cris	13,60	12,15	1,452	1,08	0,303	Lote estável	0,145	Lote não estável
BbF	14,02	11,55	2,466	1,52	0,159	Lote estável	0,247	Lote não estável
BkF	11,50	11,75	0,246	-0,22	0,832	Lote estável	-0,025	Lote não estável
BaP	13,02	12,73	0,293	0,33	0,749	Lote estável	0,029	Lote não estável
Ind	12,77	11,22	1,556	1,95	0,079	Lote estável	0,156	Lote não estável
DahA	12,93	12,68	0,250	0,15	0,887	Lote estável	0,025	Lote não estável
BghiP	12,67	11,23	1,440	0,96	0,359	Lote estável	0,144	Lote não estável

\bar{X}_c : média controle das concentrações em $\mu\text{g.kg}^{-1}$ de gordura; \bar{X}_e : média experimental das concentrações em $\mu\text{g.kg}^{-1}$;

*critério teste t: $p \geq 0,05$: lote estável; **critério σ_p : $|\bar{X}_c - \bar{X}_e| \leq 0,1 \times \sigma_p$

BaA: benzo(a)antraceno; Cris: criseno; BbF: benzo(b)fluoranteno; BkF: benzo(k)fluoranteno; BaP: benzo(a)pireno; Ind: indeno(1,2,3-cd)pireno; DahA: dibenzo(a,h)antraceno; BghiP: benzo(g,h,i)perileno

Tabela III.5 - Avaliação da estabilidade em curto prazo do material teste produzido, segundo critérios da ISO 13528 (ISO 13528, 2005) para 0 e 3 dias de armazenamento a 45° C

Analito	Estatística				Conclusão*
	$\bar{x}_{t,k}$	$\bar{y}_{t,k}$	$ \bar{x}_{t,k} - \bar{y}_{t,k} $	$0,3 \sigma_p$	
BaA	10,84	11,06	0,217	0,7154	Lote estável
Cris	13,60	12,15	1,452	0,8977	<i>Lote não estável</i>
BbF	14,02	11,55	2,466	0,9252	<i>Lote não estável</i>
BkF	11,50	11,75	0,246	0,7593	Lote estável
BaP	13,02	12,73	0,293	0,8593	Lote estável
Ind	12,77	11,22	1,556	0,8431	<i>Lote não estável</i>
DahA	12,93	12,68	0,250	0,8536	Lote estável
BghiP	12,67	11,23	1,440	0,8362	<i>Lote não estável</i>

$\bar{x}_{t,k}$: média geral controle das concentrações em $\mu\text{g.kg}^{-1}$ de gordura; $\bar{y}_{t,k}$: média geral experimental das concentrações em

$$\mu\text{g.kg}^{-1}; \text{ *critério: } |\bar{x}_{t,k} - \bar{y}_{t,k}| \leq 0,3 \times \sigma_p$$

BaA: benzo(a)antraceno; Cris: criseno; BbF: benzo(b)fluoranteno; BkF: benzo(k)fluoranteno; BaP: benzo(a)pireno; Ind: indeno(1,2,3-cd)pireno; DahA: dibenzo(a,h)antraceno; BghiP: benzo(g,h,i)perileno

Tabela III.6 – Avaliação da estabilidade em curto prazo do material teste produzido, segundo critérios do protocolo da IUPAC (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2006) para 0 e 6 dias de armazenamento a 45° C

Analito	Estatística							
	\bar{X}_c	\bar{X}_e	$ \bar{X}_c - \bar{X}_e $	Critério teste de t*			Critério σ_p **	
				t	p	Conclusão	$0,1 \sigma_p$	Conclusão
BaA	10,84	9,91	0,926	0,60	0,565	Lote estável	0,093	Lote não estável
Cris	13,60	13,64	0,042	-0,02	0,985	Lote estável	-0,004	Lote não estável
BbF	14,02	16,51	2,491	-0,55	0,596	Lote estável	-0,249	Lote não estável
BkF	11,50	12,18	0,671	-0,30	0,774	Lote estável	-0,067	Lote não estável
BaP	13,02	19,31	6,292	-0,89	0,393	Lote estável	-0,629	Lote não estável
Ind	12,77	13,00	0,225	-0,15	0,881	Lote estável	-0,023	Lote não estável
DahA	12,93	12,96	0,026	-0,01	0,988	Lote estável	-0,003	Lote não estável
BghiP	12,67	13,04	0,368	-0,16	0,878	Lote estável	-0,037	Lote não estável

\bar{X}_c : média controle das concentrações em $\mu\text{g.kg}^{-1}$ de gordura; \bar{X}_e : média experimental das concentrações em $\mu\text{g.kg}^{-1}$;

*critério teste t: $p \geq 0,05$: lote estável; **critério σ_p : $|\bar{X}_c - \bar{X}_e| \leq 0,1 \times \sigma_p$

BaA: benzo(a)antraceno; Cris: criseno; BbF: benzo(b)fluoranteno; BkF: benzo(k)fluoranteno; BaP: benzo(a)pireno; Ind: indeno(1,2,3-cd)pireno; DahA: dibenzo(a,h)antraceno; BghiP: benzo(g,h,i)perileno

Tabela III.7 – Avaliação da estabilidade em curto prazo do material teste produzido, segundo critérios da ISO 13528 (ISO 13528, 2005) para 0 e 6 dias de armazenamento a 45° C

Analito	Estatística				Conclusão*
	$\bar{X}_{t,k}$	$\bar{Y}_{t,k}$	$ \bar{X}_{t,k} - \bar{Y}_{t,k} $	$0,3\sigma_p$	
BaA	10,84	9,91	0,926	0,7154	<i>Lote não estável</i>
Cris	13,60	13,64	0,042	0,8977	Lote estável
BbF	14,02	16,51	2,491	0,9252	<i>Lote não estável</i>
BkF	11,50	12,18	0,671	0,7593	Lote estável
BaP	13,02	19,31	6,292	0,8593	<i>Lote não estável</i>
Ind	12,77	13,00	0,225	0,8431	Lote estável
DahA	12,93	12,96	0,026	0,8536	Lote estável
BghiP	12,67	13,04	0,368	0,8362	Lote estável

$\bar{X}_{t,k}$: média geral controle das concentrações em $\mu\text{g.kg}^{-1}$ de gordura; $\bar{Y}_{t,k}$: média geral experimental das concentrações em

$$\mu\text{g.kg}^{-1}; \text{ *critério: } \left| \bar{X}_{t,k} - \bar{Y}_{t,k} \right| \leq 0,3 \times \sigma_p$$

BaA: benzo(a)antraceno; Cris: criseno; BbF: benzo(b)fluoranteno; BkF: benzo(k)fluoranteno; BaP: benzo(a)pireno; Ind: indeno(1,2,3-cd)pireno; DahA: dibenzo(a,h)antraceno; BghiP: benzo(g,h,i)perileno

Tabela III.8 – Avaliação da estabilidade em curto prazo do material teste produzido, segundo critérios do protocolo da IUPAC (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2006) para 0 e 9 dias de armazenamento a 45° C

Analito	Estatística							
	\bar{X}_c	\bar{X}_e	$ \bar{X}_c - \bar{X}_e $	Critério teste de t*			Critério σ_p **	
				t	p	Conclusão	$0,1 \sigma_p$	Conclusão
BaA	10,84	10,92	0,077	-0,06	0,957	Lote estável	-0,008	Lote não estável
Cris	13,60	12,11	1,494	1,01	0,336	Lote estável	0,149	Lote não estável
BbF	14,02	11,46	2,562	1,46	0,175	Lote estável	0,256	Lote não estável
BkF	11,50	10,45	1,052	0,90	0,387	Lote estável	0,105	Lote não estável
BaP	13,02	12,26	0,756	0,42	0,684	Lote estável	0,076	Lote não estável
Ind	12,77	10,85	1,921	1,90	0,087	Lote estável	0,192	Lote não estável
DahA	12,93	11,62	1,311	0,82	0,434	Lote estável	0,131	Lote não estável
BghiP	12,67	10,53	2,134	1,43	0,182	Lote estável	0,213	Lote não estável

\bar{X}_c : média controle das concentrações em $\mu\text{g.kg}^{-1}$ de gordura; \bar{X}_e : média experimental das concentrações em $\mu\text{g.kg}^{-1}$;

*critério teste t: $p \geq 0,05$: lote estável; **critério σ_p : $|\bar{X}_c - \bar{X}_e| \leq 0,1 \times \sigma_p$

BaA: benzo(a)antraceno; Cris: criseno; BbF: benzo(b)fluoranteno; BkF: benzo(k)fluoranteno; BaP: benzo(a)pireno; Ind: indeno(1,2,3-cd)pireno; DahA: dibenzo(a,h)antraceno; BghiP: benzo(g,h,i)perileno

Tabela III.9 – Avaliação da estabilidade em curto prazo do material teste produzido, segundo critérios da ISO 13528 (ISO 13528, 2005) para 0 e 9 dias de armazenamento a 45° C

Analito	Estatística				Conclusão*
	$\bar{X}_{t,k}$	$\bar{Y}_{t,k}$	$ \bar{X}_{t,k} - \bar{Y}_{t,k} $	$0,3 \sigma_p$	
BaA	10,84	10,92	0,077	0,7154	Lote estável
Cris	13,60	12,11	1,494	0,8977	Lote não estável
BbF	14,02	11,46	2,562	0,9252	Lote não estável
BkF	11,50	10,45	1,052	0,7593	Lote não estável
BaP	13,02	12,26	0,756	0,8593	Lote estável
Ind	12,77	10,85	1,921	0,8431	Lote não estável
DahA	12,93	11,62	1,311	0,8536	Lote não estável
BghiP	12,67	10,53	2,134	0,8362	Lote não estável

$\bar{X}_{t,k}$: média geral controle das concentrações em $\mu\text{g.kg}^{-1}$ de gordura; $\bar{Y}_{t,k}$: média geral experimental das concentrações em

$$\mu\text{g.kg}^{-1}; \text{ *critério: } |\bar{X}_{t,k} - \bar{Y}_{t,k}| \leq 0,3 \times \sigma_p$$

BaA: benzo(a)antraceno; Cris: criseno; BbF: benzo(b)fluoranteno; BkF: benzo(k)fluoranteno; BaP: benzo(a)pireno; Ind: indeno(1,2,3-cd)pireno; DahA: dibenzo(a,h)antraceno; BghiP: benzo(g,h,i)perileno

Portanto, quando considerados os resultados das avaliação da estabilidade em curto prazo do material teste, deve-se destacar que todos os analitos sofreram variações significativas em sua concentração devido ao armazenamento a 45° C. Conseqüentemente, indica-se o armazenamento e transporte refrigerado do material em questão, quando se levam em conta os critérios da ISO 13528 (ISO 13528, 2005) e da IUPAC (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2006).

3.1.4 Estabilidade em longo prazo

Na **Tabela III.10**, encontram-se relacionados os resultados da avaliação da estabilidade do material teste, em intervalos de análise de 1 (T1) a 4 meses (T4) após o ensaio de homogeneidade (T0), conforme critérios do protocolo da IUPAC (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2006). Considerando-se os critérios do teste de t e do desvio padrão alvo, pode-se verificar que houve diferença significativa entre os grupos controle (médias das concentrações do T0, em $\mu\text{g.kg}^{-1}$ de gordura) e experimental (médias das concentrações do T4, em $\mu\text{g.kg}^{-1}$ de gordura) ($p < 0,05$). Nessa situação, todos os analitos apresentam instabilidade no período de 4 meses de armazenamento refrigerado, em frascos de vidro âmbar.

Tabela III.10 – Avaliação da estabilidade em longo prazo do material teste produzido, segundo critérios do protocolo da IUPAC (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2006), após 4 meses

Analito	Estatística							
	\bar{X}_c	\bar{X}_e	$ \bar{X}_c - \bar{X}_e $	Critério teste de t^*			Critério σ_p^{**}	
				t	p	Conclusão	$0,1 \sigma_p$	Conclusão
BaA	10,95	16,02	5,069	-8,30	$1,65 \times 10^{-8}$	<i>Lote não estável</i>	-0,507	<i>Lote não estável</i>
Cris	12,72	26,41	13,691	-19,5	$3,14 \times 10^{-16}$	<i>Lote não estável</i>	-1,369	<i>Lote não estável</i>
BbF	8,03	12,75	4,714	-10,1	$3,85 \times 10^{-10}$	<i>Lote não estável</i>	-0,471	<i>Lote não estável</i>
BkF	8,74	14,54	5,803	-12,7	$3,68 \times 10^{-12}$	<i>Lote não estável</i>	-0,580	<i>Lote não estável</i>
BaP	9,27	11,71	2,432	-5,70	$7,24 \times 10^{-6}$	<i>Lote não estável</i>	0,500	<i>Lote não estável</i>
Ind	8,45	12,56	4,108	-11,8	$1,66 \times 10^{-11}$	<i>Lote não estável</i>	-0,411	<i>Lote não estável</i>
DahA	9,58	12,21	2,626	-3,83	$8,17 \times 10^{-4}$	<i>Lote não estável</i>	-0,263	<i>Lote não estável</i>
BghiP	8,20	13,55	5,350	-13,7	$7,36 \times 10^{-13}$	<i>Lote não estável</i>	-0,535	<i>Lote não estável</i>

\bar{X}_c : média controle das concentrações em $\mu\text{g.kg}^{-1}$ de gordura; \bar{X}_e : média experimental das concentrações em $\mu\text{g.kg}^{-1}$;

*critério teste t : $p \geq 0,05$: lote estável; **critério σ_p : $|\bar{X}_c - \bar{X}_e| \leq 0,1 \times \sigma_p$

BaA: benzo(a)antraceno; Cris: criseno; BbF: benzo(b)fluoranteno; BkF: benzo(k)fluoranteno; BaP: benzo(a)pireno; Ind: indeno(1,2,3-cd)pireno; DahA: dibenzo(a,h)antraceno; BghiP: benzo(g,h,i)perileno

De maneira análoga, quando se consideram os critérios da norma ISO 13528 (ISO 13528, 2005), todos os analitos, mais uma vez, são apontados como instáveis no período de armazenamento refrigerado de 4 meses (**Tabela III.11**).

Tabela III.11 – Avaliação da estabilidade em longo prazo do material teste produzido, segundo critérios da ISO 13528 (ISO 13528, 2005), após 4 meses

Analito	Estatística				Conclusão*
	$\bar{X}_{t,k}$	$\bar{Y}_{t,k}$	$ \bar{X}_{t,k} - \bar{Y}_{t,k} $	$0,3\sigma_p$	
BaA	10,95	16,02	5,069	0,7229	<i>Lote não estável</i>
Cris	12,72	26,41	13,691	0,8395	<i>Lote não estável</i>
BbF	8,03	12,75	4,714	0,5303	<i>Lote não estável</i>
BkF	8,74	14,54	5,803	0,5766	<i>Lote não estável</i>
BaP	9,27	11,71	2,432	0,6121	<i>Lote não estável</i>
Ind	8,45	12,56	4,108	0,5576	<i>Lote não estável</i>
DahA	9,58	12,21	2,626	0,6323	<i>Lote não estável</i>
BghiP	8,20	13,55	5,350	0,5410	<i>Lote não estável</i>

$\bar{X}_{t,k}$: média geral controle das concentrações em $\mu\text{g.kg}^{-1}$ de gordura; $\bar{Y}_{t,k}$: média geral experimental das concentrações em

$$\mu\text{g.kg}^{-1}; \text{*critério: } |\bar{X}_{t,k} - \bar{Y}_{t,k}| \leq 0,3 \times \sigma_p$$

BaA: benzo(a)antraceno; Cris: criseno; BbF: benzo(b)fluoranteno; BkF: benzo(k)fluoranteno; BaP: benzo(a)pireno; Ind: indeno(1,2,3-cd)pireno; DahA: dibenzo(a,h)antraceno; BghiP: benzo(g,h,i)perileno

Devido à falta de estabilidade descrita no período de armazenamento refrigerado de 4 meses, houve necessidade da repetição dos testes de acordo com os critérios do protocolo da IUPAC (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2006), após 1 mês (T1) de armazenamento refrigerado (**Tabela III.12**). Observa-se que, nesse período específico, houve indicação de estabilidade para 2 analitos, benzo(a)antraceno e criseno, para os quais não houve diferença significativa entre as médias dos grupos controle (T0) e experimental (T1), quando considerados os critérios do teste de t. Entretanto, quando considerados os critérios de avaliação pelo desvio padrão alvo, também descrito no documento da IUPAC, somente um dos oito analitos pesquisados foi considerado estável: benzo(a)antraceno. Evidencia-se que, o critério do desvio padrão alvo é uma abordagem que possui um caráter mais restritivo, apontando falta de estabilidade para sete dos oito analitos pesquisados.

Tabela III.12 – Avaliação da estabilidade em longo prazo do material teste produzido, segundo critérios do protocolo da IUPAC (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2006), após 1 mês

Analito	Estatística							
	\bar{X}_c	\bar{X}_e	$ \bar{X}_c - \bar{X}_e $	Critério teste de t*			Critério σ_p **	
				t	p	Conclusão	0,1 σ_p	Conclusão
BaA	10,95	10,84	0,115	0,16	0,872	Lote estável	0,011	Lote estável
Cris	12,72	13,60	0,882	-1,02	0,316	Lote estável	-0,088	Lote não estável
BbF	8,03	14,02	5,984	-7,62	$7,43 \times 10^{-8}$	Lote não estável	-0,598	Lote não estável
BkF	8,74	11,50	2,768	-4,28	$2,60 \times 10^{-4}$	Lote não estável	-0,277	Lote não estável
BaP	9,27	13,02	3,745	-6,57	$8,62 \times 10^{-7}$	Lote não estável	-0,375	Lote não estável
Ind	8,45	12,77	4,324	-9,50	$1,33 \times 10^{-9}$	Lote não estável	-0,432	Lote não estável
DahA	9,58	12,93	3,353	-3,72	$1,07 \times 10^{-3}$	Lote não estável	-0,335	Lote não estável
BghiP	8,20	12,67	4,472	-5,89	$4,42 \times 10^{-6}$	Lote não estável	-0,447	Lote não estável

\bar{X}_c : média controle das concentrações em $\mu\text{g.kg}^{-1}$ de gordura; \bar{X}_e : média experimental das concentrações em $\mu\text{g.kg}^{-1}$;

*critério teste t: $p \geq 0,05$: lote estável; **critério σ_p : $|\bar{X}_c - \bar{X}_e| \leq 0,1 \times \sigma_p$

BaA: benzo(a)antraceno; Cris: criseno; BbF: benzo(b)fluoranteno; BkF: benzo(k)fluoranteno; BaP: benzo(a)pireno; Ind: indeno(1,2,3-cd)pireno; DahA: dibenzo(a,h)antraceno; BghiP: benzo(g,h,i)perileno

Na **Tabela III.13** está descrito o resultado da avaliação da estabilidade em longo prazo de acordo com os critérios da norma ISO 13528 (ISO 13528, 2005), após 1 mês (T1) de armazenamento refrigerado do material teste. Verifica-se uma correspondência entre esses resultados e os resultados da avaliação pelo critério do desvio padrão alvo segundo IUPAC (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2006), em que apenas um dos oito analitos pesquisados, benzo(a)antraceno, apresentou estabilidade no período avaliado.

Tabela III.13 – Avaliação da estabilidade em longo prazo do material teste produzido, segundo critérios da ISO 13528 (ISO 13528, 2005), após 1 mês

Analito	Estatística				Conclusão*
	$\bar{x}_{t,k}$	$\bar{y}_{t,k}$	$ \bar{x}_{t,k} - \bar{y}_{t,k} $	$0,3\sigma_p$	
BaA	10,95	10,84	0,115	0,7229	Lote estável
Cris	12,72	13,60	0,882	0,8395	Lote não estável
BbF	8,03	14,02	5,984	0,5303	Lote não estável
BkF	8,74	11,50	2,768	0,5766	Lote não estável
BaP	9,27	13,02	3,745	0,6121	Lote não estável
Ind	8,45	12,77	4,324	0,5576	Lote não estável
DahA	9,58	12,93	3,353	0,6323	Lote não estável
BghiP	8,20	12,67	4,472	0,5410	Lote não estável

$\bar{x}_{t,k}$: média geral controle das concentrações em $\mu\text{g.kg}^{-1}$ de gordura; $\bar{y}_{t,k}$: média geral experimental das concentrações em

$$\mu\text{g.kg}^{-1}; \text{*critério: } |\bar{x}_{t,k} - \bar{y}_{t,k}| \leq 0,3 \times \sigma_p$$

BaA: benzo(a)antraceno; Cris: criseno; BbF: benzo(b)fluoranteno; BkF: benzo(k)fluoranteno; BaP: benzo(a)pireno; Ind: indeno(1,2,3-cd)pireno; DahA: dibenzo(a,h)antraceno; BghiP: benzo(g,h,i)perileno

Em seus estudos, Sykes *et al.* (2013) e Simon *et al.* (2008) não consideraram o estudo de estabilidade em longo prazo do material teste para ensaio de proficiência. Por outro lado, Hackenberg e Stachel (2013) destacam que estudaram a estabilidade do material antes das amostras serem enviadas para o EP e nenhuma evidência de decomposição dos analitos foi percebida, entretanto, o procedimento pelo qual esses autores testam a estabilidade do material não é evidenciado no estudo.

Novamente, em relação a matriz cacau e produtos derivados, este estudo em questão, também, representa o único relato publicado na literatura em que a estabilidade em longo prazo foi investigada para oito HPAs em amêndoas de cacau, com o objetivo de se produzir um material teste para ensaio de proficiência.

Navarro *et al.* (2010) estudaram a estabilidade em longo prazo durante um período de 13 meses, de um material de tecido de molusco, em cinco diferentes intervalos. Cinco frascos de cada temperatura de armazenamento foram selecionados aleatoriamente e analisados, sendo que seis frascos que se encontravam na temperatura de referência foram analisados ao mesmo tempo. Os autores concluíram que os analitos acenafteno, fluoranteno, fenantreno, pireno, benzo(a)antraceno, criseno, benzo(a)pireno e benzo(g,h,i)perileno foram estáveis à temperatura de -20°C ,

mas não à temperatura de refrigeração, 4° C. Diferentemente de Win *et al.* (1998), que realizaram estudo de estabilidade em longo prazo em material de referência de óleo de coco, sob diferentes condições de armazenamento (4, 25 e 40° C) em 12 meses, analisando os MRs a cada 3 meses (RM 458) ou a um intervalo de 9 meses (RM 459). O método utilizado para a avaliação da estabilidade baseou-se na comparação entre os resultados da homogeneidade e da estabilidade apenas usando critérios do teste de t. Os autores concluíram que ambos os materiais foram estáveis a 25° C durante um período de 12 meses e que o material adicionado de HPAs (RM 459), também, mostrou estabilidade a 40° C em relação às frações de massas de HPAs (WIN *et al.*, 1998).

Pela observação dos dados fornecidos pelas **Tabelas III.10, III.11, III.12 e III.13**, verifica-se que houve uma tendência de aumento da concentração dos HPAs em relação ao tempo de armazenamento. Em 2008, Guillén *et al.* observaram formação de HPAs de baixo peso molecular no headspace de amostras de óleo de girassol, armazenadas em embalagens fechadas por 112 meses à temperatura ambiente. Segundo esses autores, durante esse tempo, o único processo de degradação ocorrido no óleo foi a oxidação, sugerindo que esse processo químico leva à geração de radicais livres insaturados, os quais, na presença de quantidades limitadas de oxigênio, podem evoluir para a formação de ciclos aromáticos, ou podem ocorrer reações entre produtos de oxidação secundária que são insaturados (GUILLÉN *et al.*, 2008). No entanto, o uso de frascos âmbar, como os que foram utilizados para o armazenamento do material de amêndoas de cacau, minimiza a oxidação dos lipídios do produto, constituindo uma proteção à penetração da luz ultravioleta. Apesar desse fato, deve-se considerar que não foi utilizada atmosfera modificada para o envase dos frascos, permitindo a presença de pequena quantidade de oxigênio dentro da embalagem.

Segundo Machado *et al.* (2014), que estudaram a formação de HPAs na cachaça, esses contaminantes podem ser formados durante o processamento ou podem ser incorporados através do contato com os recipientes que transportam essas substâncias. Os autores descrevem que o armazenamento da cachaça sucessivamente nos mesmos recipientes de plástico pode ser responsável pela contaminação da bebida com HPAs. Além disso, conforme Moret e Conte (2000), há possibilidade de contaminação de óleos vegetais com HPAs por redifusão de filmes

de polietileno reciclado usados para embalagem de óleos. No estudo em questão, não foram utilizados recipientes de plástico, mas, sim, frascos de vidro âmbar. Todos os frascos utilizados para armazenamento do material de amêndoas de cacau foram adequadamente limpos e rinsados com solvente orgânico (acetona), conforme orientação da EFSA para o preparo de vidrarias para análise de HPAs (EFSA, 2008). Entretanto, as tampas utilizadas nos frascos eram de material plástico, as quais não passaram pelo mesmo procedimento de limpeza que o vidro (considerando-se que estavam adequadamente embaladas e esterilizadas), mas deve-se considerar a hipótese de que o nonano (utilizado para incorporação do padrão no material) possa ter ocasionado essa redifusão de contaminantes das tampas plásticas.

Esse fenômeno do aumento da concentração dos HPAs, também, pode ser explicado por um aumento dos sólidos totais do material, ocasionado por uma possível desidratação do produto em armazenamento refrigerado ou pela evaporação do solvente (nonano) utilizado para incorporação do padrão. Tal fato pode ter possibilitado um aumento do nível de HPAs adicionados em relação ao peso do produto final.

4 CONCLUSÃO

Os resultados do procedimento piloto indicaram que, através da comparação das recuperações dos padrões de HPAs, a incorporação dos padrões ao material teste pela utilização do nonano foi mais satisfatória.

O material teste para ensaio de proficiência foi, portanto, produzido nas condições otimizadas pelo procedimento piloto: primeiramente, moagem e tamisação da amêndoa de cacau congelada por nitrogênio líquido, seguida da incorporação parcial de HPAs previamente solubilizados em nonano, posteriormente homogeneização da fração incorporada em misturador *drum* e mistura das frações incorporada e não incorporada em misturador do tipo “V”. Seguiu-se a estocagem em frascos de vidro âmbar, rotulagem e armazenamento sob refrigeração.

Houve falta de homogeneidade apenas para o composto dibenzo(a,h)antraceno quando considerados os critérios de avaliação da ISO 13528 (ISO 13528, 2005). Todo o lote foi considerado homogêneo para todos os HPAs pesquisados pelos critérios da IUPAC (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2006), destacando maior rigor do teste preconizado pela norma ISO 13528.

No caso da estabilidade em curto prazo, no período de três, seis e nove dias em armazenamento a 45° C, o lote foi considerado estável pelos critérios do teste de *t* (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2006) para todos os analitos. No entanto, todos os analitos sofreram variações significativas em sua concentração devido ao armazenamento a 45° C, de acordo com os critérios da ISO 13528 (ISO 13528, 2005) e do desvio padrão alvo da IUPAC (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2006), evidenciando-se que o transporte do material deve ser refrigerado.

Na avaliação da estabilidade em longo prazo, no período de um mês de armazenamento refrigerado, o lote foi estável apenas para o composto benzo(a)antraceno pelos critérios da IUPAC (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2006) e da ISO 13528 (ISO 13528, 2005), para o período de um mês sob refrigeração. Esse resultado reforça a ideia de que o material preparado de HPAs em amêndoas de cacau deve ser utilizado com o intuito único de se realizar um ensaio de proficiência e não pode ser usado como material de referência e nem adquirir a certificação. Na preparação de um novo material de HPAs em amêndoas de cacau, outras

possibilidades de incorporação do padrão, além de armazenamento congelado e embalagem a vácuo, devem ser consideradas caso o objetivo final seja a estabilidade desse material por um período superior ao contemplado neste estudo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas). ABNT ISO GUIA 31:2004. Materiais de referência – Conteúdo de certificados e rótulos. Rio de Janeiro: ABNT, 2004. 8 p.

ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas). ABNT ISO GUIA 32:2000. Calibração em química analítica e uso de materiais de referência certificados. Rio de Janeiro: ABNT, 2000. 7 p.

ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas). ABNT ISO GUIA 33:2002. Utilização de materiais de referência certificados. Rio de Janeiro: ABNT, 2002. 28 p.

ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas). ABNT ISO GUIA 34. Requisitos gerais para a competência de produtores de material de referência. Rio de Janeiro, 2004.

ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas). ABNT ISO Guia 35. Materiais de referência – Princípios gerais e estatísticos para certificação. Rio de Janeiro: ABNT, 2012. 73 p.

AFOAKWA, E. O. *et al.*. Chemical composition and physical quality characteristics of Ghanaian cocoa beans as affected by pulp pre-conditioning and fermentation. **J. Food Sci. Technol.**, v. 50, n. 6, p. 1097-1105, 2013.

AGUINAGA, N. *et al.* Determination of 16 polycyclic aromatic hydrocarbons in milk and related products using solid-phase microextraction coupled to gas chromatography–mass spectrometry. **Anal. Chim. Acta**, v. 596, p. 285–290, 2007.

ALONSO, J. I. G.; RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ, P. **Isotope Dilution Mass Spectrometry**, 1. ed. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2013. 453 p.

ANDRADE, J. M.; ESTÉVEZ-PÉREZ, M. G.. Statistical comparison of the slopes of two regression lines: A tutorial. **Anal. Chim. Acta**, v. 838, p. 1–12, 2014.

ARMITAGE, P.; BERRY, G.; MATTHEWS, J. N. S. **Statistical methods in medical research**. 4 ed., Oxford: Blackwell Science Ltd., 2002. 832 p.

AZEREDO, A.; TOLEDO, M. C. de F.; CAMARGO, M. C. R. de. Determinação de benzo(a)pireno em pescados. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 26, n. 1, 5 p., 2006.

BADOLATO, E. S. G. *et al.* Systematic study of benzo[a]pyrene in coffee samples. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 17, p. 989-993, 2006.

BAHIA. **Secretaria de Ciência, Tecnologia e Inovação: agenda tecnológica do arranjo produtivo do cacau**. Salvador, 2006. 40 p.

BANSAL, S.; DESTEFANO, A. Key Elements of Bioanalytical Method Validation for Small Molecules. **AAPS J.**, v.9, p. 109-114, 2007.

BARBOSA, L. H. C. (2005). O uso da espécie *Callinectes sapidus* na avaliação da contaminação da fração biodisponível de hidrocarbonetos poliaromáticos (HPAs). Programa de Pós-Graduação em Oceanografia Física, Química e Geológica. Rio Grande, Fundação Universidade Federal do Rio Grande. Mestrado: 73.

BARROS, C. B. de. Validação de métodos analíticos. **Biológico**, v. 64, n. 2, p. 175-177, 2002.

BELITZ, H. D.; GROSCH, W. **Food chemistry**. 2 ed. Berlin: Springer Verlag, 1999. p. 702-711.

BELO, R. F. C. *et al.* 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, D. W. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) em aguardentes. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 25, n. 2, p. 234-238, 2005.

BOLETIM PIB. CNA Brasil. Disponível em: <<http://www.canaldoprodutor.com.br/>>
Acesso em: 28 nov. 2015.

BORDAJANDI, L. R. *et al.* Optimisation of the GC-MS conditions for the determination of the 15 EU foodstuff priority polycyclic aromatic hydrocarbons. **J. Sep. Sci.**, v. 31, p. 1769-1778, 2008.

BOSTRÖM, C. *et al.* Cancer Risk Assessment, Indicators, and Guidelines for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Ambient Air. **Environ. Health Persp.**, v. 110, s. 3, 2002.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Secretaria de Defesa Agropecuária, Instrução Normativa número 24, de 24 de julho de 2009. Define os requisitos e critérios específicos para funcionamento dos Laboratórios de Análises de Resíduos e Contaminantes em Alimentos e Fluxograma PNCRC. Diário Oficial da União. Brasília, 22 jul. 2009. p. 7-14.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa no 8, de 29 de abril de 2010. Aprova os Programas de Controle de Resíduos e Contaminantes em Carne (Bovina, Aves, Suína e Equina), Leite, Mel, Ovos e Pescado do exercício de 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RE Nº899 de 29.05.2003, Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC nº 2, de 15 de janeiro de 2007, Aprova regulamento técnico sobre aditivos aromatizantes.

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

CAMARGO, M. C. R., ANTONIOLLI, P. R., & VICENTE, E. HPLC-FLD simultaneous determination of 13 polycyclic aromatic hydrocarbons: Validation of an analytical procedure for soybean oils. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 22, p. 1354–1361, 2011.

CAMARGO, M. C. R. *et al.* Determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) em guaraná em pó (*Paullinia cupana*). **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 26, i. 1, 5 p., 2006.

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

CAMARGO, M. S. F. O; TOLEDO, M. C. F. Efeito do processamento na contaminação de óleo refinado de milho por benzo(a)pireno. **Braz. J. Food Technol.**, v. 1, 10 p., 1998.

CARDONE, M. J. New technique in chemical assay calculations. 2. Correct solution of the model problem and related concepts. **Anal. Chem.**, v. 58, p. 438-445, 1986.

CARPENTER, D. R. *et al.* Lipid composition of *Herrania* and *Theobroma* seeds. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, v. 71, n.8, p. 845–851, 1994.

CARUSO, M. S. F.; ALABURDA, J. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos - benzo(a)pireno: uma revisão. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 67, i. 1, 27 p., 2008.

COSTOPOULOU, D. *et al.* Determination of PCDD/F, dioxin-like PCB and PAH levels in olive and olive oil samples from areas affected by the fires in summer 2007 in Greece. **Chemosphere**, v. 79, p. 285-291. 2010.

CUADROS-RODRÍGUEZ, L. *et al.* Correction function on biased results due to matrix effects - Application to the routine analysis of pesticide residues, **Anal. Chim. Acta**, v. 478, 281–301, 2003.

CUADROS-RODRÍGUEZ, L. *et al.* Principles of analytical calibration/quantification for the separation sciences. **J. Chromatogr. A**, v. 1158, p. 33–46, 2007.

CUENCA, M. A. G.; NAZÁRIO, C. C. **Importância Econômica e Evolução da Cultura do Cacau no Brasil e na Região dos Tabuleiros Costeiros da Bahia entre 1990 e 2002**. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2004. 25 p.

DANYI, S. *et al.* Analysis of EU priority polycyclic aromatic hydrocarbons in food supplements using high performance liquid chromatography coupled to an ultraviolet, diode array or fluorescence detector. **Anal. Chim. Acta**, v. 633, p. 293–299, 2009.

DHARMAPUTRA, O. S.; RETNOWATI, I.; AMBARWATI, S. Stored cocoa beans quality affected by fermentation and *Ephestia cautella* walker (lepidoptera: phycitidae) infestation. **Biotropia**, n. 15, p. 58-75, 2000.

DILETTI, G. *et al.* Isotope dilution determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in olive pomace oil by gas chromatography–mass spectrometry. **J. Chromatogr. A**, v. 1062, p. 247-254, 2005.

DIONEX. Extraction of Fat from Chocolate Using Accelerated Solvent Extraction (ASE®). Application Note 344. 2004. Disponível em: < http://www.dionex-france.com/library/literature/application_notes_updates/AN344_LPN1230-01.pdf>. Acesso em: 20 mai 2014.

DU, B. *et al.* Evaluation of an isotope dilution liquid chromatography tandem mass spectrometry method for pharmaceuticals in fish. **J. Chromatogr. A**, v. 1253, p. 177–183, 2012.

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.

EC (European Commission). Regulamento (CE) n.º 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 Europeia, Bruxelas, 19 dez. 2006. L 364, p. 5-24.

EC (European Commission). Regulamento (CE) no 2007/333/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 Europeia, Bruxelas, 29 mar. 2007. L 88, p. 29-38.

EFRAIM, P. *et al.* Influência da fermentação e secagem de amêndoas de cacau no teor de compostos fenólicos e na aceitação sensorial. **Ciênc. Tec. Alim.**, v. 30(Supl.1), p. 142-150, 2010.

EFSA (European Food Safety Authority). Scientific opinion of the panel on contaminants in the food chain on a request from the European Commission on Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Food. **The EFSA Journal**, v. 724, p. 1-114, 2008.

ELLERBE, P. *et al.* Determination of serum cholesterol by a modification of the isotope dilution mass spectrometric definitive method. **Anal. Chem.**, v. 61, p. 1718, 1989.

ELLISON, S. L. R.; THOMPSON, M.. Standard additions: myth and reality. **Analyst**, v. 133, p. 992–997, 2008.

ELLISON, S. L. R.; WILLIAMS, A.. **Eurachem/CITAC guide: Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement**. 3. ed. 2012. 141 p. Disponível em: <<http://www.eurachem.org>>. Acesso em: 15 jul. 2013.

EMONS, H.; HELD, A.; ULBERTH, F. Reference materials as crucial tools for quality assurance and control in food analysis. **Pure Appl. Chem.**, v. 78, i. 1, p. 135-143. 2006.

EPA (United States Environmental Protection Agency), Water: CWA Methods, Priority Pollutants, Disponível em: <<http://water.epa.gov/scitech/methods/cwa/pollutants.cfm>>. Acesso em: 03 fev 2014.

ERNEY, D. R. *et al.* Explanation of the matrix-induced chromatographic response enhancement of organophosphorus pesticides during open tubular column gas chromatography with splitless or hot on-column injection and flame photometric detection. **J. Chromatogr. A**, v. 638, p. 57-63, 1993.

EU (European Union). Commission Regulation (EU) No 835/2011 of 19 August 2011 amending Regulation (EC) No 1881/2006 as regards maximum levels for polycyclic aromatic hydrocarbons in foodstuffs. Official Journal of the European Union, Bruxelles, 20 ago. 2011. L 215, p. 4-8. (a)

EU (European Union). Commission Regulation (EU) No 836/2011 of 19 August 2011 amending Regulation (EC) No 333/2007 laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of lead, cadmium, mercury, inorganic tin, 3-MCPD and benzo(a)pyrene in foodstuffs. Official Journal of the European Union, Bruxelles, 20 ago. 2011. L 215, p. 9-16. (b)

EURACHEM/CITAC. **Guide to quality in analytical chemistry**. Teddington: LGC, 2002. 57 p.

FAJGELJ, A.; AMBRUS, A.. **Principles Practices of Method Validation**. 1 ed.. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2000. 314 p.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) Dados FAOSTAT. Disponível em: <<http://faostat.fao.org>>. Acesso em: 05 maio 2014.

FASSETT, J. D.. Isotopic and Nuclear Analytical Techniques in Biological Systems: A Critical Study. Part x. Elemental isotope dilution analysis with radioactive and stable isotopes. **Pure Appl. Chem.**, v. 67, p. 1943-1949, 1995.

FEARN, T.; THOMPSON, M. A new test for sufficient homogeneity. **Analyst**, v. 126, p. 1414-1417, 2001.

FIORAVANTI, C. H.; VELHO, L. Fungos, fazendeiros e cientistas em luta contra a vassoura-de-bruxa. **Sociologias**, v. 13, p. 256–283, 2011.

GALINARO, C. A.; FRANCO, D. W. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) em cachaça, rum, uísque e álcool combustível. **Quím. Nova**, v. 32, i. 6, 8 p., 2009.

GOMES, P. **Fruticultura Brasileira**. 1. ed. São Paulo: Nobel, 1972. 446 p.

GONZÁLEZ, F. J. E. *et al.* Matrix-effects of vegetable commodities in electron-capture detection applied to pesticide multiresidue analysis. **J. Chromatogr. A**, v. 966, p. 155–165, 2002.

GONZÁLEZ-GAGO, A. *et al.* Determination of ultra-trace levels of priority PBDEs in water samples by isotope dilution GC(ECNI)MS using ⁸¹Br-labelled standards. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 401, p. 2639–2649, 2011.

GRAZIELLE, Jaíne. A planta do cacau. *Ciência & Tudo*, 2012. Disponível em: <<http://www.ufvjm.edu.br/site/cienciaetudo/2012/06/29/758/>>. Acesso em: 02 jul. 2014.

GUILLÉN, M. D. *et al.* Evidence of the Formation of Light Polycyclic Aromatic Hydrocarbons during the Oxidation of Edible Oils in Closed Containers at Room Temperature. **J. Agric. Food Chem.**, v. 56, p. 2028–2033, 2008.

GUIMARÃES, L. M. P. Memórias partilhadas: os relatos dos viajantes oitocentistas e a ideia de civilização do cacau. **História, Ciências, Saúde - Manguinhos**, Rio de Janeiro, v. 8 (suplemento), p. 1059-1070, 2001.

HACKENBERG, R.; STACHEL, C. Preparation of test material and evaluation of a proficiency test for official food control laboratories on the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in baby food. **Polycycl. Aromat. Comp.**, v. 33, p. 20–30, 2013.

HAJŠLOVÁ, J.; ČAJKA, T. Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). In: PICÓ, Y. **Food Toxicants Analysis: Techniques, Strategies and Developments**. 1. ed. Amsterdam. Elsevier, 2007. p. 419-471.

HENRION, A.. Reduction of systematic errors in quantitative analysis by isotope dilution mass spectrometry (IDMS): an iterative method. **Fresenius J. Anal. Chem.**, v. 350, p. 657-658, 1994.

HEWAVITHARANA, A. K.. Matrix matching in liquid chromatography–mass spectrometry with stable isotope labelled internal standards—Is it necessary? **J. Chromatogr. A**, v. 1218, p. 359–361, 2011.

HILL, A.R.C.; REYNOLDS, S.L. Guidelines for in-house validation of analytical methods for pesticide residues in food and animal feeds. **Analyst**, v. 124, p. 953-958, 1999.

HORWITZ, W. Quality assurance in the analysis of foods for trace constituents. **J. AOAC Int**, v. 63, p. 1344-1355, 1980.

HORWITZ, W. Validation: an invisible component of measurement. AOAC Int., Arlington, Va. 2003. Disponível em: <<http://www.aoac.org>>. Acesso em: 10 jan. 2005.

HORWITZ, W ed. **AOAC Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists**, 18^a ed., 2005.

HUBER, L. **Validation of analytical methods: review and strategy**. LC/GC International, p. 96-105, Feb. 1998.

IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). Levantamento sistemático da produção agrícola. Pesquisa mensal de previsão e acompanhamento das safras agrícolas no ano civil. Dezembro 2015 Produção. Disponível em: <[ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Levantamento_Sistematico_da_Producao_Agricola_\[mensal\]/Fasciculo/2015/lspa_201512.pdf](ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Levantamento_Sistematico_da_Producao_Agricola_[mensal]/Fasciculo/2015/lspa_201512.pdf)>. Acesso em: 29 out. 2016.

ICCO (International Cocoa Organization). Disponível em: <<http://www.icco.org>>. Acesso em: 10 mar. 2014.

ICCO (International Cocoa Organization). Frequently asked questions. Disponível em: <<http://www.icco.org/faq.html>>. Acesso em: 05 out. 2015.

ILAC (International Laboratory Accreditation Cooperation). **ILAC Guidelines for the Requirements for the Competence of Providers of Proficiency Testing Schemes**. Silverwater , 2007. 35 p.

ILAC (International Laboratory Accreditation Cooperation). **ILAC Discussion Paper on Homogeneity and Stability Testing**. (PTCG_HandS_April0808), 2008. Disponível em: <<https://www.gso.org.sa/gso-website/gso-website/activities-ar/accreditation/pt/ptcg-hands-april0808.pdf>>. Acesso em: 01 jul. 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.

ISAE/FGV. **Cacau: Pontencialidades Regionais e Estudo de Viabilidade Econômica**. Manaus: Suframa, 2003.

ISHIZAKI, A. *et al.* 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. Chromatogr. A**, v. 1217, p. 5555–5563, 2010.

ISO 5725-2. Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results – Part 2: Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method. Geneva: ISO 5725-2. 42 p., 1994.

ISO 13528. Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparisons, Geneva: ISO 13528. 76p, 2005.

ISO Guide 30. Terms and definitions used in connection with reference materials. Geneva: ISO Guide 30. 8 p., 2008.

ISO/IEC 17025. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. Geneva: ISO/IEC 17025. 28 p., 2005.

ISO/IEC 17043. Conformity assessment – General requirements for proficiency testing. Geneva: ISO 17043. 41 p., 2010.

JECFA (Joint Expert Committee on Food Additives). Summary and conclusions. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Roma, Sexagésima Quarta Reunião, 47 p., 2005.

JINAP, S.; THIEN, J.; YAP, T. N., Effect of drying on acidity and volatile fatty acids content of cocoa beans. **J. Sci. Food Agric.**, v. 65, p. 67–75, 1994.

KUMARI, R. *et al.* Optimization and validation of an extraction method for the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in chocolate candies. **J. Food Sci.**, v. 77, p. T34–T40, 2012.

KUMARI, R. *et al.* Solid phase micro extraction combined with gas chromatography-mass spectrometry for the trace analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in chocolate, **Anal. Methods**, v. 5, p. 1946, 2013.

LI, X. Q. *et al.* Evaluation of matrix effect in isotope dilution mass spectrometry based on quantitative analysis of chloramphenicol residues in milk powder. **Anal. Chim. Acta**, v. 807, p. 75-83, 2014.

LINSINGER, T. P. J. *et al.* Homogeneity and stability of reference materials. **Accredit Qual Assur**, v. 6, p. 20-25, 2001.

LOPES, U. V. *et al.* On farm selection for witches' broom resistance in Bahia, Brazil: a historical retrospective. **Agrotrópica**, v.16, p.61-66, 2004.

LOWOR, S. T. *et al.* Post-harvest sources of polycyclic aromatic hydrocarbon contamination of cocoa beans: A simulation. **Int. J. AgriScience**, v. 2, p. 1043–1052, 2012.

MACHADO, A. M. R. *et al.* Contamination of cachaça by PAHs from storage containers. **Food Chem.**, v. 146, p. 65–70, 2014.

MAGALHÃES, D.; BRUNS, R. E.; Vasconcellos, P. C. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos como traçadores da queima de cana-de-açúcar: uma abordagem estatística. **Quím. Nova**, v. 30, n. 3, 5 p., 2007.

MAGNUSSON, B.; ÖRNEMARK, U. Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, 2 ed., 2014. Disponível em: <<http://www.eurachem.org>>. Acesso em: 10 abr. 2015.

MAIER, E.A.; QUEVAUVILLER, P.; GRIEPINK, B. Interlaboratory studies as a toll for many purposes: proficiency testing, learning exercises, quality control and certification of matrix materials. **Anal. Chim. Acta**, v. 283, p. 590-599, 1993.

MARCÉ, R. M.; BORRULL, F. Solid-phase extraction of polycyclic aromatic compounds. **J. Chromatogr. A**, v. 885, p. 273-290, 2000.

MARQUES, A. C.; VALENTE, T. B.; ROSA, C. S. da. Formação de toxinas durante o processamento de alimentos e as possíveis consequências para o organismo humano. **Rev Nutr.**, v. 22, n. 2, 11 p., 2009.

MARTINI, M. H. Caracterização das sementes de seis espécies de *Theobroma* em relação ao *Theobroma cacao* L. Faculdade de Engenharia de Alimentos da Unicamp. 2004. 98 p. (Tese, Doutorado em Alimentos e Nutrição)

MARTINI, M. H. et al. Localization of the cotyledon reserves of *Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) K. Schum., *T. subincanum* Mart., *T. bicolor* Bonpl. and their analogies with *T. cacao* L. **Rev. bras. Bot.**, v.31, n. 1, p.147-154, 2008.

MARTINS, J .M. *et al.* **Melhoria da qualidade do cacau**. Ilhéus: CEPLAC/CENEX, 2012. 45 p.

MEIRE, R. O.; AZEREDO, A.; TORRES, J. P. M. Aspectos ecotoxicológicos de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. **Oecol. Bras.**, v. 11 (2), p. 188-201, 2007

MILLER, J. N.; MILLER, J. C.. **Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry**. 6 ed.. Harlow: Pearson Education Limited ,2010. 297 p.

MISNAWI. Effect of cocoa bean drying methods on polycyclic aromatic hydrocarbons contamination in cocoa butter. **Int. Food Res. J.**, v. 19, p. 1589–1594, 2012.

MORET, S.; CONTE, L.S. Polycyclic aromatic hydrocarbons in edible fats and oils: occurrence and analytical methods. **J. Chromatogr. A**, v. 882, p. 245 –253, 2000.

NATA (National Association of Testing Authorities – Australia). Technical note 17. Format and content of test methods and procedures for validation and verification of chemical test methods. Sydney: NATA, 1997. 8 p.

NAVARRO, P. *et al.* Preparation of a reference mussel tissue material for polycyclic aromatic hydrocarbons and trace metals determination. **Anal. Chim. Acta**, v. 675, p. 91–96, 2010.

NEVES, L. R. S. (2006). Avaliação da contaminação de óleo no ambiente estuarino da Baía de Guanabara (RJ) pela determinação fluorimétrica de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) na bÍlis de peixe Mugil liza. Pós-Graduação em Química. Rio de Janeiro, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro. Mestrado: 120.

OETTERER, M.; REGITANO-D'ARCE, M. A. B.; SPOTO, M. H. F. **Fundamentos de ciência e tecnologia de alimentos**. 1. ed. Barueri, SP: Manole, 2006. 632 p.

OKE, D. O.; OMOTAYO, F. Effect of forced-air artificial intermittent drying on cocoa beans in South-Western Nigeria. **J. Cereals Oilseeds**, v. 3, p. 1-5, 2012.

ORLANDI, Francesca del Bove. **Cadeia de Valores do Cacau em São Tomé e Príncipe. Pós-graduação em Engenharia Alimentar**. 2011. 114 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Alimentar) - Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 2011. Disponível em: <<https://www.repository.utl.pt/bitstream/10400.5/4172/1/Tese.pdf>>. Acesso em: 24 abr. 2014.

PALMA, S. F.. Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos em produtos cárneos fumados. *Segurança e Qualidade Alimentar*. Lisboa, Editideias, v. 5, 3 p., 2008.

PEREIRA NETO, A. D. *et al.* Avaliação da contaminação humana por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) e seus derivados nitratos (NHPAS): uma revisão metodológica. **Quím. Nova**, v.23, n.6, p.765-773, 2000.

PIHLSTRÖM, T.; FERNÁNDEZ-ALBA, A. R.. European Commission, Health & Consumer Protection Directorate-General. Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed(SANCO/12571/2013), rev. 0, 2013. Disponível em: <http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/guidance_documents/docs/qualcontrol_en.pdf>. Acesso em: 02 jul. 2014.

PINTO, J. I. A. Estudo dos níveis de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em *Nodipecten nodosus* (Coquilles Saint-Jacques) de Fazendas Marinhas da Bahia da Ilha Grande-RJ. 2008. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca. Rio de Janeiro, Ministério da Saúde - Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ). 2008. 100 p.

PISSINATTI, R. *et al.* Simultaneous analysis of 10 polycyclic aromatic hydrocarbons in roasted coffee by isotope dilution gas chromatography-mass spectrometry: Optimization, in-house method validation and application to an exploratory study. **Food Control**, v. 51, p. 140-148, 2015.

PLAZA-BOLAÑOS, P.; FRENICH, A. G.; MARTÍNEZ VIDAL, J. L. Polycyclic aromatic hydrocarbons in food and beverages. Analytical methods and trends. **J. Chromatogr. A**, v. 1217, p. 6303–6326, 2010.

POSTER, D. L. *et al.* 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. Rapid validated method for the analysis of benzo[a]pyrene in vegetable oils by using solid-phase microextraction–gas chromatography–mass spectrometry. **J. Chromatogr. A**, v. 1176, p. 231–235, 2007.

RAMALHOSA, M. J. *et al.* Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in fish: evaluation of a quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe extraction method. **J. Sep. Sci.**, v. 32, p. 3529-3538, 2009.

RAPOSO, F. Evaluation of analytical calibration based on least-squares linear regression for instrumental techniques: A tutorial review. **Trends Anal. Chem. TrAC**, v. 77, p. 167–185, 2016.

RATERS, M.; MATISSEK, R. Quantitation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH4) in Cocoa and Chocolate Samples by an HPLC-FD Method. **J. Agric. Food Chem.**, v. 62, p. 10666–10671, 2014.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Quím. Nova**, v. 27, n. (5), p. 771-780, 2004.

RIBEIRO, F. A. L. *et al.* Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. **Quím. Nova**, v. 31, n. 1, p. 164-171. 2008.

RODRIGUES, T.; ALBANO, F.; SILVA, M. Preparação e certificação de materiais de referência através de ensaios de Proficiência: estudo de caso da rede metrológica RS. 49º Congresso Brasileiro de Química. Associação Brasileira de Química. Porto Alegre, Rio Grande do Sul. 2p. 2009.

RODRIGUEZ-CAMPOS, J. *et al.* Dynamics of volatile and non-volatile compounds in cocoa (*Theobroma cacao* L.) during fermentation and drying processes using principal components analysis. **Food Res. Int.**, v. 44, p. 250–258, 2011.

RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ, P. *et al.* Isotope dilution analysis for elemental speciation: A tutorial review. **Spectrochim. Acta**, v. 60, p. 151– 207, 2005.

ROEBBEN, G. *et al.* Reference materials and representative test materials: the nanotechnology case. **J Nanopart Res**, v. 15, n. 1455, p. 1-13, 2013.

ROSE, M. *et al.* 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.

SADOWSKA-ROCIEK, A.; SURMA, M.; CIEŚLIK, E. Determination of PAHs in cocoa samples using d-SPE with different sorbents. **J. Microbiol. Biotech. Food Sci.**, v. 4 (special issue 3), p. 135-137, 2015.

SALTINI, R., AKKERMAN, R., & FROSCHE, S. Optimizing chocolate production through traceability: A review of the influence of farming practices on cocoa bean quality. **Food Control**, v. 29, p. 167-187, 2013.

SÁNCHEZ-BRUNETE, C.; MIGUEL, E.; TADEO, J. L. Analysis of 27 polycyclic aromatic hydrocarbons by matrix solid-phase dispersion and isotope dilution gas chromatography-mass spectrometry in sewage sludge from the Spanish area of Madrid. **J. Chromatogr. A**, v. 1148, p. 219–227, 2007.

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. 49 p.

SCF (Scientific Committee on Food), (2002). Opinion of the Scientific Committee on Food on the risks to human health of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in food. (expressed on 4 December 2002). Disponível em: <http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out153_en.pdf>. Acesso em: 15 de maio de 2010.

SERPE, F. P. *et al.* Optimisation and validation of an HPLC method for determination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in mussels. **Food Chem.**, v. 122, p. 920–925, 2010.

SILVA, A. P.; ALVES, M. C. C. Como iniciar a validação de métodos analíticos. ENQUALAB-2006 - Congresso e Feira da Qualidade em Metrologia. REMESP. São Paulo, Brasil: 8 p. 2006.

SILVA, C. R. L.; CARVALHO, M. A. C. Funções de Exportação de Alimentos para o Brasil. XLVI Congresso da Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural. Sociedade Brasileira de Economia. Rio Branco, Acre: 18 p. 2008.

SILVA NETO, P. J. (Coord.) *et al.* **Sistema de produção de cacau para a Amazônia brasileira.** Belém: CEPLAC, 2001.

SIMON, R. *et al.* Results of a European inter-laboratory comparison study on the determination of EU priority polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in edible vegetable oils. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 391, p. 1397–1408, 2008.

SMITH, D.; LYNAM, K. GC/MS Analysis of European Union (EU) Priority Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) using an Agilent J&W DB-EUPAH GC Column with a Column Performance Comparison. Agilent Technologies, Inc., 2010. Disponível em: <<http://www.chem.agilent.com/Library/applications/5990-4883EN.pdf>>. Acesso em: 15 jan. 2012.

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.

SOUZA, S. V. C.; PINTO, C. T.; JUNQUEIRA, R. G. In house method validation: application in arsenic analysis. **J. Food Comp. Anal.**, v. 20, p. 241-247, 2007.

SPERS, E. E. Mecanismos de regulação da qualidade e segurança em alimentos. São Paulo. Faculdade de Economia, Administração e Contabilidade da USP. 2003. 155 p. (Tese, Doutorado em Administração)

STEINBERG, F. M.; BEARDEN, M. M.; KEEN, C. L. Cocoa and chocolate flavonoids: Implications for cardiovascular health. **J. Am. Diet. Assoc.**, v. 103, p. 215-223, 2003.

STÜBER, M.; REEMTSMA, T. Evaluation of three calibration methods to compensate matrix effects in environmental analysis with LC-ESI-MS. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 378, p. 910–916, 2004.

SYKES, M. *et al.* Proficiency test results for PAH analysis are not method-dependent. **Anal. Methods**, v. 5, p. 5345, 2013.

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, 7 p. 2007.

THOMPSON, M. What is proficiency testing? Guide for end-users of chemical data. **amc technical briefs**, AMCTB 18A, 2005. Disponível em: < http://www.rsc.org/images/proficiency-testing-technical-brief-18A_tcm18-214885.pdf>. Acesso em: 19 out. 2016.

THOMPSON, M.; ELLISON, S.L.R.; WOOD, R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. **Pure Appl. Chem.**, v. 74, p. 835-855, 2002.

THOMPSON, M.; ELLISON, S.L.R.; WOOD, R. The international harmonized protocol for the proficiency testing of analytical chemistry laboratories. **Pure Appl. Chem.**, v. 78, p. 145–196, 2006.

THOMPSON, M.; LOWTHIAN, P.J. Statistical aspects of proficiency testing in analytical laboratories. Part 2. Testing for sufficient homogeneity. **Analyst**, v.121, p. 1593-1596, 1996.

THOMPSON, M.; WOOD, R. Harmonized guidelines for internal quality control in analytical chemistry laboratories. **Pure Appl. Chem.**, v. 67, p. 649-666, 1995.

VAN DER VEEN, A. M. H.; LINSINGER, T. P. J.; LAMBERTY, A.; PAUWELS, J. Uncertainty calculations in the certification of reference materials. 3. Stability study. **Accredit Qual Assur**, v. 6, p. 257-263, 2001.

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.

VERÍSSIMO, Ana João Mendes. **Efeito da origem do cacau na sua qualidade comercial, funcional e sensorial**. O caso do cacau Catongo de São Tomé e Príncipe e do Brasil. 2012. Dissertação (Mestrado em Engenharia Alimentar). 87 f. Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 2012. Disponível em: <<https://www.repository.utl.pt/bitstream/10400.5/5378/1/Tese%2de%20Mestrado.pdf>>. Acesso em: 24 abr. 2014.

VESSMAN, J. *et al.* Selectivity in Analytical Chemistry (IUPAC Recommendations 2001). **Pure Appl. Chem.**, v. 73, p. 1381-1386, 2001.

VEYRAND, B. *et al.* 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. Chromatogr. A**, v. 1149, p. 333–344, 2007.

VIM (International Vocabulary of Metrology). **Basic and general concepts and associated terms**, JCGM. 3 ed: 104 p., 2012.

WANDAN, E. N.; ELLEINGAND, E. F.; NDOUBA, A. M. A screening for benzo[a]pyrène in cocoa beans subjected to different drying methods during on farm processing. **IJEST**, v. 3, n. 5, p. 3621-3630, 2011.

WANG, J. H.; GUO, C. Ultrasonication extraction and gel permeation chromatography clean-up for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in edible oil by an isotope dilution gas chromatography–mass spectrometry. **J. Chromatogr. A**, v. 1217, p. 4732-4737, 2010.

WATSON, R.; PREEDY, V. R.; ZIBADI, S. **Chocolate in Health and Nutrition**. New York: Humana Press. 574 p. 2013.

WENZL, T. *et al.* Analytical methods for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in food and the environment needed for new food legislation in the European Union. **Trends Anal. Chem. TrAC**, v. 25, i. 7, p. 716-725, 2006.

WIECZOREK, J *et al.* The occurrence of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in infusion of natural coffee, coffee substitute and cocoa. **Rocz. Panstw. Zakl. Hig.**, v. 53, n. 3, p.231-236, 2002.

WIN, T. *et al.* Reference materials for PAHs in foodstuffs: Results of the certification exercise of two coconut oil reference materials. **Fresenius J. Anal. Chem.**, v. 360, p. 640–644, 1998.

WILLUMSEN, M. J.; DUTT, A. K. Café, cacau e crescimento econômico no Brasil. **Rev Econ Pol.**, v. 11, n. 3 (43), p. 49-67, 1991.

WOOD, R.; THOMPSON, M.. Proficiency testing in analytical laboratories: how to make it work. **Accred. Qual. Assur.**, v. 1, p. 49–56, 1996.

WRETLING, S.; ERIKSSON A.; ESKHULT, G. A.; LARSSON, B. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in Swedish smoked meat and fish. **J. Food Comp. Anal.**, p. 1-9. 2010.

YAMADA, M. M. *et al.* Genetic variability in cultivated cacao populations in Bahia, Brazil, detected by isozymes and RAPD markers. **Crop Breed. Appl. Biotechnol.**, v.1, p.377-384, 2001.

YARITA, T.; AOYAGI, Y.; OTAKE, T. Evaluation of the impact of matrix effect on quantification of pesticides in foods by gas chromatography–mass spectrometry using isotope-labeled internal standards. **J. Chromatogr. A**, v. 1396, p. 109–116, 2015.

YU, L. *et al.* Isotope Dilution-GC-MS/MS Analysis of 16 Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Selected Medicinal Herbs Used as Health Food Additives. **Food Addit. Contam. Part A**, v. 29, p. 1800-1809, 2012.

ZIEGENHALS, K.; SPEER, K.; JIRA, W. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in chocolate on the German market. **J. Verbrauch. Lebensm.**, v. 4, p. 128-135. 2009.

ZROSTLÍKOVÁ, J. *et al.* Alternative calibration approaches to compensate the effect of co-extracted matrix components in liquid chromatography–electrospray ionisation tandem mass spectrometry analysis of pesticide residues in plant materials. **J. Chromatogr. A**, v. 973, p. 13–26, 2002.

APÊNDICE A

Materiais teste para ensaio de proficiência para hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em alimentos disponibilizados por provedores internacionais

Nome ou Código do EP	Provedor	Matriz	Analitos	Valores atribuídos e incerteza	Apresentação	Preço
PT 1060	JRC	Moluscos liofilizados	Benzo(a)antraceno	$3,12 \pm 0,35 \mu\text{g.kg}^{-1}$	30 g em frascos de vidro âmbar	
			Criseno	$5,66 \pm 0,54 \mu\text{g.kg}^{-1}$		
			Benzo(b)fluoranteno	$4,91 \pm 0,57 \mu\text{g.kg}^{-1}$		
			Benzo(a)pireno	$0,77 \pm 0,12 \mu\text{g.kg}^{-1}$		
			Soma 4 HPAs	$14,46 \pm 0,87 \mu\text{g.kg}^{-1}$		
PT 1060	JRC	Moluscos congelados	Benzo(a)antraceno	$3,66 \pm 0,25 \mu\text{g.kg}^{-1}$	30 g em frascos de vidro âmbar	€ 300
			Criseno	$5,28 \pm 0,29 \mu\text{g.kg}^{-1}$		
			Benzo(b)fluoranteno	$4,85 \pm 0,42 \mu\text{g.kg}^{-1}$		
			Benzo(a)pireno	$3,99 \pm 0,34 \mu\text{g.kg}^{-1}$		
			Soma 4 HPAs	$17,78 \pm 0,66 \mu\text{g.kg}^{-1}$		
EU-RL PT 824	EC-JRC-IRMM	Azeite de oliva	Benzo(a)antraceno	$2,79 \pm 0,02 \mu\text{g.kg}^{-1}$	20 g em ampolas de vidro âmbar de 25 mL	€ 250
			Criseno	$2,77 \pm 0,03 \mu\text{g.kg}^{-1}$		
			Benzo(b)fluoranteno	$5,32 \pm 0,05 \mu\text{g.kg}^{-1}$		
			Benzo(a)pireno	$2,27 \pm 0,03 \mu\text{g.kg}^{-1}$		
			Soma 4 HPAs	$13,15 \pm 0,07 \mu\text{g.kg}^{-1}$		

Nome ou Código do EP	Provedor	Matriz	Analitos	Valores atribuídos e incerteza	Apresentação	Preço
EU-RL PT 822	EC-JRC-IRMM	Manteiga de cacau	Benzo(a)antraceno	1,55 ± 0,07 µg.kg ⁻¹	20 mL em <i>vials</i> de vidro âmbar	
			Criseno	2,28 ± 0,15 µg.kg ⁻¹		
			Benzo(b)fluoranteno	1,20 ± 0,06 µg.kg ⁻¹		
			Benzo(a)pireno	0,86 ± 0,03 µg.kg ⁻¹		
			Soma 4 HPAs	5,89 ± 0,18 µg.kg ⁻¹		
EU-RL PT 822	EC-JRC-IRMM	Chocolate amargo	Benzo(a)antraceno	1,72 ± 0,09 µg.kg ⁻¹	30 g em <i>vials</i> de vidro âmbar	€ 250
			Criseno	2,12 ± 0,11 µg.kg ⁻¹		
			Benzo(b)fluoranteno	1,02 ± 0,06 µg.kg ⁻¹		
			Benzo(a)pireno	0,78 ± 0,04 µg.kg ⁻¹		
			Soma 4 HPAs	5,64 ± 0,16 µg.kg ⁻¹		
EU-RL PT-2011 on PAHs in olive oil	EC-JRC-IRMM	Azeite de oliva	Benzo(a)antraceno	2,79 ± 0,02 µg.kg ⁻¹	20 g em ampolas de vidro âmbar de 25 mL	
			Criseno	2,77 ± 0,03 µg.kg ⁻¹		
			Benzo(b)fluoranteno	5,32 ± 0,05 µg.kg ⁻¹		
			Benzo(a)pireno	2,27 ± 0,03 µg.kg ⁻¹		
			Soma 4 HPAs	13,15 ± 0,07 µg.kg ⁻¹		
EU-RL PT 1101	EC-JRC-IRMM	Suplemento alimentar (extrato seco de erva-de-são-joão)	Benzo(a)antraceno	2,98 ± 0,24 µg.kg ⁻¹	15 g do pó em <i>vials</i> de vidro âmbar	€ 250
			Criseno	4,07 ± 0,81 µg.kg ⁻¹		
			Benzo(b)fluoranteno	2,92 ± 0,28 µg.kg ⁻¹		
			Benzo(a)pireno	1,65 ± 0,26 µg.kg ⁻¹		
			Soma 4 HPAs	11,62 ± 0,93 µg.kg ⁻¹		

Nome ou Código do EP	Provedor	Matriz	Analitos	Valores atribuídos e incerteza	Apresentação	Preço
EU-RL PAHs PT 2014 Interlaboratory comparison 423 – spirulina	EC-JRC-IRMM	Pó de spirulina naturalmente contaminado e homogeneizado	Benzo(a)antraceno	4,64 ± 0,31 µg.kg ⁻¹	20 g em frasco âmbar com tampa metálica	
			Criseno	11,77 ± 0,88 µg.kg ⁻¹		
			Benzo(b)fluoranteno	9,90 ± 0,60 µg.kg ⁻¹		
			Benzo(a)pireno	3,56 ± 0,24 µg.kg ⁻¹		
			Soma de 4 HPAs	29,87 ± 1,13 µg.kg ⁻¹		
EU-RL PAHs PT 2014 Interlaboratory comparison 423 – fish oil	EC-JRC-IRMM	Óleo de peixe fortificado	Benzo(a)antraceno	3,33 ± 0,28 µg.kg ⁻¹	20 g em ampola de vidro âmbar	€ 350
			Criseno	3,57 ± 0,39 µg.kg ⁻¹		
			Benzo(b)fluoranteno	4,34 ± 0,26 µg.kg ⁻¹		
			Benzo(a)pireno	3,29 ± 0,19 µg.kg ⁻¹		
			Soma de 4 HPAs	14,54 ± 0,58 µg.kg ⁻¹		
EU-RL PAHs PT 2014 Interlaboratory comparison 424 – smoked sausage	EC-JRC-IRMM	Salsicha defumada naturalmente contaminada e homogeneizada	Benzo(a)antraceno	6,44 ± 0,41 µg.kg ⁻¹	20 g em frasco âmbar com tampa metálica	€ 300
			Criseno	6,70 ± 0,52 µg.kg ⁻¹		
			Benzo(b)fluoranteno	4,93 ± 0,42 µg.kg ⁻¹		
			Benzo(a)pireno	8,54 ± 0,49 µg.kg ⁻¹		
			Soma de 4 HPAs	26,61 ± 1,21 µg.kg ⁻¹		

Nome ou Código do EP	Provedor	Matriz	Analitos	Valores atribuídos e incerteza	Apresentação	Preço
2 nd inter-laboratory comparison (ILC) of the Community Reference Laboratory for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) on the determination of the 15+1 EU priority PAHs in edible oil and acetonitrile	EC-JRC-IRMM	Óleo comestível	5-metilcriseno	3,29 ± 0,01 µg.kg ⁻¹	20 mL em duas ampolas	Não especificado
			Benzo(a)antraceno	1,17 ± 0,01 µg.kg ⁻¹		
			Benzo(a)pireno	1,36 ± 0,01 µg.kg ⁻¹		
			Benzo(b)fluoranteno	2,60 ± 0,01 µg.kg ⁻¹		
			Benzo(c)fluoreno	7,36 ± 0,08 µg.kg ⁻¹		
			Benzo(g,h,i)perileno	5,41 ± 0,02 µg.kg ⁻¹		
			Benzo(j)fluoranteno	7,05 ± 0,03 µg.kg ⁻¹		
			Benzo(k)fluoranteno	4,19 ± 0,02 µg.kg ⁻¹		
			Criseno	2,19 ± 0,01 µg.kg ⁻¹		
			Ciclopenta(c,d)pireno	6,26 ± 0,02 µg.kg ⁻¹		
			Dibenzo(a,e)pireno	7,00 ± 0,03 µg.kg ⁻¹		
			Dibenzo(a,h)antraceno	2,79 ± 0,01 µg.kg ⁻¹		
			Dibenzo(a,h)pireno	4,58 ± 0,02 µg.kg ⁻¹		
			Dibenzo(a,i)pireno	6,20 ± 0,15 µg.kg ⁻¹		
			Dibenzo(a,l)pireno	1,73 ± 0,01 µg.kg ⁻¹		
Indeno(1,2,3-cd)pireno	8,70 ± 0,03 µg.kg ⁻¹					

Nome ou Código do EP	Provedor	Matriz	Analitos	Valores atribuídos e incerteza	Apresentação	Preço
3 rd inter-laboratory comparison (ILC) of the Community Reference Laboratory for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) on the determination of the 15+1 EU priority PAHs in sausage meat and acetonitrile	EC-JRC-IRMM	Carne de salsicha fortificada	5-metilcriseno	6,2 µg.kg ⁻¹	50 g em lata	Não especificado
			Benzo(a)antraceno	5,9 µg.kg ⁻¹		
			Benzo(a)pireno	5,3 µg.kg ⁻¹		
			Benzo(b)fluoranteno	4,1 µg.kg ⁻¹		
			Benzo(c)fluoreno	3,9 µg.kg ⁻¹		
			Benzo(g,h,i)perileno	4,7 µg.kg ⁻¹		
			Benzo(j)fluoranteno	9,2 µg.kg ⁻¹		
			Benzo(k)fluoranteno	5,2 µg.kg ⁻¹		
			Criseno	6,4 µg.kg ⁻¹		
			Ciclopenta(c,d)pireno	6,0 µg.kg ⁻¹		
			Dibenzo(a,e)pireno	7,1 µg.kg ⁻¹		
			Dibenzo(a,h)antraceno	7,7 µg.kg ⁻¹		
			Dibenzo(a,h)pireno	9,9 µg.kg ⁻¹		
			Dibenzo(a,i)pireno	5,6 µg.kg ⁻¹		
Dibenzo(a,l)pireno	7,7 µg.kg ⁻¹					
Indeno(1,2,3-cd)pireno	5,2 µg.kg ⁻¹					

Nome ou Código do EP	Provedor	Matriz	Analitos	Valores atribuídos e incerteza	Apresentação	Preço
4 th inter-laboratory comparison (ILC) organised by the Community Reference Laboratory for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (CRL PAH) on the determination of the 15+1 EU priority PAHs in fish and acetonitrile	EC-JRC-IRMM	Peixe defumado fortificado	5-metilcriseno	4,8 µg.kg ⁻¹	50 g em duas latas	Não especificado
			Benzo(a)antraceno	4,8 µg.kg ⁻¹		
			Benzo(a)pireno	5,6 µg.kg ⁻¹		
			Benzo(b)fluoranteno	5,6 µg.kg ⁻¹		
			Benzo(c)fluoreno	4,7 µg.kg ⁻¹		
			Benzo(g,h,i)perileno	5,5 µg.kg ⁻¹		
			Benzo(j)fluoranteno	4,8 µg.kg ⁻¹		
			Benzo(k)fluoranteno	4,9 µg.kg ⁻¹		
			Criseno	5,2 µg.kg ⁻¹		
			Ciclopenta(c,d)pireno	5,2 µg.kg ⁻¹		
			Dibenzo(a,e)pireno	5,2 µg.kg ⁻¹		
			Dibenzo(a,h)antraceno	5,4 µg.kg ⁻¹		
			Dibenzo(a,h)pireno	4,6 µg.kg ⁻¹		
			Dibenzo(a,i)pireno	5,1 µg.kg ⁻¹		
Dibenzo(a,l)pireno	5,2 µg.kg ⁻¹					
Indeno(1,2,3-cd)pireno	4,1 µg.kg ⁻¹					

Nome ou Código do EP	Provedor	Matriz	Analitos	Valores atribuídos e incerteza	Apresentação	Preço
4 th inter-laboratory comparison (ILC) organised by the Community Reference Laboratory for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (CRL PAH) on the determination of the 15+1 EU priority PAHs in fish and acetonitrile	EC-JRC-IRMM	Peixe fortificado com um extrato de óleo de sabor defumado	5-metilcriseno	<LOD	50 g em duas latas	Não especificado
			Benzo(a)antraceno	1,9 µg.kg ⁻¹		
			Benzo(a)pireno	0,94 µg.kg ⁻¹		
			Benzo(b)fluoranteno	0,70 µg.kg ⁻¹		
			Benzo(c)fluoreno	4,1 µg.kg ⁻¹ (apenas indicativo)		
			Benzo(g,h,i)perileno	0,39 µg.kg ⁻¹		
			Benzo(j)fluoranteno	0,49 µg.kg ⁻¹		
			Benzo(k)fluoranteno	0,36 µg.kg ⁻¹		
			Criseno	2,4 µg.kg ⁻¹		
			Ciclopenta(c,d)pireno	0,33 µg.kg ⁻¹		
			Dibenzo(a,e)pireno	<LOQ		
			Dibenzo(a,h)antraceno	<LOQ		
			Dibenzo(a,h)pireno	<LOD		
			Dibenzo(a,i)pireno	<LOD		
			Dibenzo(a,l)pireno	<LOD		
Indeno(1,2,3-cd)pireno	0,33 µg.kg ⁻¹					

Nome ou Código do EP	Provedor	Matriz	Analitos	Valores atribuídos e incerteza	Apresentação	Preço
EC JRC IRMM – CRL-PAH-08	EC-JRC-IRMM	Azeite de oliva	5-metilcriseno	1,1 µg.kg ⁻¹	20 g em ampola	Não especificado
			Benzo(a)antraceno	2,4 µg.kg ⁻¹		
			Benzo(a)pireno	3,0 µg.kg ⁻¹		
			Benzo(b)fluoranteno	5,4 µg.kg ⁻¹		
			Benzo(c)fluoreno	1,8 µg.kg ⁻¹		
			Benzo(g,h,i)perileno	6,2 µg.kg ⁻¹		
			Benzo(j)fluoranteno	1,4 µg.kg ⁻¹		
			Benzo(k)fluoranteno	8,2 µg.kg ⁻¹		
			Criseno	3,4 µg.kg ⁻¹		
			Ciclopenta(c,d)pireno	7,7 µg.kg ⁻¹		
			Dibenzo(a,e)pireno	1,0 µg.kg ⁻¹		
			Dibenzo(a,h)antraceno	3,8 µg.kg ⁻¹		
			Dibenzo(a,h)pireno	2,5 µg.kg ⁻¹		
			Dibenzo(a,i)pireno	9,8 µg.kg ⁻¹		
			Dibenzo(a,l)pireno	1,5 µg.kg ⁻¹		
Indeno(1,2,3-cd)pireno	3,8 µg.kg ⁻¹					

Nome ou Código do EP	Provedor	Matriz	Analitos	Valores atribuídos e incerteza	Apresentação	Preço
FAPAS 0668	FAPAS	Peixe defumado	Benzo(a)antraceno, Criseno, Benzo(b)fluoranteno, Benzo(a)pireno, Indeno(1,2,3-cd)pireno, Benzo(g,h,i)perileno, Soma de 4 HPAs	Não especificado (em andamento)	50 g	Não especificado
FAPAS 0669	FAPAS	Óleo de oliva	5-metilcriseno, Benzo(a)antraceno, Benzo(a)pireno, Benzo(b)fluoranteno, Benzo(c)fluoreno, Benzo(g,h,i)perileno, Benzo(j)fluoranteno, Benzo(k)fluoranteno, Criseno, Ciclopenta(c,d)pireno, Dibenzo(a,e)pireno, Dibenzo(a,h)antraceno, Dibenzo(a,h)pireno, Dibenzo(a,i)pireno, Dibenzo(a,l)pireno, Indeno(1,2,3-cd)pireno, Soma de 4 HPAs	Não especificado (em andamento)	30 mL	Não especificado