



UFAL

**INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA**

LÚCIA GUIOMAR BASTO FRAGOSO DE ALMEIDA

**DESENVOLVIMENTO DE SENSOR ELETROQUÍMICO À BASE DE FERROCENO
CARBOXÍLICO PARA DETECÇÃO DE HPA'S EM DERIVADOS
DE CANA-DE-AÇÚCAR**

Universidade Federal de Alagoas

**Campus A. C. Simões
Tabuleiro do Martins
57072-970 - Maceió-AL**

LÚCIA GUIOMAR BASTO FRAGOSO DE ALMEIDA

**DESENVOLVIMENTO DE SENSOR ELETROQUÍMICO À BASE DE FERROCENO
CARBOXÍLICO PARA DETECÇÃO DE HPA'S EM DERIVADOS
DE CANA-DE-AÇÚCAR**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação do Instituto de Química e Biotecnologia na Universidade Federal de Alagoas, como requisito para obtenção do grau de Doutora em Ciências.

Orientadora: Profa. Dra. Fabiane Caxico de Abreu Galdino
Co-orientador: José Ginaldo Junior
(*in memoriam*)

MACEIÓ - AL

2018

Catlogação na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central

Bibliotecário: Marcelino de Carvalho

A447d Almeida, Lúcia Guiomar Basto Fragoso de.
Desenvolvimento de sensor eletroquímico à base de ferroceno carboxílico para detecção de HPA`s em derivados de cana-de-açúcar / Lúcia Guiomar Basto Fragoso de Almeida. – 2019.
75 f. : il.

Orientadora: Fabiane Caxico de Abreu Galdino.
Co-orientador: José Ginaldo Junior.
Tese (Doutorado em ciências) – Universidade Federal de Alagoas.
Instituto de Química e Biotecnologia. Maceió, 2018.

Bibliografia: f. 67-75.

1. Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. 2. Técnicas biossensoriais.
3. Ácido ferroceno carboxílico. 4. Voltametria. 5. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). 6. Cana-de-açúcar. I. Título.

CDU: 543.552:547.555



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E
BIOTECNOLOGIA



BR 104 Km14, Campus A. C. Simões
Cidade Universitária, Tabuleiro dos Martins

57072-970, Maceió-AL, Brasil
Fone: (82) 3214-1144

Email: ppgqb.ufal@gmail.com

FOLHA DE APROVAÇÃO

Membros da Comissão Julgadora da Defesa de Tese da Doutoranda LÚCIA GUIOMAR BASTO FRAGOSO DE ALMEIDA intitulada: "DESENVOLVIMENTO DE SENSOR ELETROQUÍMICO À BASE DE FERROCENO CARBOXÍLICO PARA DETECÇÃO DE HPA'S EM DERIVADOS DE CANA-DE-AÇÚCAR", apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas no dia 27 de dezembro de 2018, às 09h, na sala de reuniões do IQB/UFAL.

COMISSÃO JULGADORA

Fabiane Caxico de Abreu Galdino
Prof.^a Dr.^a Fabiane Caxico de Abreu Galdino
(PPGQB/IQB/UFAL) Orientadora

Prof. Dr. José Ginaldo Júnior
(In memoriam - IFAL) - Coorientador

Josiclea Pereira Rogério
Prof.^a Dr.^a Josiclea Pereira Rogério
(UNIT)

Emanuella Gomes da Silva
Dr.^a Emanuella Gomes da Silva
(UPA)

Diógenes Mendes dos Santos
Prof. Dr. Diógenes Mendes dos Santos
(PPGQB/IQB/UFAL)

**“O conhecimento torna a alma jovem e diminui a amargura da velhice.
Colhe, pois, a sabedoria. Armazena suavidade para o amanhã.”**

Leonardo Da Vinci

À minha “**MAINHA**” Helena Basto de Castro Reis. Mãe, amiga e mestra na universidade da vida, me ensinou que o conhecimento é a pedra mais preciosa que nós podemos carregar conosco pela eternidade.

AGRADECIMENTOS

À Santíssima Trindade, e a Maria de Nazaré que estão presentes na minha vida e me guiam e inspiram todos os dias.

À Minha Orientadora e mestra Prof^a Dr^a Fabiane Caxico de Abreu Galdino pelo conhecimento a mim confiado e por me ensinar a ser uma fortaleza em todos os momentos.

Ao meu Coorientador José Ginaldo Júnior pelo pouco tempo no qual convivemos e o amor de irmão a que ele me dedicou (*in memoriam*).

À minha filha Helena Beatriz que é o primeiro raio de sol que enxergo todas as manhãs e que me ensina a sonhar sempre.

Ao meu esposo Jefferson Leon por seu apoio, paciência e amor incondicional, me mostrando o amplo sentido de companheirismo, dedicação, enfim, aquilo que me renova e fortalece todos os dias: **a nossa família**.

À minha Voinha Guiomar Basto de Castro Reis, que me ensinou as primeiras letras como também ser a força motriz de uma família (*in memoriam*).

Às minhas Tias: Beatriz Basto de Castro Reis (*in memoriam*) que foi meu espelho de inteligência e cumpriu o papel de meu pai sempre e a Nadyr Basto de Castro Reis (*in memoriam*) que me desafiava e me impulsionava

À minha segunda mãe Marlene Silva por todos os dias de motivação e superação.

Ao meu amigo e colaborador Aldy, em especial.

Ao meu amigo irmão, conselheiro e anjo da guarda Prof^o Aparecido

À minha fiel escudeira Elisa Gabriela pela ajuda e parceria todas as horas

E aos meus colegas e amigos do LEMAN (Ygor, Samaísa, Carol, Sara, Angladis, Guimarães, Tânia, Cris, Marília, Renata e todos os outros) nos quais pude contar com a força e contribuição para a conclusão deste trabalho, a valiosa ajuda de várias pessoas, de diversas formas, foi fundamental e eu não poderia deixar de registrar.

E a todos os pesquisadores e estudiosos os quais pude beber das suas descobertas científicas e assim compilar conhecimento suficiente para compor meus estudos.

RESUMO

Os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPA's) são compostos orgânicos voláteis provenientes da combustão incompleta de matéria orgânica e compreendem uma importante classe de contaminantes ambientais, muitos deles comprovadamente carcinogênicos. No presente estudo, foram analisadas amostras de derivados de cana-de-açúcar como também padrões de 5 HPA's, sendo eles antraceno, benzo(a)pireno, benzo(b)fluoranteno, fenantreno e naftaleno, os quais foram escolhidos devido a sua alta carcinogenicidade. Com o objetivo de preparar um eletrodo de ouro modificado com ferroceno carboxílico, analisar o comportamento eletroquímico das substâncias de interesse e desenvolver um sensor eletroquímico para análises de HPA's, foram realizados estudos utilizando eletrodo de carbono vítreo e de ouro modificado com ferroceno carboxílico. Experimentos com Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e Voltametria Cíclica foram desenvolvidos para comprovar que o processo de modificação do eletrodo de ouro foi eficaz, ou seja, a reação do grupo amino livre com o grupo carboxílico, formando o grupo amida. A metodologia foi aplicada no sentido de realizar análises por Voltametria Cíclica e Voltametria de Pulso Diferencial, Ressonância magnética de prótons (RMN¹H) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) com detector de fluorescência. Os resultados obtidos evidenciaram que os padrões de HPA's não são eletroativos em pH 7. Um novo sensor foi preparado e caracterizado, este formado a partir de ouro modificado com ferroceno carboxílico, no qual foi apresentada resposta catalítica para todos os HPA's estudados. Com esse sensor foi possível construir curvas de calibração bem como analisar a presença dos HPAs antraceno, benzo(b) fluoretano, fenentreno e naftaleno em amostras reais, sendo açúcar demerara, açúcar mascavo, mel de engenho, e rapadura. A análise de RMN¹H não demonstrou detecção à presença de HPA's nas amostras estudadas. Análises com Cromatografia Líquida de Alta Eficiência foi possível validar a presença dos HPA's. Esse projeto demonstrou a praticidade e eficiência do sensor eletroquímico para a análise dos HPA's testados.

Palavras-chave: Sensor modificado; ácido ferroceno carboxílico; voltametria, CLAE.

ABSTRACT

Aromatic Polycyclic Hydrocarbons (HPA's) are volatile organic compounds from the incomplete combustion of organic matter and comprise an important class of environmental contaminants, many of which are proven to be carcinogenic. In the present study, samples of sugarcane derivatives as well as 5 HPA's were analyzed, being anthracene, benzo (a) pyrene, benzo (b) fluoranthene, phenanthrene and naphthalene, which were chosen due to their high carcinogenicity. In order to prepare a gold electrode modified with ferrocene carboxylic acid, to analyze the electrochemical behavior of the substances of interest and to develop an electrochemical sensor for analysis of HPA's, studies were carried out using a glassy carbon electrode and gold modified with carboxylic ferrocene. Experiments with Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) and Cyclic Voltammetry were developed to prove that the process of modification of the gold electrode was effective, that is, the reaction of the free amino group with the carboxylic group, forming the amide group. The methodology was applied in the sense of performing Cyclic Voltammetry and Differential Pulse Voltammetry, Proton Magnetic Resonance (NMR1H) and High Efficiency Liquid Chromatography (HPLC) with fluorescence detector. The results obtained evidenced that the HPA's standards are not electroactive at pH 7. A new sensor was prepared and characterized, this one formed from gold modified with ferrocene carboxylic, in which a catalytic response was presented for all HPA's studied. With this sensor it was possible to construct calibration curves as well as to analyze the presence of the anthracene, benzo (b) fluorethane, phenentrene and naphthalene HPAs in real samples, being demerara sugar, brown sugar, plantain honey and rapadura. The analysis of ^1H NMR showed no evidence of the presence of HPA's in the samples studied. Analysis with High Performance Liquid Chromatography it was possible to validate the presence of PAHs. This project demonstrated the practicality and efficiency of the electrochemical sensor for the analysis of HPA's tested.

Keywords: Modified sensor; ferrocene carboxylic acid; voltammetry, CLAE.

LISTA DE FIGURAS

Figura – 1	Representação esquemática da formação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos por meio de pirólise	18
Figura – 2	Esquema ilustrativo da relação entre exposição e dose, em função da via de exposição	21
Figura – 3	Mecanismos de formação de adutos de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e DNA no organismo	25
Figura – 4	Mecanismo de ativação metabólica do B(a)P e representação esquemática do aduto B(a)P 7,8-diol-9,10-epóxido de guanina no DNA e RNA de pele de camundongo	28
Figura – 5	Mecanismo de ativação dos HPA's	29
Figura – 6	Diferentes componentes de um sensor funcional que vão desde um elemento de reconhecimento molecular (MRE), um elemento transdutor e um componente detector, levando eventualmente a um sinal de resposta de um evento de biossensor	44
Figura – 7	Sistema com os três eletrodos para análises eletroquímicas ...	49
Figura – 8	Esquema ilustrativo dos experimentos de Voltametria Cíclica com eletrodo de carbono vítreo	50
Figura – 9	Esquema de modificação do eletrodo de ouro	51
Figura – 10	Fluxograma do processo de extração de HPA's em amostras reais	53
Figura – 11	Processo de extração de HPA's nas amostras reais. (a) Aparelho Soxhlet em uma manta aquecedora (b) Rotaevaporador para retirada do solvente	54
Figura – 12	a) Espectros de FTIR das substâncias AET, AFC e da mistura EDC + NHS + AET + AFC. b) Espectros mostrando picos característicos entre 500 e 2000 nm	57
Figura – 13	Voltamogramas Cíclicos do eletrodo de ouro modificado com ferroceno carboxílico, em tampão fosfato e velocidade de varredura 0,1 V/s	58

Figura – 14	a) Voltamogramas Cíclicos para avaliação do efeito da velocidade de varredura em eletrodo de ouro na faixa de -0,3 a 0,6 V. b) Plote da corrente em função da raiz quadrada da velocidade de varredura	59
Figura – 15	Voltamogramas Cíclicos em eletrodo de carbono vítreo: a) benzo(a)pireno (5 mM) e (b) benzo(b)fluoranteno (5 mM) em tampão fosfato pH 7,0. Eletrodo de carbono vítreo, $v = 0,100$ V/s	59
Figura – 16	Voltamogramas Cíclicos em eletrodo de carbono vítreo: a) antraceno, b) benzo(a)pireno, c) benzo(b)fluoranteno, d) fenantreno, e e) naftaleno (5 mM) em tampão fosfato pH 7,0. Eletrodo de carbono vítreo, $v = 0,100$ V/s	60
Figura – 17	Provável mecanismo da reação entre HPA's, NBT e ferroceno carboxílico. A direita a estrutura do NBT	62
Figura – 18	Voltamogramas de Pulso Diferencial da solução estoque de antraceno, benzo(a)pireno, benzo(b)fluoranteno, fenantreno, naftaleno todos a $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em eletrodo de ouro modificado na faixa de - 0,3 a 0,6 V	63
Figura – 19	Voltamogramas de Pulso Diferencial da solução estoque: a) açúcar demerara, b) açúcar mascavo, c) mel de engenho e d) rapadura em eletrodo de ouro na faixa de - 0,3 a 0,6 V	65
Figura – 20	Espectros de RMN ¹ H dos HPA's	69
Figura – 21	Espectro de RMN ¹ H da amostra real - açúcar demerara	72
Figura – 22	Cromatograma por CLAE referente à antraceno, benzo(a)pireno, benzo(b)fluoretano, fenantreno e naftaleno, solução padrão. Coluna C18, fase móvel acetronitrila-água	73
Figura – 23	Cromatograma por CLAE referente às amostras reais de açúcar demerara, açúcar mascavo, mel de engenho e rapadura. Coluna C18, fase móvel acetronitrila-água	76

LISTA DE TABELAS

Tabela – 1	HPA's prioritários na literatura	16
Tabela – 2	Propostas para minimizar ou prevenir a contaminação dos alimentos por HPA's	39
Tabela – 3	Diferentes plataformas biossensíveis para detecção de HPA's	46
Tabela – 4	Lista de reagentes de pureza analítica	48
Tabela – 5	Valores de referência das curvas (R ² , LD e LQ)	64
Tabela – 6	Parâmetros A, B e R ² das curvas analíticas para os padrões antraceno, benzo(a)pireno, benzo(b)fluoranteno, fenantreno e naftaleno	64
Tabela – 7	Quantificação de HPA's na amostra de açúcar demerara	66
Tabela – 8	Quantificação de HPA's na amostra de açúcar mascavo	66
Tabela – 9	Quantificação de HPA's na amostra de mel de engenho	67
Tabela – 10	Quantificação de HPA's na amostra de rapadura	67
Tabela – 11	Áreas dos picos dos HPA's nas amostras reais	75
Tabela – 12	Concentrações dos HPA's nas amostras reais	78

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AET	Hidrocloreto de 2-aminoetanotiol
AFC	Ferroceno carboxílico
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
B(a)P	Benzo(a)pireno
CCA	CODEX ALIMENTARIUS
CEPEA	Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada
CETESB	Companhia Nacional do Estado de São Paulo
CG	Cromatografia gasosa
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
COP's	Contaminantes orgânicos persistentes
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
DhA	Dibenzo(a,h)antraceno
EDC	Hidrocloreto de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etil-carbodiimida
EFSA	European Food Safety Authority
ERO	Espécies reativas de oxigênio
ES	Eletrólito de suporte
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
FDA	Food and Drug Administration
HPA's	Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos
JECFA	Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives
Koc	Coeficientes de partição com carbono
Kow	Coeficientes de partição octanol-água
LMT's	Limites de tolerância
MM	Massa molecular
NAP	Naftaleno
NBT	Nitro blue tetrazolium
NHS	N-hidroxisuccinamida
NIOSH	National Institute of Occupational Safety and Health
OMS	Organização Mundial da Saúde
PNAE	Programa Nacional de Alimentação Escolar
PRONAR	Programa Nacional De Controle De Qualidade do Ar
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear

SUMÁRIO

1	Introdução	14
2	Revisão Bibliográfica	16
2.1	Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos	16
2.1.1	Definição de HPA's	16
2.1.2	Formação de HPA's	17
2.1.3	Fontes de emissão de HPA's	19
2.1.4	Tipos de exposição	19
2.2	Características e propriedades físico-químicas dos HPA's	21
2.3	Reatividade dos HPA's	23
2.4	Metabolismo dos HPA's	25
2.5	Genotoxicidade dos compostos de interesse	29
2.6	Legislação dos HPA's.....	31
2.7	Resíduos em alimentos	33
2.8	Canas-de-açúcar e derivados	39
2.9	Métodos de análise de HPA's	41
2.9.1	CLAE	41
2.9.2	RMN ¹ H	41
2.9.3	Métodos eletroquímicos	41
2.9.3.1	Voltametria cíclica	42
2.9.3.2	Voltametria de pulso diferencial	43
2.10	Sensores eletroquímicos para análise de HPA's	43
3	Objetivos	47
3.1	Objetivo geral	47
3.2	Objetivos específicos	47

4	Materiais e métodos	48
4.1	Padrões, solventes, reagentes e amostras	48
4.2	Estudos eletroquímicos	48
4.3	Preparação de eletrodo de ouro modificado com ferroceno carboxílico .	50
4.4	Caracterização do eletrodo de ouro modificado	51
4.5	Extração	52
4.6	RMN ¹ H	54
4.7	CLAE	55
5	Resultados	56
5.1	Caracterização do eletrodo de ouro modificado	56
5.2	Estudos eletroquímicos dos HPA's	59
5.3	Análise eletroquímica de amostras reais	64
5.4	Análise por RMN ¹ H	68
5.5	Validação das análises por CLAE	73
6	Conclusões	80
7	Perspectivas	81
8	Referências Bibliográficas	82

1 Introdução

Os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPA's) são compostos orgânicos voláteis provenientes da combustão incompleta da biomassa, determinados por algumas variáveis como temperatura e pressão (MEIRE; AZEREDO; TORRES, 2007). Dessa forma, incêndios florestais e de campos, como também a queima de combustível fóssil, seriam algumas das fontes principais de HPA's no meio ambiente, ainda as atividades petroquímicas como o processo e o refino na produção de óleo diesel e petróleo, contribuem para o elevado processo de contaminação, (POLAKIEWICZ, 2008). A dieta é a principal fonte de contaminação para organismos vivos, por meio de processos de defumação e cocção de carnes, as frituras sob temperatura extremamente elevada, o consumo de óleos vegetais e a fumaça de tabaco, (SANTOS; GOMES; ROSEIRO, 2011; XIA et al., 2010), (CAMARGO et al., 2011), (CHUNG et al., 2011).

Os HPA's encontram-se entre os contaminantes de maior interesse no estudo da contaminação ambiental em função do seu reconhecido potencial mutagênico, teratogênico e carcinogênico, são compostos altamente estáveis, portanto persistem no meio ambiente devido a sua resistência química, fotoquímica e biológica, possuindo assim uma extensa possibilidade de bioacumulação (DENG et al., 2013; SOLIMAN; AL ANSARI; WADE, 2014).

Os HPA's não são mutagênicos diretos, estes necessitam sofrer ativação metabólica preliminar para se tornarem capazes de reagir com o DNA e outras macromoléculas. As enzimas do sistema monooxigenases de função mista, da família dos citocromos P450 conduz esses mecanismos, os quais formam metabólitos com elevada natureza eletrofílica denominados carcinógenos efetivos (COSTA, 2001).

A cana-de-açúcar é uma das culturas mais presentes no Brasil como também no mundo de acordo com CEPEA (Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada) (BURNQUIST et al., 2018). Existe um crescente aumento neste sentido, contudo apenas 25% da produção brasileira têm colheita mecanizada e o restante é queimado antes da colheita manual, como processo natural da cultura (RIBEIRO; PESQUERO, 2010).

O Estado de Alagoas possui em sua totalidade 54 municípios e aproximadamente 450.000 ha de plantio de cana-de-açúcar, nos quais a colheita mecanizada representa apenas 10,5% de toda a matéria-prima que chega as usinas. Das 17 usinas em operação na safra 17/18, sete utilizaram a colheita mecanizada, ainda que de forma parcial com apenas 20% (SINDACÚCAR, 2017).

Vale salientar que as queimadas emitem materiais particulados que se precipitam na forma de fuligem, poluindo o ar e impactando sobre a saúde humana. No Brasil, entre maio e novembro se realiza a colheita da cana-de-açúcar, esta acontece após a queima dos canaviais. Este processo produtivo primitivo repercute primeiramente na contaminação ambiental, devido o material particulado da palha queimada, que gera fuligem, bem como inúmeros compostos tóxicos dentre os quais destacamos os HPA's que são introduzidos na atmosfera (BETTIN; FRANCO, 2005).

Quanto às estratégias analíticas, existem várias técnicas para isolar os HPA's dos alimentos. Na fase de identificação e quantificação, as técnicas cromatográficas são as mais utilizadas, dando ênfase a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). A mesma se destaca por apresentar resultados rápidos, seguros e limites de detecção e de quantificação inferiores aos obtidos por outras técnicas analíticas, no interesse de estudar a presença e o comportamento dos HPA's em alimentos (LUZ, 2013).

Contudo os sistemas eletroquímicos além de serem robustos e versáteis, possuem baixo custo, transformam sistemas inicialmente complexos em equipamentos portáteis, leves, de fácil uso em qualquer situação, mostrando que o desenvolvimento de eletrodos híbridos, tornam os sistemas mais versáteis, mais precisos, mais sensíveis, de fácil manipulação e emprego. Sendo assim as técnicas voltamétricas se apresentam como uma ótima alternativa para muitas aplicações em química analítica (PACHECO et al., 2013).

O objetivo primordial desta pesquisa é desenvolver um sensor eletroquímico a base de ferroceno carboxílico para detectar HPA's em derivados de cana-de-açúcar, tais como açúcar mascavo, açúcar demerara, rapadura e mel de engenho.

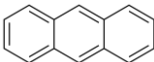
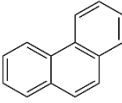
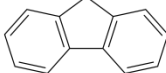
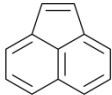
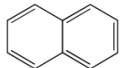
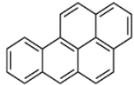
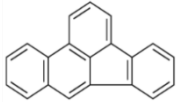
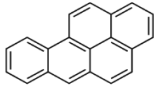
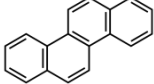
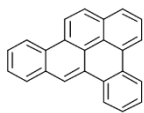
2. Revisão Bibliográfica

2.1. Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos

2.1.1. Definição de HPA's

Os HPA's são poluentes orgânicos voláteis pertencentes a uma classe de compostos orgânicos que possuem dois ou mais anéis benzênicos condensados, podendo também apresentar anéis com menos de seis carbonos (AZEVEDO; ARAÚJO; SILVA, 2013). Esses contaminantes podem ser organizados sob a forma linear, angular ou agrupada (SANTOS, 2014). A tabela 1 mostra alguns exemplos de HPA's mais analisados na literatura.

Tabela 1 - HPA's prioritários na literatura

HPAs	Abreviação	MM (g/mol)	Estrutura química
Baixa massa molecular			
Antraceno	ANT	178,23	
Fenantreno	PHE	178,23	
Fluoreno	Flu	166,22	
Acenaftaleno	Ace	152,20	
Naftaleno	NAP	128, 17	
Alta massa molecular			
Benzo(a) pireno	B(a)P	252,32	
Benzo(b)fluoranteno	B(k)F	252,31	
Pireno	PYR	202,25	
Criseno	CHR	228,3	
Dibenzo[a,e]pyrene	DB(ae)P	302.3	

Fonte: Autora; 2018

2.1.2. Formação dos HPA's

A formação dos HPA's perpassa por dois processos distintos que acontecem em temperaturas elevadas, sendo por meio de calor direto por combustão e de forma indireta por meio de pirólise seguida de pirossíntese. Compostos orgânicos são convertidos em moléculas pequenas não estáveis, por um processo denominado pirólise. Estas e outros radicais se recombina para desta vez produzir moléculas ainda maiores e mais estáveis de HPA's, por meio da pirossíntese. Formados os HPA's, estes podem passar por reações pirossintéticas, dando origem a estruturas mais complexas com anéis altamente condensados (PAZ et al., 2017). Os HPA's não são obrigatoriamente fracionados em fragmentos menores antes da pirossíntese, podendo resistir à fragmentação parcial seguida pela hidrogenação dos seus radicais primários (BETTIN; FRANCO, 2005).

A formação ocorre durante a combustão da matéria orgânica, carbono e hidrogênio reagem com o oxigênio, dando origem a dióxido de carbono e água. Contudo, se não houver oxigênio suficiente o processo de combustão não se completa e parte do combustível dá origem a outros subprodutos como monóxido de carbono e HPA's, no processo pirolítico (GARCIA et al., 2014).

Ao atingirem temperaturas em torno de 300 a 800° durante a combustão incompleta, o oxigênio diminui e a matéria orgânica é reduzida a pequenos fragmentos moleculares, como acetileno (C₂) e 1,3 butadieno (C₄). A maioria dos radicais livres C₂ e C₄ se reorganiza sucessivamente formando HPA's. Contudo pode ocorrer a formação de HPA's à temperaturas mais baixas em torno de 100 a 150°C, entretanto, para isto é necessário um maior período de aquecimento, pois a formação destes compostos é proporcionado por temperaturas elevadas e conforme a temperatura, diferentes HPA's podem ser formados (SCUSSEL, V.M.; GONÇALVES, B.; GARCIA, L. P.; STEIN, S.M.,2015).

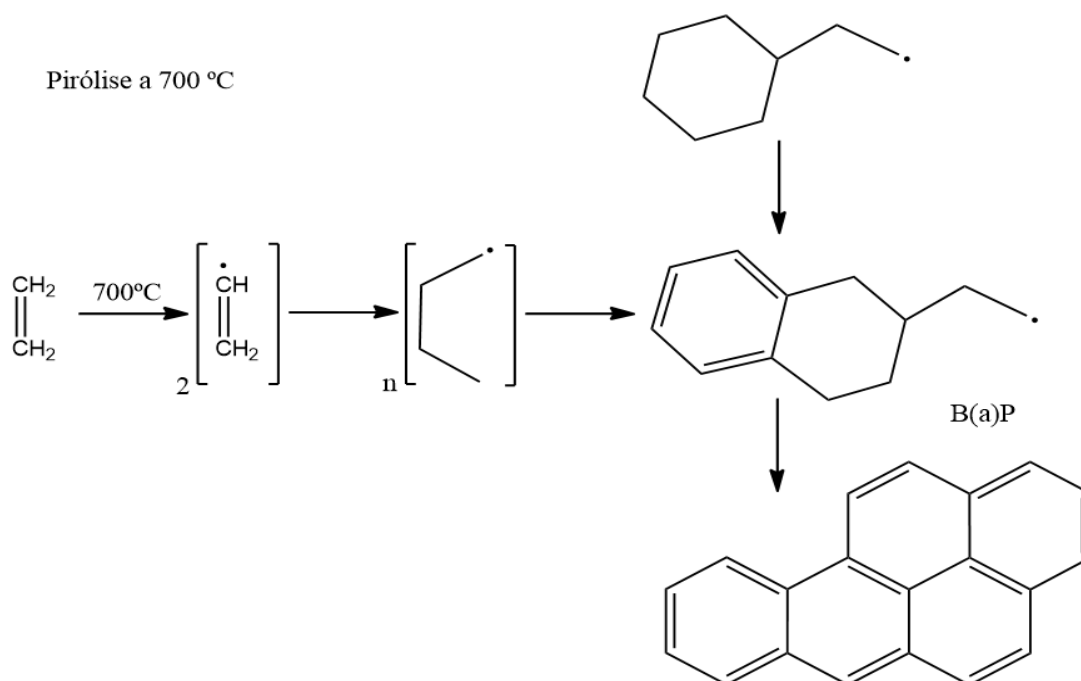
Prioritariamente serão formados os HPA's de baixo peso molecular, sendo submetidos depois a uma nova pirólises e pirosínteses para originar HPA's de maior peso molecular pelo processo denominado Zig-zag (CHÁVEZ, 2015).

Em conformidade com a fonte de origem, os HPA's, podem-se classificar em: petrogênicos, formados por fontes petroleiras e derivados, pirogênicos, formados por

processos de combustão e biológicos, sintetizados por organismos vivos (CHÁVEZ, 2015).

Com relação ao processo pirolítico de HPA's, este é extremamente complexo e variável, e vai depender de muitas condições reacionais. O mecanismo aceito para essa reação envolve a polimerização por meio de radicais livres, em diversas etapas, até a formação de núcleos aromáticos condensados como demonstrado na Figura 1. Esse processo de formação ainda vai depender de fatores, como pressão, quantidade de oxigênio disponível e tipo da biomassa presente, e principalmente do calor, pois a concentração de HPA's aumenta linearmente na faixa de temperatura entre 400 a 1000°C. Durante a queima da palha da cana-de-açúcar a temperatura chega a atingir mais de 100° C a 1,5 centímetros de profundidade e 800° C a 15 centímetros acima do solo (CARUSO; ALABURDA, 2008).

Figura 1 – Representação esquemática da formação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos por meio de pirólise.



Fonte: (Adaptado de Goncalves; Scussel, 2013).

2.1.3. Fontes de emissão de HPA's

Geralmente, todos os compostos orgânicos contendo carbono e hidrogênio, podem ser precursores de HPA's. Esses processos são provenientes de atividades antropogênicas ou formados em processos naturais, tais como carbonização (TABOR, 2015). Os HPA's são liberados durante a combustão na forma de vapores e tendo em conta suas baixas pressões de vapor, a maioria sofre condensação prioritariamente em materiais particulados presentes na combustão e assim podem ser transportadas a lugares distantes pelos ventos, contaminando outras regiões. Acontece corriqueiramente com o uso do álcool combustível produzido com cana não queimada, os HPA's que ainda não foram destruídos no interior do motor, podem retornar à atmosfera, contaminando o meio ambiente e as pessoas (CHÁVEZ, 2015).

Esses contaminantes também são originados de fontes tecnológicas que podem ser móveis ou estacionárias. Entre as fontes móveis, destaca-se o motor de combustão interna como o principal emissor, como os dos veículos de transporte de cargas e passageiros. As fontes estacionárias são subdivididas entre as utilizadas na geração de energia elétrica e calor e aquelas ligadas à atividade industrial e de incineração como rejeitos químicos (COSTA, 2001).

2.1.4. Tipos de exposição

A contaminação ambiental é a principal responsável pela exposição humana aos HPA's e ocorre pelo ar, água, solo, nas plantações muitas vezes depositadas nos alimentos (MESQUITA, 2016). De acordo com estudos realizados entre pessoas não fumantes e não ocupacionalmente expostas estima-se uma ingestão diária de cerca de 3,12 mg de 8 HPA's: 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(ghi)perileno, todavia os alimentos são os responsáveis por cerca de 96% desta ingestão (PEREIRA NETTO et al., 2000).

A exposição é determinada como o contato, em um determinado tempo e espaço entre uma pessoa e um ou mais agentes físicos, químicos ou biológicos. A Figura 2 mostra um esquema da relação entre dose e exposição. Doses são frequentemente apresentadas em quantidade do agente por unidade de tempo

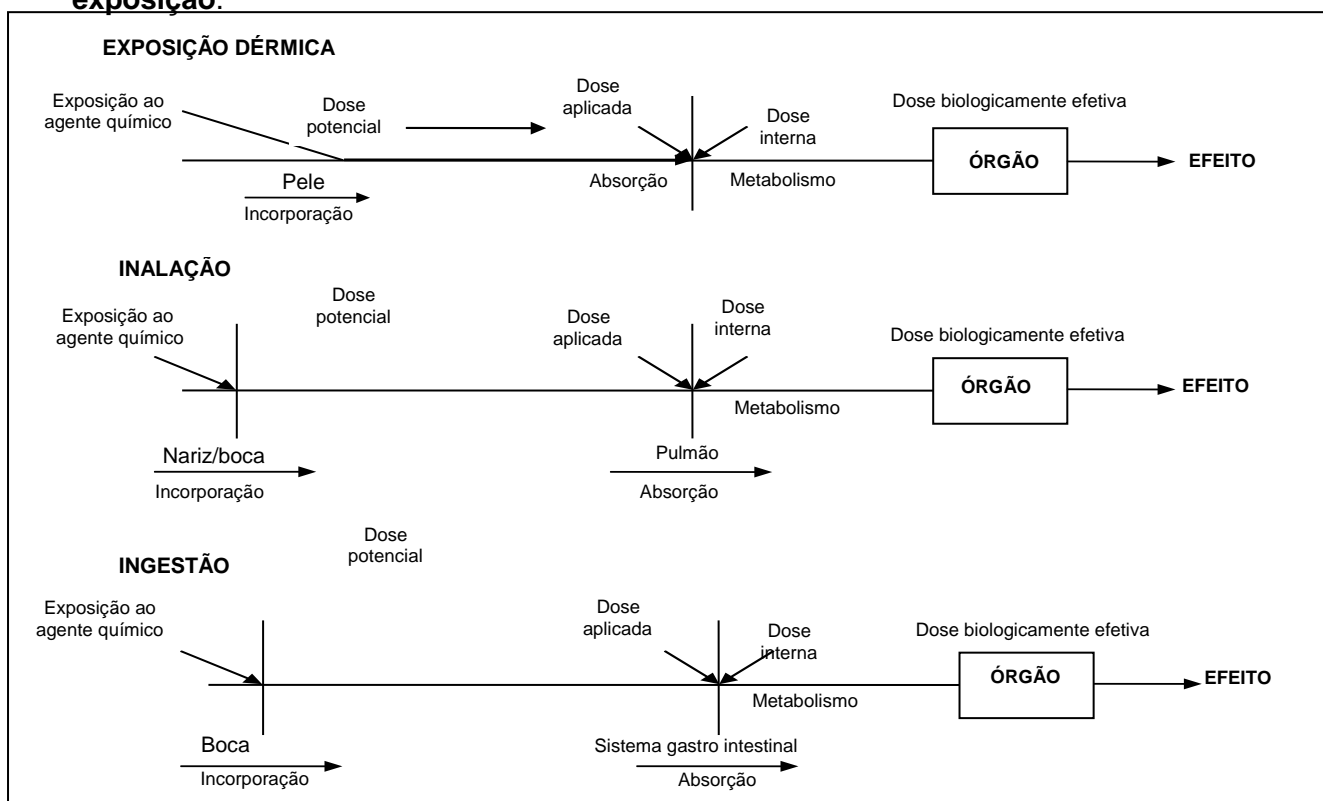
(p.ex. mg/dia) ou taxas de doses por unidade de peso corpóreo (i.e. mg/kg/dia) (NARDOCCI, 2010).

Na maioria das vezes, os agentes estão presentes no meio ambiente, nos animais e nos alimentos que os transportam e os colocam em contato com as pessoas. A concentração no ponto de contato é chamada de concentração de exposição, enquanto a dose aplicada é a quantidade de substância que está disponível para absorção em uma barreira do organismo (pulmão, trato gastrointestinal, pele). A dose interna é a quantidade do agente que é absorvida e está disponível para a interação com os receptores biologicamente significantes (NARDOCCI, 2010).

Uma vez absorvido, o agente irá passar pelos processos de metabolismo, estocagem, excreção e transporte dentro do organismo. A quantidade transportada para um órgão específico, tecido ou fluido de interesse é denominada dose disponível que representa apenas uma pequena parte da dose interna total. A dose biologicamente efetiva é a quantidade que efetivamente alcança as células membranas ou outros locais e que produz uma ação tóxica, ou um efeito adverso. Após sua entrada no organismo, o agente passa a ser descrito em termos de dose (NARDOCCI, 2010).

Importante observar que no organismo humano, o tempo de meia-vida dos HPA's varia de acordo com sua massa molecular (MM), sendo este tempo diretamente proporcional ao peso, sendo assim de degradação mais lenta (LUZ, 2013). É bastante significativa à contaminação humana por estes compostos devido a suas propriedades físico-químicas como também a sua distribuição ambiental. Pelo seu caráter lipofílico, os HPA's e seus derivados podem ser absorvidos pela pele, por ingestão ou por inalação, sendo rapidamente distribuídos pelo organismo por meio da corrente sanguínea (PEREIRA NETTO et al., 2000).

Figura 2 - Esquema ilustrativo da relação entre exposição e dose, em função da via de exposição.



Fonte: Adaptado de USEPA, 1992.

2.2 Características e propriedades físico-químicas dos HPA's

As propriedades físico-químicas dos HPA's são de extrema importância para que se possa entender o seu comportamento tanto no meio ambiental como também em organismos vivos (GARCIA et al., 2014).

As características gerais comuns a estes poluentes químicos são o alto ponto de fusão e ebulição, baixa pressão de vapor e muito baixa solubilidade em água que tendem a diminuir com o aumento da massa molecular e com o aumento do número de anéis. Mostram ser solúveis em muitos solventes orgânicos, ou seja, lipofílico, solúveis em gordura. Estes contaminantes apresentam elevada tendência à bioacumulação em tecidos ricos em lipídios de organismos vivos (LUCA; WAGENER, 2016).

Esses contaminantes apresentam coeficientes de partição octanol/água superiores a 1000, mostrando grande afinidade lipofílica, que aumenta com o número de anéis aromáticos da molécula (AMORIM, 2007). Essas propriedades são amplamente estabelecidas pelo sistema de duplas conjugadas que existem nas

estruturas dessa classe de compostos e variam em razão do número de anéis e da massa molecular (SCUSSEL; GONÇALVES, B.; GARCIA, L. P.; STEIN, 2015).

Os HPA's estão dispostos em um grupo de compostos denominado de contaminantes orgânicos persistentes (COP's). Denominam-se COP's por serem compostos que demonstram características como: tóxicos, persistentes, bioacumuláveis, transportados por longas distâncias através do ar e por fim causarem efeitos nocivos à saúde e ao meio ambiente (SCUSSEL; GONÇALVES, B.; GARCIA, L. P.; STEIN, 2015).

Alguns destes poluentes são semivoláteis, contudo, muitos deles podem ser transportados até longas distâncias e serem adsorvidos em material particulado. Os que possuem 2 ou 3 anéis aromáticos estão quase totalmente na fase de vapor; aqueles com 4 anéis encontram-se numa posição intermediária, e os que apresentam 5 ou mais anéis aromáticos são encontrados preeminentemente em particulados, na forma de cinzas ou fuligens cujas partículas são menores que 2,5 μm (LUZ, 2013).

É por meio da reação de radical cátion formado pela transferência de elétron do HPA ao oxigênio ou aceptores de outro tipo com água que ocorre a oxidação do HPA, salientando que esse processo pode ocorrer pela facilidade de transferência entre elétrons, contudo, tudo depende do potencial de oxidação de um elétron do HPA em questão. Vale ressaltar que as reações de oxidação e redução desses compostos diminuem com o aumento do peso molecular (LUZ, 2013).

Da mesma forma a volatilidade desses compostos também é inversamente proporcional a lipofilicidade, ou seja, reduz com o aumento do número de anéis aromáticos. Sendo assim, HPA's que possuem menos anéis em sua estrutura são mais voláteis e apresentam maior pressão de vapor que os com maior número de anéis (GARCIA et al., 2014).

A dissociação no ambiente (Koc & Kow) ocorre em virtude de suas características físico-químicas, estes compostos podem ser encontrados adsorvidos a materiais particulados ou em fase gasosa. Os coeficientes de partição com carbono (Koc) e os coeficientes de partição octanol-água (Kow) relacionam a concentração dos HPA's em algumas destas fases. Os Koc determinam a tendência

dos HPA's em estarem associados com os materiais particulados através de processos de adsorção. Já os Kow são relativamente altos e indicam a afinidade dos HPA's por fases orgânicas, ou seja, lipofílicas (GARCIA et al., 2014).

2.3 Reatividade dos HPA's

A atividade carcinogênica/mutagênica dos vários HPA's com suas estruturas químicas têm sido publicadas e amplamente divulgadas. De acordo com esses estudos, os HPA's não são mutagênicos diretos e necessitam sofrer ativação metabólica preliminar para se tornarem capazes de reagir com o DNA e outras macromoléculas (PEREIRA NETTO et al., 2000).

Para explicar a reatividade com macromoléculas biológicas são citados na literatura quatro mecanismos no intuito de esclarecer a ativação de HPA's: oxidação enzimática seguida de hidrólise com a formação de diol epóxidos, mecanismo este mais estudado e aceito; a formação de ésteres benzílicos, eletrolíticos, por meio de uma série de reações de substituição, a produção de radicais catiônicos por meio da oxidação enzimática com envolvimento de um elétron e, por fim, a dehidrogenação enzimática dos metabólitos dihidrodiois produzindo quinonas capazes de reagirem diretamente com o DNA ou capazes de reagirem com o O₂ gerando espécies oxigenadas reativas, como os radicais hidroxilas ou ânions superóxidos que atacam o DNA. Todos estes mecanismos não são excludentes podendo ocorrer simultaneamente (COSTA, 2001).

Quando absorvidos pelo organismo, estes contaminantes são distribuídos por diversos órgãos e tecidos, principalmente o tecido adiposo, sendo então absorvidos em fase final a nível celular. Uma vez absorvido pelas células estes são metabolicamente ativados e, desta maneira, tornam-se reativos aos grupos nucleofílicos presentes em moléculas celulares (SCUSSEL; GONÇALVES, B.; GARCIA, L. P.; STEIN, 2015).

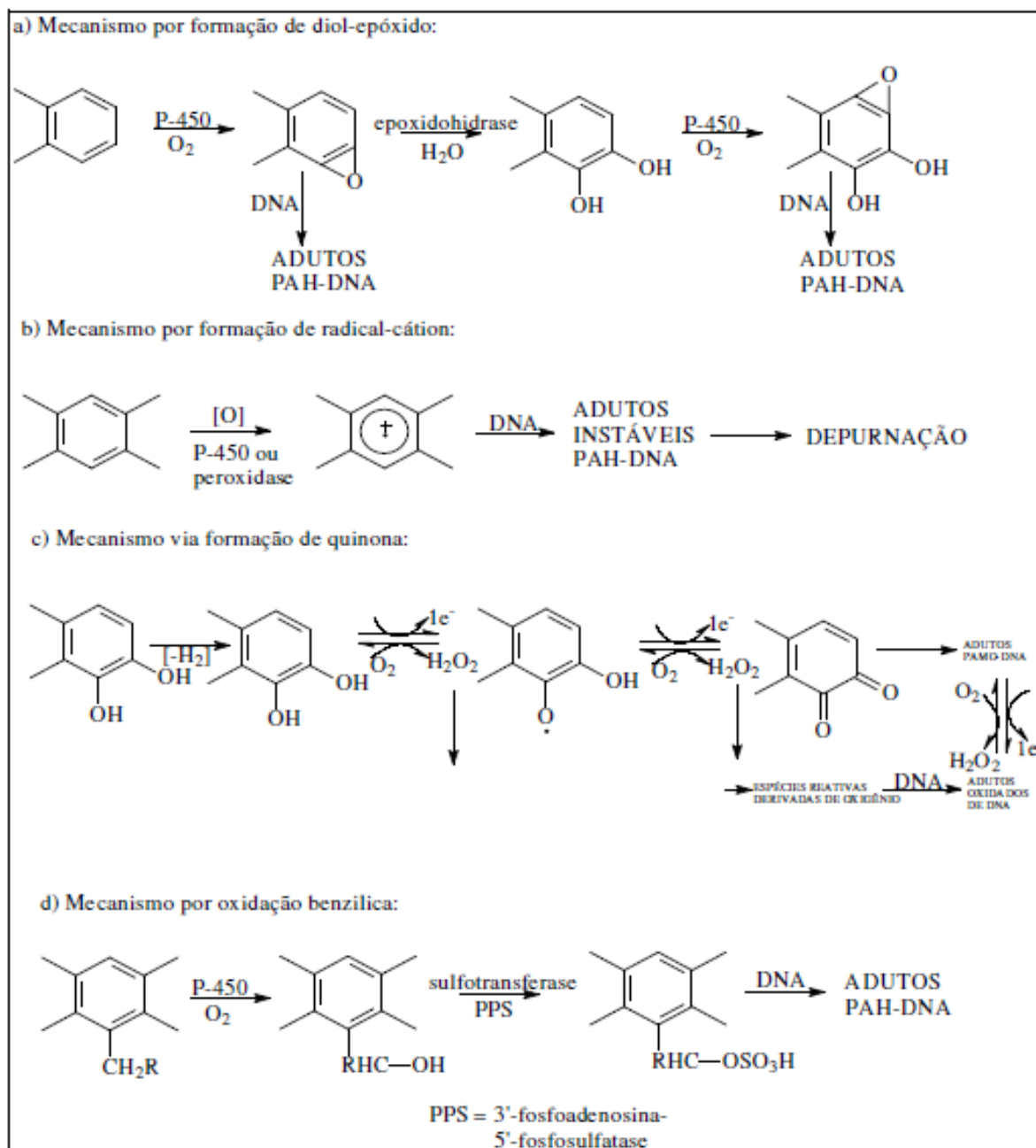
Diversos mecanismos são propostos para a ativação enzimática dos HPA's envolvendo uma série de enzimas que catalisam reações como oxidação, redução, hidrólise e conjugação. Como já foi relatado o processo de oxidação enzimática seguida de hidrólise com a formação de diol-epóxidos é considerado um dos mecanismos de ativação mais aceito atualmente na literatura para bioativação dos

HPAs carcinogênicos. A ativação desses compostos é conduzida pela enzima citocromo P450, especialmente sob duas isoformas principais: P4501A1 e P4501A2. Como por exemplo, no caso do benzo(a)pireno-B(a)P, o citocromo P450 é responsável pelo seu metabolismo em benzo(a)pireno-7,8-óxido, que por ação subsequente da epóxido hidrolase é transformado em benzo(a)pireno-7,8-diol. Estes dióis sofrem novamente ação do citocromo P450 e transformam-se em benzo(a)pireno-7,8-diol-9,10-epóxido. O benzo(a)pireno-7,8-diol-9,10-epóxido é apontado como o metabólito final de efeito carcinogênico e mutagênico, devido seu alto poder de se ligar covalentemente ao grupo 2-amino da guanina na fita dupla de DNA (CONNEY, 1982).

HPA's carcinogênicos também sofrem modificações pelo sistema enzimático de monooxigenases até serem metabolizados em substâncias com atividade na promoção de tumores, assim como os derivados do B(a)P. Contudo, existem outros mecanismos que também explicam a ativação de HPAs em sistemas biológicos, como a produção de radicais catiônicos, a formação de ésteres benzílicos e a produção de quinonas (NETTO et al., 2000).

O fígado é o órgão principal no qual ocorrem estes tipos de reações devido a enzimas do sistema monooxigenases de função mista, da família dos citocromos P450. A enzima do citocromo P450 conduz este mecanismo que ocorre em etapas (GARCIA et al., 2014). A primeira etapa é a absorção dos HPA's pelas células, seguida por oxidação enzimática realizada pelo sistema de monooxigenases, e posteriormente ocorre à conversão em dihidrodióis e diol-epóxidos Figura 3 e ao reagirem com o DNA, dão origem a forma genotóxica ativa.

Figura 3 - Mecanismos de formação de adutos de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e DNA no organismo



Fonte: Harvey, 1996.

2.4 Metabolismo dos HPA's

A biotransformação dos HPA's envolve uma série de enzimas que catalisam reações de oxidação, redução e hidrólise (oxigenases de função mista, citocromo P450, NADPH-citocromo-c-redutase) bem como as que catalisam reações de conjugação (sulfotransferase, epóxido hidrolase, glutatona-S-transferase e UDP-glicotransferase) estão dispostas em todos os tecidos (COSTA, 2001). A oxidação

enzimática dos HPA's ocorre por meio das monoxigenases dependentes do citocromo P450 (CYP1A). Os dihidrodiol-epóxidos são altamente instáveis e, quando não reagem rapidamente, são hidrolisados a tetróis, cuja formação pode ser utilizada como bioindicador da formação de diolepóxidos. (COSTA, 2001).

Nos dias atuais são conhecidos aproximadamente mais de 10.000 compostos diferentes, resultado de inúmeras pesquisas movidas pelo aumento do interesse após essas descobertas. Os HPA's de baixo peso molecular geralmente têm efeitos tóxicos e os de elevada massa molecular, entre cinco ou seis anéis, além de serem tóxicos também são altamente mutagênicos, genotóxicos e pró-carcinogênicos. Estes precisam sofrer uma ativação metabólica preliminar para formar o carcinogênico ativo e reagir com o DNA, como expressado anteriormente (CHÁVEZ, 2015).

Como já relatado, o fígado é o órgão com função predominante no metabolismo dos HPA's, mas outros órgãos como o pulmão e o intestino possuem as enzimas do complexo P450, (CYP), vitais para tal finalidade. O epitélio intestinal contém todas as enzimas do complexo CYP principais responsáveis pela detoxificação dos HPA's, embora a ativação destas enzimas seja muito mais baixa quando comparada com a observada no fígado. O fato de estas enzimas serem pouco produzidas no intestino pode ocasionalmente influenciar o desenvolvimento de tumores neste órgão ocasionados pela ingestão de HPA's em alimentos e água (DIGGS et al., 2011).

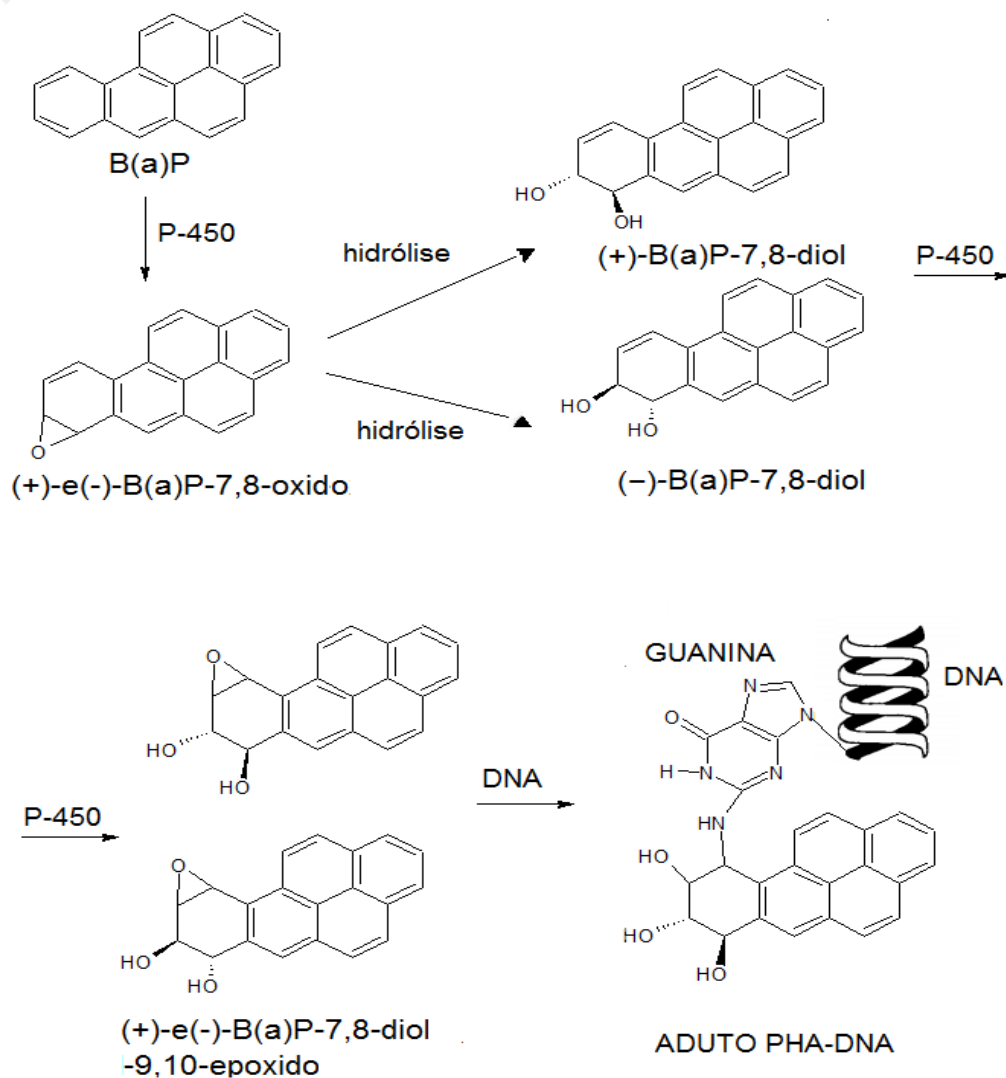
Vale salientar que devido à característica lipofílica, os HPA's tornam-se capazes de penetrar nas membranas celulares e de permanecerem indefinidamente no organismo (LUZ et al., 2016a). Antes de serem excretados pela urina e nas fezes, os HPA's sofrem uma série de transformações pelas enzimas, este processo é conhecido como detoxificação, e durante este processo alguns HPA's como o B(a)P são ativados formando espécies DNA-ligantes como diol-epóxidos que podem iniciar tumores (CHÁVEZ, 2015).

Pode-se observar na Figura 4, que no processo de detoxificação dos HPA's, alguns deles como o B(a)P, altamente cancerígeno, são metabolizados pelas enzimas hepáticas em diol-epóxidos que são compostos intermediários e tem a capacidade de aderir ao DNA formando adutos (BERNARDO; BARROS; SILVA,

2016). O DNA é indispensável à vida, quando a célula se divide, cada célula resultante tem uma cópia do DNA original. Como o DNA se encontra ligado na forma de um aduto, fará uma cópia defeituosa produzindo assim uma mudança na molécula ou uma mutação genética. Muitos desses processos não têm consequência para a célula, mas quando a mutação se produz em alguns genes que controlam o crescimento celular, então esse processo torna-se descontrolado formando tumores cancerígenos (CHÁVEZ, 2015).

O aparecimento do câncer não é apenas um simples processo. Este envolve diversas etapas, como a formação de adutos com o material genético, sendo também influenciado pela suscetibilidade individual, dentre outros fatores, tais como idade, etnia, gênero, estado de saúde, nutrição e polimorfismo genético (COSTA, 2001).

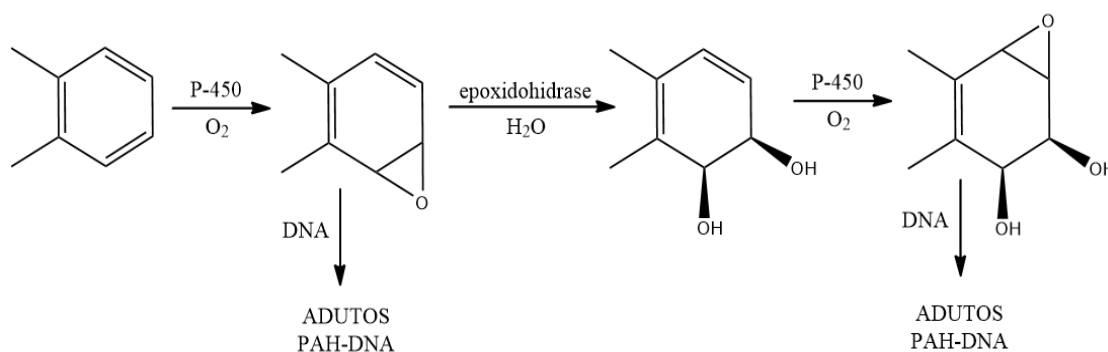
Figura 4 - Mecanismo de ativação metabólica do B(a)P e representação esquemática do aduto B(a)P 7,8-diol-9,10-epóxido de guanina no DNA e RNA de pele de camundongo.



Fonte: (Adaptado de Pereira Netto *et al.*, 2000)

Dentre os mecanismos estudados e relatados anteriormente, atualmente, o mecanismo mais aceito para a ativação dos HPA's é a oxidação enzimática seguida de hidrólise com a formação de diol-epóxidos (Figura 5).

Figura 5 - Mecanismo de ativação dos HPA's



Fonte: (Adaptado de Pereira Netto *et al.*, 2000)

2.5 Genotoxicidade dos compostos de interesse

O primeiro relato de toxicidade relacionado à HPA's foi observado por um médico inglês Percival Pott, datados do ano de 1775 que associou um tipo de tumor genital nos limpadores de chaminés pela exposição prolongada à fuligem. Cerca de 100 anos depois foi relatado uma elevada proporção de cânceres em trabalhadores do alcatrão da hulha e a parafina (FARIA *et al.*, 2004). No Japão pesquisadores, Katsuburo e Koichi, demonstraram que a aplicação do alcatrão da hulha em coelhos lhes originava câncer da pele. Todavia o alcatrão da hulha contém diversos compostos e não se conhecia qual composto era o responsável pela doença. Em 1920 foi demonstrado que certos compostos como o B(a)P e dibenzo(a,h)antraceno obtidos do alcatrão da hulha eram os responsáveis dos tumores na pele de ratos (CHÁVEZ, 2015).

Os HPA's têm como principais efeitos tóxicos o desenvolvimento de mutagênese, teratogênese e carcinogênese os quais são resultado de sua ação sobre o material genético. Cabe salientar que, embora os HPA's de $MM \geq 202$ g/mol sejam considerados tóxicos, alguns não são considerados como carcinogênicos ao homem, principalmente os de baixa MM, que contém dois ou três anéis aromáticos. Todavia, estes compostos podem apresentar toxicidade aguda quando ingeridos ou inalados em grande quantidade por um curto período de tempo levando a efeitos adversos ao sistema imunológico como também a regulação endócrina. Os compostos com elevada MM são os quais possuem mais de quatro anéis aromáticos e classificados mutagênicos e/ou carcinogênicos aos seres humanos. Organismos

invertebrados, peixes, anfíbios, aves, mamíferos, incluindo o homem são facilmente atingidos pelo B(a)P (GARCIA et al., 2014).

Os compostos estudados foram escolhidos pela alta toxicidade, iniciando pelo antraceno, HPA composto por três anéis aromáticos e que se apresenta como cristais amarelos, sólido a temperatura ambiente, de densidade 1,47g/mL, ponto de fusão 216°C e ponto de ebulição 360°C. Foi descoberto a partir do *alcatrão de hulha*. Apresenta solubilidade em solventes como o álcool e o éter, mas sua apolaridade o impede de ser solubilizado na água. Pode ser obtido a partir dos óleos antracênicos crus por deslocamento salino ou ainda por destilação. Apresenta elevada aplicabilidade como intermediário na fabricação de corantes e medicamentos (SILVA, 2018).

O fenantreno é um hidrocarboneto aromático polinuclear, cristalino, obtido principalmente da fração de óleo de antraceno do alcatrão de hulha e também sinteticamente. Considerado um poluente prioritário devido à sua toxicidade, persistência e predominância no meio ambiente. Na sua forma pura é encontrado no alcatrão do tabaco e é uma conhecida substância irritante e fotossintetizante da pele. Esse contaminante aparece como um pó branco tendo fluorescência azulada (GLOISTEIN; EPPLE; CAMMENGA, 2000).

O naftaleno e o fenantreno, se ingeridos, são facilmente absorvidos no intestino e extensivamente transformados em fenóis, di-hidrodióis e ácidos mercaptúricos (MIRANDA, 2008). O Departamento do Trabalho e Saúde Ocupacional dos Estados Unidos, 2006, relata que entre os diversos efeitos descritos em relação à inalação do fenantreno, ressalta-se: irritação da pele e das vias respiratórias, tosse, dor de garganta, vermelhidão ocular e dor abdominal. Entretanto, a carcinogenicidade deste composto não foi estabelecida em animais experimentais ou em humanos (OMS, IARC 2010).

O naftaleno é um dos contaminantes mais intensivamente pesquisados dentre os HPA's por causa de sua elevada toxicidade, baixa sensibilidade à foto-oxidação e baixo peso molecular. A exposição à inalação desse composto por meio da fumaça cirúrgica pode estar associada a diversos tipos de cânceres, como em tecidos pulmonares, olfativos e nasais, em humanos. A inalação também pode estar associada à catarata, ao cansaço, à cefaleia, e a tumores no fígado e nos rins, além

de anemia hemolítica (CLAUDIO et al., 2017). Muito utilizado como repelente de insetos, em desodorantes para sanitários e como antiséptico de uso tópico veterinário (MIRANDA, 2008).

Dentre os HPA's, o B(a)P é um dos mais conhecidos e avaliados. Sofre foto-oxidação quando exposto à luz solar ou radiação fluorescente. Reage com óxido nítrico para formar nitroderivados; é oxidado pelo ozônio, produzindo benzo(a)pireno-(1,6 ou 3,6)-quinona, como os demais HPA's é lipossolúvel. Desta forma, em sistemas aquosos, o B(a)P tende a concentrar-se em sedimentos ou permanecer associado à matéria orgânica em suspensão (CARUSO; ALABURDA, 2008).

O B(a)P é considerado um dos mais potentes agentes carcinogênicos em animais, além de embriotóxico e teratogênico. (IARC, 2006). Por esta razão, ele tem sido utilizado como indicador da presença de outros HPA's em amostras ambientais, alimentos e bebidas. Em alguns estudos de toxicidade em ratos, mostrou-se embriotóxico, teratogênico e causou diminuição na fertilidade (CARUSO; ALABURDA, 2008).

O benzo(b)fluoranteno é um importante HPA, volátil, encontrado em elevadas concentrações no ambiente. Também tem sido utilizado em muitos estudos experimentais e sugerido como indicador complementar para o B(a)P (NARDOCCI, 2010). É um dos mais potentes ingredientes do tabaco, e ainda encontrado em uísques onde sua presença é atribuída a queima da turfa (BETTIN; FRANCO, 2005).

2.6 Legislação dos HPA's

O monitoramento biológico da exposição a estes compostos pode ser feito por meio da avaliação dos mesmos em forma de mistura ou individualmente, através da determinação da concentração de seus metabólitos em fluidos biológicos ou por acompanhamento de um efeito bioquímico resultado de sua presença no organismo (GARCIA et al., 2014).

Em muitos países a legislação existente para HPA's, é bastante completa, envolvendo diferentes grupos de alimentos e água para um número diversificado de HPA's incluindo os estabelecidos pela FAO como marcadores. Todavia, outras

legislações não são específicas, não abordando grupos de alimentos, contendo apenas limites para água e B(a)P, que é o caso da legislação brasileira (GARCIA et al., 2014).

Segundo a Resolução CONAMA nº 5, de 15 de junho de 1989 - complementada pelas Resoluções CONAMA nos 3 e 8/90, é disposto o Programa Nacional de Controle da Poluição do Ar, o PRONAR, que, através de estratégias que incluem a adoção de limites máximos de emissão, a padronização da qualidade do ar, a prevenção da deterioração significativa da qualidade do ar, o monitoramento, o gerenciamento do licenciamento das fontes de emissão, o inventário nacional de fontes de poluentes, gestões políticas, desenvolvimento nacional na área de poluição ao ar e ações de curto, médio e longo prazo, sendo a CETESB o órgão técnico responsável pelas medidas de fiscalização. Segundo a legislação escocesa as concentrações máximas toleradas de HPA's em alimentos são de 1µg/L para o naftleno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno e de 2µg/L para o fluoranteno, pireno e criseno (GALINARO; FRANCO, 2009).

Importante relatar que o Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos (FDA - Food and Drug Administration), não estabelecem limites de HPA's para nenhum alimento. A legislação desse país é voltada à redução desses contaminantes no âmbito ambiental (JACQUES et al., 2007).

No contexto do *Codex Alimentarius*, programa conjunto da Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) e da Organização Mundial da Saúde (OMS), criado em 1963, com o objetivo de estabelecer normas internacionais na área de alimentos, incluindo padrões, diretrizes e guias sobre boas práticas, priorizando a segurança alimentar e a proteção do consumidor, identificou a necessidade de estabelecimento de limites para HPA's em alimentos. Esse desejo tem sido manifestado por inúmeros países, iniciando pelo o B(a)P que foi reavaliado pelo Comitê Conjunto FAO/OMS de Peritos em Aditivos Alimentares (JECFA), e recomendou a elaboração de estratégias por parte das indústrias e dos consumidores para minimizar a exposição humana a esse contaminante (LUZ, 2013).

Em nível nacional não existe legislação específica sobre os níveis de HPA's para os principais óleos comestíveis. Há somente um nível máximo estabelecido

pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para B(a)P em óleo do bagaço de azeitona ($2,0 \mu\text{g kg}^{-1}$) e aromatizantes para defumação artificial ($0,03 \mu\text{g kg}^{-1}$), e uma Portaria do Ministério da Saúde para água potável ($0,7 \mu\text{g L}^{-1}$) (BRASIL, 2011). Para fins de parâmetro, utiliza-se a legislação europeia, que trata sobre os níveis máximos de HPA's em óleos e gorduras destinados ao consumo humano direto ou como ingrediente de alimentos, que estabelece $2,0 \mu\text{g kg}^{-1}$ para o B(a)P e $10,0 \mu\text{g kg}^{-1}$ para a soma de benzo(a)antraceno, B(a)P, benzo(b)fluoranteno e criseno, chamados de 4HPA.

A legislação atual recomenda que esses quatro compostos, em conjunto, passem a ser utilizados como possíveis marcadores da presença de HPA's em alimentos e não apenas o B(a)P, como era utilizado sempre. Essa substituição visa assegurar a possível detecção de HPA's em amostras nas quais o B(a)P não possa ser detectado, aumentando assim a segurança alimentar (EFSA, 2008;EU 2011).

2.7. Resíduos em alimentos

Em indivíduos não fumantes, a dieta é a principal fonte de contaminação por HPA's, correspondendo cerca de 70 % da exposição total (PAZ et al., 2017). Pesquisas demonstram que HPA's provenientes da dieta podem determinar o processo de carcinogênese em diversos órgãos, como pulmão, trato gastrointestinal e mama (XIA et al., 2010; ZHANG; XUE; DAI, 2010).

Devido ao caráter lipofílico e características hidrofóbicas dos HPA's, eles tendem a acumular-se na cadeia alimentar. Pesquisas mostram evidências que alimentos com maior teor de gordura tendem a refletir em maiores concentrações de HPA's (SHADI; MAZANDARANI; NIKPOUR, 2012).

Pela razão dos contaminantes serem produzidos no decorrer do processamento, os HPA's podem estar presentes em diversos grupos de alimentos. Diversos estudos mostram claramente a produção de HPA's, sendo encontrados em vegetais que é uma das principais fontes de contaminação por B(a)P, onde os componentes particulados podem se depositar na superfície dos vegetais. Um estudo foi realizado na região de Campinas - SP, nele foi determinado o nível médio de ocorrência desses compostos em altas concentrações como em alface, tomate,

repolho, maçã, uva, e pera e os níveis de HPA's nas amostras foram determinados através de CLAE utilizando detector de fluorescência (MOLLE, 2017).

A contaminação do café por HPA's acontece no decorrer do processo de torrefação dos grãos. Foi verificada a presença de HPA's em café arábica e canephora após o processo de torra, com concentrações médias da soma de 13 HPA's aumentando de $0,086 \mu\text{g kg}^{-1}$ (café verde) para $0,172$ a $0,498 \mu\text{g kg}^{-1}$ (café torrado). A técnica empregada foi a CLAE com detecção por fluorescência (TFOUNI et al., 2013).

Foi observado que no processo de secagem das folhas de chá usando a combustão de madeira ocorreu a formação de diversos HPA's. Realizando uma investigação da ocorrência de 16 HPA's em erva mate o resultado foram valores maiores na etapa após secagem. (VIEIRA et al., 2010). Estudos realizados analisaram embalagens de infusões de erva-mate de marcas comerciais adquiridos em supermercados da Argentina. Foram analisados 8 HPA's sendo estes encontrados nas amostras estudadas (THEA et al., 2016). Outro estudo realizado em Buenos Aires sobre a contaminação de chás (*Camellia sinensis*) avaliou a soma de 16 HPA's e verificou que os níveis estavam entre $509,7$ e $2746,5 \mu\text{g kg}^{-1}$ em massa seca (LONDOÑO; REYNOSO; RESNICK, 2015). Em todos os estudos foram utilizada a técnica de CLAE com detecção por fluorescência.

Na Espanha um estudo demonstrou que o material usado durante o processamento de torra do pão pode favorecer para a contaminação por HPA's, observando que os pães torrados direto no fogo e em carvão apresentaram concentrações de 7 HPA's acima de $350 \mu\text{g kg}^{-1}$ e os pães torrados em fornos elétricos e torradeiras não apresentaram contaminação (REY-SALGUEIRO et al., 2008). Ainda foram analisadas a concentração de 16 HPA's em dezoito amostras de pão sendo assado com farinha de trigo branca, pão cozido a partir de farinha de trigo integral, e pão de sanduíche cozido a partir de farinha de trigo branca, neste estudo foram encontrados HPA's em 8 das amostras (AL-RASHDAN et al., 2010). Técnica utilizada, CLAE com detecção por fluorescência.

Outra grande preocupação é a contaminação de produtos de origem marinha, pois a contínua presença desses contaminantes no meio ambiente é consequência direta de sua baixa solubilidade em água e de sua associação à matéria orgânica de

solos e sedimentos, fonte alimentar para inúmeros organismos, ocasionando a incorporação dessas substâncias em diversos níveis da cadeia alimentar.

Os mexilhões são organismos filtradores, sendo assim uma maior probabilidade de acumulação de HPA's devido às características fisiológicas de seu metabolismo. A partir dessas observações, foi desenvolvido um estudo no Laboratório de Cromatografia Líquida da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, para investigar a presença de contaminação por HPA's em duas amostras mexilhões importados do Chile e processados no Brasil, utilizando a técnica por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por ultravioleta e fluorescência, resultando na descoberta de NAP, fluoreno, benzo(b)fluoranteno, B(a)P, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo(a)antraceno, criseno, dibenzo(a,h)antraceno, e benzo(g,h,i)perileno, os quais foram encontrados em todas as amostras (BOBEDA et al., 2013).

Ainda existe evidência de maiores níveis de HPA's em organismos litorâneos que em animais provenientes de sedimentos profundos ou na corrente de água oceânica. Em contrapartida foi verificado que os organismos de sedimentos profundos revelam maiores proporções de HPA's de maior MM que em outras áreas de lago (GARCIA et al., 2014).

Pesquisas desenvolvidas na Dinamarca analisaram 24 HPA's em 203 amostras comerciais de churrasco incluindo carnes dos tipos, bovina, suína, frango, salmão e cordeiro; e verificou que a concentração da somatória de 4 HPA's (B(a)P, benzo(a)antraceno, criseno e benzo(b)fluoranteno) foi maior no lombo de porco ($195 \mu\text{g kg}^{-1}$) e menor no peito de frango ($0,1 \mu\text{g kg}^{-1}$). Esse estudo também realizou a análise de 15 amostras de churrasco feitos com controle da temperatura de cocção, e as concentrações encontradas para a soma dos 4 HPA's foram menores que $0,1 \mu\text{g kg}^{-1}$ (DUEDAHL-OLESEN et al., 2015).

Outro estudo analisou a existência de 16 HPA's em diversos alimentos grelhados e defumados de estabelecimentos comerciais e restaurantes do Estado do Kuwait e verificou que as amostras apresentaram concentrações médias de B(a)P de $2,48 \mu\text{g kg}^{-1}$, sendo esse valor maior do que o limite estabelecido pela União Europeia (ALOMIRAH et al., 2011).

Um estudo recente analisou amostras de salmão defumado adquiridas mensalmente no período de outubro a dezembro de 2014, em redes de supermercados da cidade do Rio de Janeiro. Os resultados foram positivos para os HPA's de peso molecular elevado contendo 5 ou 6 anéis aromáticos conjugados, sendo identificados qualitativamente o benzo(b)fluoranteno (BbF), o benzo(k)fluoranteno (BkF), o benzo(a)pireno (BaP), o dibenzo(a,h)antraceno (DaA) e o benzo(g,h,i)perileno (BgP). Sendo assim os estudiosos concluíram que o processamento utilizado no preparo para comercialização do salmão defumado não é capaz de eliminar a contaminação de HPA's, mostrando a necessidade do constante monitoramento destes contaminantes e o desenvolvimento de procedimentos que permitam a produção de pescado dentro de normas de segurança sanitária adequada (BOBEDA, C.R.R. MONTEIRO et al., 2015). O preparo das amostras foi realizado utilizando extração por solvente em "soxhlet" e a separação e quantificação dos contaminantes foram realizadas por CLAE.

O processo de secagem das sementes ou grãos é considerado a principal fonte de contaminação de óleos vegetais. A presença de 13 HPA's foi investigada em canola, óleos de girassol e milho do mercado brasileiro por CLAE-FLD. Esses contaminantes estavam presentes em 69 das 70 amostras (MOLLE et al., 2017). Em Shandong, na China, realizaram uma investigação onde 242 amostras de óleos comestíveis quanto à presença de 15 HPA's e foram verificadas concentrações médias de $54,37 \text{ g kg}^{-1}$ da soma desses contaminantes (JIANG et al., 2015). No Brasil, na região de Campinas-SP foi avaliada a presença de 13 HPA's em amostras de óleos de soja e os resultados para a soma dos 13 HPA's variou de 10,4 a $112,0 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$ (CAMARGO et al., 2011).

Na Polônia, um estudo observou a presença de 19 HPA's em óleos extraídos por meio de prensagem de fontes não convencionais como sementes de amaranto, linhaça, linho comum, camelina, abóbora, sésamo, papoula, mostarda, açafraão, sementes pretas, borragem, prímula e noz; sendo que a soma das concentrações dos HPA's variaram de 23,4 a $234,3 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$ nas amostras de óleos de semente de papoula e abóbora respectivamente (CIECIERSKA; OBIEDZINSKI, 2013). A técnica utilizada para detecção foi a CLAE.

Entretanto, é importante relatar que o processo de refino pode apresentar-se como um agente efetivo no decréscimo dos níveis de HPA, uma vez que, na etapa de branqueamento, o uso de carvão ativado promove a adsorção de parte destes compostos. No Brasil, preferencialmente, é utilizado, como agente adsorvente, a terra de branqueamento, uma argila ativada que apresenta reduzido potencial de remoção dos HPA quando comparada ao carvão ativado (PAZ et al., 2017).

Estudos mostraram que o nível de contaminação das fórmulas para lactentes e de transição podem ser relacionados tanto no nível de contaminação ambiental como também na área a partir da qual o leite foi obtido e das condições de secagem empregadas. Os alimentos infantis são produzidos a partir de matérias primas frescas e depois vaporizado e pasteurizado, a contaminação por HPA's pode ser também por resultado da contaminação ambiental de matérias primas, principalmente vegetais (CIECIERSKA; OBIEDZIŃSKI, 2010). Outra pesquisa avaliou as concentrações de 11 HPA's em 19 amostras de formulações infantis e 17 amostras de cereais que foram coletados em supermercados O benzo(k)fluoranteno foi encontrado em duas amostras, sendo uma de leite e uma de cereal, em níveis de 0,1 e 0,3 $\mu\text{g kg}^{-1}$ respectivamente. Foi determinada também a concentração de 19 HPA's em fórmulas para lactentes (REY-SALGUEIRO et al., 2009). A técnica utilizada para a detecção foi a CLAE.

Com relação aos produtos lácteos e derivados a contaminação das pastagens por HPA's oriundas das emissões veiculares é um dos pontos cruciais da contaminação da cadeia alimentar, incluindo os ruminantes de pastagem que produzem alimentos lácteos. O solo é outro fator que pode contribuir na contaminação de HPA's na cadeia do leite.

A presença de HPA's no leite de ovelhas foi avaliada em estudo sendo o solo uma das fontes de contaminação. A ração que é ofertada ao animal também pode conter HPA's e estes podem ser metabolizados pelos mesmos e serem encontrados no leite, as investigações mostra a interação. O processamento sofrido pelo leite e seus derivados também podem ocasionar a formação destes contaminantes. Os processos que envolvem elevadas temperaturas como pasteurização, secagem, defumação e etapas que como cozimento, fervura e tostas, são fundamentais para ocorrência e formação dos poluentes (LUZ et al., 2016).

Com o aumento do consumo de guaraná nos últimos anos houve a necessidade de um incremento também na sua oferta aos consumidores. O guaranazeiro, planta da qual se obtém o guaraná (*Paulínia cupana*) é uma planta da família Sapindaceae, originária da região Amazônica (SOUSA et al., 2010). O Brasil é praticamente o único produtor de guaraná do mundo, excetuando-se algumas pequenas áreas plantadas na Amazônia venezuelana e peruana (SUFRAMA, 2010).

O processo produtivo das sementes para a obtenção dos produtos derivados passa pelas etapas de secagem, torrefação e, em alguns casos, a defumação, processos que possivelmente irá culminar na formação de HPA's. Depois de investigação realizada foram encontrados 5 diferentes HPA's em diferentes marcas de guaraná em pó comercialmente disponíveis no mercado. Foi utilizado CLAE com detecção por fluorescência para a determinação dos contaminantes. Os HPA's foram detectados em 81% das amostras analisadas (CAMARGO et al., 2006).

Todavia, evidenciar o risco de câncer atribuído por HPA's proveniente exclusivamente da dieta é bastante complexo, uma vez que não se encontram marcadores específicos que possam determinar a origem do contaminante. Vale ressaltar que os HPA's de origem alimentar se relacionam, sem distinção, com os HPA's derivados de contaminação ambiental (PAZ et al., 2017). Assim, salientamos a Tabela 2 como alternativas para reduzir ou prevenir a contaminação dos alimentos por HPA's.

Tabela 2 – Propostas para minimizar ou prevenir a contaminação dos alimentos por HPA's.

MEIO DE CONTAMINAÇÃO	ALTERNATIVAS
Óleos vegetais	Uso de carvão ativado no processo de refino Preferir a secagem artificial dos grãos
Laticínios	Evitar que vacas em lactação consumam pastagem contaminada Preferir leites com menor teor de gordura Aperfeiçoar as técnicas de defumação de queijos
Alimentos com alto teor de carboidratos	Realizar lavagem da cana de açúcar antes da trituração Métodos de cocção que não exponham diretamente o alimento à chama Expor a área com menos gordura para grelhar
Modo de cocção	Marinar a carne com especiarias e ingredientes ácidos (evitar adição de óleo de cozinha) Dar preferência ao carvão de casca de coco ao carvão comum Evitar o consumo de frituras
Contaminação ambiental	Cultivar frutas e vegetais distantes de estradas e áreas industriais Preservação dos ambientes marinhos, principalmente em áreas de pesca

Fonte: (Adaptado de PAZ *et al.*, 2017)

2.8. Canas-de-açúcar e derivados

Atualmente muitas pesquisas estão sendo desenvolvidas com alimentos ricos em açúcares e a contaminação por HPA'S em produtos de origem nacional; podemos citar a análise destes contaminantes no caldo de cana, rapadura e aguardentes.

Estudos apresentados na Holanda mostraram que a ingestão de açúcar puro e produtos açucarados são fontes importantes de HPA's na dieta da população. As análises destes produtos mostraram teores de criseno de até $36 \mu\text{g kg}^{-1}$. As amostras de açúcares comerciais brasileiros apontaram a presença de HPA's em concentrações que variam de 0,25 a $0,83 \text{ mg kg}^{-1}$ (BETTIN; FRANCO, 2005).

No ano de 2009, TFOUNI e colaboradores realizaram estudos com amostras coletadas em 20 locais diferentes do Estado de São Paulo: Ribeirão Preto e Campinas. A coleta foi realizada em dois períodos de 2007, na safra entre setembro e outubro e na entressafra de março a abril. O total de 80 amostras foram analisadas em duplicata para a presença de 4 HPA's benzo(a)antraceno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno e B(a)P. Os resultados mostraram a detecção em 50% das

amostras. Os padrões coletados no período de entressafra apresentaram quantidades médias de contaminantes de $0,013 \mu\text{g kg}^{-1}$ e $0,012 \mu\text{g kg}^{-1}$, enquanto padrões coletados durante a safra apresentou valores médios de $0,053 \mu\text{g kg}^{-1}$ e $0,055 \mu\text{g kg}^{-1}$.

Foi observada uma maior concentração e incidência de HPA's nos caldos de cana coletados no período de safra, confirmando que processo de queimada das lavouras de cana-de-açúcar é uma fonte de contaminação para o caldo de cana. Outro aspecto observado e que merece atenção é a possível remoção mecânica de parte da contaminação, já que, antes de triturar a cana de açúcar, o produto é lavado. O processo de lavagem pode auxiliar na retirada de parte dos HPA's de origem ambiental, uma vez que a simples pressão exercida pela água pode remover uma camada superficial de fuligem, minimizando, assim, a quantidade bruta de contaminantes (TFOUNI et al., 2009).

A rapadura é produzida a partir do caldo de cana-de-açúcar desidratado, é um alimento utilizado em grande escala na dieta brasileira principalmente no cardápio de escolas públicas, por fazer parte do PNAE (Programa Nacional de Alimentação Escolar). Compostos mutagênicos e carcinogênicos, incluindo os HPA's, podem contaminar este alimento durante seu processo produtivo. Em 2011, realizaram um estudo no intuito de aperfeiçoar e validar um método simples e rápido para determinação de 16 HPA's em rapadura de diversas marcas comerciais em diferentes regiões do Brasil, utilizando CLAE com detecção de fluorescência, Os HPA's foram detectados em 95% e quantificados em 80% das amostras obtidas em quatro cidades brasileiras (SILVA et al., 2011).

Foi investigado perfis de HPAS em "cachaças" brasileiras produzidas a partir do processo de queima em culturas de cana de açúcar. Foi encontrada a principal diferença entre duas classes de cachaças, a quantidade de B(a)P, o qual é mais abundante em aguardente produzida a partir de cana-de-açúcar caramelizado do que em aguardente produzido a partir de culturas não queimadas (GALINARO; CARDOSO; FRANCO, 2007).

2.9 Métodos de análise de HPA's

2.9.1 CLAE

Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), é um método de separação de compostos químicos em solução. Tem sido amplamente utilizada como ferramenta em várias áreas da química e biologia.

Verificando diversos estudos aplicados em diversas áreas do conhecimento pode-se dizer que as principais vantagens deste método são: análises com resultados quantitativas, menor tempo de execução nas análises, versatilidade, alta resolução, técnica bastante sensível e automática. Em contrapartida, apresenta algumas limitações, tais qual o alto custo de instrumentação e manutenção, difícil análise qualitativa, falta de um detector universal sensível e necessidade de mão de obra qualificada e experiente. É bastante empregada na análise de combustíveis adulterados, no controle de qualidade de medicamentos e alimentos, na análise de elementos traços e resíduos (JANDERA; HENZE, 2011).

2.9.2 RMN¹H

A Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) é uma das principais ferramentas aplicadas na caracterização de moléculas orgânicas como também no estudo de compostos inorgânicos. Com o desenvolvimento da tecnologia de gradientes de campo magnético, a técnica vem sendo empregada na análise de misturas complexas através de medidas do coeficiente de difusão. A RMN¹H é aplicada nos processos de elucidação estrutural, no estudo de processos dinâmicos de troca química, de interação hóspede-hospedeiro e em interações intermoleculares. Contudo, para que se possa entender o conteúdo dessas informações, é essencial a atribuição correta dos espectros (KELLER, 2002).

2.9.3 Métodos eletroquímicos

Os métodos eletroanalíticos estão em um grupo de métodos analíticos quantitativos fundamentados em propriedades elétricas de uma solução contendo a espécie de interesse, ou seja, o analito, quando este pertence a uma célula eletroquímica. Esses fenômenos químicos ligados à transferência de elétrons, podem ocorrer homoganeamente em solução, ou heterogeneamente na superfície

do eletrodo. O processo eletroquímico baseia-se na aplicação de um potencial capaz de oxidar ou reduzir substratos de interesse, sendo o método padrão para o estudo das reações redox (SILVA, 2014).

Uma série de vantagens é oferecida pelos métodos eletroanalíticos como seletividade e especificidade resultantes da oxirredução das espécies analíticas de interesse em um potencial aplicado específico; a seletividade decorrente dos processos de oxirredução do analito em eletrodo de trabalho feito com material específico, ou seja, material de eletrodo; grande sensibilidade e baixos limites de detecção resultante tanto das técnicas de pré-concentração quanto de modos de aquisição de sinal que proporcionam baixo sinal de fundo, entre outras vantagens, e por fim o eletrodo auxiliar que foi introduzido para assegurar uma situação potencioestática, nessa configuração, os eletrodos são conectados a um amplificador operacional, que atuará quando for aplicada uma diferença de potencial entre o eletrodo de trabalho e o eletrodo de referência, fazendo com que a resistência do eletrodo de referência aumente e a do eletrodo auxiliar, diminua. Assim, a corrente passará entre o eletrodo de trabalho e o auxiliar, evitando que ocorram distúrbios no eletrodo de referência. (PACHECO et al., 2013).

Além das vantagens explicitadas acima ainda pode-se destacar grande viabilidade, especificidade, exatidão, alta sensibilidade, redução do custo, impacto ambiental e baixo consumo de reagentes. Dentre as técnicas mais difundidas destacam-se as voltametrias cíclicas e de pulso diferencial (GONÇALVES et al., 2011).

2.9.3.1 Voltametria Cíclica

A voltametria cíclica constitui uma técnica eficiente no estudo de mecanismos de sistemas mediadores, permitindo a sua caracterização a partir dos potenciais dos picos de intensidade registrados e das modificações provocadas por alteração da velocidade de varrimento. Em contrapartida, permite o estudo comparativo de materiais de eletrodo e do estado da superfície do mesmo (FONSECA; PROENÇA; CAPELO, 2015). A eficácia desta técnica resulta de sua característica de rapidamente proporcionar informações sobre a termodinâmica de processos redox, da cinética de reações heterogêneas de transferência de elétrons e sobre reações químicas acopladas a processos adsorptivos (PACHECO et al., 2013).

2.9.3.2 Voltametria de Pulso Diferencial

Na voltametria de pulso diferencial, pulsos de amplitude fixos sobrepostos a uma rampa de potencial crescente são aplicados ao eletrodo de trabalho. A instrumentação foi desenvolvida de tal modo que as medidas de corrente e aplicações de potencial e pulsos de potencial sejam realizados em intervalos de tempo muito pequenos (ALEIXO, 2003). Pelo seu desempenho, modernas técnicas de pulso têm substituído a polarografia clássica na análise no laboratório. As distintas técnicas de pulso são todas baseadas em medidas de potencial / corrente (SKOOG et al., 2011).

A voltametria de pulso diferencial é uma técnica extremamente útil para medir vestígios de espécies orgânicas e inorgânicas. A maior sensibilidade da voltametria de pulso diferencial pode ser atribuída a uma melhora da corrente faradaica ou uma diminuição da corrente capacitiva (PACHECO et al., 2013).

2.10 Sensores eletroquímicos para análise de HPA's

As técnicas tradicionais para monitoramento de HPA's são realizadas principalmente por instrumentos de análise, tais como, CLAE acoplada com sondas fluorométricas, fotodiodo-matriz, ultravioleta ou massa detector de espectroscopia; Cromatografia Gasosa (CG) combinada com detector de ionização de chama ou espectrometria de massa, cromatografia fluida com espectroscopia ultravioleta, nefelometria.

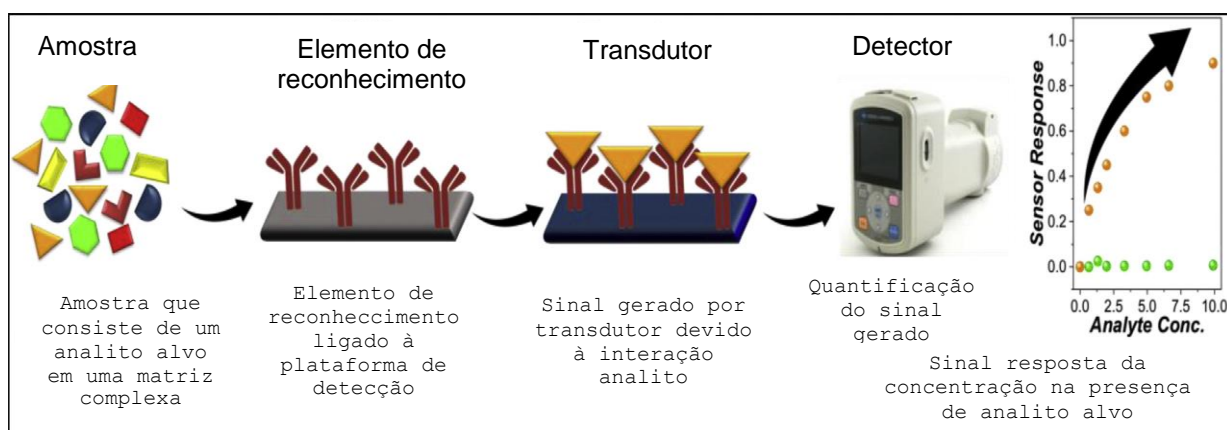
Embora estes métodos sejam precisos, e se mostrem de excelente especificidade e sensibilidade para a detecção de HPA's, eles ainda são geralmente realizados em laboratórios e são extremamente onerosos, exigem muitos recursos para as análises, o intervalo de tempo entre a coleta da amostra e análise destas é um fator crítico, pois influencia a precisão da detecção. Isso se deve ao requisito de manutenção da integridade original da amostra coletada que poderia causar alteração em função do tempo de armazenamento devido à natureza lipofílica e volátil dos HPA's (PANDEY; KIM; BROWN, 2011).

É primordial que estes procedimentos sejam realizados por um técnico capacitado em um laboratório adequado. Essas técnicas utilizam uma grande

quantidade de solventes orgânicos que causam impacto ambiental além de expor esses analistas a agentes nocivos à saúde. Dessa forma, percebe-se a necessidade de uma tecnologia analítica de baixo custo que possa levar a resultados imediatos, simples e sensíveis para a detecção dos HPA's (LIN et al., 2007). Sendo assim, há um interesse crescente em desenvolver métodos de monitoramento fáceis, confiáveis, econômicos e rápidos (BEHERA et al., 2018).

Define-se um sensor como um dispositivo analítico para detectar qualitativa ou quantitativamente a presença do analito alvo, incluindo moléculas pequenas, macromoleculares ou até mesmo células inteiras, se este for um biosensor (PERUMAL; HASHIM, 2013). Um sensor consiste basicamente em três componentes principais, um elemento de reconhecimento, Molécula de Recognition Element (MRE), um transdutor e um detector conforme mostra a Figura 6. (RAHAIE; KAZEMI, 2010). No momento em que uma amostra complexa contendo a molécula alvo entra em contato com o sensor, o MRE identifica seletivamente o analito alvo, e, portanto, traz um elemento de especificidade e seletividade para o sensor (PERUMAL; HASHIM, 2013; SAHA et al., 2012).

Figura 6 - Diferentes componentes de um sensor funcional que vão desde um elemento de reconhecimento molecular (MRE), um elemento transdutor e um componente detector, levando eventualmente a um sinal de resposta de um evento de biossensor.



Fonte: (BEHERA et al., 2018)

Os biossensores são tipicamente categorizados com base na MRE ou a plataforma do transdutor. Estes podem ser ópticos, colorimétrico, fluorométrico, luminométrica, espectrometria, como de espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier - FTIR, Espectroscopia Raman e *Surface enhanced Raman scattering* (SERS), ressonância plasmônica de superfície – SPR (ALDEWACHI et al.,

2018; CARNOVALE et al., 2016; KARIM et al., 2018; LE et al., 2017; RAHAIE; KAZEMI, 2010; ZOHORA et al., 2017).

A seguir podem-se observar as plataformas de biosensores disponíveis atualmente para detecção de HPA's por métodos eletroquímicos, e as principais características desses biosensores resumidas na Tabela 3.

Tabela 3 - Diferentes plataformas biossensíveis para detecção de HPA's.

Biossensores eletroquímicos						
MRE	Analito alvo	Limite de detecção	Vantagens	Desvantagens	Aplicação em tempo real recomendação	Referências
Anticorpos específicos do HPA	HPA's	LD de 0,02 ppb; faixa operacional linear de 0,05 e 1 ppb	<p>A sensibilidade do método foi pelo menos 40 vezes menor que o ensaio comercialmente disponível</p> <p>O LD foi menor que o padrão definido pela EPA para Método 8310 e outros métodos relatados para detecção de HPA's</p> <p>O funcionamento do sensor sem o uso de solventes orgânicos preserva a natureza comparado com outros métodos analíticos disponíveis para detecção de HPA's</p> <p>Boa recuperação durante o teste com amostras de água do que ao método convencional ELISA</p> <p>O biossensor desenvolvido teve resposta simples e rápida (tempo de análise 50 min)</p>	Nenhuma informação encontrada	Método para determinar HPA'a em amostras de água da torneira não tratada	(Lin et al., 2007)
Anticorpos específicos do HPA	Benzo(a)pireno	LD de 4 pM faixa de detecção de 8 pM a 2 nM	<p>Boa resposta do sensor em termos de reprodutibilidade, precisão e estabilidade.</p> <p>Dinâmica ampla da faixa linear</p> <p>Alta sensibilidade devido ao estratégia de amplificação dupla</p> <p>Potencial para usar abordagem para detecção múltipla de analito alvo Simultaneamente</p>	Falta de dados específicos	O sensor foi usado para avaliar benzo(a)pireno Presente em amostras de água	(Lin et al., 2012)
Anticorpos específicos do HPA	Fenantreno	L ₀ D de 0,8 ng mL ⁻¹ (800 ppt) e faixa linear de 0,5 e 45 ng mL ⁻¹	<p>Comparativamente menos tempo de análise devido à coexposição indireta</p> <p>Altamente sensível</p> <p>Bom método na determinação da quantidade total de HPA's presente nas amostras</p> <p>Capacidade de usar este conceito para fabricação de dispositivos portáteis</p>	<p>Reatividade cruzada com outros HPA's estruturalmente semelhantes</p> <p>Sensibilidade do sensor que obteve durante o teste de amostra em tempo real foi menos sensível ao valores originais</p>	O método foi usado para avaliar fenantreno em rio e em amostras de água da torneira	(Fahnrich et al., 2003)

Fonte: (BEHERA et al., 2018)

3. Objetivos

3.1 Objetivo geral

Desenvolver um método de análise eletroquímico rápido e de baixo custo para os HPA's em amostras derivadas da cana-de-açúcar

3.2 Objetivos específicos

- ✓ Preparar eletrodo de ouro modificado com ferroceno carboxílico;
- ✓ Caracterizar o eletrodo por voltametria cíclica
- ✓ Caracterizar o processo de modificação por FTIR;
- ✓ Analisar o comportamento eletroquímico de substâncias derivadas da cana-de-açúcar bem como a presença de HPA's por meio de voltametria cíclica e voltametria de pulso diferencial;
 - ✓ Desenvolver um sensor eletroquímico para análises dos HPA's escolhidos;
 - ✓ Aplicar os métodos desenvolvidos em amostras reais de açúcar demerara, rapadura, mel de engenho e açúcar mascavo;
 - ✓ Validar as análises por CLAE.

4. Materiais e Métodos

4.1 Padrões, solventes, reagentes e amostras

Todos os reagentes químicos utilizados nas análises e listados na Tabela 4 foram de grau de pureza analítica. Todas as soluções foram preparadas em água ultrapura.

Tabela 4. Lista de reagentes de pureza analítica.

Reagentes	Aquisição
Ácido ferroceno carboxílico	Alfa Aesar
Ácido sulfúrico (H ₂ SO ₄)	Sigma-Aldrich
Antraceno	Sigma-Aldrich
Acetonitrila	Sigma-Aldrich
Benzo(a)pireno	Sigma-Aldrich
Benzo(b)fluoranteno	Sigma-Aldrich
Clorofórmio	Sigma-Aldrich
Etanol	Sigma-Aldrich
Fenantreno	Sigma-Aldrich
Ferricianeto de potássio (K ₃ [Fe(CN) ₆])	Sigma-Aldrich
Ferrocianeto de potássio (K ₄ [Fe(CN) ₆])	Gold Lab
Fosfato de sódio diidratado (Na ₂ HPO ₄)	CRQ Química
Fosfato de sódio monoidratado (NaH ₂ PO ₄)	CRQ Química
Hidróxido de potássio (KOH)	Sigma-Aldrich
Hidrocloreto de 2-aminoetanotiol (AET)	Sigma-Aldrich
Hidrocloreto de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etil-carbodiimida (EDC)	Sigma-Aldrich
Naftaleno	Sigma-Aldrich
N-hexano	Neon Comercial
N-hidroxisuccinamida (NHS)	Sigma-Aldrich
Nitro blue tetraolium (NBT)	Sigma-Aldrich
Solvente acetonitrila grau CLAE	Sigma-Aldrich

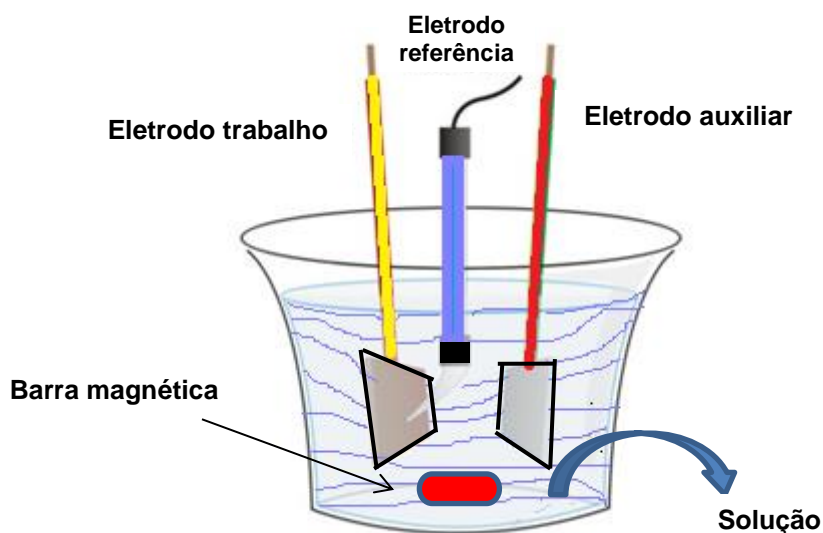
Fonte: Autora, 2018.

4.2 Estudos eletroquímicos

Os estudos eletroquímicos de Voltametria Cíclica (VC) e Voltametria de Pulso Diferencial (VPD) foram realizados à temperatura ambiente (25 ± 1 °C) em potenciostato PGSTAT (AUT73222) da Metrohm Autolab® utilizando uma célula eletroquímica de três eletrodos, sendo o de trabalho, um eletrodo de carbono vítreo para as análises com VC e um eletrodo de ouro modificado para análises de VPD, um fio de platina como eletrodo auxiliar e o sistema Ag|AgCl|Cl⁻ (saturado) como o de referência. A verificação do pH das soluções tampão foi realizado em pHmetro da Quimis.

A Figura 7 mostra eletrodo de ouro/carbono vítreo (METHROM, diâmetro 1,6 mm). Os gráficos processados foram tratados utilizando o programa Microlab Origin Pro 2016.

Figura 7 - Sistema com os três eletrodos para análises eletroquímicas.



Fonte: Autora, 2018

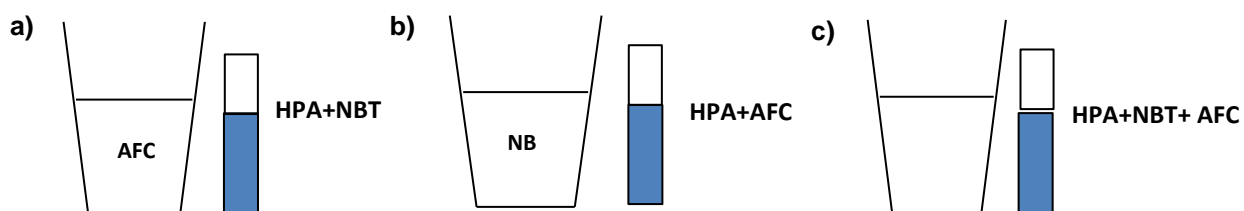
O eletrodo de carbono vítreo passou por uma limpeza mecânica antes de cada varredura de potencial. Foi polido com alumina ($0,3 \mu\text{m}$) e lavado abundantemente com água, antes de ser levado ao ultrassom por 30s em etanol, para remoção das partículas residuais na superfície do eletrodo.

Após o procedimento de limpeza, foi realizado o teste em VC com ferri/ferrocianeto de potássio $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ nos potenciais de $-0,3$ à $0,6 \text{ V}$, para verificar a área eletroativa do eletrodo, assim como a eficiência do polimento. Em seguida, após lavagem com água ultrapura os eletrodos foram utilizados no estudo eletroquímico descrito abaixo.

Utilizando a técnica de VC foram realizados três experimentos distintos. Inicialmente foi disposto em solução na cela eletroquímica o ferroceno carboxílico (AFC) e no recipiente foi misturado o HPA, neste caso o antraceno juntamente com o Nitro Blue Tetraolium (NBT) como mostra a Figura 8a. Posteriormente em um segundo experimento foi colocado na cela eletroquímica o NBT em solução e no recipiente foi disposto desta vez o HPA, neste caso o benzo(a)pireno juntamente

com o AFC como mostra a Figura 8b. Finalmente no terceiro experimento nada foi colocado na cela eletroquímica e no recipiente foram dispostos o HPA neste caso benzo(b)fluoranteno juntamente com o NBT e o AFC, como apresentado na Figura 8c.

Figura 8 – Esquema ilustrativo dos experimentos de Voltametria Cíclica com eletrodo de carbono vítreo.



Fonte: Autora, 2018

A solução estoque foi preparada com $5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ composta por antraceno e 1 mg de NBT, usado como catalisador, diluídos em 2 mL de etanol. Foi colocado na cela eletroquímica 5 mL de tampão fosfato, pH 7, e nos experimentos foram utilizados 1mg de AFC e posteriormente realizado as adições de 5, 10, 20, 50, 70, e 100 μM da solução estoque, analisadas por VC.

Ressaltamos que essa solução estoque foi repetida para todos os padrões de forma equimolar: antraceno, benzo(a)pireno, benzo(b)fluoretheno, fenantreno e naftaleno

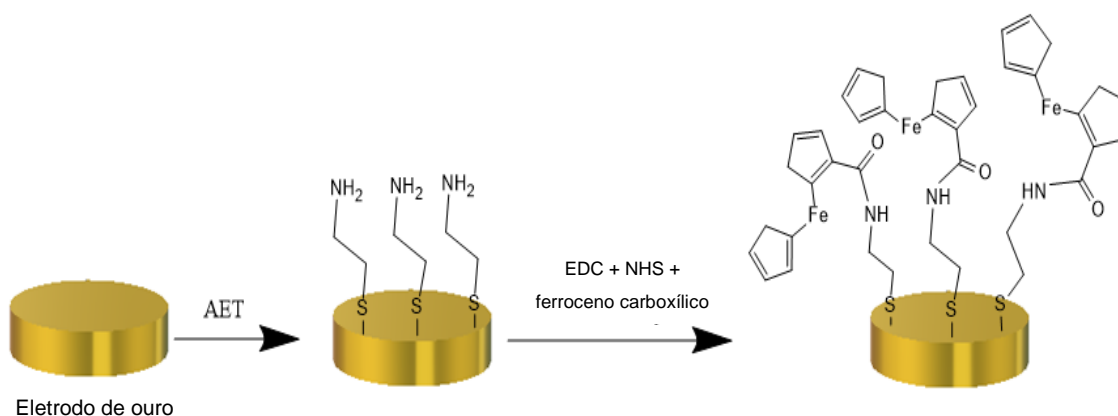
4.3 Preparação de eletrodo de ouro modificado com ferroceno carboxílico

Inicialmente foi realizada a limpeza do eletrodo, pois um eletrodo de superfície limpa é indispensável para a formação de monocamadas auto-organizadas, sendo assim, o eletrodo de ouro foi submetido a um tratamento eletroquímico em solução de H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, na faixa de potencial de $-0,4 \text{ V}$ a $1,5 \text{ V}$ e v de $0,1 \text{ V s}^{-1}$ por 30 ciclos.

Após o procedimento de limpeza, foi realizado o teste em VC com ferri/ferrocianeto de potássio $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ nos potenciais de $-0,3$ à $0,6 \text{ V}$, para verificar a área eletroativa do eletrodo.

A partir daí o eletrodo de ouro foi modificado, sendo tratado durante 5 horas com solução preparada por 1,5 mg de aminoetanotiol (AET) em 10 mL de etanol PA e em seguida, durante mais 5 horas, com solução em 10 mL de etanol com 3,8 mg de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC), 4,6 mg de N-hidroxisuccinamida (NHS) e 4,6 mg de ferroceno carboxílico. A utilização do NHS concomitantemente com EDC, possibilita melhores resultados para a imobilização. Esse processo de junção amplia a eficiência e habilita a molécula que detém o grupo carboxila a formar uma combinação estável por ligação amida, sendo a ativação por NHS fundamental para síntese de aminas reativas, conforme o esquema da Figura 9.

Figura 9 - Esquema de modificação do eletrodo de ouro



Fonte: Autora, 2018

4.4. Caracterização do eletrodo de ouro modificado

Para ter certeza que o procedimento de imobilização do AFC no eletrodo de ouro foi um eficaz, realizou-se a caracterização do eletrodo pelas técnicas de Espectroscopia de Infravermelhos (IR) com transformadas de Fourier (FTIR) e VC.

A técnica de FTIR foi escolhida, pois esta demonstra a interação da matéria com a radiação eletromagnética. A intenção do estudo é medir a quantidade de radiação produzida ou absorvida pelas moléculas ou átomos presentes nos grupos funcionais existentes, nos quais por meio de um processo matemático pelo qual o interferograma é analisado em seus componentes de frequências com suas amplitudes correspondentes mostrará a banda característica. A absorção nesta

região é associada às vibrações de deformação axial nos átomos de hidrogênio ligados a carbono, oxigênio e nitrogênio (C-H, O-H e N-H).

Foi realizado também experimento em VC para comprovar o processo imobilização eletrodica. Ainda foram feitas análises de VC no sentido de observar o comportamento da velocidade de varredura.

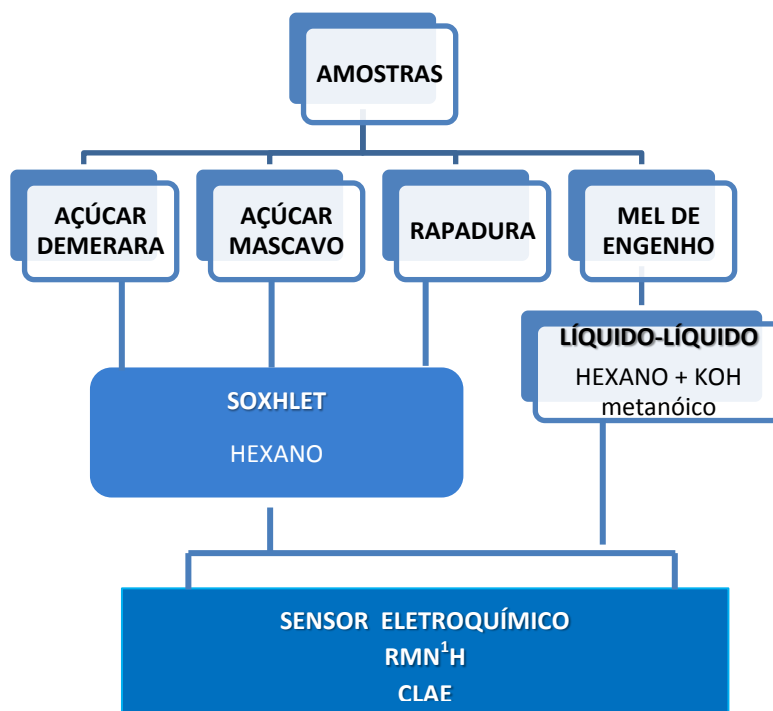
A partir deste foi realizado o estudo em VPD, desta vez com a modificação do eletrodo de ouro.

Foi utilizado uma solução estoque preparada com $5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ do padrão e 1 mg de NBT, usado como catalisador, diluídos em 2 mL de etanol. Foi colocado na cela eletroquímica 5 mL de tampão fosfato, pH 7, e nos experimentos foram utilizados 1mg de AFC e posteriormente realizado as adições 5, 10, 20, 50, 70, e 100 μM da solução estoque, analisadas por VPD. A solução estoque foi repetida para todos os padrões de forma equimolar: antraceno, benzo(a) pireno, benzo(b) fluoretheno, fhenantreno e naftaleno.

Complementado o estudo foram realizadas as análises por meio de VPD das amostras de açúcar demerara, açúcar mascavo, rapadura e mel de engenho. A solução estoque foi preparada com o extrato das amostras e adicionado a 0,5 mg de NBT em 500 μL de etanol. Na cela eletroquímica foi colocado 5 mL de tampão fosfato, pH 7 e foram feitas adições de 2 em 2 μL da solução estoque até a saturação.

4.5 Extração

A extração foi realizada em amostras reais como determina o fluxograma demonstrado na Figura 10.

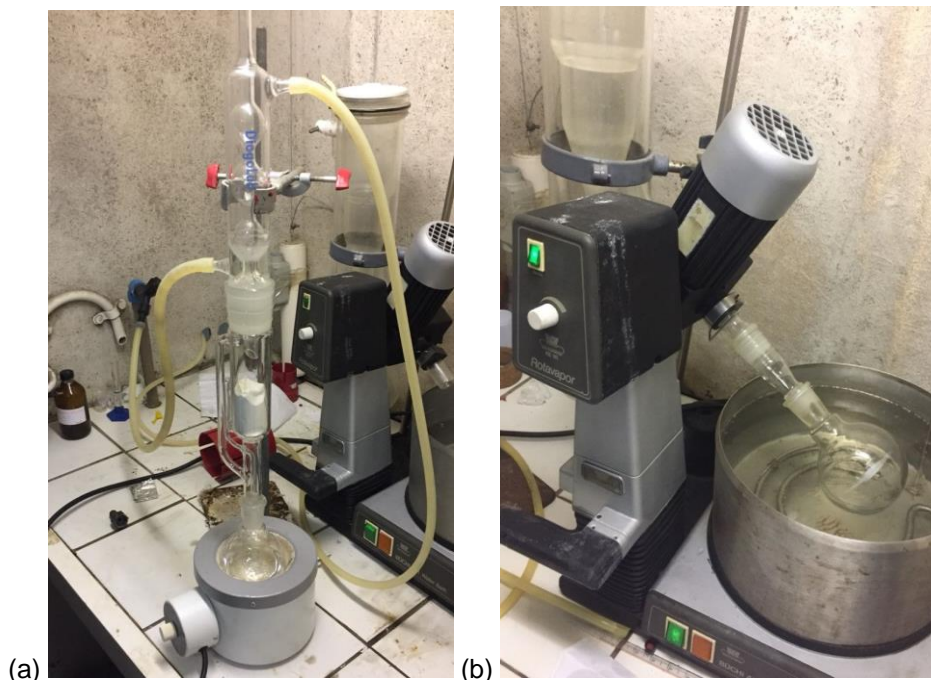
Figura 10 - Fluxograma do processo de extração de HPA's em amostras reais

Fonte: Autora, 2018.

No processo de extração, pesou-se 25 g das amostras (açúcar demerara, açúcar mascavo e rapadura) foram submetidas individualmente à extração em 100 mL de solvente n-Hexano, em um aparelho tipo Soxhlet por 4 horas. O solvente foi removido sob pressão reduzida em rotaevaporador, e obtiveram-se os extratos que foram pesados. A técnica de extração soxhlet é usada para extrair compostos não voláteis e semivoláteis de matrizes sólidas (CARUSO; ALBURDA, 2008).

Os HPA's foram extraídos das amostras reais pela metodologia citada e utilizados os equipamentos conforme apresentado na Figura 11.

Figura 11 – Processo de extração de HPA's nas amostras reais. (a) Aparelho Soxhlet em uma manta aquecedora (b) Rotaevaporador para retirada do solvente



Fonte: Autora, 2018.

Para o mel de engenho foi realizada uma extração líquido-líquido com hexano e solução aquosa. As amostras foram homogeneizadas e pesadas (25 g) em erlenmeyer, adicionaram-se 100 mL de hidróxido de potássio metanólico (2 mol L^{-1}), agitou-se por 60 minutos e deixou-se em descanso por uma noite. O material foi filtrado em funil de Buchner, transferido para um funil de separação e extraído com 2 porções de 100 mL de hexano. Juntaram-se as porções de hexano e lavou-se a fase orgânica, primeiramente, com 100 mL de metanol-água (1:1, v.v⁻¹) e, a seguir, com 100 mL de água (CARUSO; ALBURDA, 2008).

4.6 RMN ¹H

Experimentos de ressonância magnética de próton (RMN¹H) foram realizados no Instituto de Química e Biotecnologia da UFAL no equipamento 400 MHz. Os padrões e amostras foram solubilizados em hexano deuterado.

4.7 CLAE

Com o intuito de validação do método eletroquímico de análise, foi utilizada a técnica de CLAE. Nesta técnica foi utilizado como solvente uma solução de acetonitrila-água 75:25 v/v (método isocrático), fluxo de 1 mL/min, temperatura de 41°C, coluna C18. Os padrões dos HPA's foram injetados nas concentrações: 0,003 ppm; 0,005 ppm; 0,01 ppm; 0,02 ppm; 0,03 ppm. Os módulos dos equipamentos são: DGU-20A (degaseificador), LC-20AT (bomba), CBM-20A (controlador), SIL-20A (auto-injetor), CTO-20A (forno da coluna) e RF-20A (detector de fluorescência); todos da marca Shimadzu.

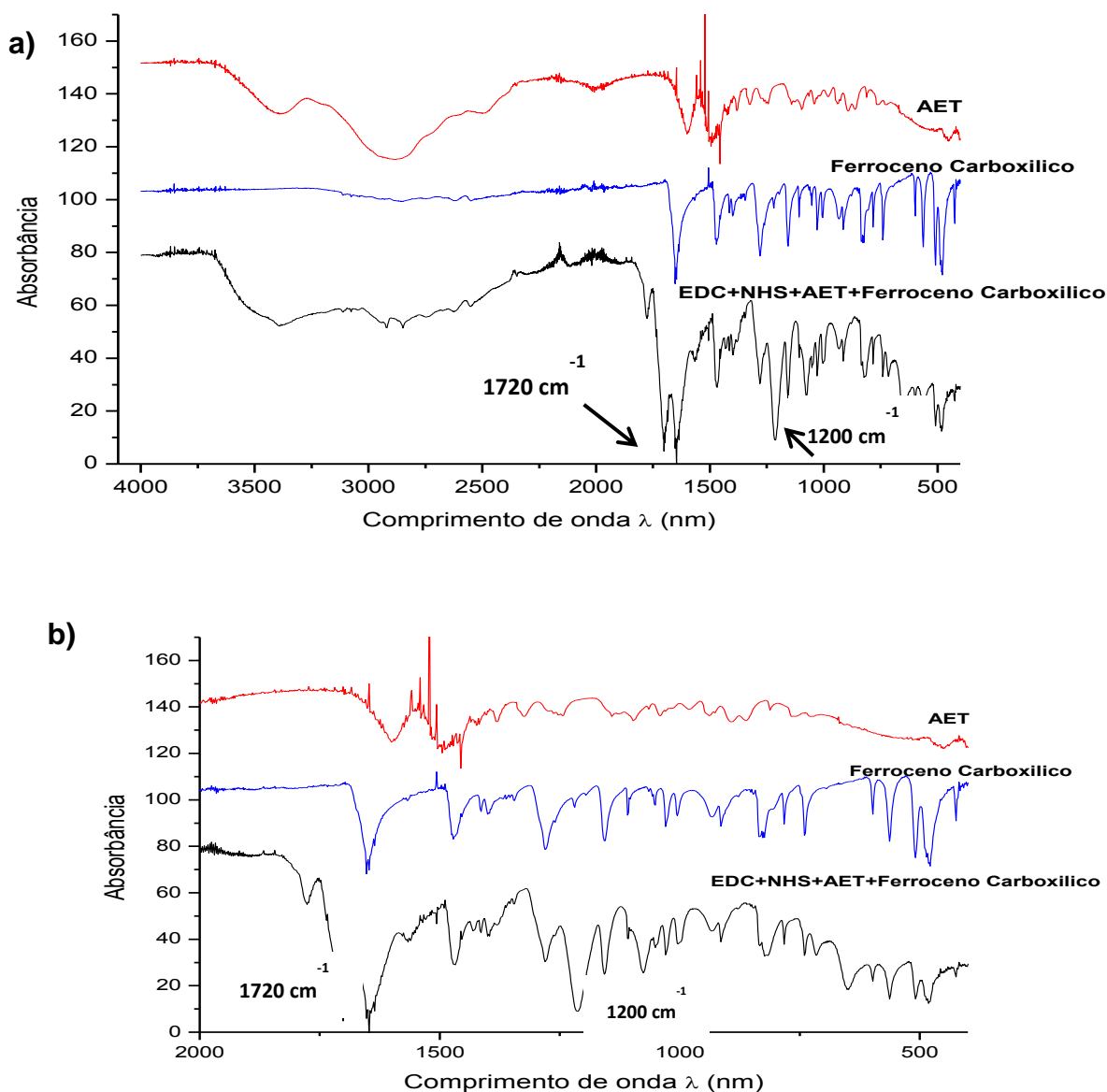
5. Resultados

Os resultados serão apresentados e discutidos na seguinte ordem: caracterização do eletrodo modificado, construção de curvas analíticas e análises com amostras reais.

5.1 Resultados obtidos com a caracterização do eletrodo de ouro modificado

Os resultados dos experimentos realizados para certificação da modificação do eletrodo de ouro apresentaram sucesso e eficiência como mostra a Figura 12a dos espectros de FTIR e a Figura 12b, a qual apresenta um estudo apenas sobre os espectros no comprimento de onda de 500 a 2000 nm.

Figura 12 a) Espectros de FTIR das substâncias aminoetanotiol, ferroceno carboxílico e da mistura hidrocloreto de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etil-carbodiimida + n-hidroxissuccinamida + aminoetanotiol + ferroceno carboxílico. b) Espectros mostrando picos característicos entre 500 e 2000 nm.



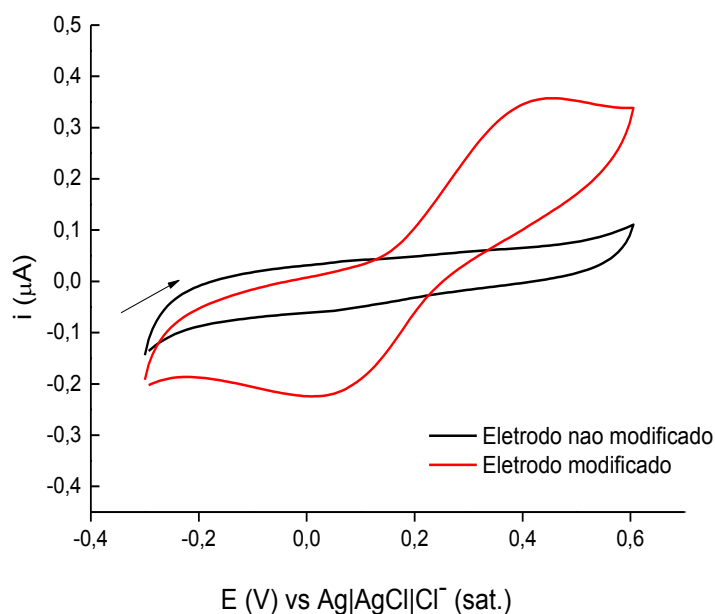
Fonte: Autora, 2018.

A Figura 12a e 12b apresentam os espectros do AET, do AFC e EDC+NHS+AET+ AFC (produto final da reação) individualmente. O AET e o AFC apresentaram seus picos característicos, ou seja, entre 3000 e 3500 nm, referente aos estiramentos das ligações C-H; N-H e O-H. Pode-se notar claramente no espectro de FTIR do produto da reação, a presença de pico em 1720 cm^{-1} proveniente do estiramento da ligação C=O de amida bem como a presença do pico

em 1200 cm^{-1} da deformação angular da ligação C-N, comprovando o processo de modificação, ou seja, a reação do grupo amino livre com o grupo carboxílico.

Experimentos de VC corroboraram com a certeza do sucesso da imobilização do AFC mediante a presença de um pico reversível de oxidação em $+0,35\text{ V}$ do sistema $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ mostrados na Figura 13.

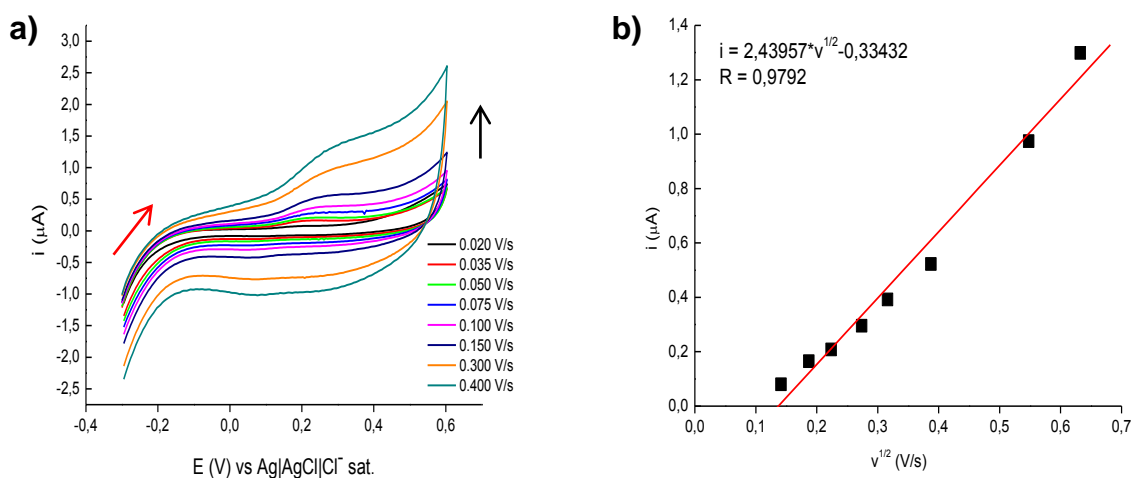
Figura 13 - Voltamogramas Cíclicos do eletrodo de ouro modificado com ferroceno carboxílico, em tampão fosfato e velocidade de varredura $0,1\text{ V/s}$.



Fonte: Autora, 2018

O efeito da velocidade de varredura demonstrou uma corrente de pico controlada por adsorção ($i_{pc} \propto v$). Conforme mostra a Figura 14a pode-se verificar que a corrente flui naturalmente à medida que o potencial vai sendo aplicado. Na Figura 14b mostra o plote da corrente de pico anódica com a raiz quadrada da velocidade da varredura, demonstrando a ocorrência de adsorção na superfície eletródica.

Figura 14 - a) Voltamogramas Cíclicos para avaliação do efeito da velocidade de varredura em eletrodo de ouro na faixa de -0,3 a 0,6 V. b) Plote da corrente em função da raiz quadrada da velocidade de varredura.

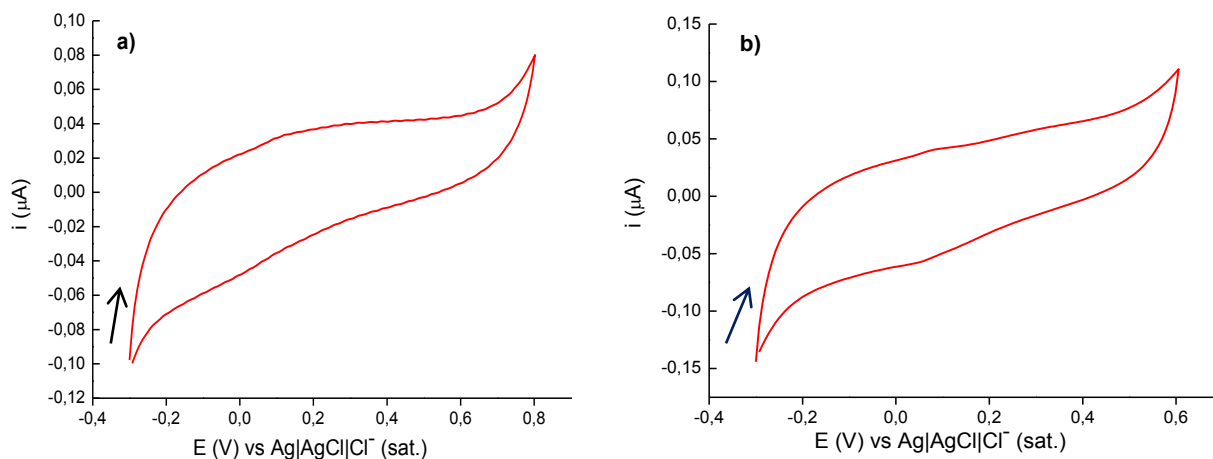


Fonte: Autora, 2018

5.2 Estudos eletroquímicos dos HPA's

Experimentos eletroquímicos dos padrões antraceno, benzo(a)pireno, benzo(b)fluoranteno, naftaleno e fenantreno em eletrodo de carbono vítreo e de ouro não apresentaram sinais de oxidação, ou seja, são eletroinativos no meio e nos eletrodos estudados, como demonstrado nas Figuras 15a e 15b. Os compostos benzo(a)pireno e benzo(b)fluoranteno foram escolhidos para representar os demais HPAs estudados.

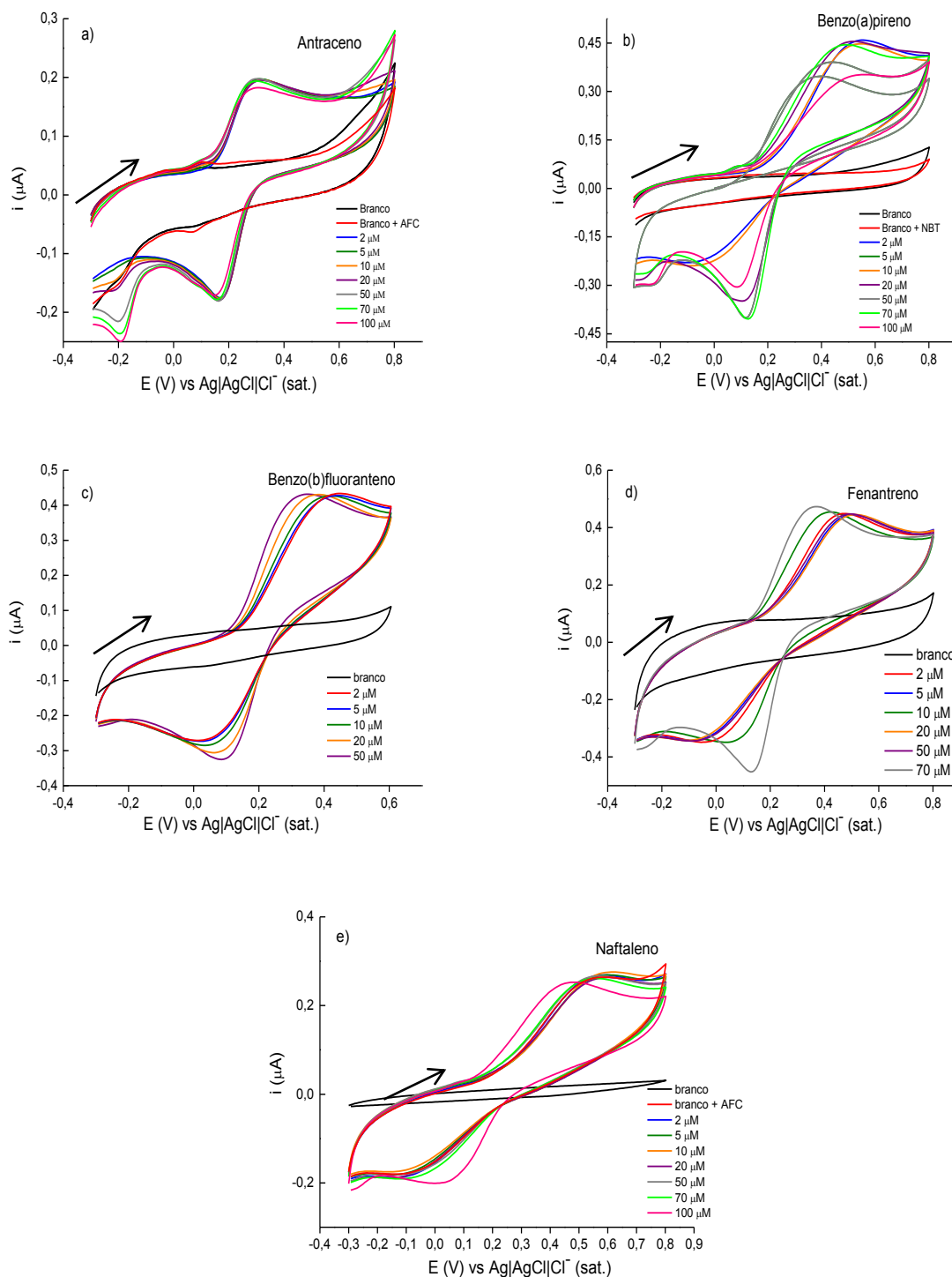
Figura 15 - Voltamogramas Cíclicos em eletrodo de carbono vítreo: a) benzo(a)pireno (5 mM) e b) benzo(b)fluoranteno (5 mM) em tampão fosfato pH 7,0. Eletrodo de carbono vítreo, $v = 0,100$ V/s.



Fonte: Autora, 2018

Os HPA's foram analisados em presença do NBT e do AFC, ambos em solução tampão. Os voltamogramas estão apresentados nas Figuras 16 a, b, c, d e e.

Figura 16 - Voltamogramas Cíclicos em eletrodo de carbono vítreo: a) antraceno, b) benzo(a)pireno, c) benzo(b)fluoranteno, d) fenantreno, e) naftaleno (5 mM) em tampão fosfato pH 7,0. Eletrodo de carbono vítreo, $v = 0,100$ V/s.



Fonte: Autora, 2018

A Figura 16a mostra em eletrodo de carbono vítreo, o AFC que foi colocado em solução e posteriormente foi adicionado o antraceno + NBT. Este experimento apresentou um pico redox reversível característico do AFC. Adições de concentrações de antraceno mostrou o forte efeito catalítico nesse sistema redox, bem como o aparecimento do novo pico de redução em aproximadamente -0,2 V. Esse sistema mostra uma eficiente estabilidade, pois não houve deslocamento de potencial.

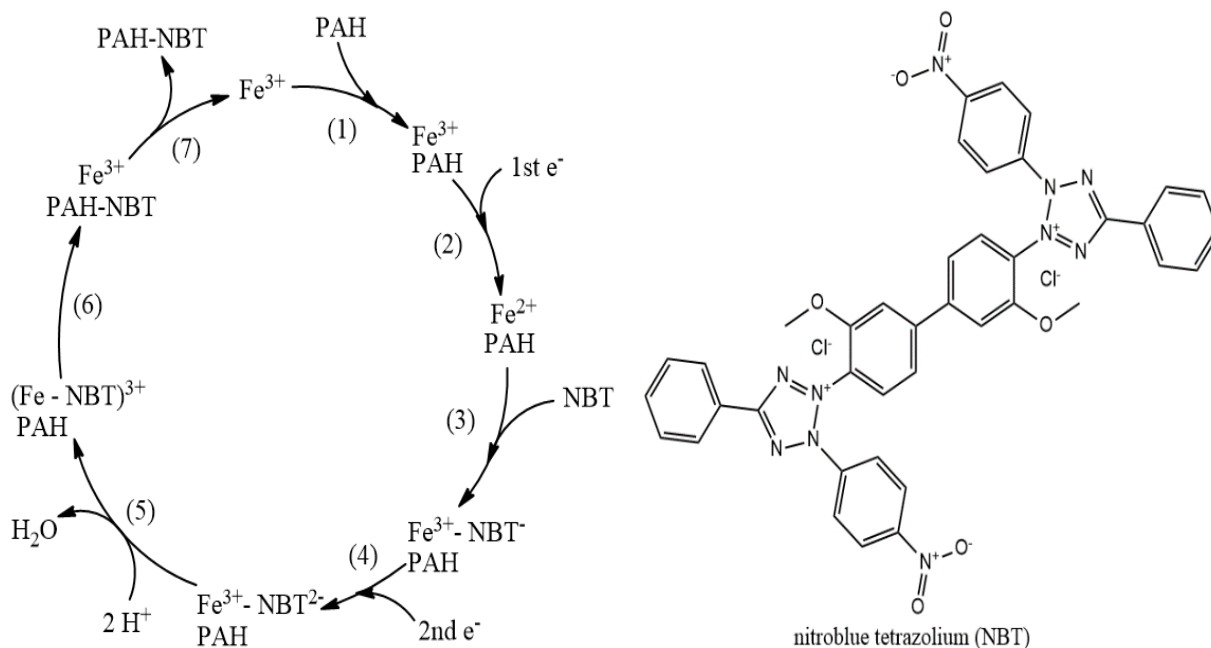
No segundo experimento como mostra a Figura 16b o NBT foi colocado previamente em solução, sendo depois adicionado o benzo(a)pireno + AFC, ocorreu neste um pico redox reversível confirmando o efeito catalítico, contudo houve um deslocamento de potencial que mostra que o sistema não é tão estável quanto anterior.

Posteriormente foi realizado um terceiro experimento como mostra a Figura 16c, no qual foi colocado desta vez em solução todos os compostos utilizados, sendo eles o NBT+ AFC + benzo(b)fluoranteno e pode-se observar que apesar do efeito catalítico, o deslocamento de potencial foi ainda maior, mostrando um sistema menos estável. Neste sistema a onda de redução em -0,2 V não foi observada.

Apesar de ter sido observado o efeito catalítico em todos os voltamogramas cíclicos, o aparecimento do novo pico de redução foi observado para todos os HPA's estudados com exceção do benzo(b)fluoranteno que embora tenha apresentado o pico redox, não demonstrou a onda de redução em -0,2 V.

Um provável mecanismo deste efeito catalítico está representado na Figura 17. O NBT recebe elétron do Fe^{2+} do AFC e forma o complexo Fe^{3+} -NBT-HPA. Este sistema é eletroquimicamente reduzido formando Fe^{3+} -NBT²⁻-HPA que após etapas de protonação e perda de água, o complexo Fe^{3+} -HPA-NBT é regenerado.

Figura 17 - Provável mecanismo da reação entre HPA's, NBT e ferroceno carboxílico. A direita está a estrutura do NBT.

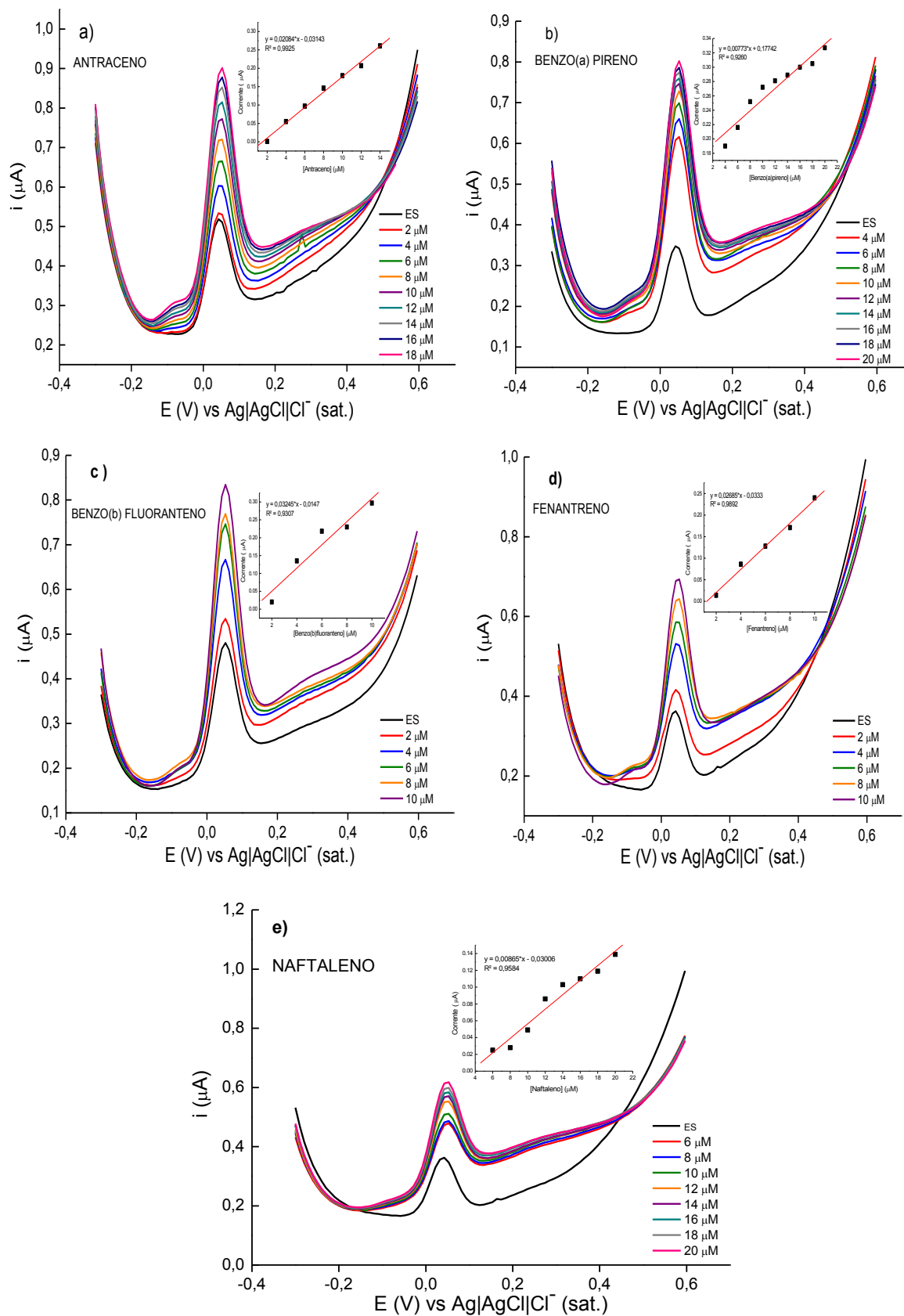


Fonte: (Adaptado de LEMOS, A.J.G, TRINDADE, E.J, 2014)

Mediante estes resultados, o primeiro modelo foi escolhido para o desenvolvimento do sensor, ou seja, o AFC foi imobilizado quimicamente na superfície do eletrodo de ouro utilizando como espaçador molecular o AET conforme esquematizado na Figura 9, na página 48.

A partir da modificação do eletrodo de ouro com AFC, foram construídas curvas analíticas utilizando a técnica de VPD. À medida que foram adicionadas as concentrações dos padrões de HPA's, no intervalo de 2 a 20 μM como mostram as Figuras 18 a, b, c, d, e.

Figura 18 - Voltamogramas de Pulso Diferencial da solução estoque de antraceno, benzo(a)pireno, benzo(b)fluoranteno, fenantreno, naftaleno todos a 5,0 mmol L⁻¹ em eletrodo de ouro modificado na faixa de - 0,3 a 0,6 V



Fonte: Autora, 2018

As análises de VPD mostraram que todos os padrões aumentaram a intensidade da corrente de pico à medida que vai ocorrendo um aumento da concentração em solução, mostrando um comportamento eletroquímico de oxidação.

As curvas de corrente versus concentração para cada HPA estudado também estão inseridas na Figura 18. Na tabela 5 estão apresentados os valores de referência destas curvas (R, LD e LQ) e na tabela 6 as equações de retas para cada padrão.

Tabela 5 - Valores de referência das curvas (R, LD e LQ).

COMPOSTO	R	LD (µM)	LQ(µM)
Antraceno	0,9925	1,2322	4,1075
Fenantreno	0,9892	1,1464	3,8212
Naftaleno	0,9584	3,3052	11,0173
Benzo(b)fluoranteno	0,9307	2,9898	9,9661
Benzo(a)pireno	0,9260	4,9677	16,5589

Fonte: Autora, 2018

Tabela 6 - Parâmetros A, B e R² das curvas analíticas para os padrões antraceno, benzo(a)pireno, benzo(b)fluoranteno, fenantreno e naftaleno.

Padrões	Parâmetros da reta $Y = A + B \cdot X$		
	A	B	R ²
Antraceno	-0,03143	0,02084	0,9925
Fenantreno	-0,03330	0,02685	0,9892
Naftaleno	-0,03006	0,00865	0,9584
Benzo(b)fluoranteno	-0,01470	0,03245	0,9307
Benzo(a)pireno	0,17742	0,00773	0,9260

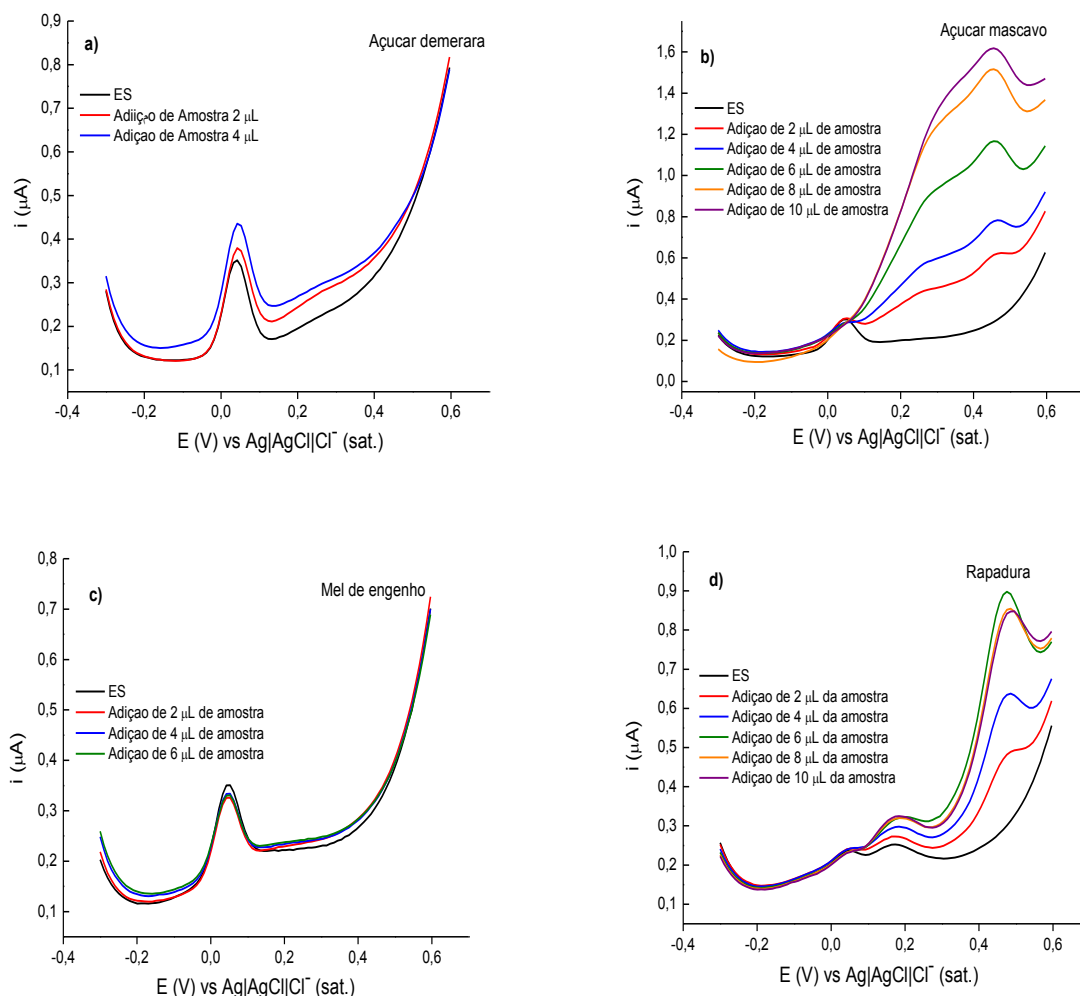
Fonte: Autora, 2018

Pode-se observar nas tabelas que estas curvas analíticas apresentaram valores de LD e LQ maiores do que alguns imunossensores apresentados na literatura (BEHERA et al., 2018). Entretanto, o sensor aqui desenvolvido é mais simples, possui resposta estável e pode ser utilizado no desenvolvimento de microdispositivos de análises do tipo point-of-care.

5.3 Análise eletroquímica de amostras reais

Foram analisadas amostras reais de açúcar demerara, açúcar mascavo, mel de engenho e rapadura. Os resultados de VPD estão representados nas Figuras 19 a, b, c, d.

Figura 19 - Voltamogramas de pulso diferencial da solução estoque: a) açúcar demerara, b) açúcar mascavo, c) mel de engenho e d) rapadura em eletrodo de ouro na faixa de -0,3 a 0,6 V



Fonte: Autora, 2018.

Utilizando o sensor, como mostrado nos voltamogramas, a presença de HPA's foi verificada nas amostras de açúcar demerara e mel de engenho mediante o efeito catalítico observado na onda do NBT em +0,11 V. Como visto anteriormente, o sensor não é seletivo para cada HPA analisado, todavia responde a todos eles. Desta forma, usamos todas as curvas analíticas e equações de reta de cada padrão para quantificar a presença dos mesmos nas amostras. Os resultados estão apresentados nas tabelas 7, 8, 9 e 10. O sensor apresentado também não possui a sensibilidade de outros sensores relatados na literatura, mas tem a vantagem da simplicidade e estabilidade nem sempre observada nos imunossensores encontrados na literatura.

Tabela 7 - Quantificação de HPA's na amostra de açúcar demerara.

Adição de amostra	Corrente de pico (μA)	HPA	Concentração (μM)
2 μL	0,01777	Antraceno	2,3608
		Benzo(a)pireno	–
		Benzo(b)fluoranteno	1,0006
		Fenantreno	1,9021
		Naftaleno	5,5295
4 μL	0,03814	Antraceno	3,3383
		Benzo(a)pireno	–
		Benzo(b)fluoranteno	1,6284
		Fenantreno	2,6607
		Naftaleno	7,8844

Fonte: Autora, 2018.

Tabela 8 - Quantificação de HPA's na amostra de açúcar mascavo.

Adição de amostra	Corrente de pico (μA)	HPA	Concentração (μM)
2 μL	0,06811	Antraceno	4,7764
		Benzo(a)pireno	–
		Benzo(b)fluoranteno	2,5519
		Fenantreno	3,7769
		Naftaleno	11,3491
4 μL	0,11594	Antraceno	7,0715
		Benzo(a)pireno	–
		Benzo(b)fluoranteno	4,0259
		Fenantreno	5,5583
		Naftaleno	16,8786
6 μL	0,12946	Antraceno	7,7203
		Benzo(a)pireno	–
		Benzo(b)fluoranteno	4,4425
		Fenantreno	6,0618
		Naftaleno	18,4416
8 μL	0,13050	Antraceno	7,7702
		Benzo(a)pireno	–
		Benzo(b)fluoranteno	4,4746
		Fenantreno	6,1006
		Naftaleno	18,5618
10 μL	0,13154	Antraceno	7,8201
		Benzo(a)pireno	–
		Benzo(b)fluoranteno	4,5066
		Fenantreno	6,1393
		Naftaleno	18,6821

Fonte: Autora, 2018.

Tabela 9 - Quantificação de HPA's na amostra de mel de engenho

Adição de amostra	Corrente de pico (μA)	HPA	Concentração (μM)
2 μL	0,02946	Antraceno	2,9218
		Benzo(a)pireno	–
		Benzo(b)fluoranteno	1,3609
		Fenantreno	2,3374
		Naftaleno	6,8809
4 μL	0,02080	Antraceno	2,5062
		Benzo(a)pireno	–
		Benzo(b)fluoranteno	1,0940
		Fenantreno	2,0149
		Naftaleno	5,8798
6 μL	0,03228	Antraceno	3,0571
		Benzo(a)pireno	–
		Benzo(b)fluoranteno	1,4478
		Fenantreno	2,4425
		Naftaleno	7,2069

Fonte: Autora, 2018.

Tabela 10 - Quantificação de HPA's na amostra de rapadura.

Adição de amostra	Corrente de pico (μA)	HPA	Concentração (μM)
2 μL	0,00905	Antraceno	1,9424
		Benzo(a)pireno	–
		Benzo(b)fluoranteno	0,7319
		Fenantreno	1,5773
		Naftaleno	4,5214
4 μL	0,01262	Antraceno	2,1137
		Benzo(a)pireno	–
		Benzo(b)fluoranteno	0,8419
		Fenantreno	1,7102
		Naftaleno	4,9341
6 μL	0,01564	Antraceno	2,2586
		Benzo(a)pireno	–
		Benzo(b)fluoranteno	0,4530
		Fenantreno	1,2402
		Naftaleno	3,4751
8 μL	0,01674	Antraceno	2,3114
		Benzo(a)pireno	–
		Benzo(b)fluoranteno	0,9689
		Fenantreno	1,8637
		Naftaleno	5,4104
10 μL	0,01756	Antraceno	2,3508
		Benzo(a)pireno	–
		Benzo(b)fluoranteno	0,9941
		Fenantreno	1,8942
		Naftaleno	5,5052

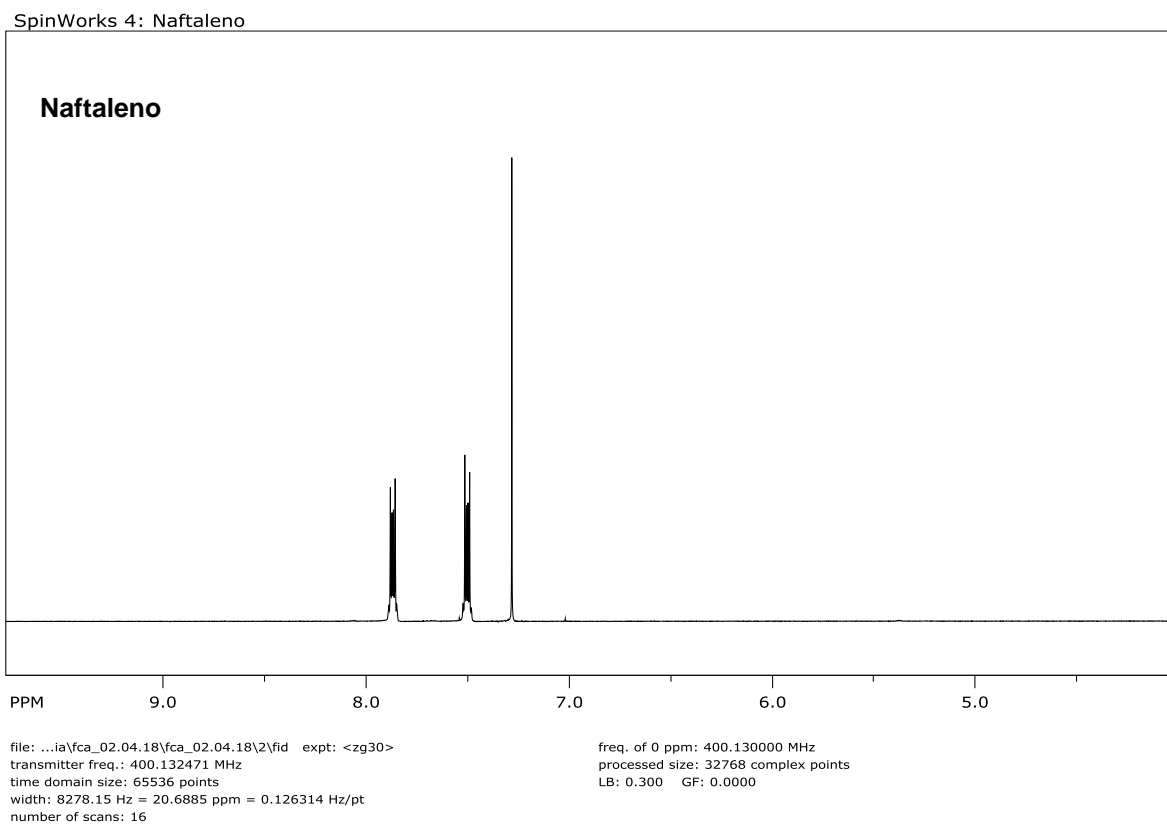
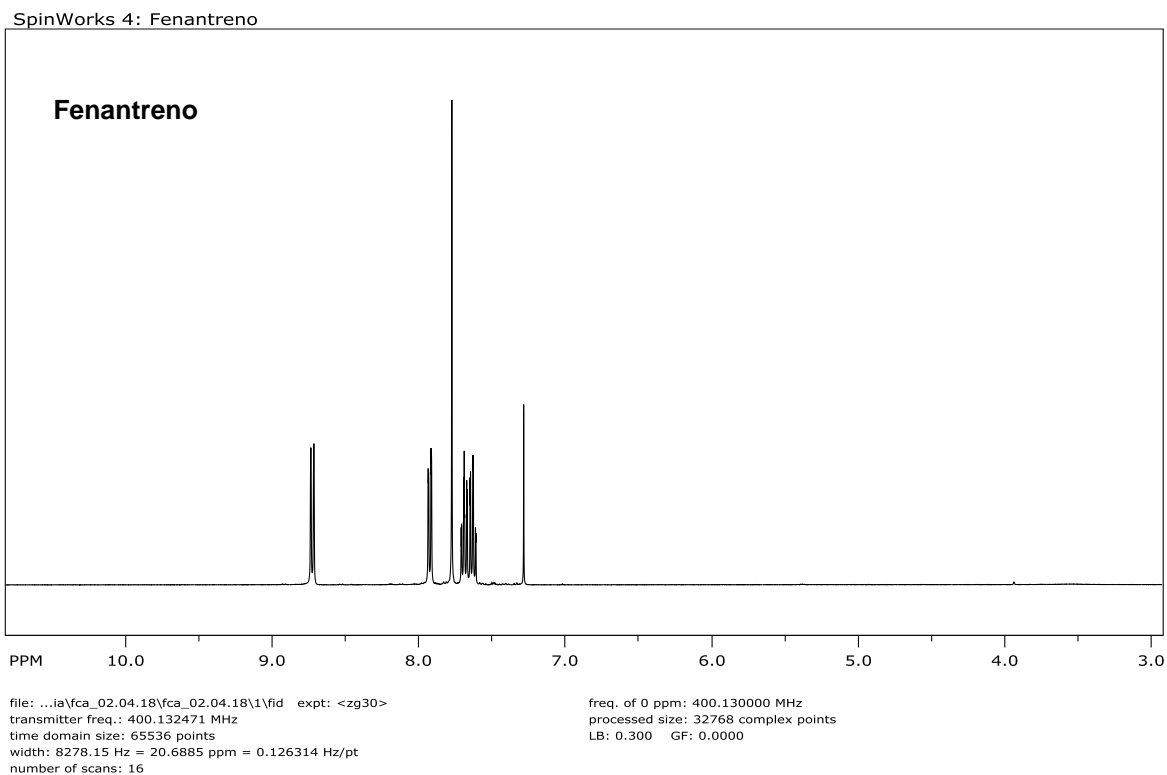
Fonte: Autora, 2018

Importante salientar que nas análises das amostras reais não foi encontrado o B(a)P, considerado o mais tóxico e carcinogênico dos HPA'S. Recentemente, em nova avaliação pela *European Food Safety Authority* (EFSA) a respeito do B(a)P ter sido adotado como marcador da presença de HPA's em alimentos, concluíram que este composto não é um marcador adequado, sendo adotado um sistema de 4 HPAs [B(a)A, ChR, B(a)P e B(k)F] como indicador mais adequado da presença de HPAs em alimentos (EC, 2011).

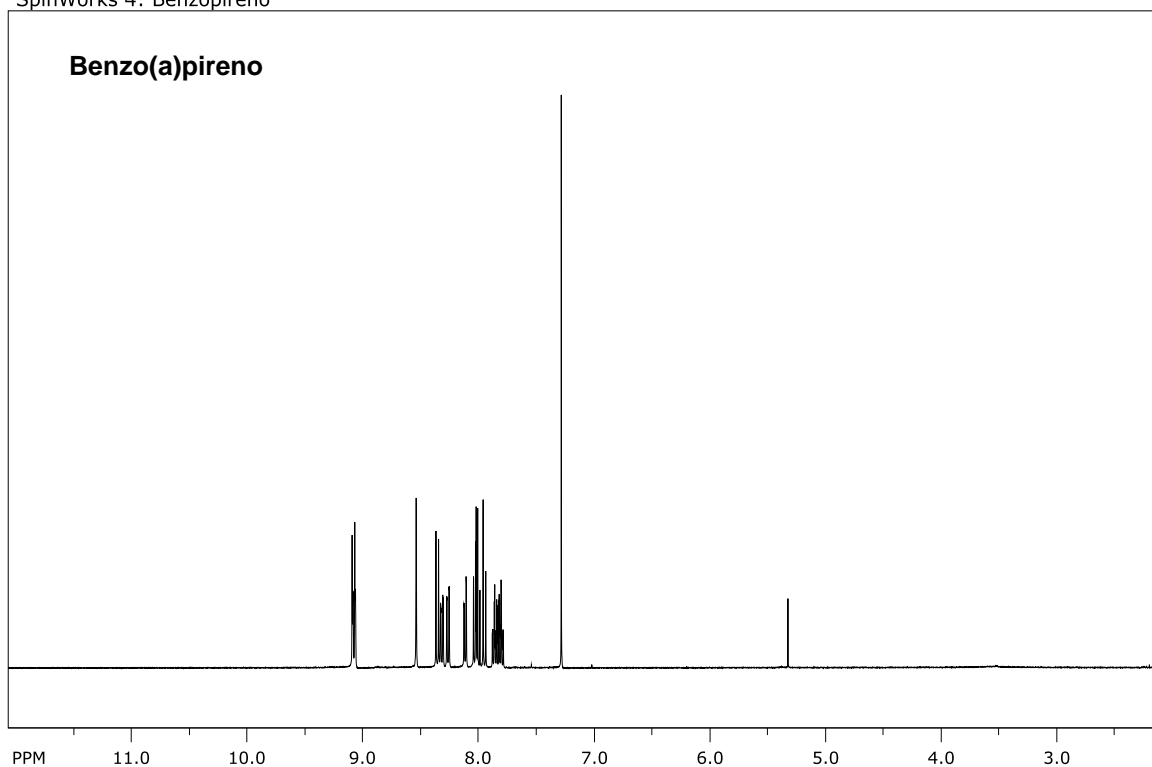
5.4 Análise por RMN¹H

A Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) é uma das técnicas mais utilizadas para a determinação da estrutura de moléculas orgânicas, tanto aquelas de baixo peso molecular, quanto de macromoléculas como proteínas. Embora amplamente consagrada como instrumento de elucidação estrutural, o aspecto dessa técnica enquanto ferramenta de análise quantitativa é subexplorado, principalmente no Brasil onde estudos voltados para esse fim são escassos. A análise de HPA's por RMN ¹H não é trivial e nunca foi testada. Com a finalidade de que esse método possa vir a dar bons resultados, submetemos experimentos com o RMN ¹H de 400 MHz. A Figura 20 representa os espectros dos padrões onde pode-se verificar a presença dos hidrogênios aromáticos característicos dos HPA's escolhidos, ou seja ente 7 e 9 ppm. Os espectros conferem com os da literatura.

Figura 20 - Espectros de RMNH dos HPA's



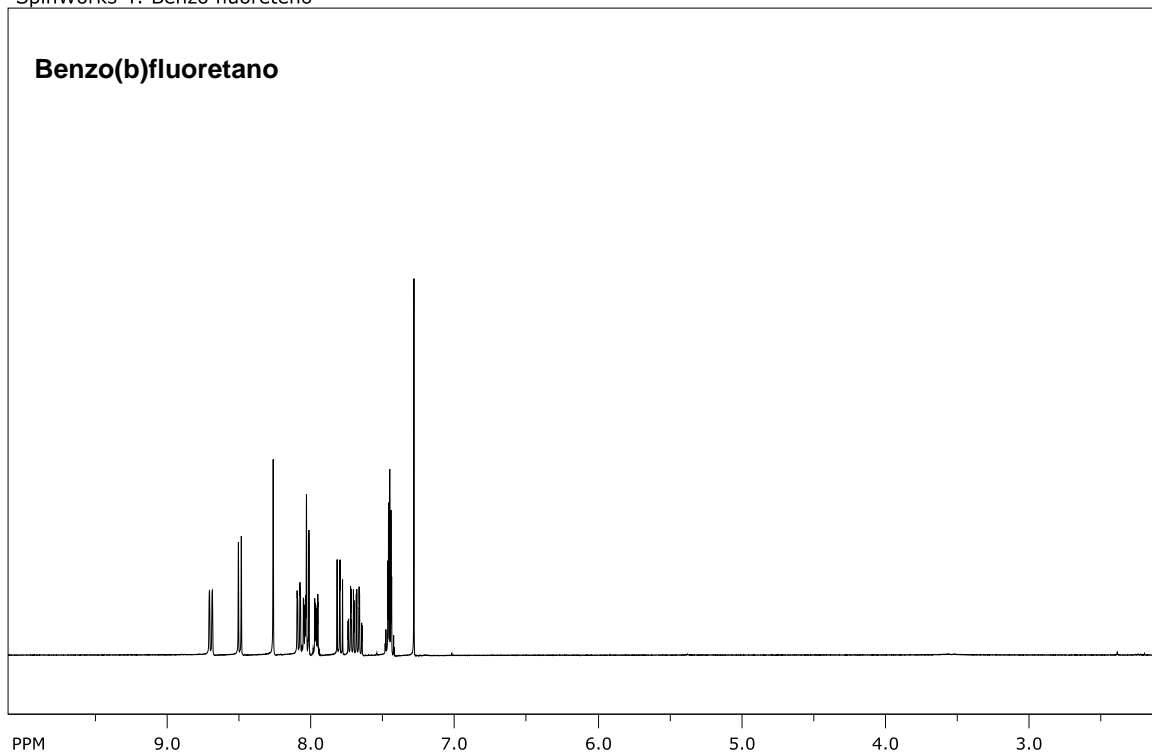
SpinWorks 4: Benzopireno



file: ...ia\fca_02.04.18\fca_02.04.18\3\fid expt: <zg30>
transmitter freq.: 400.132471 MHz
time domain size: 65536 points
width: 8278.15 Hz = 20.6885 ppm = 0.126314 Hz/pt
number of scans: 16

freq. of 0 ppm: 400.130000 MHz
processed size: 32768 complex points
LB: 0.300 GF: 0.0000

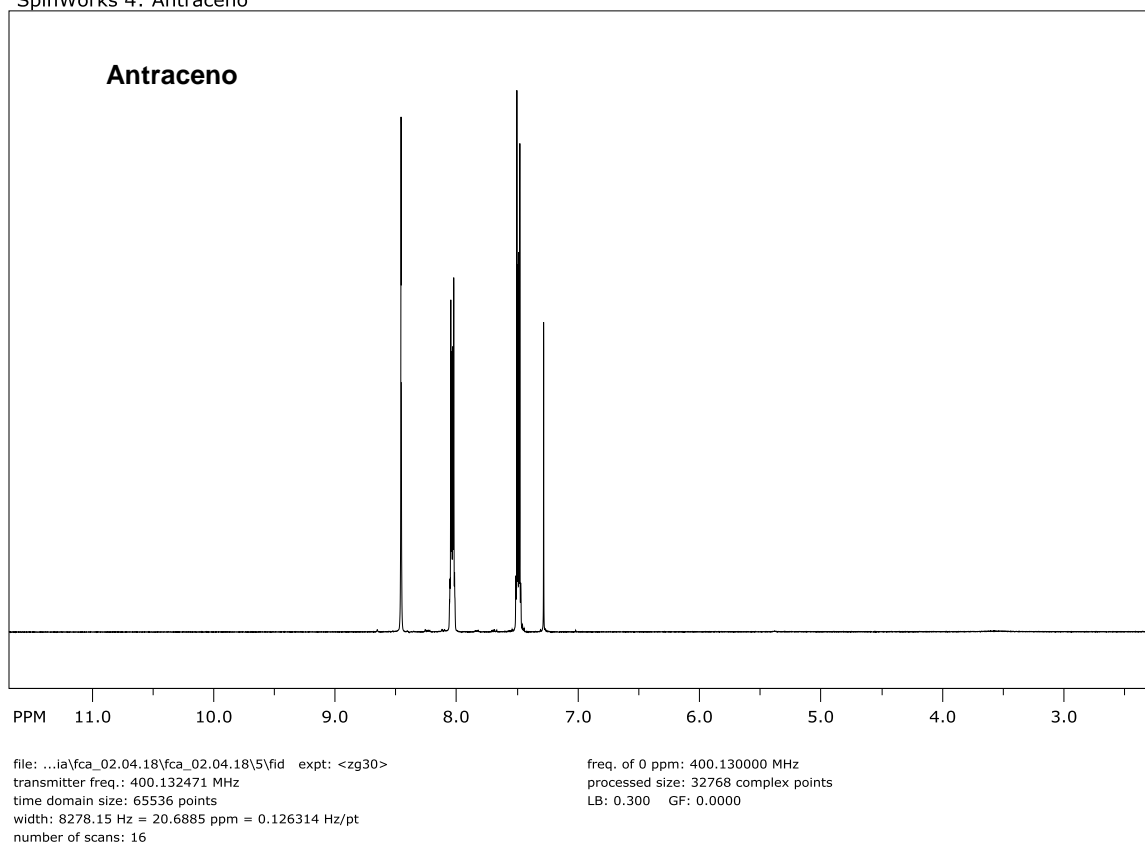
SpinWorks 4: Benzo fluoretano



file: ...ia\fca_02.04.18\fca_02.04.18\4\fid expt: <zg30>
transmitter freq.: 400.132471 MHz
time domain size: 65536 points
width: 8278.15 Hz = 20.6885 ppm = 0.126314 Hz/pt
number of scans: 16

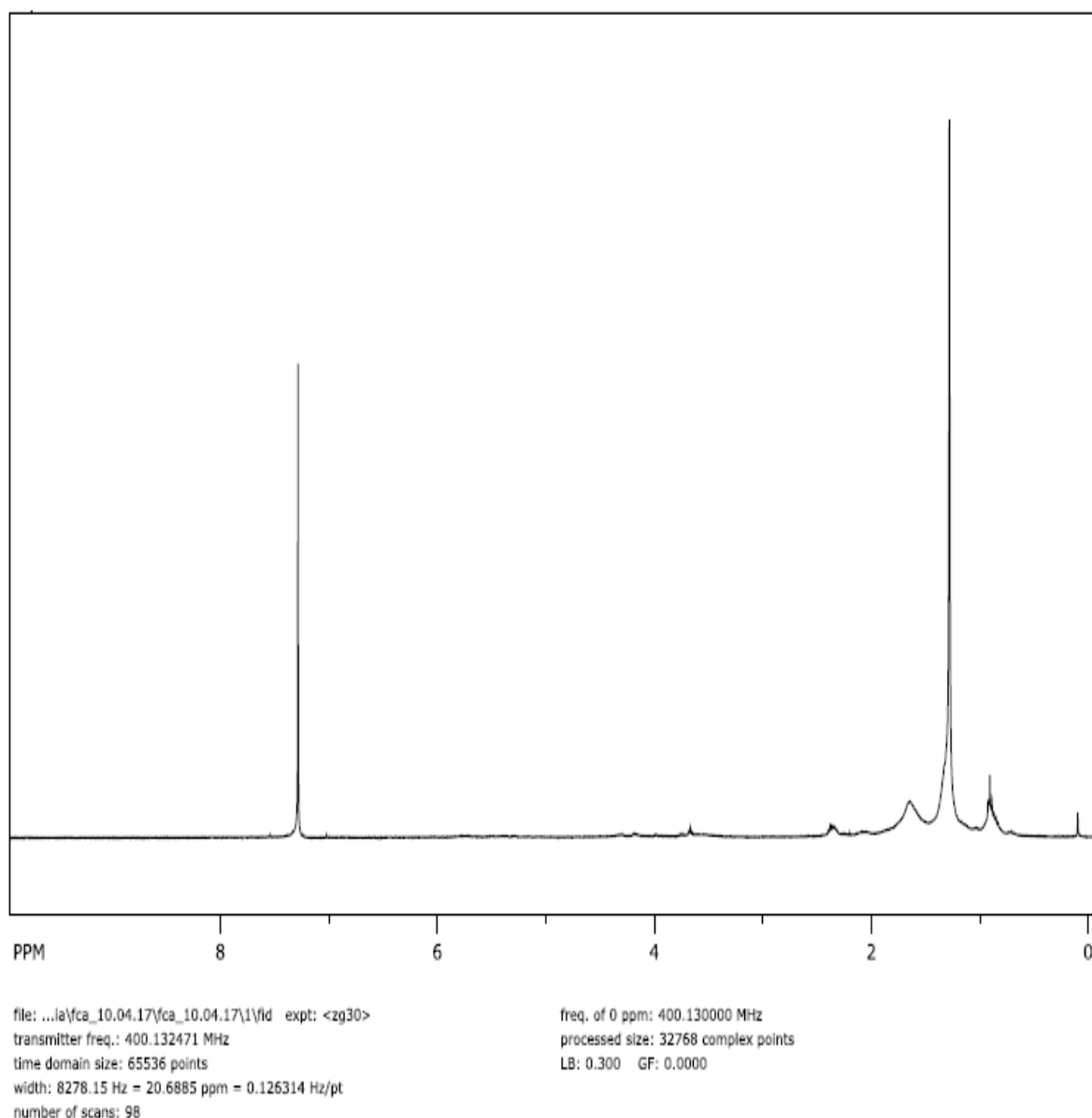
freq. of 0 ppm: 400.130000 MHz
processed size: 32768 complex points
LB: 0.300 GF: 0.0000

SpinWorks 4: Antraceno



Fonte: Autora, 2018.

Com as amostras reais, esse método não foi capaz de identificar os HPA's. Os sinais dos hidrogênios não foram visualizados em nenhuma das amostras. Isso pode ser explicado provavelmente, pela falta de sensibilidade do método em detectar concentrações dos HPA's muito baixas. Pode-se verificar a ausência de sinal na Figura 21 abaixo, que mostra o espectro da amostra de açúcar demerara.

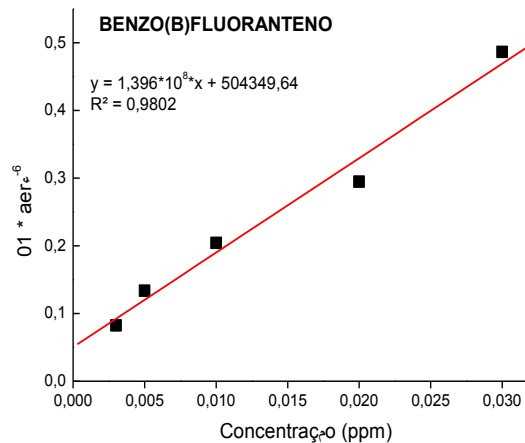
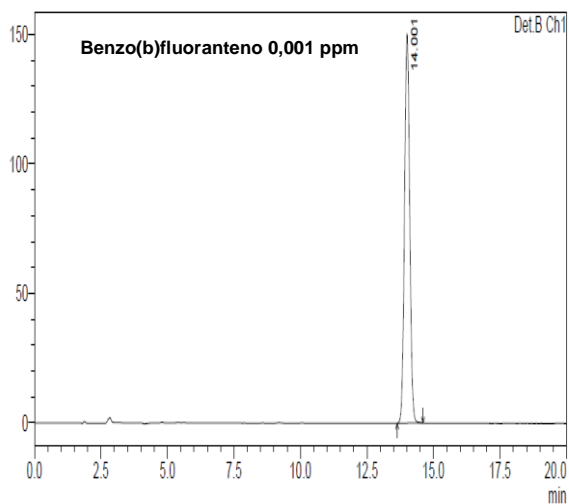
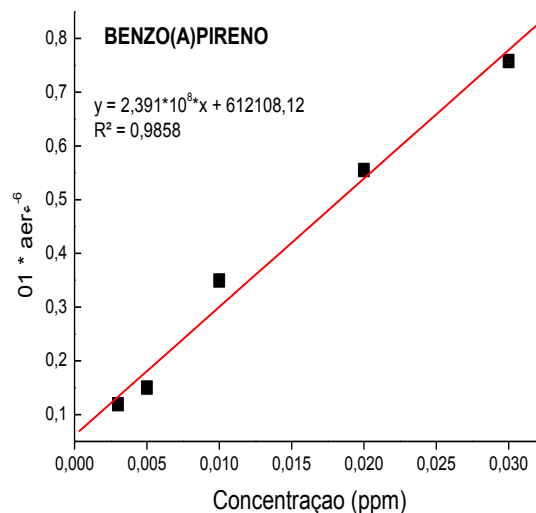
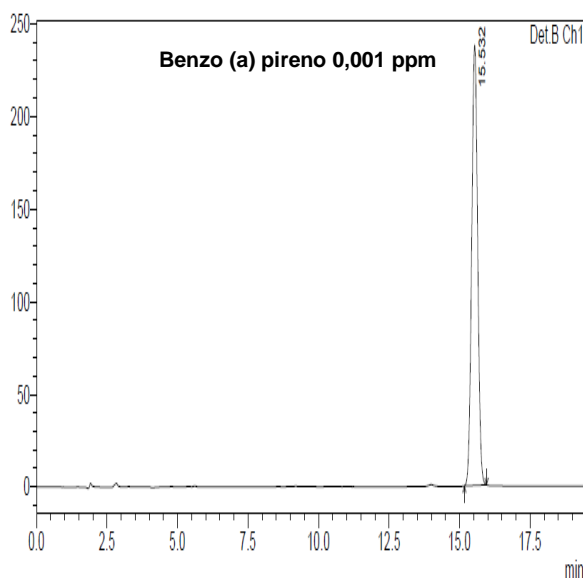
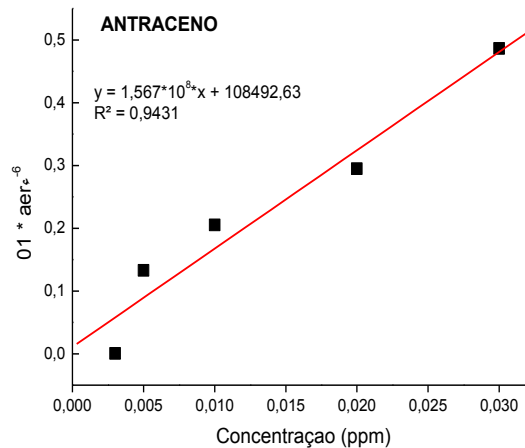
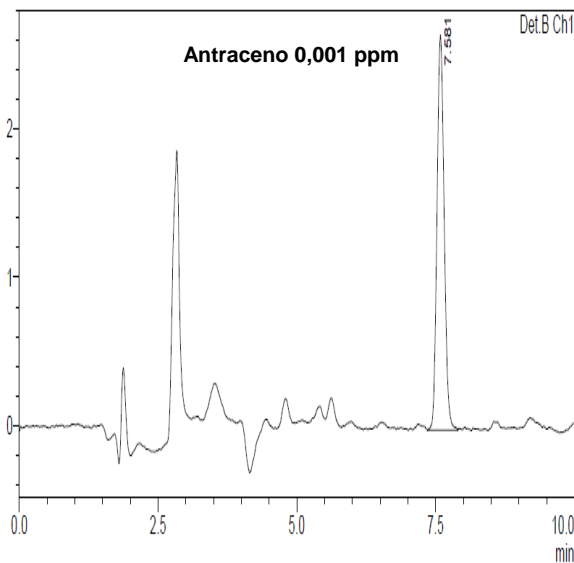
Figura 21 - Espectro de RMN¹H da amostra real - açúcar demerara

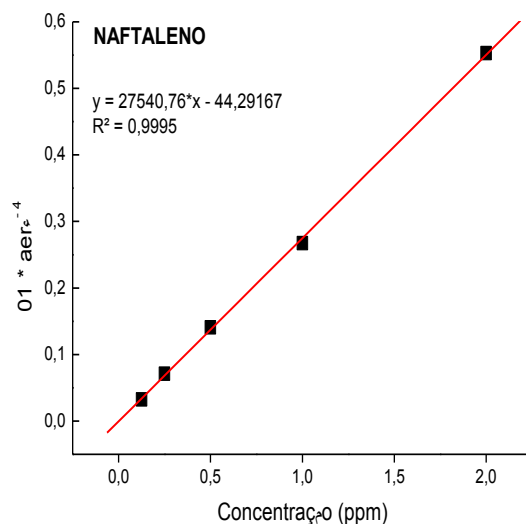
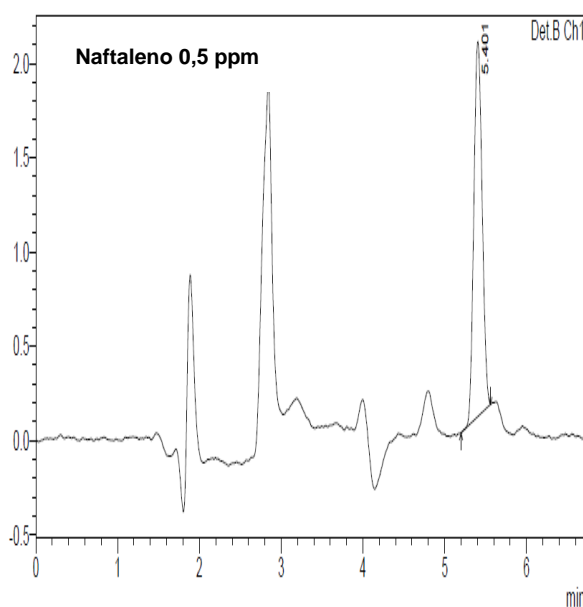
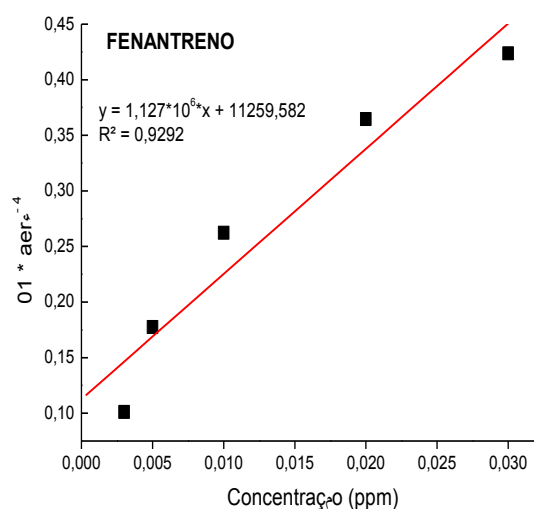
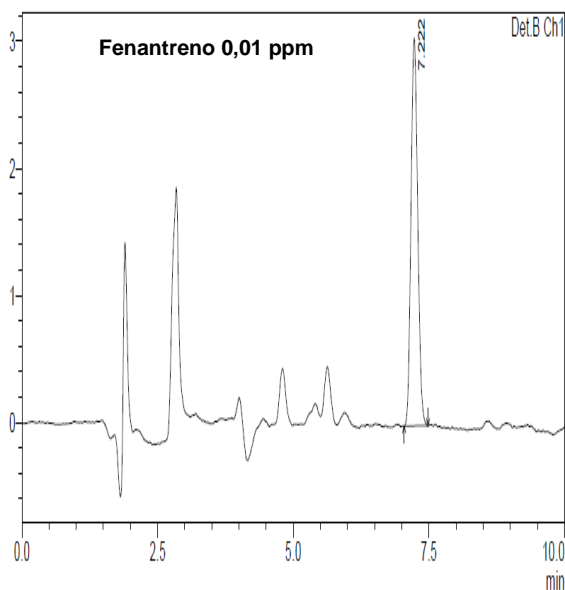
Fonte: Autora, 2018.

5.5 Validação das análises por CLAE

As amostras foram submetidas à análise por CLAE. Os cromatogramas dos padrões e as curvas de calibração são apresentados na Figura 22. As equações das curvas estão inseridas no gráfico.

Figura 22 – Cromatograma por CLAE referente à antraceno, benzo(a)pireno, benzo(b)fluoretano, fenantreno e naftaleno, solução padrão. Coluna C18, fase móvel acetronitrila-água.





Fonte: Autora, 2018.

A tabela 11 mostra os parâmetros A, B, e R^2 das curvas analíticas dos experimentos de CLAE para os padrões antraceno, benzo(a)pireno, benzo(b)fluoranteno, fenantreno e naftaleno.

Para o padrão do naftaleno não foi obtida uma boa correlação linear entre as áreas do pico e a concentração. Mas mesmo assim, para que possamos ter uma ideia da concentração de cada HPA, realizamos as análises das amostras.

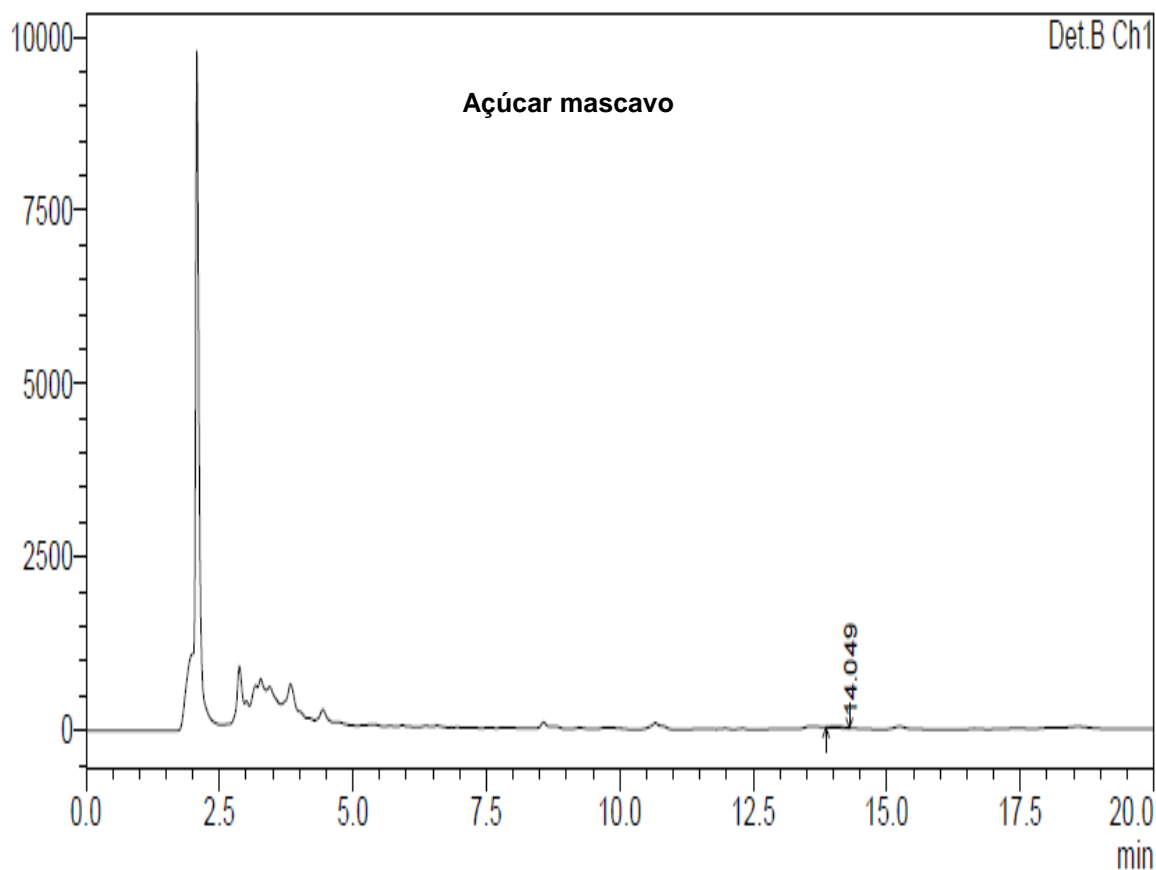
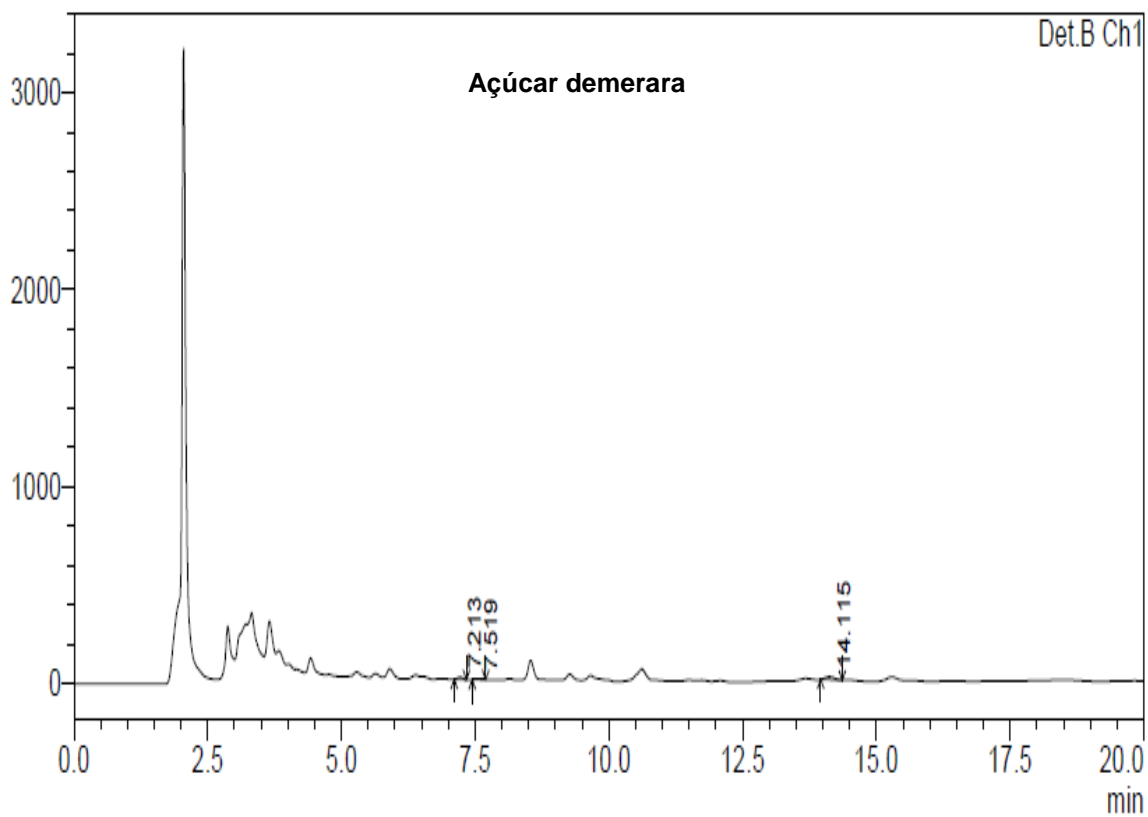
Tabela 11 - Parâmetros A, B e R² das curvas analíticas para os padrões antraceno, benzo(a)pireno, benzo(b)fluoranteno, fenantreno e naftaleno.

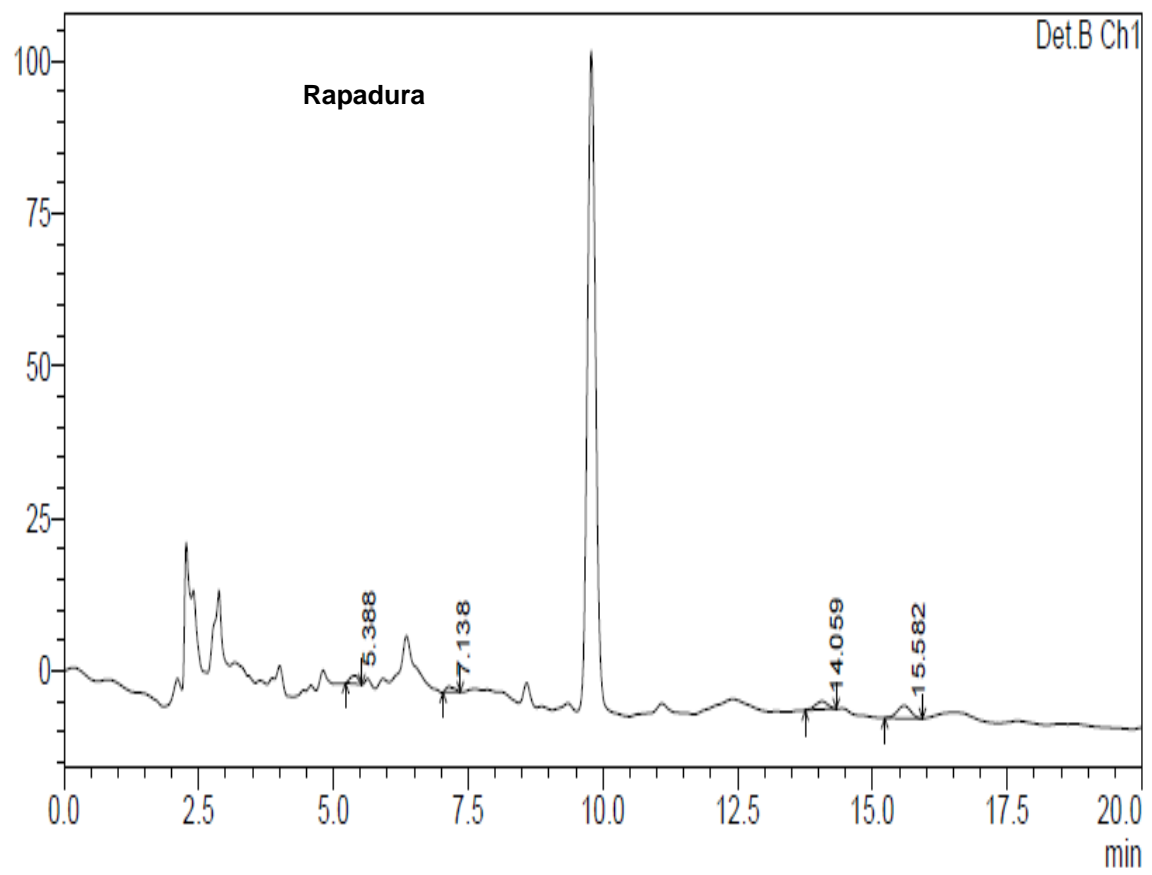
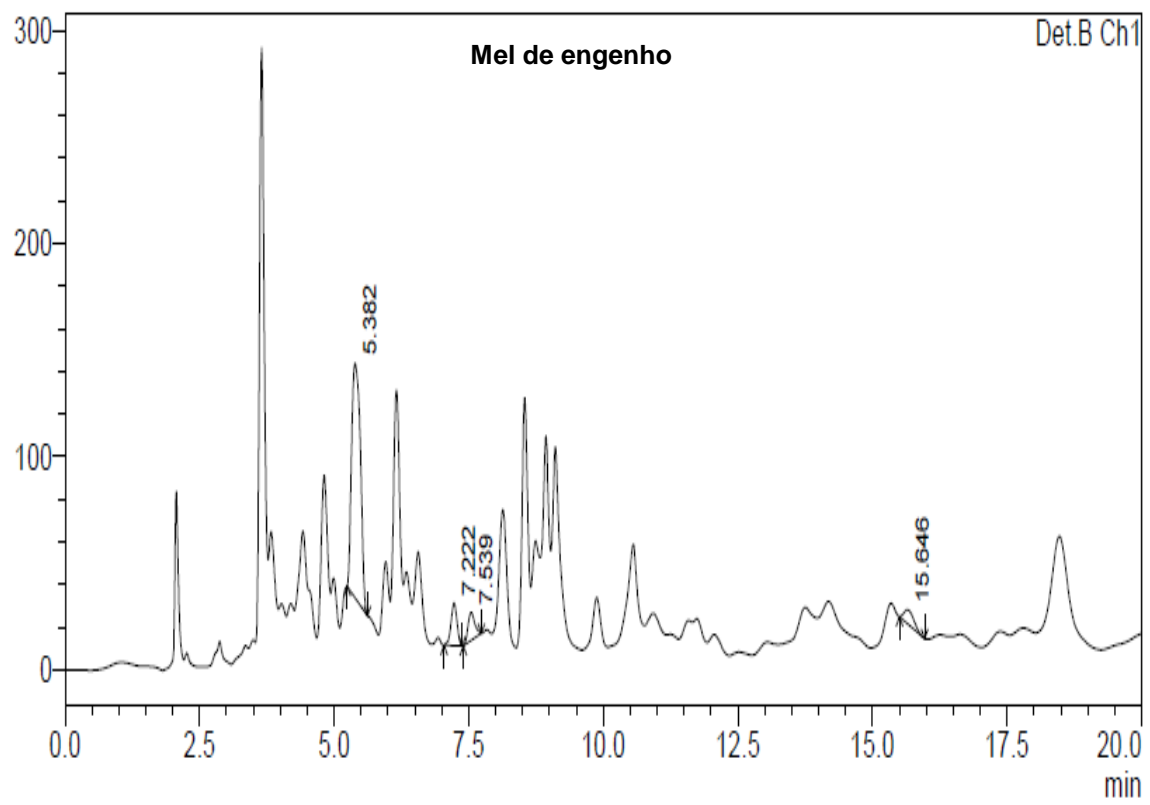
Padrões	Parâmetros da reta $Y = A + B \cdot X$		
	A	B	R ²
Naftaleno	-44,29167	27540,76	0,9995
Benzo(a)pireno	612108,12	$2,391 \cdot 10^8$	0,9858
Benzo(b)fluoranteno	504349,64	$1,396 \cdot 10^8$	0,9802
Antraceno	108492,63	$1,567 \cdot 10^8$	0,9431
Fenantreno	11259,582	$1,127 \cdot 10^6$	0,9292

Fonte: Autora, 2018

As análises das amostras reais estão representadas nos cromatogramas da Figura 23 e as áreas na Tabela 12.

Figura 23 - Cromatograma por CLAE referente às amostras reais de açúcar demerara, açúcar mascavo, mel de engenho e rapadura. Coluna C18, fase móvel acetronitrila-água.





Fonte: Autora, 2018.

Tabela 112 - Áreas dos picos dos HPA's nas amostras estudadas

Área dos picos dos compostos no cromatograma das amostras	Açúcar demerara	Mel de engenho	Rapadura	Açúcar mascavo
Naftaleno	-	1260341,4	13817,9	-
Fenantreno	81146,5	154411,8	9994,2	-
Antraceno	27826,5	115533	-	-
Benzo(b) fluoretano	162253	-	20721,8	321366,8
Benzo (a) pireno	-	81596,9	35976,2	-

Fonte: Autora, 2018

A concentração dos HPA's em amostras reais provenientes da CLAE está especificado na Tabela 12. Pode-se claramente notar que nem todos os HPA'S foram detectados provavelmente por conta de menor sensibilidade do detector utilizado. O sensor eletroquímico demonstrou uma sensibilidade maior.

Tabela 12 - Concentrações dos HPA's nas amostras reais

Concentração das amostras (μM)	Açúcar demerara	Mel de engenho	Rapadura	Açúcar mascavo
Naftaleno	-	-	2,39523925	-
Fenantreno	0,000698865	0,001431518	-	-
Antraceno	-	0,0000352	-	-
Benzo(b) fluoretano	-	-	-	-
Benzo (a) pireno	-	81596,9	-	-

Fonte: Autora, 2018

6. Conclusões

Observou-se nessa pesquisa que os padrões de HPA's não são eletroativos nos eletrodos e meios estudados (eletrodos de carbono vítreo, ouro e tampão fosfato pH 7,0). Um novo sensor eletroquímico foi desenvolvido, construído a partir de uma plataforma de ouro modificada com ferroceno carboxílico, na qual foi obtida resposta catalítica para todos os HPA's estudados em presença do NBT. Esse eletrodo modificado foi caracterizado por FTIR e VC.

A análise de RMN¹H não detectou a presença de HPA's nas amostras testadas. A análise por CLAE foi utilizada para validação do sensor, entretanto para alguns deles, as curvas analíticas não foram satisfatórias. O sensor eletroquímico demonstrou maior sensibilidade para detecção dos HPA's que pela técnica de CLAE.

Pretende-se realizar estudos no sentido de melhorar a seletividade e a especificidade do dispositivo em questão. Foi verificado que comparado a outros dispositivos, este é menos sensível quando comparado à imunossensores, todavia mostra ser uma metodologia simples e eficaz.

7. Perspectivas

- Análise das amostras por CG-EM.
- Desenvolover um biossensor a base do complexo enzima P450

8. Referências Bibliográficas

- AL-RASHDAN, A. et al. Determination of the Levels of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Toasted Bread Using Gas Chromatography Mass Spectrometry. **International Journal of Analytical Chemistry**, v. 2010, p. 1–8, 2010.
- ALDEWACHI, H. et al. Gold nanoparticle-based colorimetric biosensors. **Nanoscale**, v. 10, n. 1, p. 18–33, 2018.
- ALEIXO, L. M. Voltametria : Conceitos E Técnicas. **Chemkeys**, p. 1–40, 2003.
- ALOMIRAH, H. et al. Concentrations and dietary exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) from grilled and smoked foods. **Food Control**, v. 22, n. 12, p. 2028–2035, 2011.
- AMORIM, M. S. N. Classificação de substâncias tóxicas persistentes através de indicadores obtidos por modelos ambientais de multimeios. **Departamento de Engenharia de Materiais**, v. 7, p. 8, 2007.
- AZEVEDO, J. A. H.; ARAÚJO, R. .; SILVA, G. M. M. Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos Atmosféricos de Fontes Automotivas. **HOLOS**, v. 1, p. 102–114, 2013.
- BEHERA, B. K. et al. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in inland aquatic ecosystems: Perils and remedies through biosensors and bioremediation. **Environmental Pollution**, v. 241, 2018.
- BERNARDO, D. L.; BARROS, K. A.; SILVA, R. C. Carcinogenicidade de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos. **Quimica Nova**, v. 39, n. 7, p. 789–794, 2016.
- BETTIN, S. M.; FRANCO, D. W. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) em aguardentes. **Ciência Tecnologia de Alimentos**, v. vol.25, n. no.2, 2005.
- BOBEDA, C.R.R. MONTEIRO, S. P. P. et al. Análise de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detecção por Ultravioleta e Fluorescência (CLAE-UV-FLC) em Amostras de Salmão Defumado. In: 55º CONGRESSO BRASILEIRO DE QUÍMICA, 2004, Goiânia. **Anais**, Goiás, CBQ, 2004, SBN 978-85-85905-15-6.
- BOBEDA, C. R. R. et al. Avaliação da presença de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPA's) em Amostras de Mexilhões Importados do Chile. In: CONGRESSO LATINOAMERICANO DE HIGIENISTAS DE ALIMENTOS, 2013, Gramado, **Separatas**, RS, v.27, n. 218/219, 20 p. 2174–2178, 2013.
- BRASIL. Portaria MS nº 2914, de 12 de dezembro de 2011. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano - **Portaria MS nº 291**, 2011.
- BURNQUIST, H. L. et al. **Cepea_Açúcar_perspec18**. 2018.

- CAMARGO, M. C. R. et al. Determinação de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) em Guaraná em Pó. **Food and Scient Technology**, vol.26, n.1, pp.230-234. ISSN 0101-2061, 2006.
- CAMARGO, M. C. R. et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons in Brazilian commercial soybean oils and dietary exposure. **Food Additives and Contaminants: Part B Surveillance**, v. 4, n. 2, p. 152–159, 2011.
- CARNOVALE, C. et al. Size, shape and surface chemistry of nano-gold dictate its cellular interactions, uptake and toxicity. **Progress in Materials Science**, v. 83, p. 152–190, 2016.
- CARUSO, M. S.; ALABURDA, J. Polycyclic aromatic hydrocarbons - benzo(a)pyrene : a review. **Revista do Instituto Adolf Lutz**, v. 67, n. 1, p. 1–27, 2008.
- CHÁVEZ, I. P. A. **Dos teores de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) em aguardentes acondicionadas em tonéis de Carvalho**. Dissertação de Mestrado em Química, USP, São Carlos, SP 2015.
- CHUNG, S. Y. et al. Effects of grilling and roasting on the levels of polycyclic aromatic hydrocarbons in beef and pork. **Food Chemistry**, v. 129, n. 4, p. 1420–1426, 2011.
- CIECIERSKA, M.; OBIEDZINSKI, M. . Polycyclic aromatic hydrocarbons in vegetable oils from unconventional sources. **Food Control**, v. 30, n. 2, p. 556–562, 2013.
- CIECIERSKA, M.; OBIEDZIŃSKI, M. W. Polycyclic aromatic hydrocarbons in infant formulae, follow-on formulae and baby foods available in the Polish market. **Food Control**, v. 21, n. 8, p. 1166–1172, 2010.
- CLAUDIO, C. V. et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons produced by electrocautery smoke and the use of personal protective equipment 1. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**, v. 25, n. 0, 2017.
- CONNEY, A. H. Induction of Microsomal Enzymes by Foreign Chemicals and Carcinogenesis by Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. **AACR Journalls Editor's**, 1982.
- COSTA, A. F. “**Avaliação da Contaminação Humana por Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (PAHS): 1-Hidroxipireno Urinário**”. Dissertação de Mestrado em Saúde Pública, Centro de Estudos de Saúde do Trabalhador e Ecologia Humana da Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública, 2001.
- DENG, W. et al. Source apportionment of polycyclic aromatic hydrocarbons in surface sediment of mud areas in the East China Sea using diagnostic ratios and factor analysis. **Marine Pollution Bulletin**, v. 70, n. 1–2, p. 266–273, 2013.

DIGGS, D. L. et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons and digestive tract cancers: A perspective. **Journal of Environmental Science and Health - Part C Environmental Carcinogenesis and Ecotoxicology Reviews**, v. 29, n. 4, p. 324–357, 2011.

DUEDAHL-OLESEN, L. et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in Danish barbecued meat. **Food Control**, v. 57, p. 169–176, 2015.

EC - EUROPEAN COMMISSION REGULATION 835/2011 de 19 / AUG/ 2011. Amending Regulation (EC) n.1881/2006 as regards maximum levels for PAHs in foodstuffs. Off J Eur Union, 20 de agosto de 2011. Disponível em: <http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/?L:2011:215:0004:0008:EN:PDF>. Acesso em: 14 de janeiro de 2018.

EFSA. (European Food Safety Authority) Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Food 1 Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain Adopted on 9 June 2008. n. June, p. 1–114, 2008.

EU. amending Regulation (EC) No 1881/2006 as regards maximum levels for polycyclic aromatic hydrocarbons in foodstuffs. n. 835, p. 4–8, 2011.

FARIA, P. M. DE et al. Determinação do 1-hidroxipireno em amostras de urina por cromatografia líquida de alta eficiência – estudo dos parâmetros de validação. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 40, 2004.

FONSECA, I.; PROENÇA, L.; CAPELO, S. A Voltametria Cíclica e de Varrimento Linear Unidirecional: Suas Potencialidades na Caracterização de Processos de Corrosão. **Corrosão e Proteção de Materiais**, v. 34, n. 1, Lisboa, p. 12–21, 2015.

GALINARO, C. A.; CARDOSO, D. R.; FRANCO, D. W. Profiles of polycyclic aromatic hydrocarbons in Brazilian sugar cane spirits: Discrimination between cachaça produced from nonburned and burned sugar cane crops. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 8, p. 3141–3147, 2007.

GALINARO, C. A.; FRANCO, D. W. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAS) em cachaça, rum, uísque e álcool combustível. **Química Nova**, p. 1447–1451, 2009.

GARCIA, L. P. et al. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em alimentos: uma revisão. **PUBVET, Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia**, Londrina, v. 8, n. 19, 2014.

GLOISTEIN, U.; EPPLE, M.; CAMMENGA, H. K. Influencing the solid-solid phase transition in phenanthrene by suitable doping. **Zeitschrift für Physikalische Chemie**, v. 214, n. 3, p. 379–388, 2000.

GONÇALVES, D. et al. Voltametria de Pulso Diferencial (VPD) em Estado Sólido de Manchas de Cromatografia de Camada Delgada (CCD): Um Novo Método de Análise para Fitoativos Antioxidantes. **Química Nova**, v. 34, n. 8, p. 1476–1484, 2011.

GONCALVES, BL; SCUSSEL, VM. **HPAs em Alimentos – uma revisão**. Trabalho de Conclusão de Curso, Departamento de Ciência e Tecnologia de alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, 132pp, SC, 2013.

JACQUES, R. J. S. et al. Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. **Ciência Rural**, v. 37, n. 4, p. 1192–1201, 2007.

JANDERA, P.; HENZE, G. **Liquid Chromatography, 1. Fundamentals, History, Instrumentation, Materials**, 2011.

JIANG, D. et al. Quantitative analysis and health risk assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons in edible vegetable oils marketed in Shandong of China. **Food and Chemical Toxicology**, v. 83, p. 61–67, 2015.

KARIM, M. N. et al. Nanostructured silver fabric as a free-standing NanoZyme for colorimetric detection of glucose in urine. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 110, p. 8–15, 2018.

KELLER, J. **NMR and energy level** - capítulo 2. University of Cambridge, Department of Chemistry 2002.

LE, N. D. B. et al. Cancer Cell Discrimination Using Host-Guest “doubled” Arrays. **Journal of the American Chemical Society**, v. 139, n. 23, p. 8008–8012, 2017.

LEMOS, A.J.G, TRINDADE, E.J. Interferências no efeito farmacológico mediada pelas biotransformações dos citocromos P450. **Revista Científica do ITPAC**, Araguaína, v.7, n.2, Pub.3, 2014

LIN, Y. Y. et al. Magnetic beads-based bioelectrochemical immunoassay of polycyclic aromatic hydrocarbons. **Electrochemistry Communications**, v. 9, n. 7, p. 1547–1552, 2007.

LONDOÑO, V. A. G.; REYNOSO, C. M.; RESNICK, S. L. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) survey on tea (*Camellia sinensis*) commercialized in Argentina. **Food Control**, v. 50, p. 31–37, 2015.

LUCA, A. DE; WAGENER, R. Nível de Contaminação por Hidrocarbonetos Na Baía de Guanabara, Rio de Janeiro - RJ, Contamination Levels By Hydrocarbons in Guanabara Bay, Rio de Janeiro – RJ. **Revista Brasileira de Iniciação Científica**, Itapetininga, v. 3, n. 5, p. 90–117, 2016.

LUZ, R. D. L. F. et al. Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) em leite e derivados : contaminação e influência na saúde dos consumidores Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in dairy products : pollution and influence on consumer health Hidrocarburos aromáticos, **REAS, Revista Eletrônica Acervo Saude**, p. v. 8, n. 2, p. 868–875, 2016a.

LUZ, R. DE L. F. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) em queijos defumados e em queijos assados em churrasqueiras. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos), Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013. p. 122, 2013.

LUZ, R. DE L. F. et al. Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) em leite e derivados : contaminação e influência na saúde dos consumidores. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in dairy products : pollution and influence on consumer health Hidrocarburos aromáticos. **REAS, Revista Eletrônica Acervo Saúde**, 2016. Vol. 8 (2), 868-675, p. v. 8, n. 2, p. 868–875, 2016b.

MEIRE, R. O.; AZEREDO, A.; TORRES, J. P. M. Aspectos ecotoxicológicos de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. **Oecologia Brasiliensis**, v. 11, n. 2, p. 188–201, 2007.

MESQUITA, S. R. Contaminação por Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) em Mananciais : evidências de risco à saúde no Município de São Paulo, ontamination by Polycyclic Aromatic Hydrocarbons(PAHs) in Water Sources: evidence risk to health in São Paulo, **Revista InterfaceHS, Saúde, Meio Ambiente e Sustentabilidade**, v. 11 nº 1, 2016.

MIRANDA, V. J. M. **Degradação De Naftaleno , Fenantreno E Benzo (a) Pireno Em Solos E Sedimentos De Ambientes Costeiros , Oceânicos E Antárticos.** Dissertação de Mestrado pela Universidade Federal de Viçosa, do Programa de Pós-Graduação em Solos e Nutrição de Plantas, Viçosa Minas Gerais - Brasil. 2008.

MOLLE, D. R. D. **Avaliação da Contaminação por Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) De Óleos Vegetais De Canola, Girassol e Milho Comercializados no Brasil.** Dissertação de Mestrado pelo Instituto de Tecnologia de Alimentos, Centro de Ciência e Qualidade de Alimentos-CCQA, 2017a.

MOLLE, D. R. D. et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons in canola, sunflower and corn oils and estimated daily intake. **Food Control**, 2017b.

NARDOCCI, A. C. Avaliação probabilística de riscos da exposição aos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) para a população da cidade de São Paulo. Tese do Departamento de Saúde Ambiental da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo. USP, p. 77, 2010.

NETTO, A. D. P. et al. Avaliação Da Contaminação Humana por Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) E Seus Derivados Nitrados(NHPAS): Uma Revisão Metodológica. **Química Nova**, vol.23, n.6, pp.765-773, 2000.

PACHECO, W. F. et al. Voltametria. **Revista Virtual de Química**, v. 05, N° 04, 2013.

PANDEY, S. K.; KIM, K. H.; BROWN, R. J. C. A review of techniques for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in air. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 30, n. 11, p. 1716–1739, 2011.

PAZ, A. P. S. DA et al. Presença de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em produtos alimentícios e a sua relação com o método de cocção e a natureza do alimento. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 20, n. 0, 2017.

- PEREIRA NETTO, A. D. et al. Avaliação da contaminação humana por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) e seus derivados nitrados (NHPAs): Uma revisão metodológica. **Química Nova**, v. 23, n. 6, p. 765–773, 2000.
- PERUMAL, V.; HASHIM, U. ScienceDirect Advances in biosensors : Principle , architecture and. **Journal of Economics, Finance and Administrative Science**, v. 12, n. 1, p. 1–15, 2013.
- POLAKIEWICZ, L. **Estudo de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos nos estuários de Santos e São Vicente - SP utilizando diatomito como material adsorvente**. Dissertação pelo Instituto de Pesquisas Energéticas Nucleares - IPEN, Universidade de São Paulo, SP, 2008.
- RAHAIE, M.; KAZEMI, S. Lectin-based biosensors: as powerful tools in bioanalytical applications. **Biotechnol**, v. 9, p. 428–443, 2010.
- REY-SALGUEIRO, L. et al. Effects of toasting procedures on the levels of polycyclic aromatic hydrocarbons in toasted bread. **Food Chemistry**, v. 108, n. 2, p. 607–615, 2008.
- REY-SALGUEIRO, L. et al. Occurrence of polycyclic aromatic hydrocarbons and their hydroxylated metabolites in infant foods. **Food Chemistry**, v. 115, n. 3, p. 814–819, 2009.
- RIBEIRO, H.; PESQUERO, C. Queimadas de cana-de-açúcar: avaliação de efeitos na qualidade do ar e na saúde respiratória de crianças. **Revista de Estudos Avançados**, v. 24, n. 68, São Paulo, p. 255–271, 2010.
- Safra: 10% da cana que chega as usinas é colhida por máquinas. **Sindacúcar-AL, 2017**. Disponível em <<http://www.sindacucar-al.com.br/2017/12/safra-10-da-cana-que-chega-as-usinas-e-colhida-por-maquinas/>>. Acesso em: 20 de novembro de 2018.
- SAHA, K. et al. Gold Nanoparticles in Chemical and Biological Sensing. **Chemical reviews**, v. 112, p. 2739–2779, 2012.
- SANTOS, C.; GOMES, A.; ROSEIRO, L. C. Polycyclic aromatic hydrocarbons incidence in portuguese traditional smoked meat products. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, n. 9, p. 2343–2347, 2011.
- SANTOS, C. C. DOS. - **Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Sedimentos e Organismos Bentônicos do Terminal de Miramar (Baia do Guajara - Belém - Para - Amazônia)**. Dissertação de Mestrado pelo Intituto de Geociências da Universidade Federal do Pará - UFPA, p. 1–104, 2014.
- SCUSSEL, V. M.; GONÇALVES, B.; GARCIA, L. P.; STEIN, S. M. **Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPA's), a Secagem de Grãos Pré-Armazenagem**. Laboratório de Micotoxicologia e Contaminantes Alimentares, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil, p. 111–142, 2015.

SHADI, A.; MAZANDARANI, M. K.; NIKPOUR, Y. Concentrations of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHS) in Sediments of Khowre-Musa System (Persian Gulf). **World Journal of Fish and Marine Sciences**, v. 4, n. 1, p. 83–86, 2012.

SILVA, F. S. et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in raw cane sugar (rapadura) in Brazil. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 24, n. 3, p. 346–350, 2011.

SILVA, A. L. S. DA. **Aromáticos Condensados**. Disponível em: <<https://www.infoescola.com/quimica-organica/aromaticos-condensados/>>. Acesso em: 18 jul. 2018.

SILVA, E. G. DA. Estudo da Reatividade ao DNA De Derivados Ferrocênicos, Utilizando Técnicas Eletroquímicas e Espectroscópicas. **ANAIS DO ENCONTRO ANUAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UEL**, 2015.

SKOOG, D. . et al. **Fundamentos da Química Analítica - Tradução da 8a. edição norte-americana**, p 1124, 2005.

SOLIMAN, Y. S.; AL ANSARI, E. M. S.; WADE, T. L. Concentration, composition and sources of PAHs in the coastal sediments of the exclusive economic zone (EEZ) of Qatar, Arabian Gulf. **Marine Pollution Bulletin**, v. 85, n. 2, p. 542–548, 2014.

SOUSA, S. A. et al. Determinação de taninos e metilxantinas no guaraná em pó (*Paullinia cupana* Kunth, Sapindaceae) por cromatografia líquida de alta eficiência. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 20, n. 6, p. 866–870, 2010.

SUFRAMA, 2010. Produtos regionais conquistam mercado internacional. Manaus: Editora da Suframa, Disponível em: <http://www.suframa.gov.br/suf_suframa hoje.cfm>. Acesso em: 18 fev. 2018.

TABOR, G. P. **Estratégias para utilização de peróxido de magnésio da remediação de solo contaminado por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos**. Dissertação de Mestrado de Engenharia Ambiental da Universidade do Paraná, Curitiba, Paraná, p. 0–115, 2015.

TFOUNI, S. A. V et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in sugarcane juice. **Food Chemistry**, v. 116, n. 1, p. 391–394, 2009.

TFOUNI, S. A. V et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons in coffee brew: Influence of roasting and brewing procedures in two *Coffea* cultivars. **LWT - Food Science and Technology**, v. 50, n. 2, p. 526–530, 2013.

THEA, A. E. et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in yerba maté (*Ilex paraguariensis* St. Hil) traditional infusions (mate and tereré). **Food Control**, v. 60, p. 215–220, 2016.

VIEIRA, M. A. et al. Occurrence of polycyclic aromatic hydrocarbons throughout the processing stages of erva-mate (*Ilex paraguariensis*). **Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment**, v. 27, n. 6, p. 776–782, 2010.

XIA, Z. et al. Health risk assessment on dietary exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in Taiyuan, China. **Science of the Total Environment**, v. 408, n. 22, p. 5331–5337, 2010.

ZHANG, H.; XUE, M.; DAI, Z. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in aquatic products by HPLC-fluorescence. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 23, n. 5, p. 469–474, 2010.

ZOHORA, N. et al. Rapid colorimetric detection of mercury using biosynthesized gold nanoparticles. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 532, p. 451–457, 2017.