



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**FÁTIMA ITANA CHAVES CUSTÓDIO MARTINS**

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS UTILIZANDO HS-SPME/CG-EM  
PARA ANÁLISE DE HPAs EM CAFÉS**

**FORTALEZA**  
**2022**

FÁTIMA ITANA CHAVES CUSTÓDIO MARTINS

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS UTILIZANDO HS-SPME/CG-EM PARA  
ANÁLISE DE HPAs EM CAFÉS

Tese apresentado ao Programa de Pós-graduação em Química, da Universidade Federal do Ceará, como requisito para obtenção do título de Doutora em química. Área de concentração: Química Analítica.

Orientador: Professor Dr. Ronaldo Ferreira do Nascimento.

Coorientador: Pesquisador Dr. Guilherme Julião Zocolo

FORTALEZA

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Sistema de Bibliotecas  
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

M343d Martins, Fátima Itana Chaves Custódio.  
Desenvolvimento de métodos utilizando HS-SPME/CG-EM para análise de HPAs em café / Fátima  
Itana Chaves Custódio Martins. – 2022.  
139 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, , Fortaleza, 2022.

Orientação: Prof. Dr. Ronaldo Ferreira do Nascimento.

Coorientação: Prof. Dr. Guilherme Julião Zocolo.

1. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. 2. Café. 3. Cromatografia gasosa. 4. Quimiometria. 5.  
Validação de métodos. I. Título.

CDD

---

FÁTIMA ITANA CHAVES CUSTÓDIO MARTINS

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS UTILIZANDO HS-SPME/CG-EM PARA  
ANÁLISE DE HPAs EM CAFÉS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de doutora em Química. Área de concentração: Química Analítica.

Aprovada em: 19/05/2021.

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Ronaldo Ferreira do Nascimento (Orientador)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Guilherme Julião Zocolo (Coorientador)  
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA)

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Helena Becker  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Ana Paula Dionísio  
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA)

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Tigressa Helena Soares Rodrigues  
Universidade Estadual Vale do Acaraú (UVA)

*Dedico a minha família e, em especial, ao  
meu filho Théo Gordiano Martins Barbosa.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por me guiar, me iluminar, me dar tranquilidade para seguir em frente e por mais essa etapa vencida.

Aos meus pais, Josiêde e Eliton, pelo grande amor, carinho, estímulo, ensinamentos e dedicação em todas as etapas da minha vida.

Ao meu esposo Pablo, por sempre acreditar em minha capacidade e por todo apoio, amor, carinho e compreensão.

Ao meu filho Théo, que é o maior legado que tenho desta vida e que me dá forças todas os dias para alcançar meus objetivos.

Ao meu orientador, Dr. Ronaldo Ferreira do Nascimento, por me acolher desde a iniciação científica até os dias atuais. Agradeço pela paciência, confiança em meu trabalho, conhecimentos compartilhados e amizade em todos os momentos que passamos juntos ao longo desses 8 anos.

Ao meu coorientador, Dr. Guilherme Julião Zocolo, por todas as contribuições dadas durante a condução desse trabalho, pelo aprendizado, pela amizade construída durante os anos de convivência. Obrigada também por todas as oportunidades proporcionadas e pelos seus ensinamentos que me fizeram crescer profissionalmente e como pessoa. A você, minha gratidão e admiração.

A Profa. Dra. Tigressa Helena Soares Rodrigues, a Profa. Dra. Helena Becker e a Profa. Dra. Wladiana Oliveira Matos pela disponibilidade e por terem aceitado participar da banca examinadora deste trabalho, contribuindo bastante para melhoria do mesmo.

Aos meus colegas do Laboratório de Análise de Traços (LAT) pelos momentos de descontração propiciadas pelos mesmos: Allen, André Henrique, Ari Clecius, Carla, Cláudio, Clérton, Daniel, Edmilson, Eliezer, Fátima, Giselle, Juliene, Marília, Max, Pablo, Renata, Sarah, Tatiana e Vitor, André Gadelha, Diego, Jefferson, Rouse e Wagner.

À Embrapa Agroindústria Tropical pelas instalações concedidas durante a realização da parte experimental da minha tese, em especial, aos funcionários do LMQPN, Lorena Mara, Tigressa e Paulo Riceli, que contribuíram e sempre se prontificaram a ajudar ativamente para a execução desse trabalho.

Aos meus companheiros do LMQPN pelas horas de descontração, amizade e grandes momentos de aprendizagem: Bruno, Camila, Carol, Cristine, Erbenia, Liana, Licia,

Marcelo, Oiram, Paloma, Regis. E, em especial, a Kaline que, além de participar de todas as coisas mencionadas acima, contribuiu diretamente com minha pesquisa, revelando-se uma grande amiga e colega de trabalho que o doutorado me proporcionou.

A Universidade Federal do Ceará (UFC), onde passei boa parte do tempo durante o curso, sendo a mesma como uma segunda casa, onde adquiri bastante conhecimento apesar das enormes dificuldades e, em especial, ao Programa de Pós-graduação em Química e a todos os seus professores, pela oportunidade de realização do doutorado e pelos ensinamentos transmitidos.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES), pelo apoio financeiro – código de financiamento 001.

A todos que direta ou indiretamente tornaram possível o cumprimento de mais esta etapa.

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

Leonardo Da Vinci

## RESUMO

O café é uma das bebidas mais comercializadas mundialmente. Segundo dados da Organização Internacional do Café, o Brasil é o maior produtor e exportador mundial. Embora alguns estudos apontem os benefícios do café para a saúde humana, as propriedades tóxicas dessa bebida ainda não estão completamente esclarecidas. Entende-se que durante o processo de torrefação dos seus grãos pode ocorrer a formação de diversas substâncias potencialmente carcinogênicas, dentre elas os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), os quais estão associados à incidência de câncer em seres humanos devido ao seu potencial mutagênico e carcinogênico. Além disso, é importante salientar que a composição química do café pode sofrer mudanças em decorrência das variações da qualidade dos grãos, influenciando dessa forma seu potencial citotóxico, mutagênico e genotóxico. Esse estudo objetivou realizar análises qualitativa e quantitativa de HPAs em amostras de café, usando microextração em fase sólida (SPME) e Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM). Neste caso, foi avaliado o perfil de 16 HPAs em amostras de cafés em pó e preparação da bebida (de marcas de alta qualidade e qualidade comum), via análise multivariada por componentes principais (PCA). Foram utilizadas 10 amostras de café em pó (de alta qualidade e comum). As amostras foram codificadas para proteção das empresas. Amostras de alta qualidade: **AC, CL, O, H e ME** e amostras de qualidade comum: **TC, SC, ML, PIL e KM**, todas de produtores brasileiros. Todas as amostras pertencem à espécie *Coffea arabica*. As bebidas foram preparadas com água destilada e seguindo as instruções dos rótulos dos produtos. O método adaptado foi validado de acordo com os parâmetros seletividade, linearidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), precisão e exatidão (recuperação). Os testes estatísticos, de Student e F de Hartley, foram aplicados para verificar as significâncias dos coeficientes (linear, angular e determinação) das curvas analíticas obtidas na matriz de café. O método analítico usado para a determinação dos HPA's revelou ser bem adequado para todas as amostras (café em pó, bebidas preparadas por infusão e por cozimento), além de ser rápido, sensível e baixo consumo de solventes tóxicos. A precisão (intra-corrída) foi satisfatória, na faixa de 11-21%, 8-18% e 6-17%, respectivamente, para três níveis avaliados. Os limites de detecção e o de quantificação estabelecidos para os analitos foram na faixa de 0.39-2.02  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  e 1.20-6.48  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ , respectivamente. As recuperações dos HPAs variaram de 53% a 126%, com um coeficiente de variação  $< 20\%$ . O método se mostrou eficiente quando aplicado para detectar e quantificar 16 HPAs nas 3 amostras de café. Nas amostras de alta qualidade observamos concentrações médias de 0,9 a 1,4  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  e 0,6 a 0,7  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ , respectivamente para naftaleno e fluoreno e até 2,8  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  para fluoranteno. Nas amostras de qualidade comum além dos HPAs já citados, foram quantificados em duas amostras os compostos dibenzo[ah]antraceno (médias de 0,9 e 1,3  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), benzo[ghi]perileno (0,5 a 1,4  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) e indeno[1,2,3-cd]pireno (média de 1,3  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  em amostras obtidas por infusão). As análises mostraram que os cafés de alta qualidade apresentaram, em geral, predominância de

compostos com menores números de anéis aromáticos, enquanto as amostras de qualidade comum apresentaram níveis de compostos com maior número de anéis, havendo concentrações apreciáveis de HPAs com anel de pentose, o que caracteriza a adição de “produtos não café” durante a fabricação.

**Palavras-chave:** hidrocarbonetos policíclicos aromáticos; café; cromatografia gasosa; espectrometria de massas; validação de métodos; quimiometria.

## ABSTRACT

Coffee is one of the most commercialized beverages in the world. According data from the International Coffee Organization, Brazil is the world's largest producer and exporter. Although some studies have pointed out the benefits of coffee for human health, the toxic properties of coffees are still not completely understood. It is understood that during the process of roasting your grains, the formation of several potentially carcinogenic substances can occur, including polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), which are associated with the incidence of cancer in humans due to their mutagenic and carcinogenic potential. In addition, it is important to note that the chemical composition of coffee may change due to variations in the quality of the beans, thereby influencing its cytotoxic, mutagenic and genotoxic potential. This study aimed to perform qualitative and quantitative analysis of PAHs in coffee samples, using solid phase microextraction (SPME) and Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry (GC-MS) as well as to evaluate the presence profile and the levels of 16 priority PAHs in powdered coffees and drink preparations of high quality and common quality of these compounds in coffee preparations via chemometric method of multivariate analysis by principal component analysis (PCA). Ten samples of powdered coffee were used, divided into commercial and special quality samples. Samples were enumerated with codes so as not to reveal the manufacturers. High quality samples: AC, CL, O, H and ME and common quality samples: TC, SC, ML, PIL and KM, all from Brazilian producers. All samples belong to the species *Coffea arabica*. The preparation of the drinks was done with distilled water and following the instructions on the labels. The method was validated according to the parameters selectivity, linearity, detection limit (LD), quantification limit (LQ), precision and accuracy, the latter in terms of recovered percentage. Student's t test and Hartley's F test were applied to verify the significance of the parameters and the regression of the analytical curves obtained in the coffee matrix. The method for determining PAHs proved to be well suited for all sample determinations (analysis of powdered coffee, analysis of beverages prepared by infusion and cooking) and, in addition to being fast and sensitive, it uses a low amount of toxic solvents. The intra-run accuracies were in the range of 11-21%, 8-18% and 6-17%, respectively, for the levels 1, 2 and 3 evaluated. The detection limit and the quantification limit established for the analytes were lower than 0.39-2.02  $\mu\text{g kg}^{-1}$  and 1.20-6.48  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , respectively. PAH recoveries ranged from 53 to 126%, with a relative standard deviation < 20%. The method proved to be efficient when applied to detect and quantify 16 PAHs in 3 coffee samples obtained by different preparations. In high-quality samples were observed average concentrations of 0.9 to 1.4  $\mu\text{g kg}^{-1}$  and 0.6 to 0.7  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , respectively for naphthalene and fluorene and up to 2.8  $\mu\text{g kg}^{-1}$  for fluoranthene. In samples of common quality in addition to the PAHs already mentioned, the compounds dibenzo[a,h]anthracene (averages 0.9 and 1.3  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ), benzo[g,h,i]perylene (0.5 to 1.4  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) and indene were quantified in two samples indene[1,2,3-cd]pyrene (average of 1.3  $\mu\text{g kg}^{-1}$  in samples obtained by infusion). The

analyzes showed that high quality coffees in general showed a predominance of compounds with lower numbers of aromatic rings, while samples of common quality showed levels of compounds with a higher number of rings, with appreciable concentrations of PAHs with pentose ring, the which characterizes the addition of “non-coffee products” during manufacture.

**Keywords:** polycyclic aromatic hydrocarbons; coffee; gas chromatography; mass spectrometry. validation of methods; chemometrics.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Formação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos por meio de pirólise.....	26
Figura 2	– Formação do metabólito mais importante do benzo[a]pireno que se liga a guanina do DNA .....	28
Figura 3	– Mapa das regiões produtoras de café no Brasil.....	32
Figura 4	– Estágios do desenvolvimento da cereja do café, desde frutos verdes imaturos (esquerda) a frutos maduros secos (direita).....	34
Figura 5	– Estrutura química da cafeína .....	39
Figura 6	– Estrutura química da trigonelina .....	39
Figura 7	– Estrutura química dos ácidos clorogênicos .....	40
Figura 8	– Descrição geral dos principais métodos de extração de café. Decocção: Fervida /Turca (A) e vácuo (B). Infusão: Filtrada (C). Pressão: Cafeteira Francesa (D); Cafeteira com fogão / Moka (E) e Espresso (F) .....	42
Figura 9	– Esquema simplificado de um processo de detecção por espectrometria de massas .....	46
Figura 10	– Esquema ilustrativo do processo de extração por SPME .....	53
Figura 11	– Gráficos típicos de desvios residuais .....	63
Figura 12	– Ajuste da curva de calibração para obtenção do modelo linear mais adequado para estimativas de quantificação .....	64
Figura 13	– Exemplo de uma curva analítica com a identificação dos parâmetros de desempenho “Faixa de trabalho”, “faixa linear”, “Sensibilidade analítica”, “LD” e “LQ” .....	66
Figura 14	– CG-EM empregado no estudo .....	72
Figura 15	– Esquema do sistema utilizado nas determinações por SPME .....	73
Figura 16	– Fibras testadas na extração dos compostos, <i>holder</i> e suporte para o <i>holder</i> .....	75

Figura 17 – Planejamento da seleção de amostras para aplicação do método e quantificação de voláteis e HPAs em diferentes cafés .....	90
Figura 18 – Cromatogramas de um padrão multicomponente dos HPAs no modo TIC de aquisição (A) e modo EIC de monitoramento para os analitos indeno(1,2,3-cd)pireno e benzo(g,h,i)perileno (B) e para o analito dibenzo(a,h)antraceno (C), nas condições cromatográficas reportadas e respectivos tempos de retenção. (1) Naftaleno tr = 4,57 min; (2) Acenaftileno tr = 7,82 min; (3) Acenafteno tr = 8,24 min; (4) Fluoreno tr = 9,41 min; (5) Fenantreno tr = 11,64 min; (6) Antraceno tr = 11,75 min; (7) Fluoranteno tr = 14,79 min; (8) Pireno tr = 15,40 min; (9) Benzo(a)antraceno tr = 19,29 min; (10) Criseno tr = 19,33 min; (11) Benzo(b)fluoranteno tr = 24,41 min; (12) Benzo(k)fluoranteno tr = 24,54 min; (13) Benzo(a)pireno tr = 25,64 min; (14) Indeno(1,2,3-c,d)pireno tr = 28,67 min; (15) Dizendo(a,h)antraceno tr = 18,81 min; (16) Benzo(g,h,i)perileno tr = 29,37 min .....	93
Figura 19 – Resultados do estudo de seleção de revestimento de fibras (PDMS-DVB, PDMS, DVB-CAR-PDMS em função da magnitude de áreas de picos dos HPAs extraídos em diferentes temperaturas: a) 60°C, b) 90°C e 120°C, fortificados com concentrações de 1µg.ml <sup>-1</sup> dos HPAs .....	96
Figura 20 – Áreas de pico dos HPAs extraídos com três diferentes fibras (PDMS-DVB, PDMS, DVB-CAR-PDMS) e temperatura de 90°C .....	97
Figura 21 – Áreas de pico dos HPAs extraídos com três diferentes fibras (PDMS-DVB, PDMS, DVB-CAR-PDMS) e temperatura de 120°C .....	97
Figura 22 – Comparação do efeito da temperatura na extração dos HPAs na fibra PDMS em função da magnitude de áreas de pico dos HPAs nas temperaturas 60°C, 90°C e 120°C, fortificados com concentrações de 1µg.ml <sup>-1</sup> .....	98
Figura 23 – Cromatograma CG-EM da amostra de café fortificada (10 µg. L <sup>-1</sup> ) obtida empregando modo TIC (a) e modo EIC (b) .....	100
Figura 24 – Curvas de calibração do acenaftileno solubilizado no solvente (azul) e matriz (vermelho) .....	103

Figura 25 – Percentual de efeito matriz dos HPAs (EM,%) em amostras de café .....	105
Figura 26 – Curvas de calibração obtidas pelo sistema HS-SPME-GC-MS para quantificação de naftaleno (a) e pireno (b) solubilizado em solvente puro (azul) e matriz de café (vermelho) .....	106
Figura 27 – Gráficos de resíduos ( $d_y$ ) para a calibração do acenafteno via MMQO (a) e MMQP (b) .....	108
Figura 28 – Perfil geral comparativo das concentrações médias de HPAs quantificados por grupos de amostras de café bebida (alta qualidade e qualidade comum) preparadas pelos métodos de cozimento (a) e infusão (b) .....	117
Figura 29 – PCA biplot de cafés em pó das marcas de alta qualidade em azul e as comuns em vermelho. Os <sup>a</sup> axes referem-se a pontuações com valores percentuais da variância explicada em cada Componente Principal, e os <sup>b</sup> axes referem-se a carregamentos representados por vetores da origem .....	120
Figura 30 – PCA biplot dos extratos de cafés em pó preparados por cozimento, com marcas de alta qualidade em azul e as comuns em vermelho. Os <sup>a</sup> axes referem- se a pontuações com valores percentuais da variância explicada em cada Componente Principal, e os <sup>b</sup> axes referem-se a carregamentos representados por vetores da origem .....	121
Figura 31 – PCA biplot dos extratos de cafés em pó preparados por infusão, com marcas de alta qualidade em azul e as comuns em vermelho. Os <sup>a</sup> axes referem-se a pontuações com valores percentuais da variância explicada em cada Componente Principal, e os <sup>b</sup> axes referem-se a carregamentos representados por vetores da origem .....	122

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Principais propriedades físico-químicas dos 16 HPAs prioritários pelo US-EPA .....	24
Tabela 2 – Potencial carcinogênico dos principais hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) .....	27
Tabela 3 – Limites máximos de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em alimentos segundo legislações de diferentes países .....	30
Tabela 4 – Condições para torrefação do café .....	37
Tabela 5 – Emprego da cromatografia na análise de HPAs em diferentes matrizes relatados na literatura nos últimos anos .....	40
Tabela 6 – Características dos 16 HPAs estudados .....	44
Tabela 7 – Resumo das fibras disponíveis comercialmente .....	55
Tabela 8 – Estudo de efeito de matriz .....	60
Tabela 9 – Condições utilizadas no desenvolvimento do método CG-EM (TIC-SCAN) .....	77
Tabela 10 – Faixas de Aceitação da Recuperação acima e abaixo de 100% .....	87
Tabela 11 – Critérios de Aceitação da Reprodutibilidade .....	88
Tabela 12 – Percentual de extração da fibra PDMS /CAR/DVB em relação as duas outras fibras (PDMS e PDMS/DVB) .....	95
Tabela 13 – Percentual de extração relativa dos HPAs na temperatura de 90 °C .....	99
Tabela 14 – Compostos eluídos e seus respectivos tempos de retenção e íons monitorados no modo EIC .....	101
Tabela 15 – Teste $F$ de comparação de variâncias ( $s^2_i$ ) das curvas de regressão utilizando solvente e matriz, considerando $F_{crit} = 19,00$ ( $v_1 = 2/v_2 = 2$ ) e teste $t$ de <i>Student</i> com nível de confiança de 95% .....	102

<p>Tabela 16 – Parâmetros de calibração estatística da linearidade dos 16 HPAs alvo: coeficientes de correlação (<math>r</math>); Teste <math>t</math> de <i>Student</i> calculado (<math>t_r</math>) e <math>t</math> tabelado (<math>t_{crit}</math> com <math>\alpha = 0.05</math>); faixa de linearidade; e resultados de teste <math>F</math> calculado (<math>F_{calc}</math>) e tabelado (<math>F_{crit}</math>, <math>f = 2</math>; <math>k</math>; <math>\alpha = 0.05</math>) para avaliar a homogeneidade da variância (<math>k =</math> número de grupos de calibração de pontos)</p> <p>.....</p>	107
<p>Tabela 17 – Repetibilidade (CV, %), recuperação (%) para os níveis baixo, médio e alto de concentração, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) e resultados quantitativos dos HPAs determinados em diferentes amostras de preparação de café, considerando a concentração média <math>\pm</math> desvio padrão para <math>n = 3</math>, e <math>\Sigma</math> 16 HPAs é a soma de todos os 16 HPAs</p> <p>.....</p>	111
<p>Tabela 18 – Resultados analíticos para as amostras preparadas via processo 1 (cozimento). Os resultados correspondem a concentração média observada em cada amostra e desvio padrão. Para resultados <math>&lt; LOD</math> o analito não foi detectado; para <math>&lt; LOQ</math> o analito foi detectado, porém não quantificado <math>\Sigma</math> PAH = concentração total de PAHs quantificados na amostra</p> <p>.....</p>	114
<p>Tabela 19 – Resultados analíticos para as amostras preparadas via processo 2 (infusão). Os resultados correspondem a concentração média observada em cada amostra e desvio padrão. Para resultados <math>&lt; LOD</math> o analito não foi detectado; para <math>&lt; LOQ</math> o analito foi detectado, porém não quantificado. <math>\Sigma</math> PAH = concentração total de PAHs quantificados na amostra</p> <p>.....</p>	115

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>18</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>22</b>
<b>2.1</b>	<b>Objetivo geral</b> .....	<b>22</b>
<b>2.2</b>	<b>Objetivos específicos</b> .....	<b>22</b>
<b>3</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>23</b>
<b>3.1</b>	<b>Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos</b> .....	<b>23</b>
<b>3.1.1</b>	<i>Formação e características físico-químicas</i> .....	<b>23</b>
<b>3.1.2</b>	<i>Toxicidade dos HPAs</i> .....	<b>26</b>
<b>3.1.3</b>	<i>Legislações referentes à HPAs</i> .....	<b>29</b>
<b>3.2</b>	<b>Café</b> .....	<b>31</b>
<b>3.2.1</b>	<i>Agronegócio e consumo mundial de café</i> .....	<b>31</b>
<b>3.2.2</b>	<i>Cultivo e processamento dos grãos de café</i> .....	<b>33</b>
<b>3.2.3</b>	<i>Qualidade do Café</i> .....	<b>34</b>
<b>3.2.4</b>	<i>Torrefação</i> .....	<b>36</b>
<b>3.2.5</b>	<i>Composição química do café</i> .....	<b>38</b>
<b>3.2.6</b>	<i>Métodos de preparação da bebida de café</i> .....	<b>42</b>
<b>3.3</b>	<b>Métodos de análise e detecção dos HPAs</b> .....	<b>44</b>
<b>3.3.1</b>	<i>A técnica CG-EM</i> .....	<b>45</b>
<b>3.4</b>	<b>Métodos de preparo de amostra para extração dos HPAs</b> .....	<b>51</b>
<b>3.4.1</b>	<i>Microextração em Fase Sólida (SPME – Solid Phase Micro Extraction)</i> .....	<b>52</b>
<b>3.5</b>	<b>Análises estatísticas</b> .....	<b>56</b>
<b>3.5.1</b>	<i>Análise de componentes principais</i> .....	<b>56</b>
<b>3.6</b>	<b>Validação de métodos analíticos</b> .....	<b>57</b>
<b>3.6.1</b>	<i>Seletividade</i> .....	<b>58</b>
<b>3.6.2</b>	<i>Linearidade</i> .....	<b>61</b>
<b>3.6.3</b>	<i>Limite de detecção (LD)</i> .....	<b>65</b>
<b>3.6.4</b>	<i>Limite de quantificação (LQ)</i> .....	<b>66</b>
<b>3.6.5</b>	<i>Precisão</i> .....	<b>66</b>
<b>3.6.6</b>	<i>Exatidão</i> .....	<b>68</b>
<b>4</b>	<b>PARTE EXPERIMENTAL</b> .....	<b>70</b>
<b>4.1</b>	<b>Seleção das amostras e armazenamento</b> .....	<b>70</b>

4.2	Equipamentos e condições .....	71
4.3	Reagentes e padrões analíticos .....	72
4.4	Preparo das amostras via SPME .....	72
4.4.1	<i>Seleção da fibra para extração dos HPAs</i> .....	74
4.4.2	<i>Escolha da melhor temperatura para extração dos HPAs</i> .....	76
4.5	Desenvolvimento do método CG-EM para determinação dos HPAs .....	76
4.6	Validação do método analítico .....	78
4.6.1	<i>Linearidade</i> .....	78
4.6.2	<i>Seletividade e efeito matriz</i> .....	82
4.6.3	<i>Limites de detecção (LD) e limites de quantificação (LQ)</i> .....	85
4.6.4	<i>Exatidão</i> .....	86
4.6.5	<i>Precisão</i> .....	87
4.7	Análise das amostras .....	88
4.7.1	<i>Preparação dos cafés para o estudo de validação</i> .....	88
4.7.2	<i>Preparação dos cafés para o estudo quimiométrico</i> .....	89
5	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	92
5.1	Desenvolvimento do método CG-EM para detecção dos HPAs .....	92
5.2	Estudo de otimização da extração dos compostos .....	94
5.2.1	<i>Seleção do melhor revestimento de fibra para extração dos HPAs</i> .....	94
5.2.2	<i>Influência da temperatura na extração SPME dos HPAs</i> .....	97
5.3	Validação da metodologia para análise dos HPAs .....	99
5.3.1	<i>Seletividade</i> .....	99
5.3.2	<i>Efeito matriz</i> .....	102
5.3.3	<i>Linearidade e estatística</i> .....	106
5.3.4	<i>Limite de detecção e limite de quantificação</i> .....	108
5.3.5	<i>Precisão e exatidão</i> .....	110
5.4	Aplicação do método validado para determinação dos HPAs em amostras reais de café .....	112
5.4.1	<i>Análises das amostras das preparações (café bebida)</i> .....	113
5.5	Variabilidade dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) .....	119
6	<b>CONCLUSÃO</b> .....	125
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	127

## 1 INTRODUÇÃO

O café é uma das bebidas mais consumidas em todo o mundo, sendo o Brasil o maior produtor mundial, responsável por 30% do mercado internacional, seguido dos países como Colômbia, Vietnã, México e Indonésia. O consumo interno de café no Brasil, no período de novembro de 2020 a outubro de 2021, foi estimado em 21,5 milhões de sacas, que correspondem a aproximadamente 1,71 milhão de toneladas para o referido ano. Os números de consumo revelam que, apesar da crise econômica, gerada pela pandemia, que afetou diversos setores em 2020, a procura por café seguiu seu ritmo de crescimento: 1,34% de alta em relação ao mesmo período analisado no ano anterior (ABIC, 2022; DAL MOLIN, 2006; EMBRAPA, 2022).

O Brasil se destaca como segundo maior consumidor de café em nível mundial, sendo precedido pelos Estados Unidos, que consomem em torno de 25,8 milhões de sacas de café. O consumo no Brasil deverá se aproximar desse volume dos EUA até o ano 2021, quando deverá atingir 25 milhões de sacas, se considerada uma projeção da taxa média anual de crescimento de mais de três por cento ao ano. O consumo de café especial, no Brasil, também cresceu e já é responsável por 45% do mercado brasileiro (ABIC, 2022).

O processamento do café consiste das seguintes etapas: composição do “blend” do café, torrefação, moagem, embalagem e armazenamento. Na torrefação, o café é submetido a elevadas temperaturas, favorecendo a formação dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), (ABIC, 2022; FLAMENT, 2002). Os HPAs constituem uma família composta por mais de 100 substâncias químicas, contendo carbono e hidrogênio em dois ou mais anéis aromáticos condensados. Esses compostos são formados a partir da combustão incompleta ou pirólise de matéria orgânica, estando presentes na natureza como contaminantes de solos, ar, água e alimentos (SINGH, *et al.*, 2020). Nos alimentos, por sua vez, os HPAs podem ser formados durante o processamento do produto, principalmente quando o mesmo é exposto a elevadas temperaturas como, por exemplo, em processos de torrefação, defumação e secagem (CARUSO; ALABURDA, 2008).

Nos últimos anos várias pesquisas associaram os HPAs com o aumento da incidência de diversos tipos de câncer nos seres humanos. 16 HPAs são considerados prioritários pela Agência de Proteção Ambiental Americana e classificados, segundo a Agência Internacional para Pesquisa do Câncer (IARC), de acordo com suas propriedades carcinogênicas e mutagênicas (US EPA, 1998). Os HPAs com maior número de anéis

aromáticos (4, 5 e 6 anéis), em geral apresentam alta massa molecular, oriundos de fontes de origem pirolíticas, enquanto que os HPAs de poucos anéis aromáticos (2 e 3 anéis) são de baixa massa, e se caracterizam de fontes de origem petrogênica como aquelas derivadas diretamente do petróleo. Estes apresentam maior solubilidade e maior potencial de causar toxicidade aguda (SINGH, *et al.*, 2020).

Segundo IARC, os HPAs considerados possivelmente carcinogênicos são naftaleno, benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno e indeno(123-cd)pireno. O dibenzo(a,h)antraceno é classificado como provavelmente carcinogênico, e o benzo(a)pireno é considerado carcinogênico, apresentando genotoxicidade comprovada, assim como o fluoranteno. Os compostos mais pesados, além de mais estáveis, possuem maior caráter lipofílico, característica que facilita sua absorção pelo corpo. De modo que são considerados mais preocupantes quanto à genotoxicidade (EFSA, 2008; SINGH, *et al.*, 2020).

Em relação à legislação para HPAs nos diferentes países, existem algumas bem definidas, envolvendo diferentes grupos de alimentos e água para um número diversificado de HPAs (incluindo os estabelecidos pela FAO como marcadores). Contudo, outras legislações não são específicas, não abordando grupos de alimentos, contendo apenas limites para B(a)P em água, como o caso da legislação brasileira (GARCIA, 2014; SINGH, *et al.*, 2020).

No Brasil a portaria nº 888 de 04 de maio de 2021, da ANVISA, menciona o benzo[a]pireno como contaminante prioritário a ser monitorado em água para consumo humano com limite de  $0,4 \mu\text{g L}^{-1}$  (ANVISA, 2021), no entanto, não relata nenhuma legislação desses ingredientes ativos em alimentos. Agências europeias possuem legislação para benzo[a]pireno em azeite de oliva ( $2 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) e para outros HPAs ( $5 \mu\text{g kg}^{-1}$ ). Na Alemanha, a Sociedade Alemã da Ciência dos Lipídeos (*The German Society for Fat Science*) fixou para o teor total de HPAs em alimentos o limite de  $25 \mu\text{g L}^{-1}$  e de  $5 \mu\text{g kg}^{-1}$  para os HPAs de elevada massa molecular (EFSA, 2008).

A obtenção de informações sobre as características de desempenho global das metodologias de extração, como dados analíticos relativos à determinação cromatográfica dos HPAs encontrados nas amostras de café, possibilitará uma expansão de conhecimentos científicos e técnicos que podem auxiliar os processos de monitoramento de resíduos de produtos tóxicos em alimentos (GARCIA, 2014).

Os HPAs em suas formas nativas, aparentemente não apresentam atividade carcinogênica, entretanto são convertidos metabolicamente dentro de organismos, caracterizando-se mais como pró-carcinogênicos. Esses compostos podem ser convertidos através de mecanismos de epoxidação, em derivados carcinogênicos potentes, como no caso do benzo[a]pireno que pode se ligar diretamente a guanina do DNA (SILVA, 2006).

Considerando as implicações toxicológicas da ingestão desses compostos, vê-se a necessidade de se conduzir estudos no campo de desenvolvimento de métodos analíticos cada vez mais poderosos e eficientes para identificação e quantificação de compostos tóxicos em alimentos, servindo como ferramentas analíticas na área de segurança alimentar (EFSA, 2008; GARCIA, 2014).

O desenvolvimento de métodos que proporcionam elevada sensibilidade e seletividade, que utilizem pequenas quantidades de amostra e solventes orgânicos, que sejam rápidos, simples e geram resultados mais confiáveis, são alguns dos atributos esperados para um método analítico. Tais características contribuem para exemplificar o papel fundamental da Química Analítica na questão da segurança alimentar.

Para a extração dos HPAs, várias técnicas já foram relatadas na literatura, como: soxhlet, ultrassonificação (SUN P. *et al.*, 2006), extração com fluido supercrítico (CAJTHAML, T.; SASEK, V., 2005) e microondas (SÁNCHEZ-URÍA, J. E.; CASTILLO-BUSTO, del E., 2018). Além de possuírem muitas etapas, essas técnicas fazem uso extensivo de solventes como, acetonitrila, acetona, diclorometano (DCM), além de mistura de solventes, n-hexano:acetona, DCM:acetona, éter de petróleo:acetona, DCM:n-hexano, acetona:ciclohexano (SUN P. *et al.*, 2006 e SÁNCHEZ-URÍA, J. E.; CASTILLO-BUSTO, del E., 2018).

O método de microextração em fase sólida (HS-SPME, do inglês *solid-phase microextraction/headspace*) foi desenvolvido em 1990 por Janusz Pawliszyn e colaboradores na Universidade de Waterloo em Ontário, no Canadá (ARTHUR; PAWLISZYN, 1990). É uma técnica que integra amostragem, extração, pré-concentração e introdução da amostra no sistema cromatográfico em uma única etapa, empregando pouco ou nenhum uso de solventes. Além disso, promove uma análise simples, fácil manuseio, e utilização de pequena quantidade de amostra, podendo também ser aplicada a diversas áreas, revelando uma acentuada potencialidade dessa técnica em ser adaptada e otimizada para diversas aplicações (LI *et al.*,

2022; BIANCOLILLO *et al.*, 2022; CARVALHO *et al.*, 2021; ZIANNI *et al.*, 2022). Tendo em vista a consolidação e versatilidade da técnica SPME na determinação de HPAs em diversas amostras a mesma tem enorme potencial de aplicação em amostras de cafés (JALILI *et al.*, 2019; JALILI *et al.*, 2020).

Desde que o impacto que os HPAs podem gerar na sociedade e no meio ambiente, quanto aos efeitos carcinogênicos, então merece a atenção contínua da comunidade científica e dos órgãos governamentais o monitoramento desses contaminantes em matrizes alimentícias, sobretudo a prevenção e controle dos riscos à saúde devido ao consumo excessivo diário de café. Dentro deste contexto, este trabalho visa desenvolver um método analítico para determinação de HPAs em cafés, baseados em técnicas de microextração em fase sólida (SPME) e cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS) para a identificação e quantificação desses analitos.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Desenvolver e validar métodos analíticos para a determinação de resíduos de HPAs em cafés da espécie *Coffea arabica*, de alta qualidade e qualidade comum, obtidas de produtores brasileiros, usando as técnicas SPME- GC-MS.

### 2.1 Objetivos Específicos

- Desenvolver métodos cromatográficos para análise dos HPAs, empregando GC-MS para identificação e quantificação desses componentes;
- Estudar a otimização do método SPME para a extração de HPAs em amostras de café em pó para posterior identificação e quantificação por GC-MS;
- Estudar a otimização da técnica microextração em fase sólida – SPME para extração de HPAs em cafés preparados (bebida);
- Validar os métodos analíticos nas condições otimizadas de extração e análise por GC-MS, para determinação dos HPAs nas amostras de café;
- Realizar análises qualitativa e quantitativa de HPAs em diferentes amostras de café de qualidade comum e superior, bem como avaliar o grau de persistência desses compostos em preparações de café;
- Correlacionar os dados quimiométricos com a finalidade de identificar alguma similaridade entre os compostos ou as amostras.

### **3 REVISÃO DE LITERATURA**

#### **3.1 Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos**

##### ***3.1.1 Formação e características físico-químicas***

Os HPAs são um grupo de compostos orgânicos que contêm carbono e hidrogênio combinados em dois ou mais anéis aromáticos condensados, podendo também apresentar anéis com menos de seis carbonos. Essas substâncias podem ser organizadas sob a forma linear, angular ou agrupada (ALMEIDA, 2018). De acordo com a agência de proteção ambiental dos Estados Unidos - *Environment Protection Agency* (EPA), dezesseis HPAs são considerados poluentes orgânicos prioritários (EPA, 1998). Suas fórmulas estruturais bem como suas principais propriedades físico-químicas são representadas na tabela 1.

Tabela 1 - Principais propriedades físico-químicas dos 16 HPAs prioritários pelo US-EPA.

Composto	Estrutura	Log K <sub>ow</sub>	Solubilidade (mmol.L <sup>-1</sup> )	Pressão de vapor (Pa)
Acenaftileno		3,98	-	8,9.10 <sup>-1</sup>
Acenafteno		4,07	2,9.10 <sup>-2</sup>	2,9.10 <sup>-1</sup>
Antraceno		4,45	3,7.10 <sup>-4</sup>	8,0.10 <sup>-4</sup>
Benzo[a]antraceno		5,61	-	2,8.10 <sup>-5</sup>
Benzo[e]acefenantrileno		-	-	-
Benzo[k]fluoranteno		6,06	-	1,3.10 <sup>-7</sup>
Benzo[g,h,i]perileno		6,84	6,0.10 <sup>-8</sup>	1,4.10 <sup>-8</sup>
Benzo[a]pireno		6,13	8,4.10 <sup>-7</sup>	7,3.10 <sup>-7</sup>
Criseno		5,16	5,7.10 <sup>-7</sup>	8,4.10 <sup>-5</sup>
Dibenzo[a,h]antraceno		6,50	3,7.10 <sup>-10</sup>	1,3.10 <sup>-8</sup>
Fluoranteno		4,90	1,3.10 <sup>-3</sup>	1,2.10 <sup>-3</sup>
Fluoreno		4,18	1,2.10 <sup>-2</sup>	8,0.10 <sup>-2</sup>
Indeno[1,2,3-ed]pireno		6,58	-	1,3.10 <sup>-8</sup>
Naftaleno		3,36	2,4.10 <sup>-1</sup>	10,4
Fenantreno		4,45	7,2.10 <sup>-3</sup>	1,6.10 <sup>-2</sup>
Pireno		4,88	7,2.10 <sup>-4</sup>	6,0.10 <sup>-4</sup>

Dentre as principais fontes responsáveis pela presença dessas moléculas em alimentos e bebidas podemos destacar: mecanismos naturais (processos geoquímicos e queimadas em florestas); alguns tipos de processamentos (torrefação, defumação e secagem direta com madeira); poluição ambiental (vazamentos de óleo, sistemas de aquecimento,

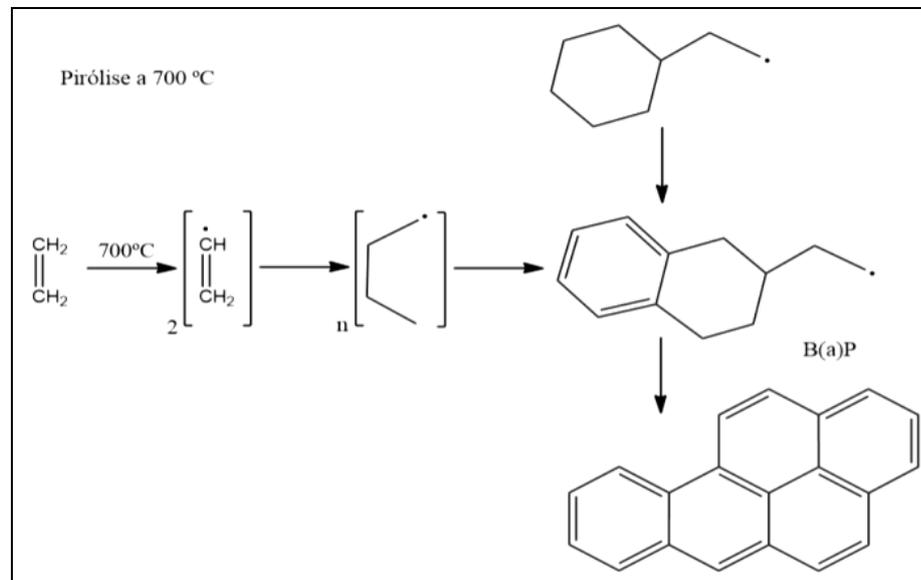
tráfego e atividades industriais) e materiais de embalagem. A exposição humana aos HPAs pode ocorrer com a ingestão de alimentos e/ou água contaminados e através do contato com as vias aéreas e dérmica, sendo rapidamente absorvidos pelo pulmão, intestino e pela pele. De acordo com a IARC (traduzindo do inglês agência internacional de pesquisa sobre câncer), os maiores níveis detectáveis de HPAs estão no fígado (IARC, 1985, 2020). A contaminação do café com os HPAs, por exemplo, pode ocorrer durante o processo de torrefação dependendo das temperaturas utilizadas (SILVA, 2019; SINGH, L.; AGARWAL, T, 2018; SINGH, L.; AGARWAL, T, 2020).

As características físico-químicas dos HPAs, como solubilidade e pressão de vapor, são fatores importantes que direcionam a distribuição desses contaminantes entre as fases solúvel e particulada dos meios atmosférico, aquoso e biótico. Em geral, a solubilidade dos HPAs em água diminui com o aumento da massa molecular, variando entre os altamente insolúveis, como o benzo(g,h,i)perileno (solubilidade de 0,0003 mg/L), aos pouco solúveis, como o naftaleno (solubilidade de 31 mg/L). São também classificados como moderadamente a altamente lipossolúveis, com coeficientes de partição octanol-água ( $\log K_{ow}$ ) variando entre 3,37 e 7,10 (PISSINATTI, 2013).

Os HPAs são formados a partir da combustão incompleta da matéria orgânica, sendo influenciada por fatores como temperatura e pressão. O aumento da temperatura contribui para o maior percentual de formação desses agentes contaminantes. Durante a combustão da matéria orgânica, o carbono e hidrogênio reagem com o oxigênio formando dióxido de carbono e água.

O processo de pirólise se dá quando a quantidade de oxigênio é insuficiente, de modo que acontece a combustão incompleta, onde somente parte do combustível da reação origina outros subprodutos, como monóxido de carbono e HPAs (SILVA, 2019). Com o aumento da temperatura, a pirólise de compostos orgânicos origina fragmentos de moléculas e radicais livres que reagem entre si e formam os HPAs, sendo liberados como vapor na zona de combustão (GARCIA *et al.*, 2014). O mecanismo aceito para a reação de formação dos HPAs envolve a polimerização por meio de radicais livres, em diversas etapas, até a formação de anéis aromáticos condensados, como representado na Figura 1.

Figura 1- Formação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos por meio de pirólise.



Fonte: ALMEIDA, 2018

### 3.1.2 Toxicidade dos HPAs

Os HPAs têm sido objeto de muitos estudos devido aos seus potenciais carcinogênicos e mutagênicos (IARC, 1983; LAMICHHANE; KRISHNA; SARUKKALIGE, 2016). Muitos dos HPAs são considerados compostos tóxicos, mesmo em pequenas concentrações, sendo que os compostos de menor massa molecular formados por dois ou três anéis (como naftaleno, fenantreno e antraceno) possuem elevada toxicidade aguda, mas baixo ou nenhum potencial carcinogênico, enquanto os compostos de maior massa molecular contendo quatro, cinco ou seis anéis (como benzo(a)pireno) possuem baixa toxicidade aguda, mas um maior potencial carcinogênico, ou seja, apresentam-se como carcinogênicos ou mutagênicos quando a exposição for crônica (PISSINATTI, 2013).

Os efeitos agudos atingem, principalmente, o rim e fígado, levando a inflamações cutâneas, hiperqueratose e ulcerações. São relatadas, ainda, alterações nos linfonodos e indução de efeitos imunossupressores (GARCIA *et al.*, 2014; SINGH, L.; AGARWAL, T, 2018; SINGH, L.; AGARWAL, T, 2020). Recentemente, a IARC atualizou a classificação do composto benzo(a)pireno para o nível mais tóxico (grupo 1), considerado o composto mais

prejudicial dessa classificação, sendo comprovadamente carcinogênico para humanos (IARC, 2020). Neste grupo, estão presentes 109 agentes (ou misturas) com evidências suficientes de carcinogênese em humanos. Segundo a IARC, os HPAs são classificados entre o grupo 1 e grupo 3 de acordo com a carcinogenicidade, conforme mostra a Tabela 2.

Tabela 2 - Potencial carcinogênico dos principais hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs).

HPAs	Classificação IARC (International Agency for Research on Cancer)	
	Grupo	Ano
Naftaleno	2B	2002
Acenaftileno	NC	-
Acenafteno	3	2010
Fluoreno	3	2010
Fenantreno	3	2010
Antraceno	3	2010
Fluoranteno	3	2010
Pireno	3	2010
Benz(a)antraceno	2B	2010
Criseno	2B	2010
Benz(b)fluoranteno	2B	2010
Benz(k)fluoranteno	2B	2010
Benzo(a)pireno	1	2012
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	2B	2010
Dibenzo(a,h)antraceno	2A	2010
Benzo(g,h,i)perileno	3	2010

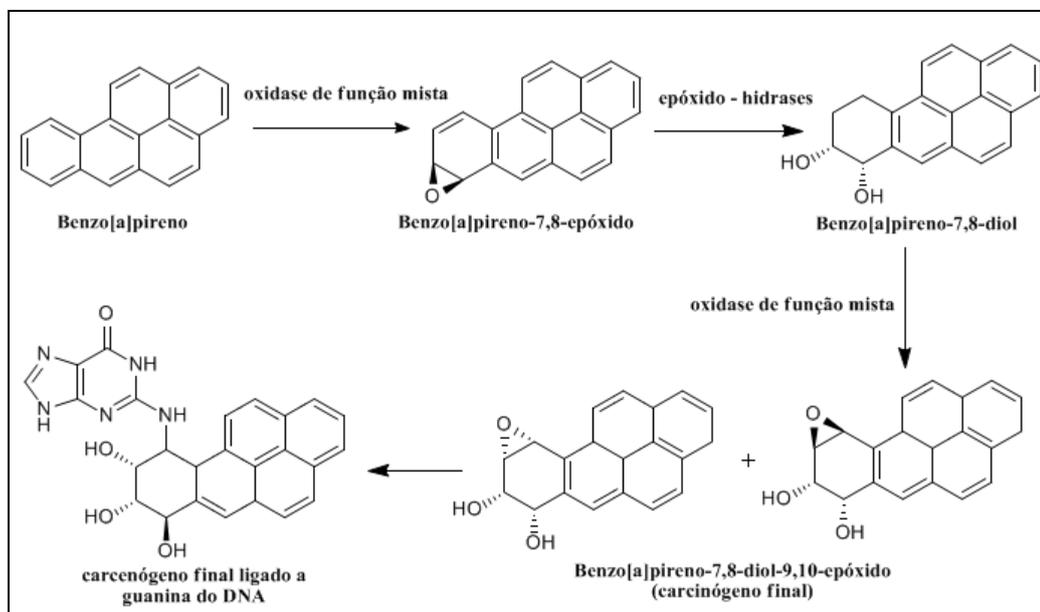
Fonte: IARC, 2020.

Grupo 1: Carcinogênico para humanos; Grupo 2A: Provavelmente carcinogênico para humanos; Grupo 2B: Possivelmente carcinogênico para humanos; Grupo 3: Faltam evidências quanto a carcinogenicidade para humanos; NC: Não classificado até o momento.

Dentre os principais efeitos tóxicos dos HPAs podemos destacar o desenvolvimento de mutagênese, teratogênese e carcinogênese que são consequência de sua interação com o material genético. De maneira geral, os danos causados à saúde são resultado de uma exposição crônica, ou seja, caracterizado pela ingestão de pequenas quantidades de contaminante por um longo período de tempo (SUN *et al.*, 2019). Os HPAs podem ser convertidos metabolicamente dentro de organismos, podendo expressar suas características mutagênicas e ativar o carcinógeno capaz de reagir com o DNA e outras moléculas, caracterizando-se mais como pró-carcinogênicos (GARCIA *et al.*, 2014).

Os HPAs ligam-se ao DNA (ácido desoxirribonucleico) formando complexos HPA-DNA. Durante a ativação enzimática do B(a)P, por exemplo, a enzima que catalisa a reação de epoxidação forma um composto denominado B(a)P-diol-epóxido. Esse diol-epóxido é capaz de reagir covalentemente com as bases nucleofílicas do DNA, os principais sítios são os grupamentos amino da guanina e da adenina, causando alterações no material genético e embasando o processo de carcinogênese. A mudança da guanina afeta a estrutura da dupla hélice do DNA, formando o aduto HPA-DNA que resulta na replicação incorreta da molécula (Figura 2). O aumento na produção de adutos de DNA nas células pode provocar um potencial efeito mutagênico (PISSINATTI, 2013; JALILI, 2019; JALILI, 2020).

Figura 2 - Formação do metabólito mais importante do benzo[a]pireno que se liga a guanina do DNA.



Fonte: SILVA, 2006.

A cafeína aumenta a solubilidade do B(a)P em água devido à formação do complexo B(a)P-cafeína, que é solúvel no meio aquoso. Esse composto presente no pó do café pode arrastar o B(a)P e os demais HPAs para a bebida. Estudos confirmaram que a quantidade de cafeína extraída do café fervido era 19-30% superior em relação ao café que foi apenas coado. Esses dados sugerem que a fervura favorece a formação do complexo solúvel HPA-cafeína, contribuindo para a passagem dos hidrocarbonetos para a bebida (CAMARGO, TOLEDO, 1998). Dessa forma, ao realizar o preparo da bebida através da fervura do pó de café junto com a água, é possível que o consumidor esteja ingerindo mais HPAs totais do que aqueles indivíduos que tomam apenas o café coado (CAMARGO, TOLEDO, 2002). A

eliminação do B(a)P pelo corpo humano envolve a formação de epóxidos e posteriormente, de compostos poliidroxilados que são mais solúveis em água e conseqüentemente, mais facilmente eliminados pela via urinária. Um dos intermediários gerados durante esse processo pode reagir com a guanina do DNA, formando um complexo capaz de induzir a célula a erros de reparação que resultam no desenvolvimento de tumores (SILVA, 2019).

### **3.1.3 Legislações referentes à HPAs**

Alemanha, Áustria e Polônia possuem uma regulamentação bastante completa sobre os limites máximos tolerados (LMTs) de HPAs, envolvendo diferentes grupos de alimentos e água para um número diversificado de HPAs (incluindo os estabelecidos pela FAO como marcadores). Contudo, outras legislações não são específicas, não abordando grupos de alimentos, contendo apenas limites para B(a)P (Tabela 3), que é o caso da legislação brasileira, (ANVISA, 2007; GARCIA *et al.*, 2014).

Os órgãos responsáveis pela legislação brasileira, tanto a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) quanto o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) ainda não estabeleceram LMT para a maioria dos alimentos suscetíveis a contaminação por HPAs. A ANVISA estabelece apenas Portarias e Resoluções Normativas que determinam LMT de B(a)P para alimentos que passaram por processo de defumação, além de água e gelo. Dessa forma, a Resolução RDC n°2/2007 estabeleceu LMT de 0,03 µg/kg para B(a)P em alimentos adicionado de aroma de fumaça e a Portaria n°518/2004, juntamente com a Resolução RDC n°274/2005, estabeleceram LMT de 0,7 µg/L para água envasada e gelo (ANVISA, 2007). Os valores dos limites tolerados estão expressos na Tabela 3.

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

A Argentina estabelece limites para água potável, água potável envasada ou água mineral sendo 0,01 µg/L de B(a)P (Resolução Conjunta SPRyRS e SAGPyA N° 68/2007 e N° 196/2007). De acordo com a Resolução n° 1541/1990, os corantes de uso alimentar, não devem conter HPAs com mais de três anéis condensados, e o solvente hexano empregado na extração de óleos alimentícios tem o limite máximo 0,2% v/v de resíduos (Resolução Conjunta SPRyRS e SAGPyA N° 122/2005 e N° 581/2005) (GARCIA *et al.*, 2014).

Nos Estados Unidos, o FDA (Food and Drug Administration) não estabelece limites de HPAs para nenhum alimento. A legislação desse país é focada na redução do emprego desses contaminantes em questões ambientais (GARCIA *et al.*, 2014).

Tabela 3 - Limites máximos de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em alimentos segundo legislações de diferentes países.

Gêneros alimentícios	LMT		
	B[a]P <sup>1</sup>	B[a]P, B[a]A <sup>2</sup> , B[a]F <sup>3</sup> e Cri <sup>4 (a)</sup>	
União Européia <sup>§</sup>			
Óleos e gorduras (exceto manteiga de cacau e óleo de coco) Consumo direto humano ou ingrediente em alimentos	2,0	10,0	
Óleo de coco para consumo direto ou ingrediente em alimentos	2,0	20,0	
Grãos de cacau e produtos derivados	5,0	35,0 (de gordura – até 31/03/2015)	
		30,0 (de gordura – de 01/01/2015)	
Carne defumada e produtos à base de carne defumada	5,0 (até 31.08.2014)	30,0 (até 31.08.2014)	
	2,0 (de 01.09.2014)	12,0 (de 01.09.2014)	
Brasil <sup>§§</sup>			
Produtos adicionados de aroma de fumaça	0,7	Tempo (min)	Cor do grão
Água e gelo	0,01 µg/L		NA
Argentina <sup>§§§</sup>			
Corantes para uso alimentar	MM		NA
Água mineral e potável	0,01		NA

1 - benzo(a)pireno; 2 - benzo(a)antraceno; 3 - benzo(a)fluoranteno; 4 - criseno; a - as concentrações para os limites inferiores são calculadas com base no pressuposto de que todos os valores das quatro substâncias abaixo do limite de quantificação são zero; b - para os produtos em lata, a análise será realizada em todo o conteúdo da lata; c - carne e produtos à base de carne que foram submetidos a um tratamento térmico que dê potencialmente origem à formação de HPA, ou seja, apenas grelhados na grelha ou em churrasqueira; d - não aplicável e não

deve conter HPAs com massa molecular  $\geq 202$  g/mol ou três anéis aromáticos §EC, 2011 §§Brasil, 2005, 2007 §§§Argentina, 1990, 2005, 2007.

### 3.2 Café

O café pertence à família botânica *Rubiaceae*. Há provavelmente 25 espécies principais, todas nativas da África tropical e de algumas ilhas do Oceano Índico. As dificuldades na classificação e na designação de uma planta como membro verdadeiro do gênero *Coffea* acontece em decorrência da grande variação nas plantas e nas sementes. As duas mais importantes espécies econômicas de café são o arábica (*Coffea arabica*), e robusta (*Coffea canephora*), responsáveis por 75% e 25%, da produção mundial de café, respectivamente (CNCAFE, 2020).

A espécie de café arábica é cultivada em regiões de altitudes de 900 a dois mil metros. Têm teor de cafeína relativamente baixo (entre 0,9% e 1,5%). Os frutos são redondos, suaves, levemente amargos, de cor achocolatada, com crosta lisa e perfume intenso. Essa é uma espécie conhecida por produzir cafés de melhor qualidade, por apresentar nuances de sabores que resultam em cafés mais finos e requintados. O café arábica é encontrado na América Latina, na África Central e do Leste, na Índia e em alguma extensão na Indonésia (CNCAFE, 2020).

#### 3.2.1 Agronegócio e consumo mundial de café

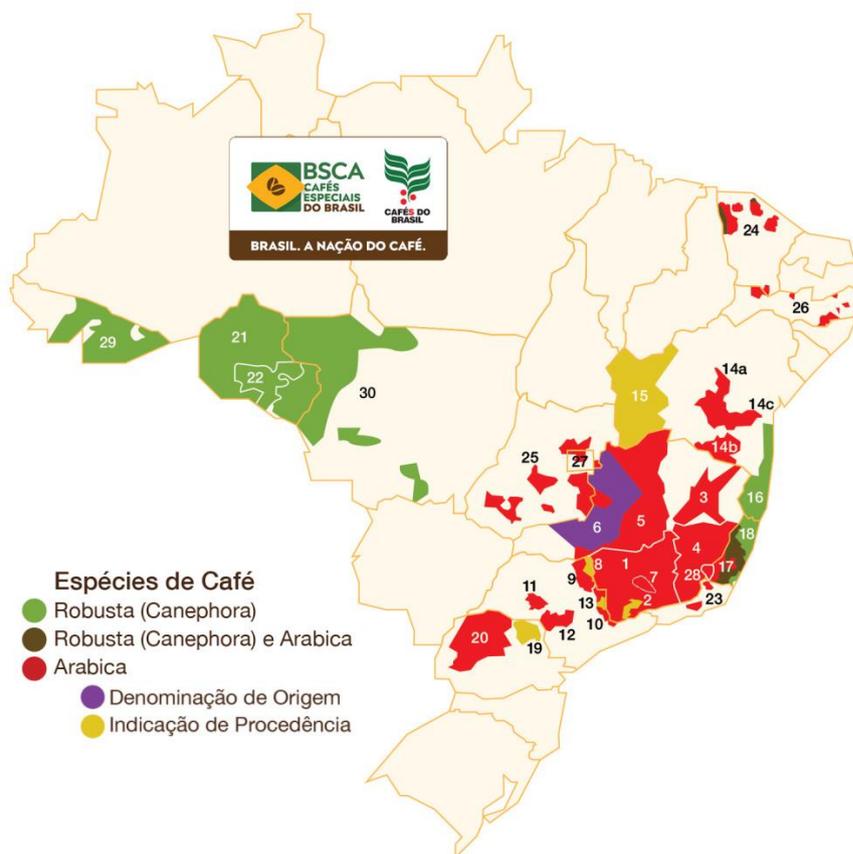
O Brasil destaca-se como maior exportador de café no mercado mundial e ocupa a segunda posição, entre os países consumidores da bebida. Segundo dados da ABIC (2022) a produção no Brasil no ano de 2021 atingiu 21,5 milhões de sacas, a estimativa é de 51,37 milhões de sacas beneficiadas e, desse total, 35 milhões de sacas foram direcionadas para exportação, resultando na receita cambial de US\$ 5,6 bilhões. Esse resultado representa um acréscimo de 18,8%, comparado com a produção de 43,24 milhões de sacas obtidas na safra anterior (ABIC, 2022). Em relação ao consumo, o Brasil ocupa a segunda colocação, seu consumo *per capita* é 6,02 kg/ano de café cru e 4,82 kg/ano de café torrado e moído.

Em relação à produção de cafés especiais no Brasil, esse mercado cresce cerca de 15% ao ano, enquanto os cafés tradicionais crescem 2%. Com base na produção brasileira em 2021, o volume de cafés especiais no país representou cerca de 8 milhões de sacas. As

cooperativas brasileiras têm dado suporte aos produtores que querem ingressar no setor de cafés especiais. Em leilões e prêmios pelo mundo, os cafés brasileiros são cada vez mais valorizados, entretanto, os preços ainda variam muito (BSCA, 2022).

A cotação das sacas de cafés especiais já é 25% superior à do produto convencional e, em alguns casos, pode ultrapassar 100% (BSCA, 2022). A Associação Brasileira de Cafés Especiais (BSCA) traz o mapa das origens produtoras do grão no país (figura 3).

Figura 3 – Mapa das regiões produtoras de café no Brasil.



Fonte: CNCAFE, 2020.

O consumo interno de café no Brasil vem crescendo a cada ano. Isso é observado através da ampliação do espaço dedicado ao café nos supermercados e pela abertura de lojas especializadas em cafés, como acontece no mercado americano e europeu (PISSINATTI, 2013). No período compreendido entre novembro de 2019 a outubro de 2020, a ABIC registrou o consumo de 21,5 milhões de sacas, representando um acréscimo de 1,71 % em relação ao período anterior correspondente (ABIC, 2022).

O consumo de café continua concentrado nas residências, representando 64% do total, enquanto fora do lar atingiu 34%. Este último tende a crescer continuamente, porque a oferta de cafés de alta qualidade em cafeterias, restaurantes e panificadoras induz ao aumento de demanda da bebida. O consumo *per capita* foi de 6,02 kg de café em grão cru ou 4,82 kg de café torrado, quase 83 L para cada brasileiro por ano, registrando uma evolução de 2,10 % em relação ao período anterior. O consumo de café deve continuar em expansão com uma tendência de crescimento contínuo até 2021, com evolução estimada em 3,5% ao ano (ABIC, 2022).

Entre as razões que justificam o aumento do consumo interno, destacam-se a melhora da qualidade da produção brasileira e a percepção do público com relação aos benefícios do café para a saúde humana (ABIC, 2022), com ênfase nos compostos bioativos do café ou compostos com atividades funcionais antioxidantes (CHENG *et al.*, 2016; JANISSEN AND HUYNH, 2018).

### ***3.2.2 Cultivo e processamento dos grãos de café***

A qualidade da bebida de café, caracterizada por seu sabor e aroma, é influenciada por diversos fatores pré e pós-colheita que garantem a expressão da qualidade final do produto. Dentre os fatores pré-colheita são destacados a espécie e variedades de café, o local do cultivo, a maturação dos grãos, a incidência de microrganismos e o efeito de adubações. Em relação aos fatores pós-colheita, destacam-se as fermentações enzimáticas e microbianas, os processos de armazenamento do café beneficiado, as misturas e torrefação dos grãos (PEREIRA *et al.*, 2019).

Dentre as operações envolvidas na cadeia produtiva do café, o processamento dos grãos constitui uma das etapas mais importantes. O processo do café começa com a remoção dos componentes externos da cereja do café, por métodos secos ou úmidos, deixando apenas grãos de café verdes. O método seco é comumente empregado para o café Robusta e produz o café natural, mais conhecido como café em coco, enquanto o método úmido é usado principalmente para arábica, originando os cafés cereja descascados, despulpados e desmucilados. Os componentes externos incluem a pele, polpa/casca e pele prateada (figura 4), sendo a pele prateada o principal subproduto do processo de torrefação.

Figura 4 - Estágios do desenvolvimento da cereja do café, desde frutos verdes imaturos (esquerda) a frutos maduros secos (direita).



Fonte: Adaptado de JANISSEN; HUYNH, 2018.

O processamento pós-colheita tem efeito pronunciado na composição química dos grãos de café, especialmente em compostos solúveis em água, como carboidratos, cafeína, trigonelina e ácidos clorogênicos. Além disso, a separação dos frutos verdes e imaturos dos frutos maduros é fundamental para se obter uma bebida de melhor qualidade e, para isto, é necessário dispor das mais diferentes técnicas de processamento. Em síntese, as condições do processo produtivo, operações pós-colheita, seleção de frutos, tipo de processamento, secagem e armazenamento podem influenciar diretamente a qualidade intrínseca dos grãos, sendo que a utilização do processamento pós-colheita varia entre os produtores, em função de aspectos tecnológicos, climáticos e econômicos (ALVARENGA, 2017).

### ***3.2.3 Qualidade do Café***

A ABIC (Associação Brasileira da Indústria do Café), define as categorias de qualidade de cafés segundo um critério denominado Qualidade Global (QG), que varia dentro de uma escala de 0 a 10. Após avaliação das características de qualidade é definido um valor de QG para o café. As categorias são definidas conforme faixas de valores dentro de uma escala. Esta classificação, que é única no mundo, auxilia a definir a qualidade do café, conforme a seguinte escala: cafés tradicionais ou extrafortes ( $4.5 \leq QG < 5.9$ ), considerados como cafés com custo menor, qualidade comum; cafés superiores ( $6.0 \geq QG < 7.2$ ),

considerado um café de boa qualidade e sabor mais acentuado, numa escala intermediária de qualidade; cafés *gourmet* ( $7.3 \geq \text{QG}$  até 10), considerada uma categoria de cafés de excelência, exclusivo e de alta qualidade, com sabor e aroma mais suaves por causa da seleção dos grãos.

A classificação é uma operação importante em nível comercial, pois através dela é determinada a qualidade do café, da qual depende seu preço e sua aceitação no mercado. A avaliação da qualidade compreende duas fases; classificação por tipos e classificação pela qualidade. A classificação por tipos é feita para identificar e quantificar os defeitos no café, como grãos alterados (preto, verde, ardido, etc.) e impurezas como pedras, paus, cascas. A classificação pela qualidade, indica a origem do café e as características finais da bebida. Para isso é feito o teste sensorial, conhecido como teste de xícara, onde degustadores avaliam diversos aspectos do produto final. Dentre esses aspectos destacam-se: doçura, acidez, amargor, corpo e aroma (NASCIMENTO, 2006).

Os grãos de cafés crus são classificados de acordo com sua composição em:

- Cafés *Gourmet* ou especiais: Constituídos de grãos de cafés 100% arábica, de origem única ou misturados de bebida mole. Deve ser completamente ausente de grãos com defeitos, (grãos PVA (Pretos, Verdes e Ardidos) e/ou fermentados). É considerado o mais nobre dos cafés. Produz uma bebida normalmente mais doce, chegando muitas vezes a dispensar o uso de açúcar. O aroma e o sabor podem lembrar cereais torrados, flores, frutas ou achocolatados. São encontrados geralmente em embalagens valvuladas, com mecanismo interno que impede a saída dos gases do café e a entrada de ar. A torra varia de moderadamente clara a moderadamente escura.
- Cafés Superiores: Constituídos de grãos de cafés arábica ou misturados com grãos de café robusta (robusta), estes com limite de até 15% na mistura, desde que limpos e de bebida dura a mole, devem ter um máximo de 10% de defeitos pretos, verdes e ardidos (PVA) e/ou fermentados. Apresenta certa flexibilidade no "blend" (mistura de grãos), podendo ter até 20% da variedade de grão robusta, mais utilizada em cafés solúveis. A torra não é muito escura, e o sabor é suave, porém mais amargo que o do gourmet.
- Cafés Tradicionais: Constituídos de grãos de cafés arábica ou misturados com robusta, estes com limite de até 30% na mistura, desde que limpos. Admite-se um máximo de 20% de grãos

PVA e ausência de grãos fermentados. São os mais comuns. Podem ser formados por diferentes espécies de grão, a torra geralmente é mais escura, e o gosto não é muito adocicado. O equilíbrio (doçura e amargura) é variável.

O Brasil é o maior produtor e exportador de café e seu crescimento no mercado está associado à melhoria da qualidade do produto. A Instrução Normativa nº 16, de 24/5/2010, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) visa a garantia da qualidade para o café torrado e moído, e estabelece como 1% o percentual máximo permitido em conjunto de impurezas (cascas e paus), sedimento (pedras, torrões e areia) e matérias estranhas (milho, centeio, açúcar, cevada, sementes de açaí, entre outras). A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) estabeleceu um limite máximo admissível de 1% para o conteúdo de substâncias estranhas no café (ANVISA, 1999; MAPA, 2020).

#### **3.2.4 Torrefação**

A torrefação é uma etapa de extrema importância para o desenvolvimento do aroma e do sabor final da bebida. O processo de torrefação é dependente do tempo e da temperatura e induz mudanças químicas nos grãos de café, podendo ser dividido em três fases: secagem, torrefação propriamente dita e resfriamento. É uma etapa de extrema importância para a formação do aroma e do sabor final da bebida, característica atribuída aos compostos voláteis, presentes nos grãos antes e/ou após a torra (PISSINATTI, 2013).

Nesta fase os grãos sofrem reações pirolíticas importantes, necessárias à formação da qualidade sensorial e mudanças físicas. As reações pirolíticas ocorrem nos compostos orgânicos do grão cru gerando produtos, tais como; ácidos voláteis, sulfetos, caramelos e outros que podem variar de uma espécie a outra e também entre cultivares. É através da pirólise que ocorre o desenvolvimento do sabor do café, acontecendo simultaneamente degradações e síntese de novos compostos. Mais de 800 compostos voláteis de várias classes já foram identificados no café torrado (ROSA, 2010).

As torras são classificadas em clara, média e escura. A Tabela 4 apresenta as condições para a torrefação dos cafés.

Tabela 4 - Condições para torrefação do café.

Torra	Temperatura final (°C)	Tempo (min)	Cor do grão
Clara	200 ( $\pm 20$ )	5	Marrom claro
Média	200 ( $\pm 20$ )	8	Marrom escuro
Escura	200 ( $\pm 20$ )	10	Preto

Fonte: Rosa, 2010

Os atributos sensoriais da bebida estão intimamente relacionados com o grau de torra do café. Abaixo estão discriminados os principais tipos de torra e como eles realçam o sabor da bebida:

Torra clara: Acentua acidez e aroma com suavidade do sabor. Ameniza o amargor. A torra clara preserva mais os óleos aromáticos (grãos permanecem secos), mas acentua a acidez da bebida ao mesmo tempo que produz um café gourmet menos encorpado. Ideal para máquinas de café expresso. A torra clara privilegia a presença da acidez cítrica do grão, que lembra a do limão. Também destaca os diversos aromas dos cafés finos e delicados. Nesse processo, os óleos essenciais são preservados, produzindo uma bebida mais encorpado, parecendo veludo. Por não ficar muito tempo dentro do torrador, os grãos não desenvolvem um amargor acentuado, que é aquele gostinho de queimado. Assim, o resultado é uma bebida com sabor suave ao nosso paladar.

Torra média: Ponto de equilíbrio entre várias características como acidez, aroma e amargor. Normalmente acentua o corpo. Porém, o café gourmet começa a ficar menos encorpado com torras mais escuras. Ideal para coador de pano ou filtro de papel. É na torra média que o café encontra o seu ponto de equilíbrio: acidez, doçura, amargor e corpo. É promovida a intensa caramelização dos açúcares e a decomposição dos ácidos naturais, que faz com que o grão diminua os óleos essenciais, sua acidez intensa, aromas e sabores. Em contrapartida, ganha mais corpo e apresenta tonalidade marrom e avermelhada. O resultado é uma bebida em perfeita harmonia, que preenche a boca e deixa um final doce prolongado no paladar. Essa torra é perfeita para um café coado.

Torra escura: Café menos ácido, mais amargo e menos encorpado. Torra mais escura deixa o café gourmet mais amargo o que pode ser confundido com um café “mais forte”. Porém, a torra muito escura pode “queimar” o café, acentuando muito o amargor e praticamente

eliminando a acidez e o corpo. Esse é o ponto em que os grãos começam a escurecer e deve ser parado antes da queima dos grãos para evitar uma bebida desagradável. Nessa torra, o resultado é um café menos ácido, com uma leve doçura e um pouco de óleo na superfície. O amargor começa a ficar mais acentuado e os grãos apresentam tonalidades escuras, com tons amarronzados. Ele nos lembra chocolate e caramelo e é muitas vezes confundido com um café mais forte. Essa torra é a mais próxima dos cafés que os brasileiros estão acostumados a beber.

### 3.2.5 Composição química do café

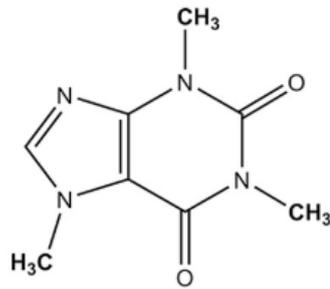
O sabor e a constituição do aroma do café ocorrem devido a uma mistura complexa de compostos químicos voláteis e não voláteis, tais como aldeídos, açúcares, cetonas, proteínas, aminoácidos, ácidos graxos e compostos fenólicos, que podem se formar ao longo da torração (CHENG *et al.*, 2016). Muitos destes compostos são originários principalmente das reações de pirólise, caramelização e reação de *Maillard*, que por sua vez são dependentes do binômio tempo e temperatura do processo. Por essa razão, o café é um dos alimentos que mais é alterado durante o seu processamento.

Alguns constituintes bioquímicos, como cafeína, trigonelina, lipídios, sacarose e ácidos clorogênicos, são considerados componentes-chave por serem significativos na influência da qualidade do café e por apresentarem características sensoriais comercialmente importantes. Esses componentes permanecem estáveis e agem como atributos de sabor no café preparado (bebida) ou são degradados durante a torrefação, contabilizando precursores de sabor (CHENG *et al.* 2016; JANISSEN; HUYNH, 2018).

#### 3.2.5.1 Cafeína

A cafeína (Figura 5) é um composto estável durante a torra, sendo também um dos atributos de amargura mais importantes que contribuem para a qualidade do café. Além disso, devido às suas propriedades fisiológicas e farmacológicas, é o componente do café mais conhecido e é bastante consumido devido ao seu efeito estimulante. Quando a cafeína é consumida moderadamente, foram relatados aumento da disponibilidade de energia, atenção e concentração, fadiga reduzida e aumento do desempenho físico; no entanto, cafeína em excesso pode resultar em efeitos indesejáveis, como doenças cardiovasculares, depressão e até vícios (CHENG *et al.* 2016; SINGH, *et al.*, 2018).

Figura 5 - Estrutura química da cafeína.



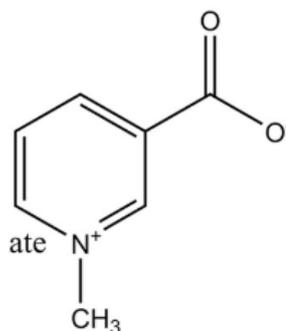
Fonte: Adaptado de Cheng et al. 2016.

De acordo com Cheng *et al.* 2016, o teor de cafeína em espécies *C. arabica L.* e *C. canephora*, tanto em grãos crus quanto em torrados, é de 0,6 a 1,8 % (m/m) e 1,2 a 4,0 % (m/m), respectivamente, indicando maiores quantidades desse composto nas espécies de café robusta em comparação com o de teor de cafeína no café arábica.

### 3.2.5.2 Trigonelina

A trigonelina (Figura 6) é um composto nitrogenado encontrado em maiores quantidades no café verde, sendo importante para o sabor e aroma do café. Depois da cafeína, a trigonelina é o segundo alcalóide mais abundante nos grãos de café. Como um derivado da piridina, a trigonelina é um precursor do aroma que contribui para os produtos aromatizantes desejáveis formados durante a torrefação do café, incluindo pirazina, furanos, alquil-piridinas e pirróis. A trigonelina se decompõe rapidamente, dependendo da temperatura de torrefação (CHENG *et al.* 2016).

Figura 6 - Estrutura química da trigonelina.



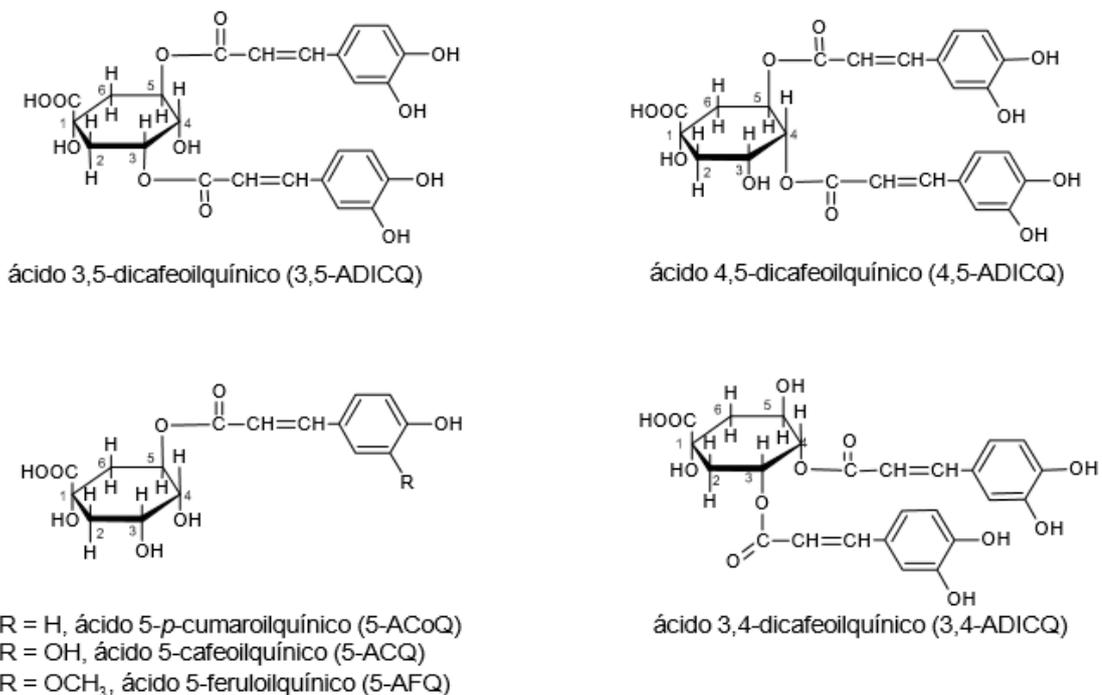
Fonte: Adaptado de Cheng et al. 2016.

A grande importância da trigonelina se concentra nos aspectos nutricionais, pois durante a torra essa substância é convertida a ácido nicotínico (niacina - vitamina importante do complexo B), fazendo do café uma fonte dessa vitamina na dieta, sendo um dos únicos produtos que mediante um processo tão drástico produz uma vitamina importante para o metabolismo humano. A niacina também é conhecida como vitamina B3 e apresenta eficácia na redução do colesterol (CHENG *et al.*, 2016; FROST-MEYER, LOGOMARSINO, 2012).

### 3.2.5.3 Ácidos clorogênicos

Os ácidos clorogênicos (ACGs) são um grupo de compostos fenólicos que apresentam múltiplos atributos e são conhecidos principalmente por suas características antioxidantes. A atividade antioxidante dos compostos fenólicos se deve, principalmente, às suas propriedades redutoras e à sua estrutura química (FROST-MEYER, LOGOMARSINO, 2012; JANISSEN, HUYNH, 2018). A composição de ácidos clorogênicos no café é extremamente complexa com a presença de pelo menos cinco grupos principais: ácidos cafeoilquínico (ACQ), ácidos dicafeoilquínico (ADICQ), ácidos feruloilquínico (AFQ), ácidos p-coumaroilquínico (ACoQ) e ácidos cafeoilferuloilquínico (ACFQ). A Figura 7 mostra a estrutura dos ácidos clorogênicos (NASCIMENTO *et al.*, 2003).

Figura 7 - Estrutura química dos ácidos clorogênicos.



Fonte: Nascimento, P. M., 2006.

Durante a torrefação, uma grande porcentagem dos ACGs se degrada para formar ácido cafeico, lactonas e outros derivados do fenol por meio das reações de Maillard, que resultam em aumento de amargor, adstringência e aroma. As ACGs são termicamente instáveis e no café Arábica, sua perda após torrefação leve e escura de grãos corresponde a 60,9% e 96,5%, respectivamente, enquanto em Robusta essa perda corresponde a 59,7% a quase 98%, respectivamente (CHENG *et al.*, 2016).

#### 3.2.5.4 Sacarose

O café pode conter até 60% de carboidratos, sendo a sacarose o açúcar de baixo peso molecular mais abundante no café cru. Seu conteúdo é importante para a formação de pigmentos e outros compostos responsáveis pelo aroma do café. Como precursora do aroma, a sacarose se degrada rapidamente durante a torrefação e forma monossacarídeos (frutose e glicose), precursores de ácidos e aldeídos, responsáveis pelo aroma e sabor do café, destacando-se a frutose e a glicose, com teores entre 0 a 0,5 % (m/m).

Esse açúcar é degradado rapidamente durante o processo de torra, podendo variar dependendo do genótipo do café. Em café arábica, o teor de sacarose varia entre 7,4 % e 11,1 % (m/m), enquanto em café robusta este valor situa-se entre 4,05 % e 7,05 % (m/m) (CHENG *et al.*, 2016; JANISSEN; HUYNH, 2018).

#### 3.2.5.5 Lipídios

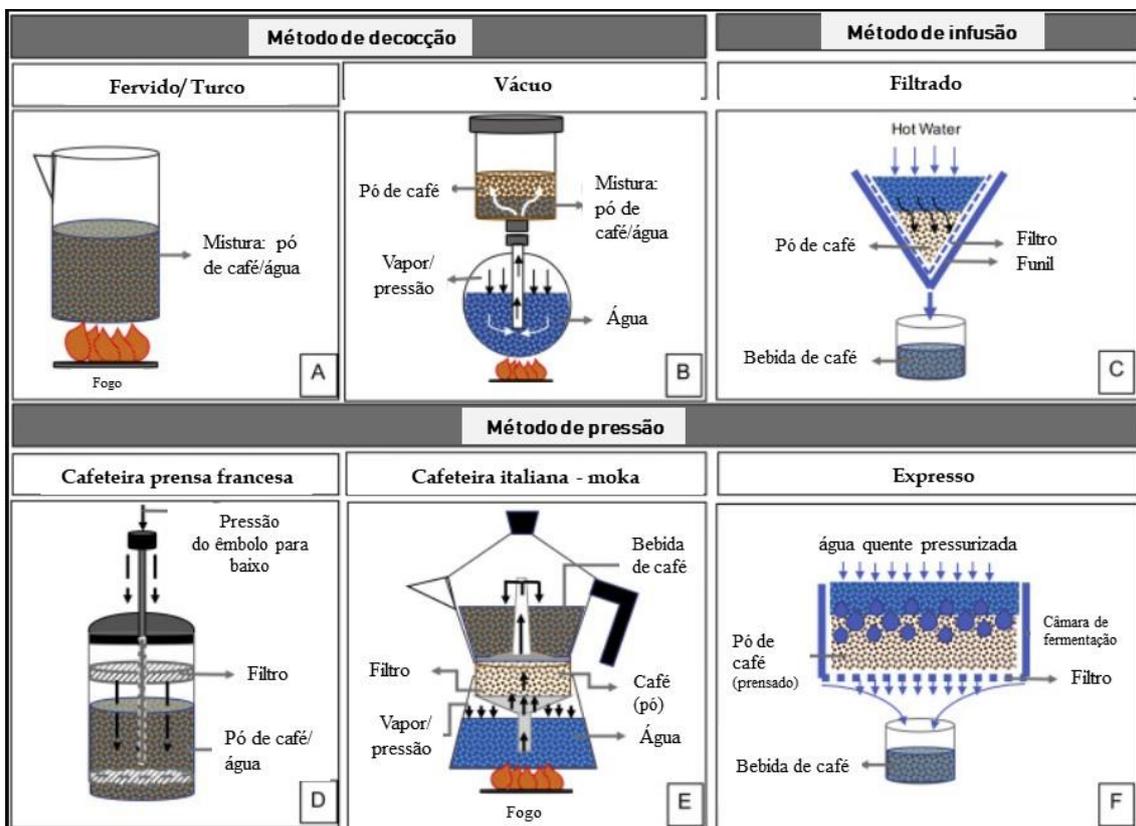
Os lipídeos são compostos importantes quando considerados os aspectos fisiológicos e sensoriais dos alimentos e estão relacionados com a percepção do aroma e sabor. Entretanto, a liberação dos ácidos graxos não é uniforme e a degradação se dá de forma diferenciada de um ácido para outro. Eles podem contribuir para a perda da qualidade sensorial durante o armazenamento (ALVARENGA, 2017).

Seu conteúdo em grãos varia de acordo com a espécie. Para cafés arábica varia de 12% a 18% (m/m) e, para café robusta, de 9% a 14% (m/m). Na fração óleo, os ácidos graxos insaturados mais importantes são os ácidos linoleico, oleico e linolênico. Durante a torração, eles são mobilizados no grão, retendo componentes voláteis, muitos dos quais são perdidos após a moagem. Injúrias aos grãos podem causar sua oxidação, levando à formação de aldeídos indesejáveis ao sabor (CHENG *et al.*, 2016).

### 3.2.6 Métodos de preparação da bebida de café.

Os métodos de extração podem ser categorizados pelas ferramentas de extração, bem como pelos principais parâmetros do processo que influenciam o perfil final de sabor. A figura 8 mostra a classificação dos principais métodos de extração de café que são usados para avaliar a composição química e sensorial das bebidas de café sob diferentes condições de extração. Apesar dos inúmeros métodos de extração, a extração de café pode ser classificada em três categorias principais: métodos de decocção (café cozido, café turco, café coador e café a vácuo), métodos de infusão (café de filtro) e métodos de pressão (prensa francesa, moka e expresso). Em geral, a decocção é uma operação que requer contato prolongado entre sólidos e água; enquanto o método de infusão requer que a água quente flua através do leito de café, permitindo um curto tempo de contato com cada volume elementar de água. Finalmente, no método de pressão, é necessária uma força motriz (pressão) para o fluxo de água passar através de um leito compacto (bolo de café) feito de borra de café (CORDOBA *et al.*, 2020).

Figura 8 - Descrição geral dos principais métodos de extração de café. Decocção: Fervida /Turca (A) e vácuo (B). Infusão: Filtrada (C). Pressão: Cafeteira Francesa (D); Cafeteira com fogão / Moka (E) e Espresso (F).



Fonte: Adaptado de Cordoba *et al.* 2020.

A extração do café é realizada por diferentes métodos para produzir a bebida. Com relação a preparação da bebida, é possível elencar diferentes formas, destacando-se:

1) Café de coador ou filtro: é o método mais utilizado no Brasil e pode ser feito utilizando um coador de pano ou um filtro de papel. Apesar de ser a forma mais comum é a que oferece mais chances de produzir diferentes sabores. Em moagens mais grossas os cafés são mais saborosos e macios.

2) Cafeteira elétrica: é semelhante ao sistema do coador de filtro, porém se perde um pouco da aromaticidade do café nesse processo.

3) Café turco: é o método mais antigo sendo mais utilizado nos países árabes. O pó de café bem fino é colocado em uma vasilha de cobre com cabo longo, adiciona-se água e é aquecido, fervendo 3 vezes e servido sem coar. Os aromas e os sabores mais delicados desaparecem, apenas o sabor forte permanece.

4) Cafeteira de embolo: esse método é prático e rápido no preparo de um café macio e leve que extrai muito aroma e sabor. Na forma de preparo, coloca-se o pó de café na cafeteira e em seguida água quente até o nível desejado. Tampa-se com o embolo erguido, e aguarda-se por 4 minutos. Depois se inicia uma leve compressão sobre o embolo para abaixá-lo lentamente, a fim de que separe o pó da infusão e retenha-o no fundo da cafeteira. A moagem ideal é a média - grossa.

5) Cafeteira Moka: Esse método é muito difundido na Europa e vem crescendo no Brasil. O café preparado nesse tipo de cafeteira é uma mistura entre um “expresso antigo” por pressão de vapor e um café filtrado muito forte. A forma de preparo é simples, a cafeteira possui três compartimentos. No compartimento inferior é colocada água fria até o limite do compartimento, na parte central onde fica o filtro (peneira de metal) é colocado o pó. O compartimento superior é que vai receber a infusão de café para ser servido. A cafeteira deve ser levada ao fogo para que a água entre em ebulição, e com a pressão de vapor, a água passa sobre o pó e chega ao compartimento superior. A moagem utilizada é a média.

6) Café expresso: É intenso e encorpado, preparado para ser consumido no momento, é o método de preparação no qual temperatura e pressão combinadas extraem os

óleos contidos nas partes profundas do grão. Seu consumo vem aumentando a cada ano principalmente em países da Europa (NASCIMENTO, 2006).

### 3.3 Métodos de análise e detecção dos HPAs

O entendimento dos riscos quanto à toxicidade de HPAs têm despertado a comunidade científica para o desenvolvimento de metodologias analíticas que visam identificar e quantificar níveis cada vez menores desses analitos em diferentes matrizes. Dentre as técnicas mais empregadas, destaca-se a cromatografia. A tabela 5 a seguir destaca alguns trabalhos encontrados na literatura que fizeram uso dessa técnica.

Tabela 5 - Emprego da cromatografia na análise de HPAs em diferentes matrizes relatados na literatura nos últimos anos.

<b>Método</b>	<b>Matriz</b>	<b>Compostos detectados</b>	<b>Referência</b>
<b>GC-MS/MS e LC-MS/MS</b>	Unhas humanas	Naftaleno, fluoreno, fenantreno e seus metabólitos hidroxilados	Zeng Z., Gao Y., Cui J, Lin M., Tang J., Wang F., Yang Y., Yu Y., Ma S. (2022)
<b>HPLC-DAD</b>	Bebida de chá	naftaleno, acenaftileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno e pireno	Feng J., Feng J., Loussala H.M., Han S., Ji X., Li C., Sun H., Sun M. (2021)
<b>HPLC-FLD</b>	Frango cozido e café torrado	Todos os 16 HPAs prioritários listados pela US-EPA	Singh L., Agarwal T. (2021)
<b>GC-MS/MS</b>	Água	Fluoreno, Pireno, Antraceno, fenantreno, fluoranteno, Benzo(a)antraceno e criseno	Bhardwaj, Sharma, Jindal, (2021)
<b>TD-GC-MS</b>	Partículas atmosféricas finas	Fluoranthene, Pyrene, Benz[a]anthracene, Chrysene,	Chu X., Sasaki T., Aono A., Kudo Y., Tanaka K., Fuse Y. (2021)

		Benzo[b]fluoranthene, Benzo[k]fluoranthene, Benzo[a]pyrene, Indeno[1,2,3-cd]pyrene, Benzo[ghi]perylene	
<b>GC-MS/MS</b>	Mexilhões	Foram detectados os 16 HPAs, sendo predominantes os de baixo peso molecular	Grigoriou C., Costopoulou D., Vassiliadou I., Chrysafidis D., Tzamtzis V., Bakeas E., Leondiadis L. (2021)
<b>HPLC-MS/MS e GC-MS</b>	Sedimento	Todos os 16 HPAs prioritários listados pela US-EPA	Wang T.-F., Zhang W.-J., Li L.-Q., Zhang M.-Y., Liao G.-Y., Wang D.-S. (2021)

GC-MS/MS (Gas chromatography-mass spectrometry); Thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry (TD-GC-MS); detector de fluorescência de cromatografia líquida de alta pressão (HPLC-FLD); HPLC-DAD: cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos.

### 3.3.1 A técnica CG-EM

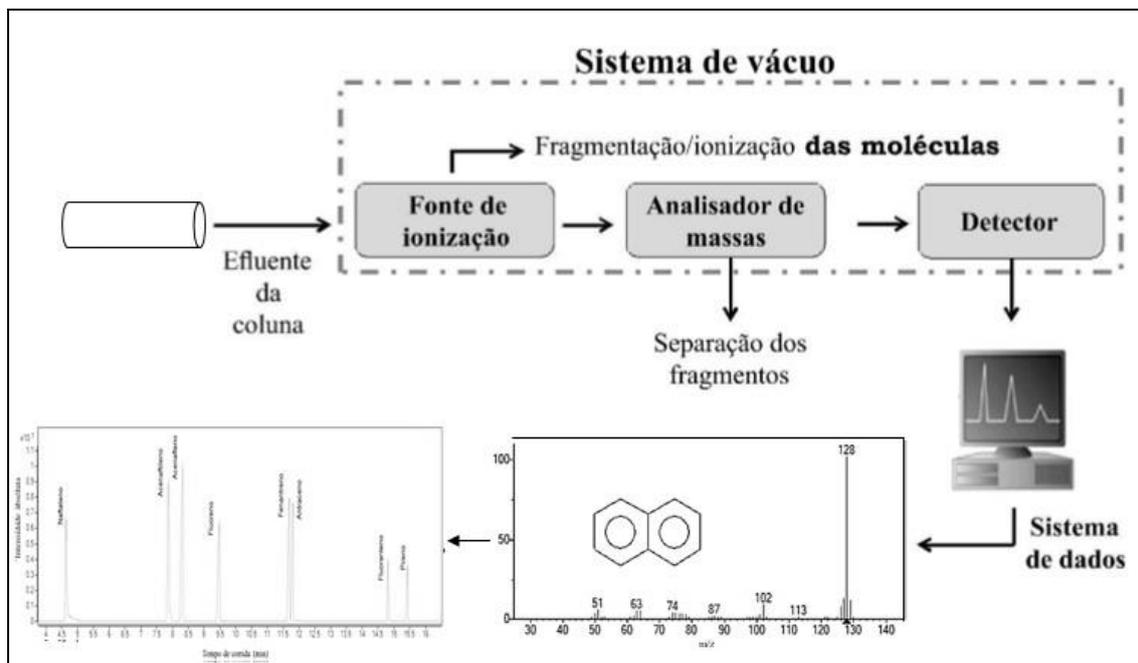
A cromatografia gasosa (CG) é uma técnica analítica que envolve a separação físico-química de componentes de uma amostra. Essa separação se dá pela interação diferencial dos analitos com as fases, móvel e estacionária, no interior da coluna. Assim, cada composto chega ao detector em tempo diferente e há a identificação de cada composto através de um banco de dados disponível no equipamento (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008). A cromatografia gasosa limita-se a determinação de compostos que apresentem uma certa volatilidade e que sejam termicamente estáveis, para que os mesmos passem para a fase vapor sem sofrer degradação química (SKOOG *et al.*, 2010).

Entre os componentes básicos de um CG podemos destacar a fase móvel, o sistema injetor da amostra, a coluna cromatográfica, o forno para controle de temperatura da coluna e o sistema de detecção. Vários detectores podem ser utilizados em CG para fins de identificação e quantificação de componentes da amostra que são eluídos da coluna. Diante disso, a espectrometria de massas tem sido bastante empregada em conjunto com a cromatografia e tem se revelado uma poderosa técnica de detecção, oferecendo informações

qualitativas e quantitativas, além de elevada sensibilidade e capacidade de distinção entre diferentes substâncias em um mesmo tempo de retenção (LI *et al.*, 2014).

A técnica cromatográfica combinada com a espectrometria de massas permite a junção das vantagens da CG, dentre elas alta seletividade e eficiência de separação, com as vantagens da espectrometria de massas (como obtenção de informação estrutural, massa molar e aumento adicional de seletividade). O espectrômetro de massas (EM) é constituído de três regiões principais: a fonte de ionização (que pode ser por ionização química ou impacto de elétrons, sendo esta última mais usual), um analisador de massas e um detector de íons/multiplicador de elétrons (LANÇAS, 2009). A figura 9 representa o esquema simplificado de um espectrômetro de massas.

Figura 9 – Esquema simplificado de um processo de detecção por espectrometria de massas.



Fonte: Adaptado de NASCIMENTO *et al.*, 2018.

O mecanismo de detecção por espectrometria de massas (EM) baseia-se inicialmente no bombardeamento das moléculas dos analitos com um feixe de elétrons de alta energia (em torno de 70 eV), de modo que as moléculas se ionizam, gerando uma série de fragmentos. Cada fragmento possui um valor de razão entre sua massa e carga elétrica (razão  $m/z$ ). Os fragmentos são separados por dispositivo analisador de massas, sendo detectados separadamente (NASCIMENTO *et al.*, 2018). O detector expressa um gráfico, denominado

espectro de massas, que mostra a abundância relativa e as massas dos fragmentos gerados na ionização de um dado composto. Além disso, também é fornecido o cromatograma da análise, onde são expressos os picos cromatográficos (sinais analíticos) para cada composto, de forma que para cada pico cromatográfico tem seu espectro de massas associado.

Existem diferentes métodos de ionização na espectrometria de massas, sendo os principais a ionização por impacto de elétrons (IE) e a ionização química (IQ), assim como diferentes tipos de analisadores de massas, quadrupolar, *ion trap* (armadilha de íons) e o analisador por tempo de voo (TOF - time of flight) (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008).

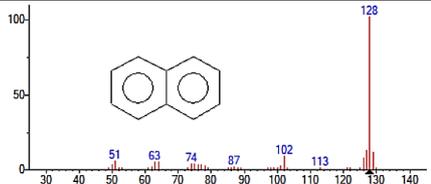
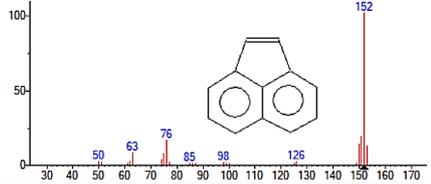
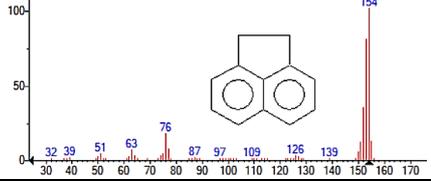
O quadrupolo simples, ou espectrômetro de massas quadrupolar de transmissão, é o analisador mais comum utilizado no acoplamento cromatografia a gás/espectrometria de massas (CG-EM) devido ao baixo custo e possibilidade em se trabalhar no modo monitoramento seletivo de íons (SIM) ou no modo monitoramento de íons extraídos (IE). No modo SIM, o espectrômetro de massas é ajustado para monitorar apenas alguns valores de massa/carga ( $m/z$ ) (no máximo cinco valores). Primeiramente, é gerado o cromatograma de íons totais (TIC), em que toda a faixa de íons (todas as razões  $m/z$ ) de cada composto que elui da coluna são detectadas, dando origem aos espectros de massas para cada substância, a partir daí seleciona-se os valores de  $m/z$  que serão monitorados no modo SIM para o analito de interesse (HARRIS, 2013).

Entretanto, para espectrômetros de massas mais modernos, escolhe-se uma faixa ampla de íons que serão monitorados no modo TIC, exemplo ( $m/z$  de 50-500), e todo o espectro de massas de cada composto é registrado separadamente durante a corrida cromatográfica. Dessa forma, pode-se selecionar quaisquer valores de  $m/z$ , dentro da faixa monitorada, para que apenas o espectro que os contém apareça na tela, gerando o cromatograma de IE (HARRIS, 2013). Por exemplo, ao selecionar  $m/z$  de 128, 152 e 166, apenas o analito que apresenta essas três massas será revelado no cromatograma, embora todos os valores dentro da faixa de 50 a 500 tenham sido medidas. O modo SIM e o IE aumentam a seletividade e melhoram a sensibilidade, diminuindo a resposta do instrumento a tudo que possa interferir na medida (ALCÂNTARA *et al.*, 2018).

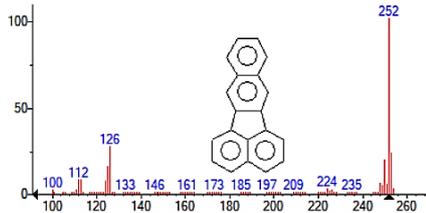
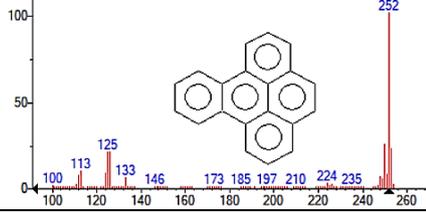
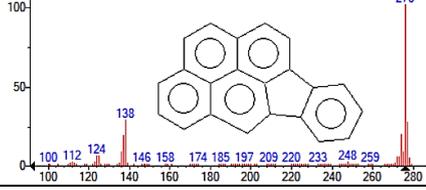
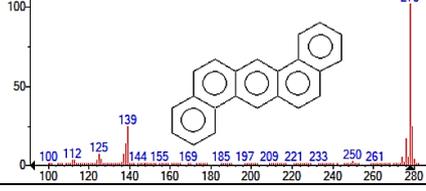
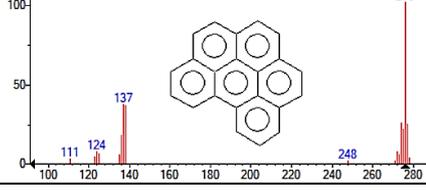
A interpretação do espectro de massas é extremamente viável para a obtenção de informações qualitativas sobre os analitos, auxiliando a identificação. Na análise qualitativa os espectros de massa dos analitos podem ser comparados simultaneamente com os espectros obtidos de padrões analisados, ou de bibliotecas armazenadas no software do equipamento. Na tabela 6 são apresentados os espectros de massa dos 16 HPAs, sendo observado que esses compostos possuem certa similaridade em seu perfil de fragmentação, gerando sempre os fragmentos do íon molecular (pico base) correspondente de cada um. Isso acontece porque a estrutura molecular dos HPAs é muito estável, devido aos sistemas de ressonâncias dos anéis benzênicos, permitindo um perfil de fragmentação onde há a predominância do íon molecular (CRISTALE; SILVA; MARCHI, 2008). Apesar de haver similaridade entre as estruturas de alguns compostos, é possível identificar diferenças entre os espectros, devido a outros fragmentos gerados.

Os íons de quantificação e identificação foram selecionados para cada HPA a partir dos espectros de massa referente a cada pico obtido nas análises por GC-MS (*SCAN*) (Tabela 6). De posse dessas informações, foi obtido o cromatograma do íon extraído (*EIC*) para cada um dos analitos estudados.

Tabela 6 - Características dos 16 HPAs estudados.

Nome	PM	Fórmula Molecular	Espectro de Massas
Naftaleno	128	C <sub>10</sub> H <sub>8</sub>	
Acenaftileno	150	C <sub>12</sub> H <sub>8</sub>	
Acenafteno	154	C <sub>12</sub> H <sub>10</sub>	

Fluoreno	166	$C_{13}H_{10}$	
Fenantreno	178	$C_{14}H_{10}$	
Antraceno	178	$C_{14}H_{10}$	
Fluoranteno	202	$C_{16}H_{10}$	
Pireno	202	$C_{16}H_{10}$	
Benzo[a]antraceno	228	$C_{18}H_{12}$	
Criseno	228	$C_{18}H_{12}$	
Benzo[b]fluoranteno	252	$C_{20}H_{12}$	

Benzo[k]fluoranteno	252	C <sub>20</sub> H <sub>12</sub>	
Benzo[a]pireno	252	C <sub>20</sub> H <sub>12</sub>	
Indeno[1,2,3-c,d]pireno	276	C <sub>22</sub> H <sub>12</sub>	
Dibenzo[a,h]antraceno	278	C <sub>22</sub> H <sub>12</sub>	
Benzo[g,h,i]perileno	276	C <sub>22</sub> H <sub>12</sub>	

A técnica de CG-EM operando no modo de impacto de elétrons (IE) é extensivamente empregada em laboratórios de análise de resíduos de poluentes orgânicos, permitindo a elucidação de diversos compostos como os HPAs. De maneira geral, diversos trabalhos têm sido reportados na literatura sobre a determinação de resíduos de HPAs em alimentos por CG-EM. Guatemala-morales *et al.* 2016, por exemplo, analisou 16 HPAs em café com diferentes temperaturas e tempos de torrefação utilizando CG-EM para detecção. Santos *et al.* 2019, utilizou o método SPME no preparo de amostra para análise de HPAs e seus derivados nitrados e oxigenados (totalizando 24 analitos) em amostras comerciais de café por GC-EM. Pietrogrande *et al.*, 2023 analisaram HPAs em particulados atmosféricos empregando CG-EM e SPME com fibra de poliácrlato, tendo obtido uma extração próxima a 80% para todos os HPAs.

### 3.4 Métodos de preparo de amostra para extração de HPAs

A extração de HPAs empregando métodos tradicionais, além de demandarem uma etapa extra de purificação, são técnicas morosas e fazem uso de grande quantidade de solvente. Dentre as etapas envolvidas, podemos destacar a saponificação da amostra com solução de hidróxido de potássio, seguida de partição líquido-líquido em solventes orgânicos e purificação em coluna utilizando como fase estacionária sílica gel, alumina ou florissil (CAMARGO & TOLEDO, 2002). Os solventes utilizados precisam ser de alta pureza, o que encarece a análise, além de acarretarem na formação de emulsões difíceis de serem quebradas, que podem afetar a recuperação para alguns analitos (ORECCHIO, CIOTTI & CULOTTA, 2009). Alguns autores consideram que a etapa de saponificação é importante na eliminação de interferentes (CHUNG *et al.*, 2011; VEIGA *et al.*, 2014; SINGH & AGARWAL, 2021). Entretanto, SCAL *et al.* (2020), mostraram ser possível a extração sem o emprego desta etapa, afirmando ainda que este processo poderia levar a perdas dos analitos de interesse.

A preocupação em aliar sustentabilidade e práticas ambientalmente amigáveis com métodos que possuam maior confiabilidade, têm favorecido o desenvolvimento de diferentes técnicas de extração e purificação de amostras. HAKME *et al.*, 2018 utilizaram cromatografia de permeação em gel para remoção de lipídios e compostos de alta massa moléculas

A cromatografia de permeação em gel (CPG) representa uma ferramenta útil no isolamento de componentes moleculares, incluindo HPAs, pesticidas e ftalatos, de componentes interferentes com alto peso molecular, que podem condensar no injetor ou na entrada da coluna cromatográfica (BLAGODATSKIKH, I.V. *et al.*, 2002; COTUGNO *et al.*, 2021). Entretanto, a técnica de extração em fase sólida é mais utilizada, isso porque o volume de solvente e tempo gasto são consideravelmente menores quando comparados à extração líquido-líquido, além de permitir que a análise seja feita de maneira automática (TOBISZEWSKI *et al.*, 2009). HOUSSOU *et al.* (2005) e VEYRAND *et al.* (2007) utilizaram cartuchos com de C18 para amostras de bebida de café, e observaram que essa fase é seletiva para os HPAs devido a sua lipofilicidade e capacidade de formar ligações  $\pi$ - $\pi$  com o anel aromático dos HPAs. HOUSSOU *et al.*, 2007), em trabalhos posteriores, empregou cartuchos com sílica para a purificação dos HPAs em extratos de amostras de café verde e torrado, utilizando sistema de extração líquida pressurizada para extração dos analitos.

A extração líquida pressurizada (ELP) utiliza solventes orgânicos convencionais sob elevadas temperaturas (100 a 180 °C) e pressão ( $6,9 \times 10^6$  a  $1,0 \times 10^7$  Pa) para realizar a extração de compostos orgânicos em amostras sólidas ou semissólidas. Desde 1996 tem sido utilizada como método padrão EPA para análise de contaminantes orgânicos (pesticidas, herbicidas, dentre outros) em matrizes ambientais (MITRA, 2003). O aumento da temperatura do solvente faz com que a extração ocorra com menores viscosidade e tensão superficial. Em alta temperatura a solubilidade do analito aumenta, resultado do enfraquecimento de interações como força de Van der Waals e pontes de hidrogênio, permitindo uma transferência de massa mais rápida. A alta pressão também permite que o solvente penetre mais profundamente na matriz. A junção desses fatores propicia uma extração mais rápida e com melhores recuperações (MITRA, 2003).

Na literatura, existem muitos trabalhos que demonstram a eficiência do uso da ELP para análises de HPAs (MERLO, T. C. *et al.*, 2021; GBEDDY, G. *et al.*, 2020; HARRIS, K. J. *et al.*, 2020). WANG (2007) fez um comparativo entre as técnicas de ELP, Soxhlet e extração por solvente assistida por microondas (MAE) para extração de HPAs em amostras de solos, observando que a ELP apresentou maior eficiência de extração, além das vantagens já descritas anteriormente.

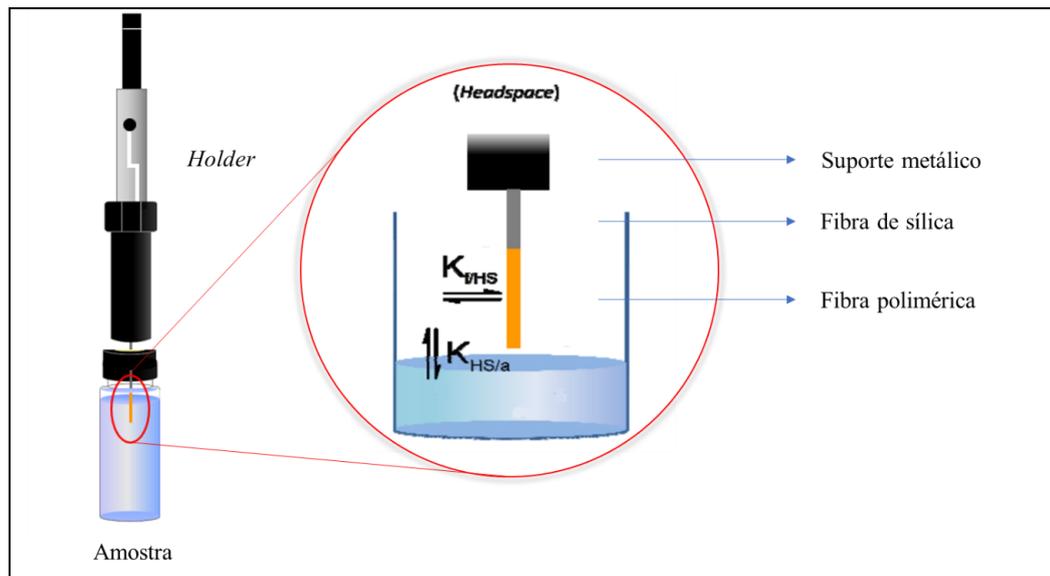
#### ***3.4.1 Microextração em Fase Sólida (SPME – Solid Phase Micro Extraction)***

A microextração em fase sólida (SPME, do inglês *solid-phase microextraction*) é um método de extração baseado no equilíbrio de fases e uma quantidade mínima de solvente, que combina a amostragem, o isolamento e a pré-concentração dos analitos, além da introdução da amostra no sistema cromatográfico em uma única etapa (JALILI; BARKHORDARI; NOROUZIAN, 2019). Essa técnica possui alguns recursos exclusivos, incluindo simplicidade, baixo custo, repetibilidade, sensibilidade, seletividade e um curto tempo de análise (JALILI; BARKHORDARI; GHASVAND, 2020). Foi desenvolvida em 1990 por Janusz Pawliszyn e colaboradores na Universidade de Waterloo em Ontário, no Canadá (ARTHUR; PAWLISZYN, 1990).

O modo de amostragem pode ser selecionado no formato de *headspace* ou no modo de imersão direta da fibra de SPME. O modo *headspace* oferece maior seletividade que

o modo de imersão direta, pois apenas os compostos voláteis e semi-voláteis são transferidos para o espaço livre e, portanto, compostos não voláteis não são extraídos. O HS-SPME, de fato, fornece extratos mais puros, maior seletividade e maior tempo de vida do adsorvente (uma vez que a matriz da amostra não possui contato direto com o revestimento). Na Figura 10, tem-se um esquema de como ocorre a extração por *headspace*, onde o analito se distribui entre a fase aquosa e gasosa, e entre a fase gasosa e a fibra.

Figura 10 – Esquema ilustrativo do processo de extração por SPME.



(Fonte: Elaborado pelo autor).

Essa técnica de microextração é baseada no particionamento do analito entre a fase de extração fixada em uma fibra coberta com um polímero não-volátil (partição) ou uma fibra de sílica fundida (adsorção) e a matriz. Os compostos são dessorvidos termicamente após alcançar o equilíbrio diretamente no sistema injetor do cromatógrafo a gás. A fibra responsável pela extração fica protegida no interior de uma agulha, adaptada em um dispositivo chamado *holder*, sendo exposta pela movimentação de um êmbolo.

Cada analito apresenta características físico-químicas particulares, se comportando de maneira específica em relação ao equilíbrio de partição ou adsorção existente entre a fibra e matriz da amostra, por essa razão é preciso buscar melhorias nas condições de extração cujo equilíbrio favoreça a concentração dos analitos no revestimento polimérico. Diante disso, primeiramente é feita a escolha apropriada da fase estacionária da fibra, que deve possuir afinidade pelo analito, ou pela maioria dos analitos a serem investigados, sendo essa a etapa

determinante no processo de SPME. Em seguida, deve-se otimizar as condições de extração, tais como salinidade do meio, pH, temperatura e tempo de extração (NASCIMENTO *et al.*, 2018).

A salinização do meio é feita com o emprego de cloreto de sódio (NaCl). A função do cloreto de cálcio é aumentar a força iônica do meio aquoso (fase líquida – bebida de café) e potencializar a transferência dos voláteis, do café preparado, para a fase vapor (*headspace*), promovendo o “efeito *salting out*”.

A afinidade dos analitos com os sorventes desempenham um papel fundamental na eficiência da extração nessa técnica. Por essa razão, a escolha da composição da fase estacionária da fibra é determinante no sucesso do procedimento de SPME, por ser essa a fase que irá interagir e promover a extração dos analitos. Silva *et al.* 2013, avaliaram dois tipos de revestimentos, PDMS e PDMS-DVB, no processo de extração de quatro pesticidas, atrazina, parationa metílica, clorpirifós e cipermetrina, e observaram que a fibra PDMS foi capaz de detectar os quatro pesticidas de maneira mais eficiente. A fibra PDMS/DVB apresentou boa extração apenas dos pesticidas mais polares (atrazina, parationa metílica, clorpirifós).

Estão disponíveis comercialmente fibras com revestimentos de polidimetilsiloxano (PDMS), poliacrilato (PA), polidimetilsiloxano-divinilbenzeno (PDMS-DVB), Carbowax/divinilbenzeno (CW/DVB), Carboxen/polidimetilsiloxano (CAR/PDMS), divinilbenzeno/carboxen/polidimetilsiloxano (DVB-CA-PDMS) e *Carbowax-templated resin*. As fibras mistas, por possuírem característica polares e apolares, simultaneamente, são muito aplicadas em análises onde se deseja aumentar o espectro de analitos a serem determinados (NASCIMENTO *et al.*, 2018).

O revestimento de polidimetilsiloxano (PDMS) é o material mais usado. Ambas as fases PDMS e PA extraem as amostras através da absorção (partição) dos analitos, que se dissolvem e se difundem para o material do revestimento. Os tipos restantes, carbowax-DVB (CW-DVB), *Carbowax-templated resin* (CW-TPR), PDMSCarboxen (PDMS-CAR) extraem os analitos através de mecanismos de adsorção. Nessa situação os analitos permanecem na superfície da fibra, como uma monocamada (MCNAIR; MILLER, 2009). O revestimento PDMS-Carboxen é um caso especial que compreende uma fase de carbono ativo micro particulado (adsorvente Carboxen 1006 com aproximadamente  $1000 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$  de área

superficial), sendo amplamente aplicado na determinação de gases e compostos voláteis. Na tabela 7 há um resumo das fibras disponíveis no comércio, com as principais características.

Tabela 7 - Resumo das fibras disponíveis comercialmente.

COMPOSIÇÃO DA FASE	POLARIDADE	TIPO DE INTERAÇÃO	ESPESSURA DO FILME ( $\mu\text{m}$ )	TEMPERATURA MÁXIMA DE OPERAÇÃO ( $^{\circ}\text{C}$ )	TÉCNICA
Polidimetilsiloxana (PDMS)	Apolar	Absorção	100	280	CG/HPLC
			30	280	
			7	340	
Polidimetilsiloxana/Divinilbenzeno (PDMS/DVB)	Polar	Adsorção	60	270	HPLC
			65		CG
Carboxen/Polidimetilsiloxana (CX/PDMS)	Polar	Adsorção	75	320	CG
			85		
Carbowax/Divinilbenzeno (CW/DVB)	Polar	Adsorção	65	265	CG
			70		
Divinilbenzeno/Carboxen/Polidimetilsiloxana (DVB/CX/PDMS)	Polar/apolar	Adsorção	50	280	CG
Poliacrilato (PA)	polar	Absorção	85	320	CG/HPLC

Fonte: NASCIMENTO *et al.*, 2018.

O desenvolvimento da técnica HS-SPME forneceu uma alternativa poderosa para a pré-tratamento e amostragem de compostos voláteis e várias amostras biológicas. No entanto, também possui algumas desvantagens, como limitações na capacidade de sorção, normalmente com base no equilíbrio (entre as fibras revestimento e a amostra). Uma desvantagem significativa da técnica SPME é que as fibras são bastante frágeis e de alto custo (JALILI; BARKHORDARI; NOROUZIAN, 2019). No entanto, como a SPME não utiliza solventes, há uma grande redução na geração de descartes e exposição ocupacional. É uma técnica simples, de fácil manuseio em relação a outras técnicas, e possui a vantagem da utilização de pequena quantidade de amostra, podendo ser aplicada a diversas áreas, tais como ambiental, farmacêutica, alimentícia, aromas, forense e toxicologia (JALILI; BARKHORDARI; GHASVAND, 2020).

NAING *et al.*, 2020 combinaram microextração líquido-líquido dispersivo assistido por vórtice (VA-DLLME) e extração em fase micro-sólida ( $\mu$ -SPE) para determinação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs) em material particulado. CLARKE *et al.*, 2019 desenvolveram um método empregando HS-SPME/CG-EM para a quantificação de voláteis associados à oxidação lipídica em leite em pó integral usando metodologia de superfície de resposta.

### 3.5 Análises estatísticas

A análise estatística é uma ferramenta empregada para coletar informações relevantes de um conjunto de dados, ela está dividida em dois grupos, um que trata as variáveis de maneira isolada (análise univariada), e outro que observa as variáveis de forma conjunta (análise multivariada). Os métodos multivariados são escolhidos de acordo com os objetivos da pesquisa, com finalidades bem diversas entre si (ALVARENGA, 2017). Dentre esses métodos encontra-se a análise por componentes principais (PCA), que é um método exploratório de dados (CANUTO *et al.*, 2018). FARAG *et al.*, 2015 e BRESSANELLO, *et al.*, 2017 utilizaram a quimiometria para comparar o perfil volátil das amostras analisadas.

#### 3.5.1 Análise de Componentes Principais

A análise de componentes principais (PCA, do inglês, *principal component analysis*) é uma técnica estatística da análise multivariada que possibilita investigações com um grande número de variáveis e observações. Por meio dela é possível calcular variáveis latentes (componentes principais) e determinar quais das variáveis originais têm maior influência na formação de cada componente. Além disso, esta técnica permite o agrupamento de indivíduos similares em gráficos de dispersão no espaço bi ou tridimensional, de fácil interpretação geométrica. Esta técnica é classificada como exploratórios ou não supervisionados, tendo em vista que nenhuma informação com relação à identidade das amostras é levada em consideração (ALVARENGA, 2017).

Diante disso, a PCA permite a visualização gráfica de todo o conjunto de dados, mesmo quando o número de amostras e variáveis é elevado. O agrupamento das amostras define a estrutura dos dados por meio dos scores (coordenadas) e loadings (coeficiente de

combinação linear que fornecem o peso, ou seja, o quanto cada variável contribui, representado pela correlação entre as variáveis).

A PCA é um método estatístico que encontra autovalores e autovetores da matriz de covariância dos dados, podendo, assim, reduzir a dimensão deles e analisar a variabilidade presente, separando informações importantes de desprezíveis. Essa redução é obtida por meio do estabelecimento de novas variáveis ortogonais entre si, denominadas componentes principais (PCs) e organizadas em ordem decrescente de importância, as PCs são combinações lineares das variáveis originais. Os gráficos obtidos representam as amostras em um sistema cartesiano onde os eixos são as PCs (CORREIA; FERREIRA, 2007).

Essa técnica tem ainda o objetivo de reduzir o número de variáveis do problema e analisar quais delas ou quais conjuntos de variáveis explicam a maior parte da variabilidade total dos dados, revelando que tipo de relacionamento existe entre eles. Ou seja, constrói-se um novo sistema de eixos (denominados de componentes principais, variáveis latentes ou ainda autovetores) para representar as amostras, no qual a natureza multivariada dos dados pode ser visualizada em poucas dimensões (ALVARENGA, 2017).

Nesse tipo de análise, as variáveis são representadas por vetores e as amostras por pontos. Quanto mais próximo o ângulo entre os vetores, maior a correlação entre as variáveis. Essa análise multivariada é utilizada quando o interesse é verificar como as amostras se relacionam, ou seja, o quanto elas são semelhantes segundo as variáveis utilizadas no trabalho. Assim, este novo conjunto de eixos de coordenadas no qual se projetaram as amostras é muito mais informativo e, por terem sido ordenados pela sua importância, é possível visualizar estas mesmas amostras num gráfico de baixa dimensionalidade (ALVARENGA, 2017).

### **3.6 Validação de métodos analíticos**

A validação é uma etapa fundamental no desenvolvimento da metodologia analítica, pois é ela quem vai definir se o método produz resultados confiáveis podendo ou não ser viável para aplicação pretendida. Agências regulamentadoras, como Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e o International Conference on Harmonization (ICH) fornecem guias de validação que estabelecem parâmetros e critérios de

aceitação aplicáveis à validação e visam garantir a qualidade metrológica dos resultados analíticos (ICH, 2014; MAPA, 2011).

Para cada tipo de aplicação de um método haverá um conjunto de parâmetros que necessitam ser calculados durante o processo de validação, por exemplo, a abordagem relacionada aos ensaios e parâmetros de desempenho que devem ser avaliados para um método analítico de determinação de traços do analito na amostra é diferente da que se faz para um método que tem como escopo de aplicação a determinação de componentes principais (EURACHEM, 2014; DANZER; CURRIER, 1998).

Nos estudos de validação de metodologias analíticas quantitativas multirresíduo devem ser determinados os seguintes parâmetros:

- Seletividade
- Efeito de matriz
- Linearidade (Faixa de trabalho)
- Limite de detecção (LD)
- Limite de quantificação (LQ)
- Precisão (repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade)
- Exatidão (recuperação)
- Robustez (\*)

(\*) A robustez é um procedimento opcional, normalmente realizado previamente à validação do método, na etapa de otimização (INMETRO, 2020; EURACHEM, 2014).

### ***3.6.1 Seletividade***

É a capacidade do método de poder quantificar o analito na presença de outros analitos ou de uma mistura complexa. Diz-se que o método é seletivo quando o mesmo produz respostas para vários analitos, mas que pode distinguir a resposta de um analito em particular numa mistura contendo outros componentes que apresentam propriedades químicas semelhantes, como isômeros, metabólitos, produtos de degradação (INMETRO, 2020).

As espécies oriundas da matriz podem causar interferências no desempenho da medição, podendo aumentar ou reduzir o sinal relativo da espécie de interesse, comprometendo o resultado. Além disso, a magnitude desse efeito está diretamente relacionada com a concentração do analito na amostra. Dessa forma, no estudo de seletividade é necessário verificar também a existência de efeito de matriz (ANVISA, 2017; MAPA, 2011).

#### *3.6.1.1 Efeito matriz*

O efeito de matriz, também conhecido como efeito de competição de matriz, em cromatografia ocorre com a superestimação (aumento) ou subestimação (diminuição) da resposta cromatográfica induzida pela matriz. Na prática é um estudo de seletividade que tem por objetivo averiguar possíveis interferências causadas pelas substâncias que compõem a matriz amostral (MAPA, 2011). Este efeito se torna mais pronunciado em análises de amostras complexas, como é o caso de frutas, vegetais, vinhos, dentre outras matrizes (PINHO *et. al.*, 2009). Alguns modos como esse estudo pode ser conduzido estão descritos na tabela 8.

Tabela 8 - Estudo de efeito de matriz.

<b>Caso</b>	<b>Procedimento</b>	<b>Hipóteses</b>	<b>Teste estatístico</b>	<b>Conclusões</b>
<b>Matriz sem o analito disponível ou um grupo satisfatório de amostras de referência disponível</b>	Preparar dois grupos de amostras de teste, um com a matriz e o outro sem. Ambos os grupos com a concentração do analito idêntica em cada nível de concentração de interesse. Deve-se testar toda a faixa de estudo (baixa, média e alta), com no mínimo 3 replicatas por nível de concentração	1) a matriz não afeta a precisão do analito nos níveis de concentrações estudados  2) a matriz não afeta o sinal do analito nos níveis de concentrações estudados	Teste F (Snedecor) de homogeneidade de variâncias, por nível de concentração e teste t (Student) de comparação de médias por nível de concentração	Se o teste F (Snedecor) não for significativo, a matriz não causa um efeito sobre a precisão, por nível de concentração e se o teste t (Student) não for significativo, a matriz não causa um efeito sobre o resultado, por nível de concentração.
<b>Matriz sem o analito não disponível</b>	Preparar duas curvas analíticas, que contenham a mesma adição de analito para cada nível de concentração. Uma curva é preparada com adição de analito na matriz da amostra (que já contém um nível do analito) e a outra curva analítica não inclui a matriz da amostra. Devem ser preparados, no mínimo, 5 níveis de concentração com 3 replicatas por nível	A matriz não interfere na inclinação da curva de adição padrão	Teste t para inclinações das curvas. Este também pode ser aplicado no caso acima.	Comparam-se as inclinações (coeficientes angulares) das curvas analíticas. Se as inclinações dessas duas curvas de regressão linear não diferirem significativamente, não há efeito de matriz, o que pode ser observado graficamente pelo paralelismo aproximado das duas curvas. Caso contrário, a curva analítica deve ser preparada na matriz. Os dados obtidos nesse procedimento podem ser usados para estudo de linearidade

Para que haja a quantificação exata dos HPAs em níveis traços é importante desenvolver um método que possa minimizar esse efeito de matriz, já que nenhum método é capaz de eliminá-lo totalmente. (PINHO *et al.*, 2009; RIBANI *et al.*, 2004).

Os compostos potencialmente interferentes da matriz podem reduzir ou ampliar o sinal analítico relativo à espécie de interesse, de modo que a magnitude deste efeito está diretamente ligado nível de concentração do analito na amostra (INMETRO, 2020). Para que haja uma aplicação confiável do método analítico este precisa ser reavaliada rotineiramente durante a validação e posterior uso do método, sendo a seletividade o primeiro parâmetro determinado no desenvolvimento e validação do método. Durante o estudo de validação podem ocorrer processos de degradação de compostos presentes na matriz da amostra (reações químicas adversas), havendo a produção de outras espécies que podem vir a interferir na determinação do analito (SANTOS *et al.* 2019; SINGH *et al.* 2020).

O efeito matriz é consequência da interferência de coextrativos da amostra que prejudicam a seletividade do método, além de influenciar também nos resultados de precisão e exatidão (PINHO *et al.*, 2009). A diversidade de compostos que constitui a matriz amostral pode dar origem a problemas críticos na quantificação das espécies que se deseja analisar. Dentro de contexto, o estudo do efeito matriz objetiva investigar, de maneira mais profunda, os possíveis interferentes que possam estar presentes na amostra.

### **3.6.2 Linearidade**

O parâmetro de desempenho linearidade refere-se à capacidade que o método tem de fornecer resultados de sinal analítico ou resposta analítica (tais como área ou intensidade em cromatografia) que sejam diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, ou seja, é a capacidade de o procedimento analítico produzir curvas de calibração que se ajustem adequadamente pela equação de uma reta (MAPA, 2011). Na avaliação de linearidade do procedimento analítico, se estabelece um intervalo de concentrações que é chamado de faixa de trabalho. De modo que, a faixa linear de trabalho é por inferência a faixa de concentração do analito em que os resultados do método são proporcionais à concentração do analito (EURACHEM, 2014).

A linearidade é obtida por padronização interna ou externa, obtendo-se uma expressão matemática para estimativa da concentração a ser determinada em uma amostra real (INMETRO, 2020). A equação 1 expõe uma representação genérica de uma equação de curva de calibração linear estimada pelo método dos mínimos quadrados (MMQ).

$$y = ax + b \quad (1)$$

onde:

$y$  = sinal analítica (intensidade ou área de pico cromatográfico);

$x$  = concentração do analito;

$a$  = inclinação (coeficiente angular);

$b$  = intercepto (coeficiente linear).

O coeficiente de correlação ( $r$ ) é uma medida da relação entre duas variáveis aleatórias, não sendo definido como um parâmetro conclusivo para medida da linearidade. Todavia, o parâmetro  $r$  é usado posteriormente no teste estatístico  $t_r$  para qualidade do ajuste.

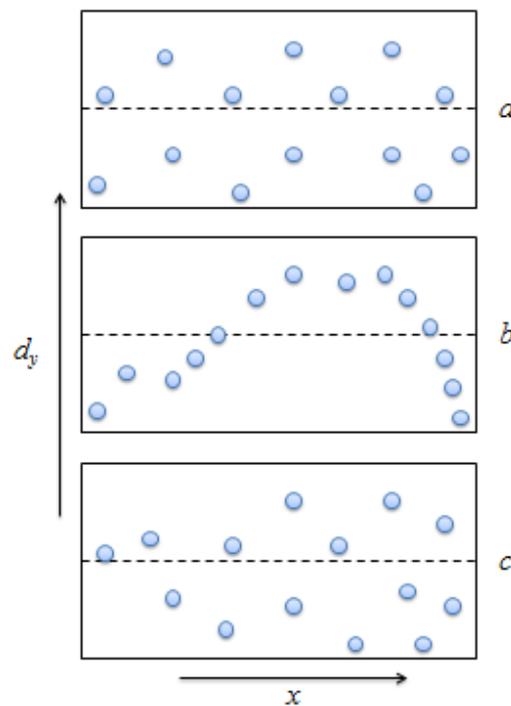
### ***Teste de homocedasticidade***

O estudo de homocedasticidade visa avaliar o perfil de distribuição das variâncias em cada nível de calibração. A homocedasticidade é assegurada quando as variâncias dos resíduos ( $d_y$ ) são constantes em relação aos valores de  $x$  (figura 11a). A representação gráfica dos resíduos pode ser obtida pela distribuição dos resíduos ao longo dos valores de  $x$ , ou seja, pode ser representada com  $d_y$  em função de  $x$  (figura 11) (MARTINS *et al.*, 2018).

Na figura 11b pode-se notar que os resíduos apresentam desvios sistemáticos, indicando falta de ajuste do modelo linear (curva de calibração não retilínea). Nesses casos, um polinômio de ordem superior a um pode ser utilizado para ajuste da calibração. Nesses gráficos,  $d_y$  frequentemente é uma função de  $x$  com aparência afunilada (figura 11c). De modo que, para testar a homoscedasticidade nesses casos, um simples teste F de Hartley pode ser feito (MAPA, 2011). O teste F faz a comparação entre as variâncias (quadrado do desvio-padrão) das respostas instrumentais ou dos resíduos nos níveis de calibração (DANZER; CURRIER, 1998; MAPA, 2011).

Em caso de homogeneidade das variâncias, é possível realizar a estimativa da curva de calibração pelo método dos Mínimos Quadrados Ordinários (MMQO), já em casos de variâncias não homogêneas (modelo heterocedástico), o modelo deve ser obtido pelo método dos Mínimos Quadrados Ponderados (MMQP), que representa o método de regressão adequado para esta condição. Por fim, deve-se avaliar estatisticamente o ajuste do modelo (teste  $t_r$  de qualidade do ajuste), para concluir, com confiabilidade, que o modelo linear está ajustado (MAPA, 2011; MILLER; MILLER, 2010).

Figura 11 - Gráficos típicos de desvios residuais



Fonte : Elaborado pela autora.

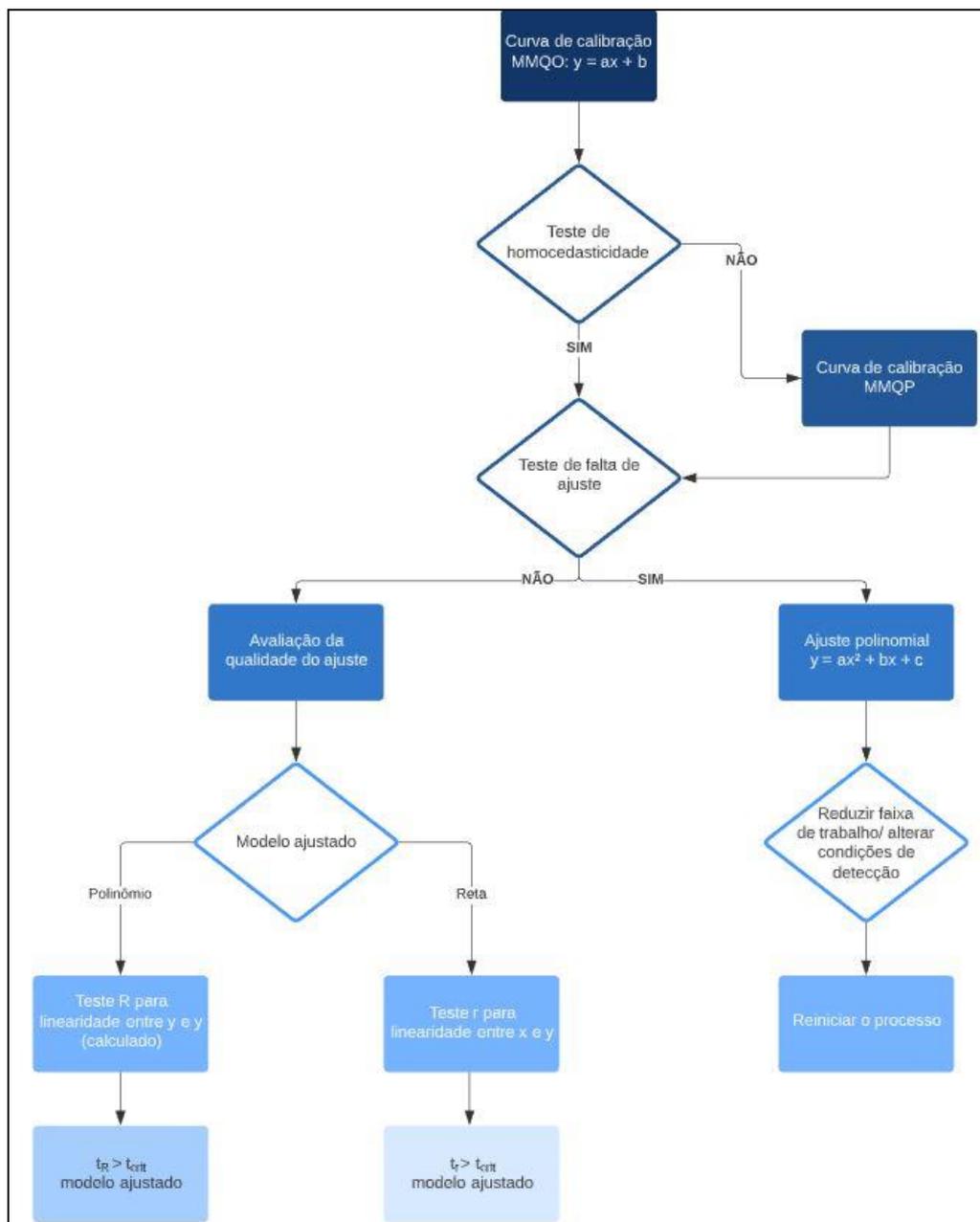
Em que:

- (a) Resíduos aleatoriamente dispersos em torno da linha zero, indicando um ajuste satisfatório (modelo linear adequado).
- (b) Resíduos apresentando desvios sistemáticos, desvios em forma de U ou de U invertido, indicando falta de ajuste ou de linearidade (modelo inadequado) na faixa de calibração. Nesses casos, a curva de calibração pode ser ajustada por um polinômio de ordem superior a um, ou alternativamente reduz-se a faixa de concentração da calibração.

(c) Resíduos crescentes (ou decrescentes) com a concentração, em formato afunilado ou de cone, indicando heterocedasticidade da resposta instrumental e exigindo o ajuste pelo MMQP.

O fluxograma da figura 12 resume a metodologia para obtenção dos estudos de linearidade.

Figura 12 - Ajuste da curva de calibração para obtenção do modelo linear mais adequado para estimativas de quantificação.



Fonte: Adaptado de MARTINS et al., 2018.

### ***3.6.3 Limite de Detecção (LD)***

O Limite de detecção (LD) é a menor concentração que o método é capaz de detectar com confiabilidade, porém não pode ser quantificada com a precisão e exatidão adequados. O limite de detecção para um procedimento analítico pode variar em função do tipo da amostra. É fundamental assegurar-se de que todas as etapas de processamento do método analítico sejam incluídas na determinação desse limite de detecção, também é importante para ensaios qualitativos (EURACHEM, 2014; INMETRO, 2020).

O limite de detecção é um parâmetro diretamente relacionado com a sensibilidade do método analítico, de modo a ser preferível que possua os menores valores possíveis, obtendo-se assim um método mais sensível, principalmente para as análises de traços e contaminantes. Existe uma diferença entre o limite de detecção do método propriamente dito e o “limite de detecção instrumental”. O limite de detecção instrumental é a menor concentração do analito que o instrumento é capaz de detectar em uma condição ideal, como numa solução padrão do analito em solvente puro, não reflete o LD do procedimento analítico, pois se trata de uma estimativa executada em uma condição livre das possíveis interferências da amostra e limitações do método que podem afetar a estimativa de LD real (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002).

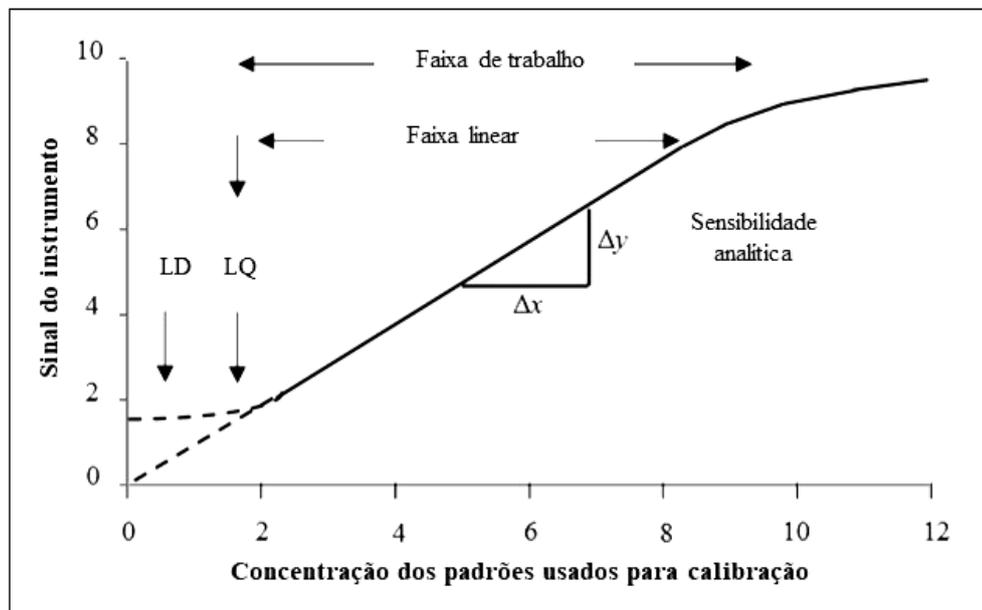
### ***3.6.4 Limite de Quantificação (LQ)***

O limite de quantificação (LQ) de um método analítico é a menor concentração ou teor do analito na amostra que o método é capaz de ser quantitativamente mensurado com precisão e exatidão aceitáveis. Na prática, corresponde normalmente ao padrão de calibração de menor concentração (excluindo o branco) (EURACHEM, 2014; ICH, 2014). O limite de quantificação é um parâmetro indispensável em métodos desenvolvidos para determinação de analitos os quais se espera que estejam em níveis muito baixos de concentração, como análise de traços, impurezas e/ou produtos de degradação.

O critério de aceitação para LQ deve ser direcionado a partir do propósito de aplicação do método analítico. Por exemplo, se o limite máximo permitido para um contaminante em uma amostra ambiental, estabelecido por algum órgão competente é de 100  $\mu\text{g L}^{-1}$ , o limite de quantificação de um método analítico desenvolvido para monitorar este

contaminante deve ser  $LQ \leq 100 \mu\text{g L}^{-1}$ . O limite de quantificação é um valor de concentração referência para a tomada de decisão (EURACHEM, 2014). Na figura 13, estão resumidos os parâmetros de desempenho descritos neste item.

Figura 13 - Exemplo de uma curva analítica com a identificação dos parâmetros de desempenho “Faixa de trabalho”, “faixa linear”, “Sensibilidade analítica”, “LD” e “LQ”.



Fonte: Adaptado de EURACHEM, 2014.

### 3.6.5 Precisão

Precisão é um termo utilizado para designar a dispersão dos resultados entre ensaios independentes, de uma mesma amostra que é injetada repetidas vezes, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas. As três maneiras de expressá-la são por meio da repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade. As duas primeiras são expressas pelo desvio-padrão ( $s$ ) e desvio-padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV) (INMETRO, 2020). Já esta última somente pode ser estimada mediante a participação de um ensaio colaborativo entre diferentes laboratórios, geralmente não disponível (MAPA, 2011).

### 3.6.5.1 Repetitividade

É a precisão intracorrída, ou melhor, o grau de concordância entre os resultados obtidos através de medições sucessivas, sob as mesmas condições de análise, mostradas a seguir:

- Mesmo procedimento;
- Mesmo analista;
- Mesmo instrumento nas mesmas condições;
- Mesmo local, e
- Repetições em curto espaço de tempo.

De acordo com o MAPA a repetitividade do método deve ser verificada através da análise de um conjunto de amostras fortificadas, no mínimo em três níveis de concentração, de modo que os limites permitidos contemplem o valor de LMR para a substância de interesse. Para cada nível, a análise deve ser feita em seis réplicas independentes, procede-se com o cálculo das concentrações médias, os desvios-padrão de repetitividade (s) e os coeficientes de variação de repetitividade (%) das amostras em cada nível de concentração (MAPA, 2011).

### 3.6.5.2 Precisão Intermediária

Também conhecida como reprodutibilidade intralaboratorial ou interna, é a avaliação da precisão de uma mesma amostra, mesmo método e no mesmo laboratório, mas variando as condições de análise especificadas a seguir:

- Dias de análise;
- Diferentes analistas;
- Diferentes equipamentos e
- Condições ambientais.

O procedimento para determinação da precisão intermediária é semelhante ao descrito para estudos de precisão intracorrída, repetindo-se os mesmos passos pelo menos mais duas vezes em dias diferentes e variando alguns dos fatores citados acima (MAPA, 2011).

#### *3.6.5.3 Reprodutibilidade*

É o grau de concordância das medições de uma mesma amostra, realizadas sob condições variadas, tais como mudança de operador, local, equipamentos, etc. A reprodutibilidade refere-se aos estudos de parceria efetuados entre laboratórios, sendo importante para avaliar o desempenho do método em relação aos dados de validação (INMETRO, 2020; RINANI *et. al.*, 2004).

A IUPAC recomenda realizar as análises em, no mínimo, oito laboratórios. Além disso, os laboratórios envolvidos devem possuir competência e habilidades similares àqueles que usarão o método em rotina (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002).

#### *3.6.6 Exatidão*

A exatidão está relacionada ao grau de concordância entre a média de um número suficientemente grande de resultados de um ensaio e o valor de referência estabelecido como verdadeiro. Dessa forma, quanto mais satisfatórios forem os resultados obtidos para esse parâmetro menor será a magnitude do erro sistemático associado às análises (MAPA, 2011).

A avaliação dos resultados para exatidão é sempre considerada dentro de certos limites, para o caso da determinação de níveis de traços, esses limites são mais amplos. Já para determinação de níveis de concentração elevados, os limites são mais estreitos. A determinação da exatidão pode ser realizada por diferentes meios, sendo três os métodos mais utilizados: materiais de referência certificado (MRC); comparação de métodos; ensaios de recuperação (MAPA, 2011; RIBANI, 2004).

Os materiais de referência certificados (MRC) são padrões acompanhados de um certificado que fornecem informações bastante precisas sobre concentração de uma dada substância ou outras grandezas, além de uma incerteza associada. Esses materiais são fornecidos por instituições reconhecidas internacionalmente, como NIST (“National Institute

Standards and Technology” – USA), USP, FAPAS (“Food Analysis Performance Assessment Scheme” – UK), etc (THOMPSON *et al.*, 2002; MAPA, 2011; RIBANI *et al.*, 2004).

A comparação de métodos consiste em comparar resultados obtidos entre o método que está sendo desenvolvido e um método de referência, essa análise é feita através da avaliação do grau de proximidade entre os resultados dos dois métodos. Para esse procedimento admite-se uma incerteza conhecido do método de referência. As análises são feitas em replicata, sendo estabelecida uma faixa de concentração em que se pretende validar o método (RIBANI *et al.*, 2004).

Outra forma de avaliar a exatidão é através de ensaios de recuperação. A recuperação pode ser entendida como a correção de erros sistemáticos oriundos de efeitos de extração e de perdas advindas de toda a marcha analítica que interferem na quantificação do resultado analítico, ou seja, representa a quantidade que pode ser extraída e passível de ser quantificada (MAPA, 2011; RIBANI *et al.*, 2004).

A recuperação pode ser estimada pela análise de amostras fortificadas com quantidades conhecidas do analito. As amostras podem ser fortificadas em três níveis de concentração distintos, um valor próximo ao Limite de Detecção (LD), um próximo ao Limite Máximo de Resíduo (LMR) e um valor intermediário a faixa linear do método (INMETRO, 2017).

Estudos envolvendo validação de método para determinação de HPAs, são reportados na literatura, para diferentes finalidades. ZENG *et al.*, 2022, validou um método para determinação de HPAs e seus metabólitos em unhas humanas. SINGH E AGARWAL, 2021, realizaram um estudo comparativo de métodos de extração convencionais e mais verdes, empregando validação de métodos para análise de HPAs em frango cozido e café torrado. Swit *et al.*, 2022, validaram um método analítico para determinação de HPAs em amostras de ar para posterior determinação, usando HPLC-DAD-FLD.

## 4. PARTE EXPERIMENTAL

A execução das atividades experimentais da pesquisa foi realizada no Laboratório Multiusuário de Química de Produtos Naturais (LMQPN) na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Agroindústria Tropical), localizado no campus do pici, na Universidade Federal do Ceará (UFC).

### 4.1 Seleção das amostras e armazenamento

Foram selecionadas 10 amostras de cafés de diferentes fabricantes e regiões do Brasil, com base na classificação ABIC, as amostras foram adquiridas em supermercado local da cidade de Fortaleza-CE. Os cafés torrado e moído (100% arábica ou mistura) foram compradas em supermercados locais. Dentre as amostras analisadas temos 5 cafés tradicionais, 3 cafés superiores e 2 cafés gourmet. Consideramos, portanto, para fins de classificação neste estudo, 5 amostras de café tradicionais como o grupo de qualidade comum e as 3 amostras de cafés superiores juntamente com as 2 amostras de cafés gourmet como o grupo de alta qualidade. Para não revelar os fabricantes as amostras foram designadas através de siglas. Amostras de alta qualidade: **AC** (Minas Gerais, Brasil), **CL** (Espírito Santo, Brasil), **O** (São Paulo, Brasil), **H** (Colômbia) e **ME** (Colômbia); amostras de qualidade comum: **TC** (Minas Gerais, Brasil), **SC** (Minas Gerais, Brasil), **ML** (Minas Gerais, Brasil), **PIL** (São Paulo, Brasil) e **KM** (São Paulo, Brasil), todas de produtores brasileiros.

Visando avaliar a presença e os níveis dos HPAs, assim como a influência do modo de preparo sobre a transferência destes compostos para a bebida, todas as amostras foram preparadas através de dois procedimentos diferentes: a) cozimento (café fervido) e b) infusão (café coado). Foi realizado o preparo com 10,0 g de café moído, 100,0 mL de água ultrapura a 95 °C e papel de filtro. O método de preparação da bebida por infusão foi o seguinte: primeiro o café moído foi adicionado ao filtro, em seguida, a água foi adicionada sobre o café, finalmente a amostra de café foi inserida no frasco para análise. Na preparação da bebida por cozimento o café foi colocado junto com a água em fervura, que foi mantida por 2 minutos, logo após, foi filtrado e transferido para o *vial* de 20 mL. Feito isso, as bebidas foram analisadas através de método validado baseado em microextração em fase sólida e

cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (SPME-GC-MS) para a determinação de 16 HPAs prioritários.

#### 4.2 Equipamentos e condições

Para a análise cromatográfica foi empregado cromatógrafo a gás (Agilent Technologies, modelo 7890B, EUA) acoplado a espectrômetro de massa com quadrupolo simples (Agilent Technologies, modelo 5977A, EUA). A separação dos HPAs foi realizada usando uma coluna capilar HP5-MS (5% fenil-95% dimetilsiloxane com dimensões 30 m × 0.25 mm d.i. × 0.25 µm de espessura de filme). O fluxo de gás de arraste hélio foi de 1.0 mL min<sup>-1</sup>, modo de injeção *splitless*, temperatura do injetor 240°C, com temperatura inicial da corrida a 100°C por 1 min, seguida de uma rampa de 10 °C.min<sup>-1</sup> até 200 °C e em seguida a 7 °C.min<sup>-1</sup> até 250 °C, mantendo por 5.86 min. Finalmente a temperatura foi elevada a 20°C.min<sup>-1</sup> até 300°C, mantendo por 4.5 min. O detector MS operou no modo ionização de elétrons (EI) a 70 eV e temperatura da interface foi de 300°C. Os compostos foram identificados por avaliação de similaridade com a biblioteca de espectros de massa NIST 2.0, 2012 (Nacional Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, Md, EUA), com todas as amostras analisadas em triplicata.

Para os procedimentos de preparo das amostras via método SPME, foram utilizados os seguintes equipamentos e utensílios: (1) tubos de vidro (*vial*) capacidade de 20 mL, (2) pipetas volumétricas de 10 mL, (3) micropipetas (10 – 100 µL) e (100 – 1000 µL), (4) balança analítica Bioprecisa modelo FA-2104N com precisão ± 0,0001 g (± 0,1mg). Foi utilizado sistema *holder* com diferentes fibras com revestimentos de dimetilpolissiloxano (PDMS, 100 µm), (DVB-CAR-PDMS, 50 µm) e (PDMS-DVB, 65 µm), descrito em maior detalhe na subseção 4.4.

Para as análises cromatográficas foi empregado cromatógrafo a gás da Agilent Technologies GC System modelo 7890 B e detector espectrometria de massas também da Agilent Technologies MS SQ System modelo 5977A (figura 14), microseringa Hamilton de 10 µL para CG, *vials* para armazenamento das amostras, balões volumétricos de 10 mL e 5 mL para preparo das soluções padrão estoque e de calibração. A análise de dados foi conduzida com software GCMS Qualitative Analysis B.06.00 com biblioteca de espectros NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library NIST 08.L.

Figura 14 - CG-EM empregado no estudo



Fonte: Autor (2018)

### 4.3 Reagentes e padrões analíticos

Um total de 16 padrões de HPAs ( $1000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA): naftaleno; acenaftileno; acenafteno; fluoreno; fenantreno; antraceno; fluoranteno, pireno, benzo[a]antraceno, criseno, benzo[b]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno, benzo[a]pireno, indeno[1,2,3-cd]pireno (I123cdP), dibenzo[a,h]antraceno, benzo[ghi]perileno (BghiP). Os compostos deuterados acenafteno-d10, criseno-d12, fenantreno-d10, naftaleno-d8 e perileno-d12 ( $1000 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) foram utilizados como padrões internos de HPAs. O solvente utilizado, acetonitrila (J.T. Baker), foi de grau HPLC. Água pura ( $18 \text{M}\Omega$ ) foi obtida pelo sistema Milli-Q (Millipore; Bedford, MA, EUA). Cloreto de sódio (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, EUA) de alta pureza analítica.

### 4.4 Preparo das amostras via SPME

Nesta etapa foram conduzidos experimentos para avaliar as melhores condições de extração dos compostos via SPME. Para tanto, foram selecionadas três diferentes fibras que foram analisadas em três diferentes temperaturas via CG-EM para investigação dos principais compostos presentes.

A fim de otimizar a extração através da escolha da melhor fibra, os procedimentos foram realizados em triplicata, os *vials* foram fortificados com concentrações de  $1\mu\text{g/ml}$  dos HPAs e  $0,1\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  dos padrões deuterados. Em seguida, cada uma das fibras de SPME foram expostas aos ensaios, durante 30 min, sob diferentes temperaturas ( $60\text{ }^\circ\text{C}$ ,  $90\text{ }^\circ\text{C}$  e  $120\text{ }^\circ\text{C}$ ). Os compostos absorvidos pelas fibras foram identificados e quantificados por GC- EM.

As extrações foram realizadas por *headspace*, em vials de 20 mL, com septo de silicone/PTFE, usando fibra com revestimentos de dimetilpolissiloxano (PDMS), DVB-CAR-PDMS e PDMS-DVB acoplado a um *holder*, todos da Supelco. O equipamento CG-EM da Agilent dispõe de uma câmara de agitação magnética com aquecimento que possibilita a extração por SPME, esta foi empregada para efetuar o preparo da amostra (Figura 15).

Figura 15 - Esquema do sistema utilizado nas determinações por SPME.



Fonte: <http://leapwiki.com/mediawiki/index.php/SPME> (2018)

Uma quantidade de 6 mL das amostras e 3 g de NaCl foram colocadas em frascos de vidro de 20 mL lacrados com tampas de rosca contendo septos de silicone/PTFE (Supelco, Bellefonte, PA, EUA). Todas as amostras foram adicionadas com  $0,1\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de solução padrão deuterada. Foi empregado um sistema *holder* de SPME automático (Supelco, Bellefonte, PA, USA) com fibra PDMS com  $100\mu\text{m}$  de espessura de filme e 1 cm de comprimento, usada na extração dos analitos no *headspace* da amostra. Antes das análises, as fibras foram condicionadas de acordo com a temperatura recomendada pelo fabricante. O frasco contendo a amostra foi pré-incubado a  $90\text{ }^\circ\text{C}$  por 15 min, após o qual a fibra de SPME

foi exposta dentro do frasco de cada amostra (*headspace*), na mesma temperatura de incubação, por 30 minutos, para extração dos HPAs. Após a extração dos analitos, a fibra foi retirada do frasco e imediatamente inserida no injetor do cromatógrafo por 3 min para dessorção térmica a 300 °C. Todas as avaliações foram realizadas em triplicata.

Para a análise das amostras, a extração foi conduzida com alíquotas de 6 mL da bebida de café, as quais foram adicionadas em *vials* de 20 mL com temperatura 90°C por 15 min e agitação constante de 500 rpm. Uma alíquota de 6 mL de água ultrapura (Mili-Q) e 3 g de NaCl foram utilizadas como branco da amostra. O tempo de exposição da fibra foi de 30 min a 90°C, sendo seguida injeção da fibra no interior no cromatógrafo para dessorção dos compostos extraídos a 240°C por 3 min.

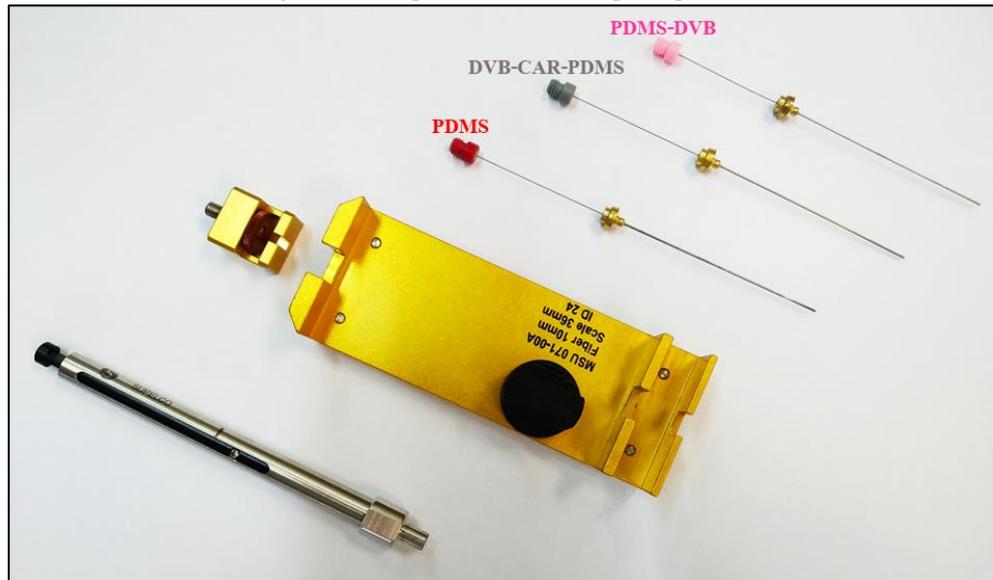
O estudo de desenvolvimento do método foi conduzido para os 16 HPAs em matriz de café, entretanto devido a limitações do método inicial apenas os oito primeiros analitos foram detectados, com isso surgiu a necessidade de otimizar o método a fim de ampliar o conjunto de compostos. Dessa forma, a etapa de extração sofreu certas modificações, como mostrado a seguir.

#### ***4.4.1 Seleção da fibra para extração dos HPAs***

O revestimento de fibra para SPME é um dos fatores mais importantes para avaliar a eficiência de extração, isso porque existe uma forte interação com a substância química extraída, devido as suas características de polaridade e volatilidade (MENDES; GONC; CÂMARA, 2012; PAULA *et al.*, 2012).

Três recobrimentos (PDMS, PDMS/DVB e DVB/CAR/PDMS) foram testados quanto à sua eficiência de extração dos HPAs (Figura 16). Estes testes foram realizados utilizando a solução padrão contendo uma mistura dos 16 HPAs prioritários. O desempenho de cada fibra foi determinado com base na intensidade da área de pico e nas quantidade de compostos identificados.

Figura 16 – Fibras testadas na extração dos compostos, *holder* e suporte para o *holder*.



(Fonte: Elaborado pelo autor).

#### 4.4.2 Escolha da melhor temperatura para extração dos HPAs

A temperatura de adsorção é um parâmetro importante para o processo SPME. Em teoria, temperaturas mais elevadas aumentarão a pressão de vapor parcial dos analitos no *headspace*, mas, ao mesmo tempo, a sorção da fibra diminuirá, particularmente para os componentes mais voláteis. O efeito prático da temperatura foi examinado através de soluções contendo uma mistura dos HPAs com temperaturas de 60, 90 e 120 °C usando fibra PDMS de 100 µm com um tempo de extração constante de 30min.

A fim de otimizar a extração através da escolha da melhor fibra, os procedimentos foram realizados em triplicata, os *vials* foram fortificados com concentrações de 1µg/ml dos HPAs e 0,1µg/ml dos padrões deuterados. Em seguida, cada uma das fibras de SPME foram expostas aos ensaios, durante 30 min, sob diferentes temperaturas (60 °C, 90 °C e 120 °C).

Três diferentes temperaturas de extração foram testadas usando a fibra de PDMS-100 para otimizar o período de amostragem SPME. A figura 12 mostra o perfil de extração em diferentes temperaturas, indicando que as adsorções de HPAs mais leves (cadeia curta) diminuem ligeiramente com o aumento da temperatura de 60 °C até 90 °C e ainda mais de 120 °C, por se tratarem de compostos mais voláteis. Para os HPAs de cadeia longa, no

entanto, as condições são invertidas, o aumento da temperatura potencializa a extração dos mesmos.

#### **4.5 Desenvolvimento do método CG-EM para determinação dos HPAs**

Inicialmente foi desenvolvido um método em que a amostra foi injetada por injeção direta, em seguida o mesmo foi adaptado para a versão de análise por SPME. Para o desenvolvimento do método cromatográfico CG-EM (modo *SCAN*) foram utilizadas soluções mistas dos 16 HPAs em acetonitrila, preparadas a partir das soluções padrão individuais de cada HPA.

Os íons de quantificação e identificação foram selecionados para cada HPA a partir dos espectros de massa referente a cada pico obtido nas análises por GC-EM (*SCAN*) (tabela 6). De posse dessas informações, foi obtido o cromatograma do íon extraído (*EIC*) para cada um dos analitos estudados.

Nesta etapa inicialmente foi planejado um método cromatográfico GC-EM no modo de injeção direta para avaliar os compostos alvo e intensidade dos picos cromatográficos relativos aos compostos extraídos, em seguida foi feita a otimização desse método e adaptação para análise por SPME. Além disso, foi realizada a otimização da programação de temperatura com o objetivo de detectar os compostos em tempo reduzido de corrida e melhorar a resolução dos picos cromatográficos. A solução mista de HPAs de concentração  $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$  foi utilizada para otimização das condições cromatográficas, a energia da fonte de íons foi de 70 eV e vazão do gás de arraste foi de  $1 \text{ mL.min}^{-1}$ . As condições utilizadas em cada método testado estão apresentadas na tabela 9.

Tabela 9 - Condições utilizadas no desenvolvimento do método CG-EM (TIC-SCAN).

<b>Condições CG</b>	
Temperatura do injetor: 300°C	
Volume de injeção: 1.0 µL	
Modo de injeção: <i>splitless</i>	
Gás de arraste: Hélio	
<b>Injeção direta</b>	<b>HS-SPME</b>
Programa de Temperatura:	Programa de Temperatura:
Forno:	Forno:
(1) 100°C por 1 min	(1) 100°C por 1 min
(2) 100-200 a 10°C/min	(2) 100-200 a 10°C/min
(3) 200-250°C (7°C/min) por 5.86 min	(3) 200-250°C (7°C/min) por 5.86 min
(4) 250-300°C a 20°C/min	(4) 250-300°C a 20°C/min
(5) 300°C por 4.5 min	(5) 300°C por 4.5 min
Tempo de corrida: 31.00 min	Tempo de corrida: 31.00 min
<b>Condições SPME</b>	
<b>Condição I</b>	<b>Condição II</b>
Temperatura de condicionamento da fibra: 240°C	Temperatura de condicionamento da fibra: 240°C
Tempo de PRÉ-INCUBAÇÃO: 15 min	Tempo de PRÉ-INCUBAÇÃO: 15 min
Agitação: 500 rpm	Agitação: 500 rpm
Tempo de extração: 30 min	Tempo de extração: 30 min
Temperatura de aquecimento da amostra: 60°C	Temperatura de aquecimento da amostra: 90°C
Tempo de dessorção: 3 min	Tempo de dessorção: 3 min
Tempo de pós-condicionamento: 10 min	Tempo de pós-condicionamento: 10 min
<b>Condições detector</b>	<b>Condições detector</b>
Temperatura da interface CG-EM: 300°C	Temperatura da interface CG-EM: 300°C
Temperatura da fonte de íons: 300°C	Temperatura da fonte de íons: 300°C
Modo ionização: Impacto de elétrons (IE)	Modo ionização: Impacto de elétrons (IE)
Tempo de corte do solvente: 3.0 min	Tempo de corte do solvente: 3.0 min
Modo de aquisição: <i>TIC SCAN</i>	Modo de aquisição: <i>TIC SCAN</i>
Faixa de <i>m/z</i> : 30 – 300 Da	Faixa de <i>m/z</i> : 100 – 300 Da

Após a obtenção dos cromatogramas, a identificação foi conduzida mediante comparação por análise de similaridade dos espectros de massa dos principais picos detectados com os espectros da biblioteca *Mass Spectral Library NIST 08.L*.

## 4.6 Validação do método analítico

### 4.6.1 Linearidade

A avaliação da linearidade do método para os analitos foi conduzido conforme as seguintes etapas: (1) obtenção das equações para as curvas de calibração primárias no solvente através de calibração por padrão externo e regressão linear por método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO). (2) Teste de homocedasticidade através da avaliação visual dos gráficos de resíduo ( $d_y$ ) da resposta analítica ( $y_i$ ) em função da concentração ( $x_i$ ) e adicionalmente por teste  $F$  de Hartley (3). Teste  $t_r$  para falta de ajuste para verificação do ajuste das equações de calibração (KONIECZKA; NAMIESNIK, 2009; MAPA, 2011; MILLER, 2010; THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002). Essas análises também estão resumidas na figura 13.

#### 4.6.1.1 Curvas de calibração

Para o estudo de linearidade foi definida a faixa de concentração correspondente a 1 a 500  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  na amostra. Foram preparadas soluções padrão de calibração multicomponente dos HPAs em solvente acetonitrila e em todas elas foram adicionadas uma concentração conhecida (100  $\mu\text{g}/\text{L}$ ) dos cinco padrões isotopicamente modificados (solução mix), empregados nesse estudo como padrões *surrogates*. Os padrões internos (usados como padrões *surrogates*) foram empregados durante todo o procedimento analítico para compensar perdas e contaminação durante as extrações das amostras e análises cromatográficas (CAVALCANTE *et al.*, 2012).

As soluções de calibração foram obtidas por diluição de uma solução padrão 10  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  multicomponente dos analitos em acetonitrila, em balões volumétricos de 10,0 mL. Os dez pontos de calibração para o estudo de linearidade estão compreendidos na faixa 1, 5, 10, 15, 30, 45, 60, 100, 200 e 500  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . Cada solução padrão de calibração foi injetada no CG/EM em triplicata.

Após todas as injeções foram obtidas as áreas de pico cromatográfico (AP) relativas a cada concentração ( $x_i$ ) para todos os analitos como também as áreas de pico relativas ao padrão interno (API). Em seguida, foi obtida a relação da área de pico de cada analito com a área de pico do padrão interno AP/API ( $y_i$ ) para cada concentração ( $x_i$ ) como

resposta instrumental para estimativa das curvas de calibração via regressão linear por mínimos quadrados ordinários (MMQO), empregando Microsoft Excel 2016.

#### 4.6.1.2 Teste de Homocedasticidade

Concluindo-se a etapa de estimativa das equações de calibração e tendo obtido os parâmetros de regressão inclinação ( $a$ ) e intercepto ( $b$ ) primários MMQO para cada analito, foram calculados os resíduos ( $d_y$ ) das respostas instrumentais conforme equação 2 e plotados os gráficos de resíduo em função da concentração ( $x_i$ ) para avaliação da hipótese de homocedasticidade.

$$d_y = (y_i - \hat{y}_i) \quad (2)$$

Em que:

$y_i$  = Resposta instrumental experimental ( $A_{P,i}/A_{PI}$ );

$\hat{y}_i$  = Resposta instrumental prevista pela equação de calibração obtida via MMQO.

Para os casos em que houve dispersão aleatória do resíduo na faixa de concentração considerada, a hipótese de homocedasticidade foi aceita. Quando o perfil de distribuição dos resíduos apresentou aparência afunilada (forma de “trombeta”) considerou-se a hipótese de heterocedasticidade, sendo de qualquer forma conduzido o teste  $F_{máx}$  de Hartley para nível de confiança de 95 %, conforme equação 3 (BARBOSA *et al.*, 2018; KONIECZKA; NAMIESNIK, 2009; MAPA, 2011; MILLER; MILLER, 2010).

$$F = \frac{s_{máx}^2}{s_{min}^2} \quad (3)$$

Em que:

$F$  = Parâmetro  $F$  de Hartley calculado;

$s_{máx}^2$  = Maior variância do conjunto de dados da calibração;

$s_{min}^2$  = Menor variância do conjunto de dados da calibração.

Se  $F_{\text{máx}} < F_{\text{crítico}}$  considerando  $f = m-1$  graus de liberdade, sendo  $m$  o número de réplicas de cada conjunto de dados e  $k$  o número grupos de dados comparados admite-se homocedasticidade para um dado nível de confiança.

Se  $F_{\text{máx}} > F_{\text{crítico}}$  considerando  $f = m-1$  graus de liberdade e  $k$  o número grupos de dados comparados admite-se heterocedasticidade para um dado nível de confiança.

Temos  $m = 3$  ( $f = 2$ )  $k$  igual ao número de pontos de calibração definidos para cada composto e nível de confiança de 95 %, para todos os testes desenvolvidos neste trabalho.

Para os casos em que a hipótese de heterocedasticidade foi verificada, as estimativas das equações para as curvas de calibração foram conduzidas via método de regressão linear por mínimos quadrados ponderados MMQP, conforme descrito na próxima seção (BARBOSA *et al.*, 2018; KONIECZKA; NAMIESNIK, 2009; MAPA, 2011; MARTINS, F. I. C. C.; BARBOSA, P. G. A ; ZOCOLO; NASCIMENTO, 2018; MILLER; MILLER, 2010).

#### 4.6.1.3 Regressão linear via Método dos Mínimos Quadrados Ponderados (MMQP)

Entre os analitos cujos perfis se apresentaram heterocedásticos ou com falta de ajuste na calibração por MMQO, foi conduzida a estimativa dos parâmetros de regressão ( $a_w$  - inclinação) e ( $b_w$  - intercepto) e coeficiente de correlação ponderado ( $r_w$ ) via regressão linear por mínimos quadrados ponderados (MMQP). O peso (ponderação)  $w_i$  considerado é definido na equação 4, a inclinação ( $a_w$ ), o intercepto ( $b_w$ ) e o coeficiente de correlação ( $r_w$ ) foram estimados conforme equações 5, 6 e 7, respectivamente (KONIECZKA; NAMIESNIK, 2009; MAPA, 2011; MILLER; MILLER, 2010).

$$w_i = \frac{s_i^{-2}}{\sum_i \frac{s_i^{-2}}{n}} \quad (4)$$

$$b_w = \frac{\sum_i w_i x_i y_i - n \bar{x}_w \bar{y}_w}{\sum_i w_i x_i^2 - n \bar{x}_w^2} \quad (5)$$

$$a_w = \bar{y}_w - b_w \bar{x}_w \quad (6)$$

$$r_w = \frac{S_{xyw}}{\sqrt{S_{xxw}S_{yyw}}} = \frac{\sum w_i(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum w_i(x_i - \bar{x})^2 \cdot \sum w_i(y_i - \bar{y})^2}} \quad (7)$$

Em que:

$s_i$  = Desvio padrão no ponto  $i$  da calibração;

$n$  = Número de pontos de calibração;

$w_y$  = Coordenada centroide ponderada da resposta analítica ( $y_i$ );

$w_x$  = Coordenada centroide ponderada da concentração ( $x_i$ );

Após a obtenção das equações das curvas de calibração ponderadas foi conduzida avaliação dos resíduos normalizados ( $d_{y,norm}$ ), para verificar qualidade do ajuste linear e da heterocedasticidade. Os cálculos dos resíduos normalizados foi baseado na equações 8 (BARBOSA et al., 2018; MAPA, 2011).

$$d_{y,norm} = \frac{d_y}{s_{res,yi}} \quad (8)$$

Em que:

$d_y$  = Resíduo da resposta instrumental;

$s_{res,yi}$  = Desvio padrão dos resíduos

#### 4.6.1.4 Teste $t_r$ para ajuste linear

O teste  $t_r$  possibilita a verificação do ajuste dos modelos lineares para as equações de calibração, sendo conduzido tanto para as equações de calibração obtidas via MMQO, quanto para as obtidas via MMQP (BARBOSA et al., 2018; CACOULLOS, 2001; MAPA, 2011; MILLER; MILLER, 2010). Este teste baseou-se no cálculo do parâmetro  $t_r$  para os modelos das equações de curva de calibração definidas para as respectivas faixas de calibração estabelecidas, conforme equação 9.

$$t_r = \frac{|r| \cdot \sqrt{N_x - 2}}{\sqrt{1 - r^2}} \quad (9)$$

Em que:

$r$  = Coeficiente de correlação;

$n$  = Número de pontos de calibração considerados.

Se  $t_{r,calc} < t_{crítico}$  para  $(n - 2)$  graus de liberdade e nível de confiança de 95 % é considerada a hipótese de falta de ajuste linear para o modelo da equação de calibração;

Se  $t_{r,calc} > t_{crítico}$  para  $(n - 2)$  graus de liberdade e nível de confiança de 95 % é considerada a hipótese de ajuste linear para o modelo da equação de calibração.

#### **4.6.2 Seletividade e efeito matriz**

A seletividade do método para os HPAs foi determinada através da análise da amostra isenta dos analitos (branco da amostra) e da amostra adicionada dos analitos, sob as mesmas condições cromatográficas e de detecção (ANVISA, 2017; MAPA, 2011). Foram preparadas soluções de café para análise via SPME, isento (branco) e fortificado com padrão dos analitos, sendo em seguida analisados por CG/EM nas condições definidas para o método.

Após a obtenção dos cromatogramas referentes ao branco da amostra e à amostra adicionada dos analitos, foi feito uso do cromatograma do íon extraído (EIC), selecionando as principais fragmentos do espectro de massa de cada analito (um íon de quantificação e dois de identificação) para obter um cromatograma apenas para o composto de interesse, melhorando a sensibilidade e seletividade (ALCÂNTARA *et al.*, 2018).

Apesar do emprego do cromatograma de íons extraídos (EIC), foi avaliada se a presença de coextrativos da matriz podem causar influência direta (quando coextrativos da matriz são detectados no mesmo tempo de retenção dos analitos de interesse) ou indireta (em que os compostos da matriz podem causar superestimação ou supressão do sinal do analito) na quantificação dos compostos.

##### **4.6.2.1 Efeito matriz**

No estudo inicial de avaliação do efeito matriz do método, na faixa de concentração correspondente de 0,10 a 60,0  $\mu\text{g.L}^{-1}$  na amostra, as soluções padrão foram preparadas em extratos da matriz isenta dos analitos (padronização externa por superposição de matriz) e em solvente puro (padronização externa), de modo foram obtidas equações de

regressão ajustadas via MMQO para os analitos, considerando dados de calibração produzidos no solvente e na matriz (café preparado).

Para obtenção das soluções padrão de calibração na matriz foram preparados 200,0 mL de café (bebida). Cada amostra foi analisada adicionando-se, em *vial* com capacidade de 20,0 mL, 3,0 g de NaCl, 6,0 mL de bebida e alíquota do padrão mix dos 16 HPAs (perfazendo concentrações de 0.1, 0.5, 1.0, 5.0, 10.0, 15.0, 30.0, 45.0 e 60.0  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ). O mesmo procedimento foi realizado para a curva no solvente, nesse caso utilizou-se solvente acetonitrila ao invés do café preparado.

A avaliação do efeito matriz foi conduzida com base na comparação estatística das inclinações (*a*) e interceptos (*b*) das três curvas de calibração ajustadas obtidas no solvente puro e na matriz, preparadas conforme descrito anteriormente. Após a construção e ajuste das curvas sob as condições do método e a obtenção das equações de regressão, foi aplicado teste *F* (Fisher-Snedecor) para avaliar a igualdade estatística das variâncias das inclinações e interceptos, conforme equação 10. A variância dos parâmetros de regressão estimados para curva de calibração do analito no solvente foi comparada com a variância destes mesmos parâmetros estimados para a curva de calibração na matriz curvas (MAPA, 2011).

$$F_{calc} = \frac{s_{i,1}^2}{s_{i,2}^2} \quad (10)$$

Em que:

$s_{i,1}^2$  e  $s_{i,2}^2$  = variâncias dos parâmetros de regressão comparados para as curvas de calibração no solvente e na matriz.

Se  $F_{calc} < F_{crítico}$  para 2 graus de liberdade e nível de confiança 95 %, admite-se a hipótese de igualdade das variâncias dos parâmetros de regressão comparados, não havendo efeito de matriz significativo sobre a variância.

Se  $F_{máx} > F_{crítico}$  para 2 graus de liberdade e nível de confiança de 95 %, admite-se a hipótese de diferença estatística entre as variâncias dos parâmetros comparados, havendo efeito de matriz significativo sobre a variância.

Seguido da comparação entre as variâncias foi conduzido teste *t* de *Student* para comparação estatística dos valores absolutos dos parâmetros de regressão estimados para a curva de calibração no solvente e na matriz. O teste foi conduzido inicialmente pelo cálculo

dos valores de  $t$  para as inclinações ( $a$ ) e para os interceptos ( $b$ ), conforme equações 11 e 12 (MAPA, 2011).

$$t_{calc,a} = \frac{|a_1 - a_2|}{\sqrt{\frac{s_{a,1}^2}{N_{x,1}} + \frac{s_{a,2}^2}{N_{x,2}}}} \quad (11)$$

$$t_{calc,b} = \frac{|b_1 - b_2|}{\sqrt{\frac{s_{b,1}^2}{N_{x,1}} + \frac{s_{b,2}^2}{N_{x,2}}}} \quad (12)$$

Sendo:

$a_{a,1}$  e  $a_{a,2}$  são as inclinações das curvas realizadas na matriz e no solvente puro;  $s_{a,1}$  e  $s_{a,2}$  são os desvios padrão da inclinação para as duas curvas e  $N_{x,1}$  e  $N_{x,2}$  correspondem ao número de réplicas de calibração.

Os valores de  $t_{calc}$  foram comparados ao valor crítico de  $t$  para os referidos graus de liberdade e nível de confiança de 95 %. Para  $t_{calc} \leq t_{crit,a,v}$  é considerada a hipótese de igualdade estatística entre os valores absolutos do parâmetros de regressão comparados, não havendo efeito significativo da matriz; para  $t_{calc} \geq t_{crit,a,v}$ , é considerada a hipótese de diferença estatística entre os valores absolutos do parâmetros de regressão, havendo efeito significativo da matriz.

Outro método utilizado para avaliação do efeito matriz (EM) pode ser feito usando-se as soluções padrão preparadas no extrato das amostras e em solvente puro (LEE; CHOI; CHO, 2011). O sinal obtido para a matriz em três níveis de concentração (0,03; 0,25 e 0,50 mg.L<sup>-1</sup>) foi comparado aos resultados obtidos para o solvente nos níveis correspondentes. O efeito de matriz (em %) foi calculada segundo a equação 13:

$$EM (\%) = \frac{(A_M - A_S)}{A_S} \times 100 \quad (13)$$

Sendo:

$A_M$  = Área de pico do padrão na matriz

$A_S$  = Área de pico do padrão no solvente

Segundo a equação anterior, o valor positivo ou negativo de EM (%) reflete a valorização e supressão induzida pela matriz, respectivamente. Nenhum efeito matriz é observado quando EM é igual a 0%. Valores superiores a 20% ou inferiores a -20% indicam reflete a valorização (aumento) ou supressão de sinal induzida pela matriz, respectivamente.

#### 4.6.3 Limites de detecção (LD) e limites de quantificação (LQ)

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram estimados com base nos parâmetros das curvas de calibração ajustadas na matriz. A estimativa estatística foi conduzida inicialmente para os LDs, conforme equações 14 e 15. A equação 14 possibilita a estimativa do valor de concentração correspondente ao limite de detecção do analito, enquanto a equação 15 é aplicada na estimativa da resposta instrumental crítica ( $y_{crit}$ ) associada ao limite de detecção (BAZILIO *et al.*, 2014; BARBOSA *et al.*, 2018).

$$LOD = \frac{(y_{crit} - a_w)}{b_w} \quad (14)$$

O termo  $b_w$  representa a inclinação ponderada e  $y_{crit}$  foi calculado com a Equação 15.

$$y_{crit} = a_w + t_{(\alpha;v)} \cdot s_{y/x_w} \sqrt{\frac{1}{\sum w_i} + \frac{1}{n} + \frac{\bar{x}_w^2}{\sum_{i=1}^n (w_i x_i - n\bar{x})^2}} \quad (15)$$

Em que:

$a$  = Inclinação da curva de calibração ajustada

$b$  = Intercepto da curva de calibração ajustada

$t_{(\alpha;v)}$  = Valor t de relativo ao grau de liberdade considerado e nível de confiança de 95 %

$s_{(y/x)_w}$  = Erro padrão da regressão

$w_i$  = Pesos relativos a cada nível  $i$  de calibração

$n$  = Número de pontos de calibração

Os limites de quantificação foram estimados pela Equação 16.

$$\text{LOQ} = \frac{(2 \cdot \text{LOD} \cdot b_w + a_w) + t_{(\alpha;v)} \cdot s_{(y/x)_w} \cdot \sqrt{\frac{1}{\sum w_i} + \frac{1}{n} + \frac{(2 \cdot \text{LOD} - \bar{x}_w)^2}{\sum_{i=1}^n (w_i x_i - n\bar{x})^2}} - a_w}{b_w} \quad (16)$$

#### 4.6.4 Exatidão

##### 4.6.4.1 Ensaios de recuperação

Os estudos de exatidão foram baseados em ensaios de recuperação realizados em três níveis de concentração, um nível baixo, um intermediário e um nível alto, dentro da faixa de linearidade estabelecida para os analitos, sendo conduzidos em 6 réplicas em cada nível de concentração. O nível mais baixo de concentração selecionado foi de 5 µg/L, o nível intermediário foi de 15 µg/L e o nível alto 60 µg/L (ICH, 2005; MAPA, 2011).

Os ensaios de recuperação foram conduzidos através da fortificação das amostras de café com solução multicomponente 1 mg L<sup>-1</sup> dos HPAs, sendo adicionadas alíquotas da solução para fornecer as referidas concentrações nas réplicas de 6,0 mL de café preparado, antes da execução do preparo das amostras. Juntamente com as amostras fortificadas foram analisadas amostra não fortificadas (branco da amostra). Após a fortificação das amostras as mesmas foram preparadas conforme o método SPME e analisadas por CG/EM nas condições do método selecionado. Para todas as amostras foi adicionada uma concentração conhecida de 100 ppb do padrão surrogate (conforme item 3.7.1.1).

Os percentuais de recuperação foram calculados conforme equação 17 expressa abaixo:

$$\text{Rec}(\%) = \left( \frac{C_f - C_b}{C_{ad}} \right) \times 100 \quad (17)$$

Em que:

$C_f$  = Concentração quantificada após análise.

$C_b$  = Concentração quantificada na amostra branco.

$C_{ad}$  = Concentração adicionada na fortificação.

Os resultados aceitáveis de recuperação dependem do nível de concentração do analito na amostra, de modo que, quanto menor a concentração do analito na amostra, maior será a faixa de aceitação da recuperação. Dessa forma, os valores médios obtidos pelo método estão de acordo com os intervalos indicadas no Guia do MAPA (tabela 10).

Tabela 10 - Faixas de Aceitação da Recuperação acima e abaixo de 100%.

Concentração (c)	Intervalos (%)
$c \leq 1 \mu\text{g/kg}$	-50 % a +20 %
$1 \mu\text{g/kg} < c < 10 \mu\text{g/kg}$	-30 % a +10 %
$c \geq 10 \mu\text{g/kg}$	-20 % a +10 %

(Fonte: Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, 2011)

#### 4.6.5 Precisão

A precisão do método foi avaliada através da repetitividade, ou precisão intracorrída, avaliando-se o grau de concordância entre os resultados obtidos em medições sucessivas efetuadas sob as mesmas condições. A precisão foi avaliada quantitativamente através dos coeficientes de variação CV (%) calculados para os três níveis de concentração considerados nos ensaios de recuperação.

Após as quantificações das concentrações nos ensaios nos níveis de 5  $\mu\text{g/L}$ , 15  $\mu\text{g/L}$  e 60  $\mu\text{g/L}$  foram calculados os desvios padrão da repetitividade ( $s_r$ ) e em seguida os coeficientes de variação para cada pesticida em cada nível conforme equações 18 e 19, respectivamente (ICH, 2005; MAPA, 2011).

$$s = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{n - 1}} \quad (18)$$

$$CV(\%) = \frac{s}{\bar{x}} \times 100 \quad (19)$$

Em que:

$x_i$  = Valores quantificados para concentração em cada réplica para o nível  $i$  de concentração

$x$  = Valor médio da concentração num dado nível  $i$

$n$  = Número de réplicas em cada nível ( $n = 6$ )

$s_r$  = Desvio padrão da repetitividade

De acordo com o referido guia (MAPA, 2011), em condições de repetitividade, o coeficiente de variação deve tipicamente situar-se abaixo de dois terços dos valores apresentados na tabela a seguir, conforme a faixa de concentração.

No caso de análises repetidas de uma amostra em condições de reprodutibilidade intralaboratorial, o coeficiente de variação da média não deve exceder aos valores da tabela 11.

Tabela 11 - Critérios de Aceitação da Reprodutibilidade

Concentração (c)	Coeficiente de variação - CV (%)
$c \leq 1 \mu\text{g/kg}$	35
$1 \mu\text{g/kg} \leq c < 10 \mu\text{g/kg}$	30
$10 \mu\text{g/kg} \leq c < 100 \mu\text{g/kg}$	20
$100 \mu\text{g/kg} \leq c < 1 \text{mg/kg}$	15
$1 \text{mg/kg} \leq c < 10 \text{mg/kg}$	10
$10 \text{mg/kg} \leq c < 100 \text{mg/kg}$	7.3
$100 \text{mg/kg} \leq c < 1 \text{g/kg}$	5.3
$1 \text{g/kg} \leq c < 10 \text{g/kg}$	3.7
$10 \text{g/kg} \leq c < 100 \text{g/kg}$	2.7
$100 \text{g/kg} \leq c < 1 \text{kg/kg}$	2.0

## 4.7 Análise das amostras

### 4.7.1 Preparação dos cafés para o estudo de validação

Amostras de café com diferentes preparações (café solúvel, café simples e café expresso, três amostras de cada tipo de café) foram utilizadas para a determinação dos 16 HPAs. Para o café solúvel, uma colher de sopa cheia (10 g) de café em pó foi diluída em 50

mL de água quente (100 °C). O café simples foi preparado na mesma medida anterior em 200 mL de água quente e, a seguir, filtrado em filtro de papel.

Os cafés expressos foram adquiridos em um supermercado local em Fortaleza (Brasil), o qual foi preparado em uma máquina automática de expresso. Uma quantidade de 7 g de grãos de café foi moída em um moedor elétrico e as amostras resultantes foram prensadas. A bebida final do café foi obtida passando-se água quente (90 °C) pelo café prensado. O tempo de preparo de 50 mL de cada café foi em torno de 30 s, sendo esse procedimento realizado em triplicata. Cada amostra foi preparada de acordo com a forma como a bebida deveria ser consumida.

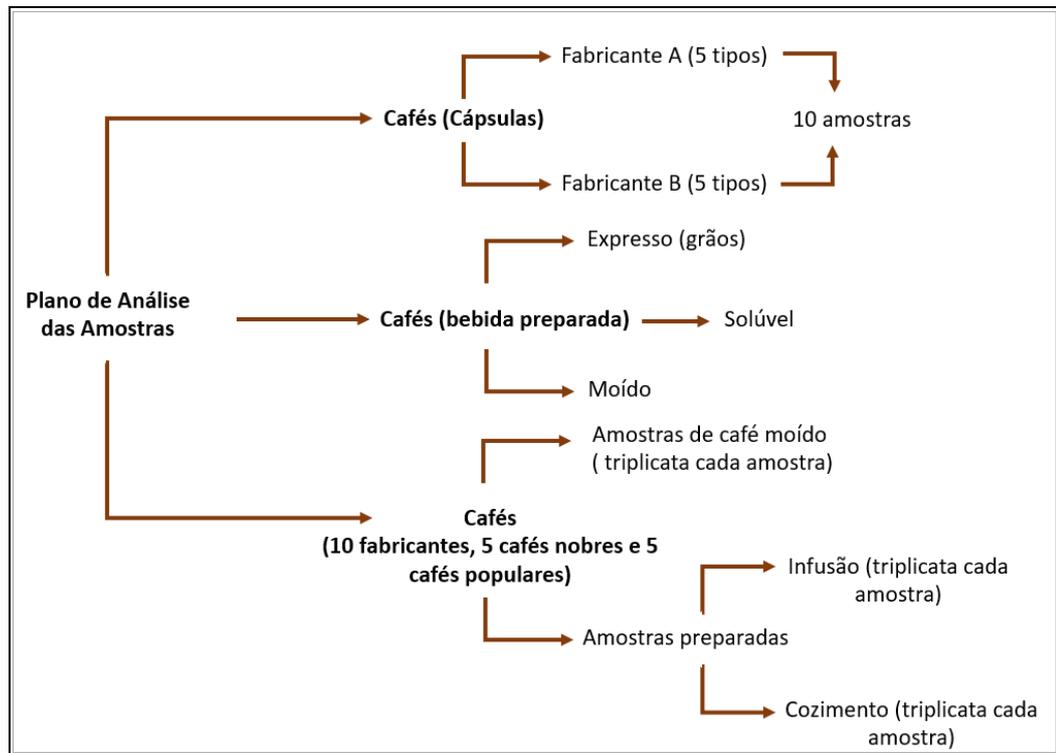
#### ***4.7.2 Preparação dos cafés para o estudo quimiométrico***

Foram analisadas amostras de café em pó, bem como nas preparações de café, visando avaliar o nível de persistência dos HPAs do pó para o café pronto. As regiões de produção das amostras analisadas foram: Suldeste (São Paulo, Espírito Santo e Minas Gerais), Nordeste (Ceará), que são algumas das principais regiões produtoras de café do país (Revista Cafeicultura) e Colômbia por ser o segundo maior produtor mundial.

O método desenvolvido foi aplicado na análise de amostras de cafés de diferentes tipos, marcas e preparações, conforme descrito no fluxograma da figura a seguir, a fim de monitorar dezesseis resíduos de HPAs. O método SPME/CG-EM foi aplicado em 23 amostras (Cápsulas de café-10, tipos de café- 3; marcas de café-10).

No processo de análise das amostras, foram efetuadas a análise e posterior determinação dos HPAs e compostos voláteis de acordo com a figura 17 a seguir:

Figura 17 - Planejamento da seleção de amostras para aplicação do método e quantificação de voláteis e HPAs em diferentes cafés.



Fonte: (Elaborado pelo autor).

Foram selecionadas 10 amostras de cafés de diferentes fabricantes e regiões, com base na classificação ABIC. Os cafés torrado e moído (100% arábica ou mistura) foram compradas em supermercados locais. Dentre as amostras analisadas temos 5 cafés tradicionais, 3 cafés superiores e 2 cafés gourmet. Consideramos, portanto, para fins de classificação neste estudo, 5 amostras de café tradicionais como o grupo de qualidade comum e as 3 amostras de cafés superiores juntamente com as 2 amostras de cafés gourmet como o grupo de alta qualidade. Para não revelar os fabricantes as amostras foram designadas através de siglas. Amostras de alta qualidade: **AC** (Minas Gerais, Brasil), **CL** (Espírito Santo, Brasil), **O** (São Paulo, Brasil), **H** (Colômbia) e **ME** (Colômbia); amostras de qualidade comum: **TC** (Minas Gerais, Brasil), **SC** (Minas Gerais, Brasil), **ML** (Minas Gerais, Brasil), **PIL** (São Paulo, Brasil) e **KM** (São Paulo, Brasil), todas de produtores brasileiros.

Visando avaliar a presença e os níveis dos HPAs, assim como a influência do modo de preparo sobre a transferência destes compostos para a bebida, todas as amostras foram preparadas através de dois procedimentos diferentes: cozimento (café fervido) e infusão (café coado). Foi realizado o preparo com 10,0 g de café moído, 100,0 mL de água ultrapura a

95 °C e papel de filtro. O método de preparação da bebida por infusão foi o seguinte: primeiro o café moído foi adicionado ao filtro, em seguida, a água foi adicionada sobre o café, finalmente a amostra de café foi inserida no frasco para análise. Na preparação da bebida por cozimento o café foi colocado junto com a água em fervura, que foi mantida por 2 minutos, logo após, foi filtrado e transferido para o *vial*. Feito isso, as bebidas foram analisadas através de método validado baseado em microextração em fase sólida e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (SPME-HS-GC-MS) para a determinação de 16 HPAs prioritários.

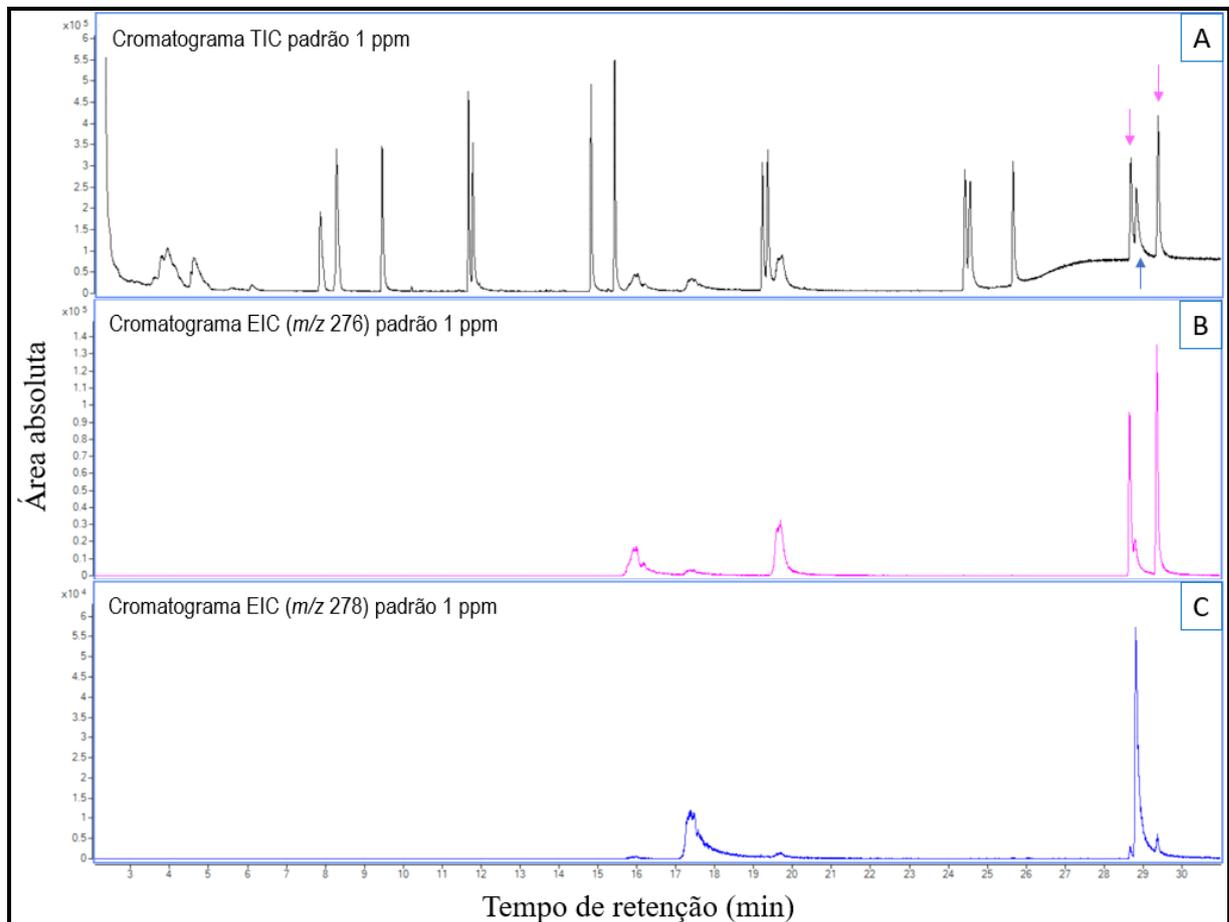
## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Desenvolvimento do método CG-EM para separação e detecção dos HPAs

No estudo de definição das condições cromatográficas para a separação e detecção adequada dos HPAs, a programação de temperatura e a vazão do gás de arraste foram os fatores básicos avaliados experimentalmente. De acordo com as condições testadas, que foram reportadas na tabela 9, o método reportado mostrou-se como o de melhor desempenho com relação ao tempo de análise, como também, com relação a resolução e intensidades dos sinais obtidos para os analitos. O método CG/EM *scan* foi selecionado como o conjunto de condições cromatográficas base para configuração do método CG/EM no modo de monitoramento SIM.

A figura 18 traz um cromatograma com a identificação dos 16 HPAs investigados. Já a condição II, que foi escolhida após os estudos de otimização da extração, se apresentou bastante favorável para a detecção de todos os analitos, tendo sido escolhida para concluir a validação do método e análise das amostras. O cromatograma da figura 18A, nele é possível observar que no modo TIC de monitoramento, a quantificação de alguns compostos se torna mais drástica devido à baixa resolução de alguns picos cromatográficos que são eluídos da coluna em tempos de retenção bem semelhantes, como é o caso, por exemplo, dos três últimos compostos indicados pelas setas.

Figura 18—Cromatogramas de um padrão multicomponente dos HPAs no modo TIC de aquisição (A) e modo EIC de monitoramento para os analitos indeno(1,2,3-cd)pireno e benzo(g,h,i)perileno (B) e para o analito dibenzo(a,h)antraceno (C), nas condições cromatográficas reportadas e respectivos tempos de retenção. (1) Naftaleno tr = 4,57 min; (2) Acenaftileno tr = 7,82 min; (3) Acenafteno tr = 8,24 min; (4) Fluoreno tr = 9,41 min; (5) Fenantreno tr = 11,64 min; (6) Antraceno tr = 11,75 min; (7) Fluoranteno tr = 14,79 min; (8) Pireno tr = 15,40 min; (9) Benzo(a)antraceno tr = 19,29 min; (10) Criseno tr = 19,33 min; (11) Benzo(b)fluoranteno tr = 24,41 min; (12) Benzo(k)fluoranteno tr = 24,54 min; (13) Benzo(a)pireno tr = 25,64 min; (14) Indeno(1,2,3-c,d)pireno tr = 28,67 min; (15) Dizendo(a,h)antraceno tr = 18,81 min; (16) Benzo(g,h,i)perileno tr = 29,37 min.



Os compostos marcados pelas setas superiores, na figura 18A, apresentam íons de quantificação  $m/z$  276, já o composto identificado com a seta inferior apresenta íon de quantificação  $m/z$  278. Como se pode observar, utilizando-se o recurso do EIC, é possível separar os picos selecionando cada  $m/z$  em um cromatograma específico. Na Figura 18B o íon  $m/z$  276 apresenta os compostos apontados pelas setas superiores na figura 18A, e a figura 18C mostra o íon com fragmento 278 (seta inferior), que antes apresentava resolução mais problemática com um dos compostos da figura 18B mas que aparece isolado nesse cromatograma. Isso acontece por que os outros dois picos não possuem  $m/z$  278 como um fragmento majoritário. Diante dessas informações, é possível notar que essa ferramenta torna o método bastante seletivo para a detecção de todos os compostos.

Neste método, as injeções foram realizadas empregando o modo *splitless*. Para essa situação, o emprego de uma temperatura inicial mais reduzida no sistema cromatográfico promove uma concentração do vapor da amostra no início da coluna, convertendo-a em uma banda estreita e homogênea de vapor, o que é bastante positivo para que os processos de separação dos analitos sejam mais eficientes, principalmente para analitos com pontos de ebulição elevados. A elevação conduzida sobre a vazão do gás de arraste possibilitou um aumento da velocidade de migração dos analitos através da coluna, reduzindo seus tempos de retenção, sem potencializar processos de alargamento de banda e perda de resolução de pico (HARRIS, 2013).

## **5.2 Estudo de otimização da extração dos compostos**

### **5.2.1 Seleção do melhor revestimento de fibra para extração dos HPAs**

De acordo com as condições apresentadas na tabela 3 (condição I), a extração se revelou favorável para os oito primeiros analitos eluídos, empregando-se uma temperatura de desorção para SPME de 60°C. O método com essa configuração foi utilizado para estudos prévios de validação, no entanto, com o objetivo de ampliar o escopo de aplicação do método para analisar os 16 HPAs, optou-se pelo estudo de otimização da melhor temperatura de extração dos compostos. Ainda nesse estudo de otimização, foram escolhidas três fibras para identificar qual seria a mais favorável para extração dos HPAs, os detalhes estão apresentados na próxima seção.

Na temperatura de extração de 90 °C, 10 dos HPAs foram extraídos satisfatoriamente com a fibra DVB/CAR/PDMS, enquanto somente 11 compostos foram extraídos com a fibra PDMS/DVB, ao passo que 15 HPAs foram extraídos com a fibra PDMS). Os resultados para a eficiência de extração das diferentes fibras são apresentados nas Figuras 19, 20, 21 e Tabela 12. Os resultados empregando-se temperatura de 60°C foram descartados devido a detecção eficiente de apenas oito dos primeiros HPAs, como reportado anteriormente.

Os revestimentos das fibras DVB/CAR/PDMS e PDMS/DVB) não foram eficientes na extração de HPAs menos voláteis; além disso, bem como as áreas dos picos

desses compostos apresentaram valores baixos, mostrando que estas fibras não são viáveis para a configuração do método desejado. A fibra com PDMS apresentou maior eficiência de extração dos HPAs. Provavelmente, devido fato do revestimento ser de natureza apolar e os HPAs compostos apolares (com baixos valores de coeficiente de partição octanol-água, log P). Para as diferentes temperatura de extração investigadas (figuras 20 e 21) é possível observar que a fibra PDMS é mais eficiente na extração dos HPAs estudados frente a outras fibras estudadas.

Considerando a magnitude de área de pico média para cada analito, relativa a cada tipo fibra estudado como critério para avaliar o percentual de extração relativo, foi possível estimar tais percentuais conforme tabela 12. Os percentuais foram calculados com referência a fibra PDMS/CAR/DVB, em relação cada fibra separadamente.

Tabela 12 – Percentual de extração da fibra PDMS /CAR/DVB em relação as duas outras fibras (PDMS e PDMS/DVB).

HPA	(% ) EXTRAÇÃO RELATIVO DA PDMS/CAR/DVB	
	PDMS	PDMS/DVB
NAFTALENO	61	95
ACENAFTILENO	33	71
ACENAFTENO	26	68
FLUORENO	7	69
FENANTRENO	27	46
ANTRACENO	19	64
FLUORANTENO	-39	45
PIRENO	-29	41
B[A]A	-39	28
CRISENO	-121	25
B[B]FLUORANTENO	-169	30
B[K]F	-	-
B[A]P	-502	30
INDENO	-	-
D[A,H]A	-	-
B[GHI]P	-	-

Com base nos percentuais comparativos de extração da fibra PDMS/CAR/DVB em relação às demais fibras, pode-se observar que a mesma apresenta maiores percentuais de extração para os compostos naftaleno, acenaftileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno e antraceno.

A fibra PDMS apresentou maior percentual de extração em relação as demais fibras para os compostos fluoranteno, pireno, benzo{a}antraceno, criseno, benzo[b]fluoranteno e benzo[a]pireno.

A fibra PDMS/DVB foi sempre menos eficiente na extração dos HPAs, quando comparada as demais fibras.

Por outro lado, resultados da literatura reportam que para compostos polares, as fibras de revestimento misto (DVB-CAR-PDMS e PDMS-DVB) são a melhor alternativa que a fibra PDMS-100  $\mu\text{m}$  (ANTALICK; PERELLO; REVEL, 2010).

Figura 19 - Resultados do estudo de seleção de revestimento de fibras (PDMS-DVB, PDMS, DVB-CAR-PDMS em função da magnitude de áreas de picos dos HPAs extraídos em diferentes temperaturas: a) 60°C, b) 90°C e 120°C, fortificados com concentrações de  $1\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  dos HPAs.

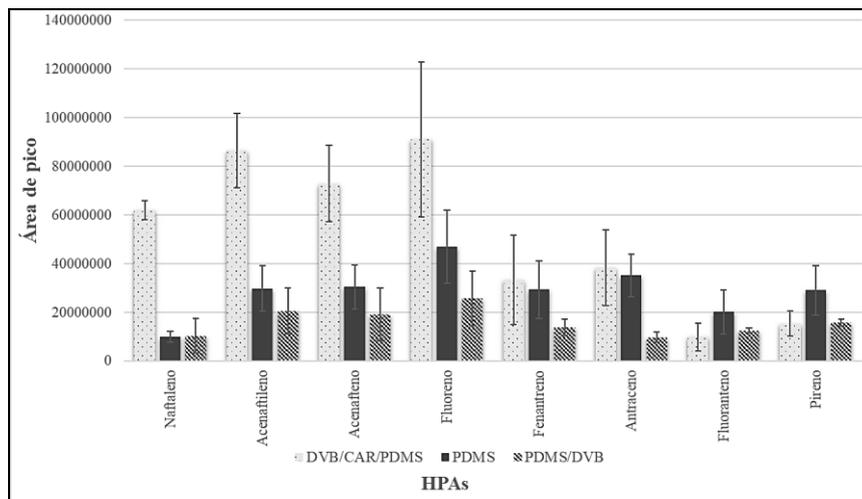


Figura 20 - Áreas de pico dos HPAs extraídos com três diferentes fibras (PDMS-DVB, PDMS, DVB-CAR-PDMS) e temperatura de 90°C.

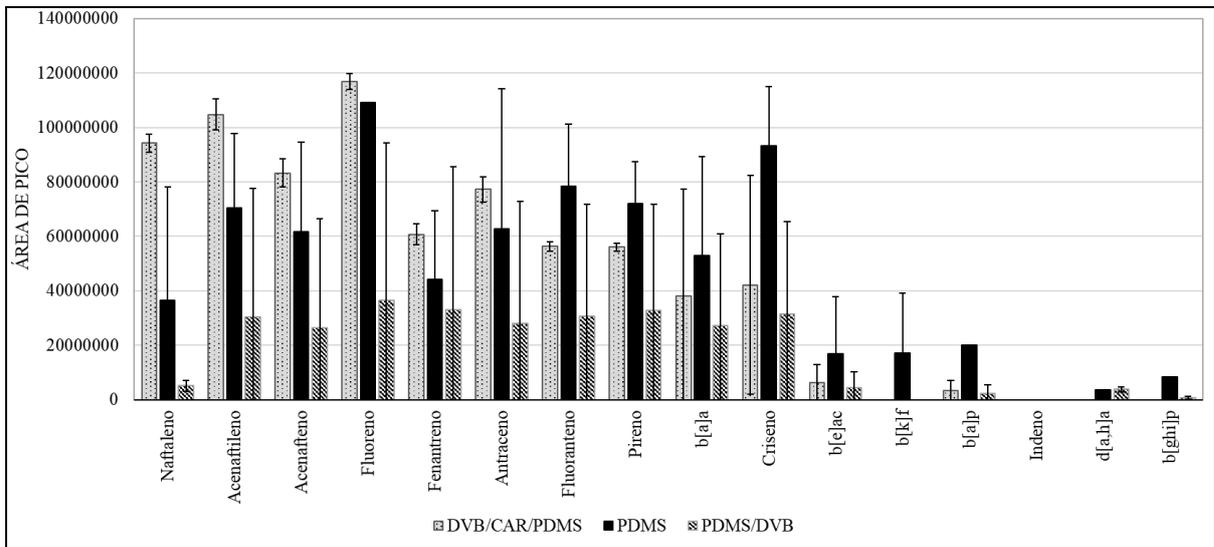
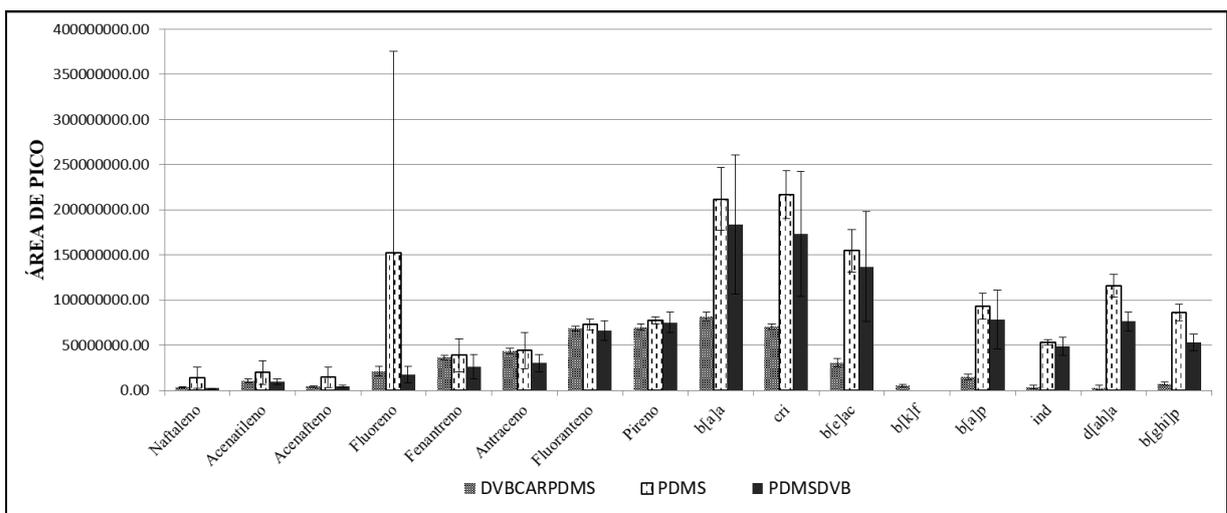


Figura 21 - Áreas de pico dos HPAs extraídos com três diferentes fibras (PDMS-DVB, PDMS, DVB-CAR-PDMS) e temperatura de 120°C.



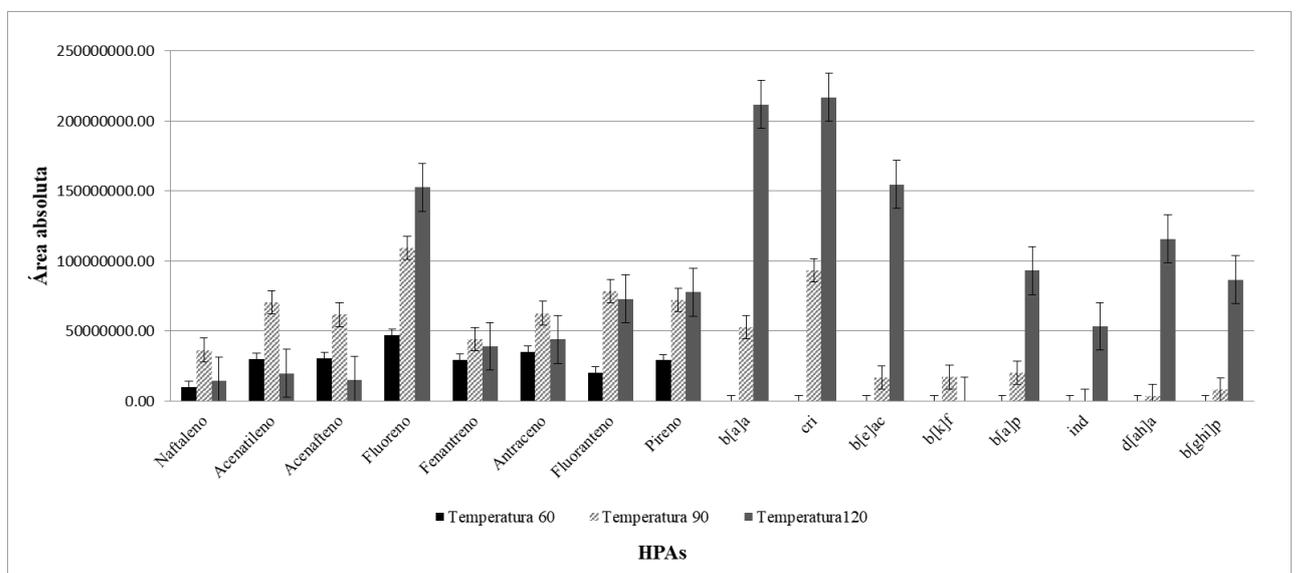
### 5.2.2 Influência da temperatura na extração SPME dos HPAs

A temperatura de extração é um parâmetro importante para o processo SPME. Em teoria, temperaturas mais elevadas aumentarão a pressão de vapor parcial dos analitos no *headspace*, mas, ao mesmo tempo, a sorção da fibra diminuirá, particularmente para os componentes mais voláteis. O efeito da temperatura foi examinado através de soluções contendo uma mistura dos HPAs com temperaturas de 60, 90 e 120 °C usando fibra PDMS de 100 µm com um tempo de extração constante de 30 min.

A figura 22 mostra que a fibra PDMS-100 $\mu\text{m}$  é a mais eficiente para todos os hidrocarbonetos estudados, uma vez que é mais eficiente na extração de compostos apolares e menos voláteis, características estas que são comuns aos analitos, que apresentam estruturas semelhantes (PIETROGRANDE, DEMARIO, RUSSO, 2023; NAING *et al.*, 2020). Este tipo de fibra de PDMS foi aplicado com sucesso à análise de ésteres em lombo curado (LORENZO *et al.*, 2014). Já era esperado que a fibra PDMS (revestimento de baixa polaridade) fosse eficiente na extração de compostos menos polares (ou aqueles com maior coeficiente de partição octanol-água). A figura 22 mostra que para os HPAs apolares mais voláteis, a fibra PDMS-DVB tem melhor performance que a fibra PDMS-100  $\mu\text{m}$ .

Os HPAs de alto peso molecular são mais eficientemente extraídos na temperatura de 120 °C, mas em temperatura de 90 °C também houve extração eficiente. Por outro lado, na temperatura de extração de 60°C o método não tem eficácia, seja qual for a natureza do revestimento de fibra.

Figura 22 - Comparação do efeito da temperatura na extração dos HPAs na fibra PDMS em função da magnitude de áreas de pico dos HPAs nas temperaturas 60°C, 90°C e 120°C, fortificados com concentrações de  $1\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ .



Apesar de ter sido identificado que o método empregando uma temperatura de extração de 120°C é o mais favorável para a quantificação dos analitos, devido ao ganho de sensibilidade (ver figura anterior), os estudos de linearidade mostraram resultados não satisfatórios para a maioria dos compostos. Com isso, para evitar o comprometimento de todo o estudo, optou-se por utilizar uma temperatura intermediária (90°C) nas etapas subsequentes.

Considerando a magnitude de área de pico média para cada analito, relativa a cada temperatura de extração avaliada, utilizando a fibra PDMS, sendo definido como critério para avaliar o percentual de extração relativo, foi possível estimar tais percentuais de extração conforme tabela 13. Os percentuais foram calculados com referência à temperatura de 90°C.

Com base nos percentuais comparativos de extração a temperatura de 90°C apresentou maiores percentuais de extração em geral para os compostos naftaleno, acenaftileno, acenafteno fluoreno, fenantreno, antraceno e fluoranteno e pireno, quando comparada a temperatura de 60°C. Quando avaliamos a extração da temperatura de 90°C em relação a 120°C, de todos os compostos citados acima, apenas fluoreno e pireno apresentaram maiores percentuais de extração na temperatura de 120°C. Os demais HPAs de maiores massa moleculares não foram extraídos a temperatura de 60°C, apresentando maiores percentuais de extração na temperatura de 120°C.

Tabela 13 – Percentual de extração relativa dos HPAs na temperatura de 90 °C.

HPA	(%) EXTRAÇÃO RELATIVA NA TEMPERATURA DE 90°C	
	60 °C	120°C
NAFTALENO	72,8	60,3
ACENAFTILENO	57,7	71,8
ACENAFTENO	50,5	75,9
FLUORENO	57	- 39,8
FENANTRENO	33,7	11,8
ANTRACENO	43,7	29,5
FLUORANTENO	74,2	7,0
PIRENO	59,5	-7,9
B[A]A	-	- 300
CRISENO	-	- 132,5
B[A]AC	-	- 814
B[A]FLUORANTENO	-	-
B[K]F	-	-
B[A]P	-	- 364,2
INDENO		
D[A,H]A	-	-3.147,8
B[GHI]P		- 948

### 5.3 Validação da metodologia para análise dos HPAs

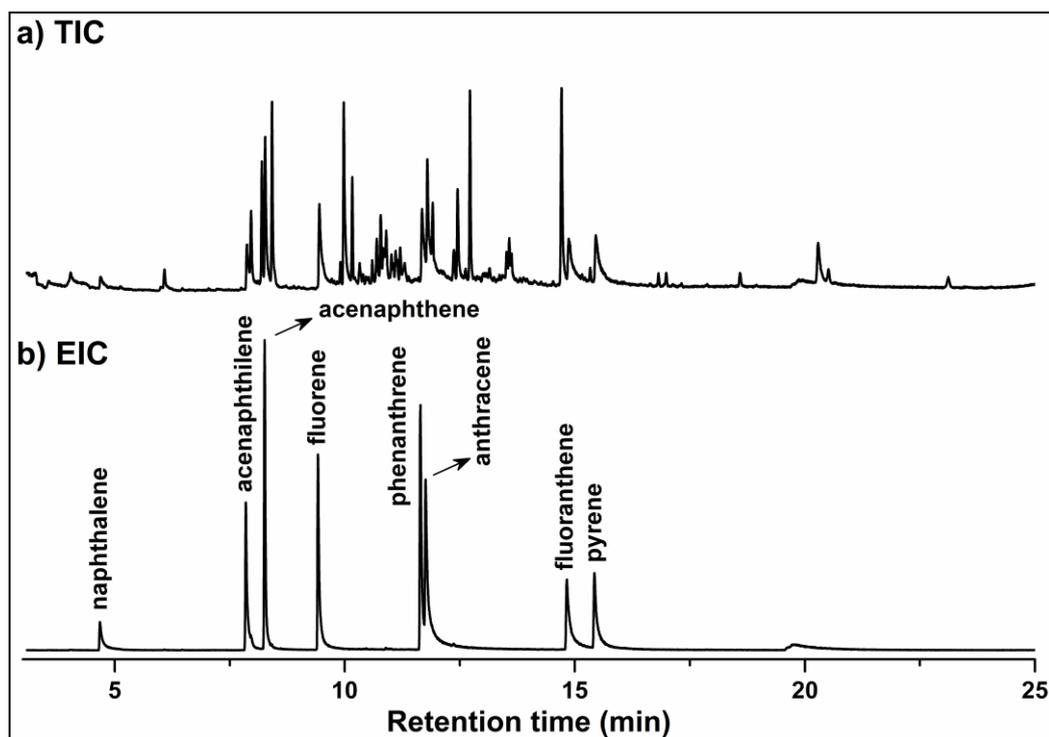
#### 5.3.1 Seletividade

Detectores modernos de massas, possuem ferramentas capazes de extrair o cromatograma dos analitos de interesse usando as ferramentas, tais como: cromatograma de íon extraído (IEC) e cromatograma de íons totais (TIC). A Figura 23 mostra uma comparação

entre os cromatogramas obtidos em diferentes modos de aquisição, como cromatograma de íons totais (TIC) e cromatograma de íons extraídos (EIC). Pode-se observar que o modo TIC de varredura apresenta baixa seletividade para os HPAs devido à sobreposição elevada dos fragmentos de íons (Fig. 23a). Isso ocorreu porque o modo TIC faz a varredura de todos os fragmentos de íons gerados durante a detecção (ALCÂNTARA *et al.*, 2018). Por outro lado, o modo EIC permite extrair íons específicos para a identificação de um composto alvo, conforme ilustrado na Figura 23b.

Portanto, o modo EIC foi selecionado para o desenvolvimento e validação do método SPME- GC-MS estudado devido a sua seletividade mais adequada para todos os analitos de HPAs.

Figura 23 - Cromatograma CG-EM da amostra de café fortificada ( $10 \mu\text{g. L}^{-1}$ ) obtida empregando modo TIC (a) e modo EIC (b).



Comparando-se o EIC com o TIC nota-se menor intensidade dos sinais no cromatograma EIC, considerando que o EIC se utiliza apenas do pico base do composto, que é o íon com maior intensidade observado no espectro, já o TIC faz a somatória das contribuições de todos os íons selecionadas para confirmação do composto, além do referido íon de identificação.

Após, isso é necessário selecionar o fragmento correto do espectro de massas do analito alvo, obtendo-se assim, ganho de seletividade e sensibilidade. Para os HPAs e padrões internos foram usados os fragmentos de valores de  $m/z$  discriminados na tabela 14.

Tabela 14 - Compostos eluídos e seus respectivos tempos de retenção e íons monitorados no modo EIC.

<b>Composto</b>	<b>Tempo de retenção</b>	<b>Íons (<math>m/z</math>)</b>
Naftaleno-d8	4.52	<b>136</b> , 135, 137
Naftaleno	4.57	<b>128</b> , 127, 129
Acenaftileno	7.82	<b>152</b> , 151, 150
Acenafteno-d10	8.12	<b>164</b> , 163, 162
Acenafteno	8.24	<b>154</b> , 153, 152
Fluoreno	9.41	<b>166</b> , 165, 163
Fenantreno-d10	11.57	<b>188</b> , 99, 186
Fenantreno	11.64	<b>178</b> , 89, 176
Antraceno	11.75	<b>178</b> , 89, 176
Fluoranteno	14.79	<b>202</b> , 101, 200
Pireno	15.40	<b>202</b> , 101, 200
Benzo[a]antraceno	19.29	<b>228</b> , 114, 226
Criseno-d12	19.35	<b>240</b> , 238, 125
Criseno	19.33	<b>228</b> , 226, 113
Benzo[b]fluoranteno	24.41	<b>252</b> , 126, 250
Benzo[k]fluoranteno	24.54	<b>252</b> , 126, 250
Benzo[a]pireno	25.64	<b>252</b> , 126, 250
Perileno-d12	26.34	<b>264</b> , 132, 260
Indeno[g, h, i-c,d]pireno	28.67	<b>276</b> , 138, 137
Dibenzo[a,h]antraceno	28.81	<b>278</b> , 139, 276
Benzo[g,h,i]perileno	29.37	<b>276</b> , 138, 137

Dessa forma, todos os dados foram tratados utilizando o cromatograma do íon extraído (EIC) de cada um dos analitos pois este apresenta maior visibilidade de pico (ALCÂNTARA *et al.*, 2018).

### 5.3.2. Efeito matriz

Na avaliação estatística dos estudos de efeito matriz foi observada influência significativa da matriz apenas para os compostos acenaftileno, acenafteno, fluoreno e fluoranteno. Na tabela 15 são apresentados os resultados dos testes  $F$  de *Fisher-Snedecor*, calculados a partir dos valores de variância obtidos para a inclinação no solvente e na matriz ( $s^2_{a,s}$  e  $s^2_{a,m}$ ), assim como para os interceptos ( $s^2_{b,s}$  e  $s^2_{b,m}$ ). Como as curvas foram obtidas em triplicata, os graus de liberdade associados ao numerador e ao denominador foram  $\nu_1 = \nu_2 = 2$ , com o valor  $F_{crit} = 19,00$ , considerando nível de confiança de 95 %. Para o composto fenantreno, por exemplo, é observado que a matriz afeta significativamente a variância do parâmetro de regressão inclinação (a), com  $F_{calc,a} = 51.02$ , sendo dessa forma  $F_{calc,a} > F_{crit}$ . Este teste sugere que, do ponto da análise quantitativa do referido composto, a matriz afeta a precisão das medidas de maneira importante, para o nível de confiança adotado (MAPA 2011; MARTINS *et al.*, 2018).

Tabela 15 - Teste  $F$  de comparação de variâncias ( $s^2_i$ ) das curvas de regressão utilizando solvente e matriz, considerando  $F_{crit} = 19,00$  ( $\nu_1 = 2/\nu_2 = 2$ ) e teste  $t$  de Student com nível de confiança de 95%.

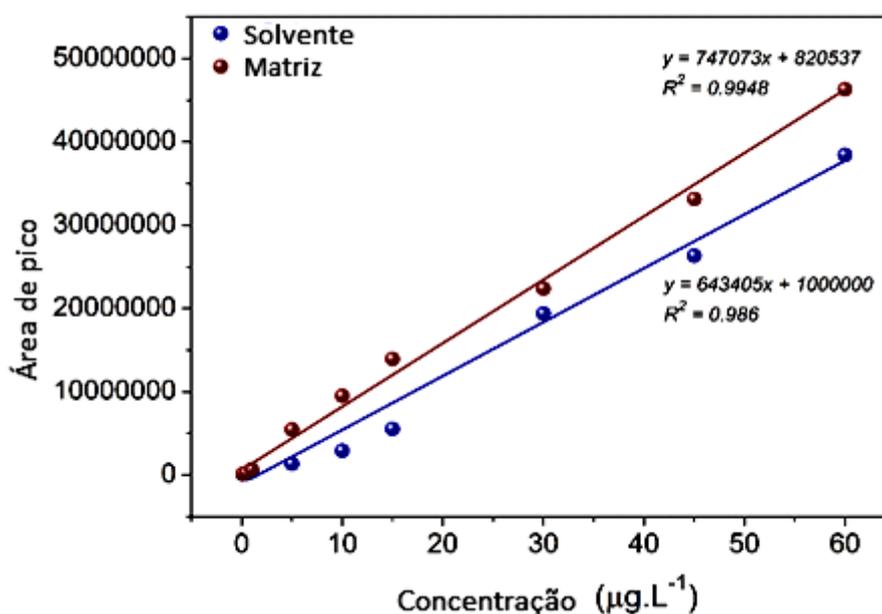
PAHs*	$F_{calc,a}$	$F_{calc,b}$	$t_{calc,a}$	$t_{crit,a}$	$t_{calc,b}$	$t_{crit,b}$
Naph	4.610	6.53	22.07	2.18 ( $\nu = 12$ )	4.960	2.20 ( $\nu = 11$ )
Aphthy	0.210	70.20	2.16	2.18 ( $\nu = 12$ )	0.140	2.31 ( $\nu = 8$ )
Aphth	6.120	116.53	5.45	2.20 ( $\nu = 11$ )	0.002	2.31 ( $\nu = 8$ )
Flu	1.580	2833.51	2.80	2.11 ( $\nu = 17$ )	6.210	2.31 ( $\nu = 8$ )
Phen	51.02	0.01	5.72	2.31 ( $\nu = 8$ )	2.980	2.31 ( $\nu = 8$ )
Ant	0.010	7.30	3.58	2.31 ( $\nu = 8$ )	5.360	2.20 ( $\nu = 11$ )
Fluo	0.005	47.63	10.31	2.31 ( $\nu = 8$ )	8.050	2.31 ( $\nu = 8$ )
Pyr	0.003	0.01	7.86	2.31 ( $\nu = 8$ )	3.280	2.31 ( $\nu = 8$ )

\* Legenda: Naf – naftaleno; aceftl – acenaftileno; aceft – acenafteno; flu – fluoreno; fen – fenantreno; ant – antraceno; fluo – fluoranteno; pir – pireno.

No teste  $t$  de *Student* para a comparação dos valores absolutos dos parâmetros de regressão, observamos que apenas o composto acenaftileno não parece sofrer influência significativa da matriz sobre sua quantificação, como reportado na tabela 15. O valor de  $t_{calc,a}$

= 2.16, com valor  $t_{crit} = 2.18$  ( $\nu = 12$ ), sendo portanto  $t_{calc,a}$  é apenas levemente maior que  $t_{crit,a}$ , e o  $t_{calc,b} = 0.14$ , com valor  $t_{crit} = 2.31$  ( $\nu = 8$ ), esse fato defende a hipótese nula de que as inclinações são iguais. Se a hipótese nula não for rejeitada, considera-se que não há efeito matriz significativo. Neste caso, as retas de regressão podem ser consideradas paralelas, neste caso a calibração por padrão externo pode ser aplicada ao invés de calibração por superposição na matriz o que tornaria o método operacionalmente mais simples (ANVISA, 2017). Essa situação pode ser observada na figura 24.

Figura 24 - Curvas de calibração do acenaftileno solubilizado no solvente (azul) e matriz (vermelho).



A partir das informações apresentadas, verifica-se que a maioria dos analitos apresentaram efeito de matriz importante, de modo que as curvas de calibração aplicadas nos cálculos para estudos posteriores de validação foram as obtidas na matriz. As propriedades complexas da matriz de café, bem como a presença de muitas substâncias voláteis, pode levar a efeitos de ionização dos componentes co-eluídos da matriz. Poucas alternativas são sugeridas para compensar o efeito matriz, incluindo padrões internos marcados isotopicamente e calibrações matriciais (método de adição de padrão) (CHOI *et al.*, 2015). No presente estudo, foram empregados os padrões deuterados (como *surrogates*) para os outros parâmetros de validação. A vantagem em se utilizar padrões *surrogates* está justamente em compensar erros que possam surgir em decorrência de efeitos da matriz na detecção e

quantificação dos analitos, gerando resultados mais confiáveis (SANTOS *et al.* 2019; GUATEMALA-MORALES *et al.*, 2016).

O experimento mostrou que a maioria dos analitos foi influenciada pelo efeito da matriz, o que sugeriu o uso da calibração com matriz combinada (POOLE, 2007). A complexidade das amostras de café (muitos compostos coeluídos) favoreceu a competição entre os PAHs no adsorvente de fibra SPME e outros compostos voláteis (SILVA *et al.*, 2017). Existem poucas metodologias alternativas publicadas para compensar o efeito da matriz, incluindo padrões internos marcados isotopicamente, bem como o método de adição padrão (CHOI *et al.*, 2015). Nesse sentido, este estudo utilizou padrões deuterados (surrogates) para o desenvolvimento da validação do método, o que é vantajoso para compensar erros do efeito de matriz durante a detecção e quantificação, gerando resultados confiáveis (CAVALCANTE *et al.*, 2012).

O efeito de matriz geralmente aumenta ou suprime o sinal analito devido à presença de componentes coeluídos da amostra. Este fato pode influenciar direta ou indiretamente as interferências durante a análise cromatográfica (PÁLENÍKOVÁ *et al.*, 2015). A Figura 25 mostra o efeito de matriz para amostras fortificadas com 1, 15 e 45  $\mu\text{g L}^{-1}$  de HPAs: naftaleno (a), acenaftileno (b), acenafteno (c), fluoreno (d), fenantreno (e), antraceno (f), fluoranteno (g) e pireno (h).

Dentre os compostos, o naftaleno, acenaftileno, acenafteno e fluoreno apresentaram efeito positivo, o que sugere que a presença do efeito matriz pode causar uma superestimação dos sinais. Por outro lado, antraceno, fluoranteno, fenantreno e pireno apresentaram efeito de matriz negativo. A maior inclinação da curva pela presença da matriz do que na presença do solvente pode ser observada na Figura 26a. O efeito negativo da matriz ilustrado na Figura 26b significa que a presença da matriz suprime o sinal do analito, o que resulta na subestimativa da quantidade do composto. Sabe-se que a magnitude do efeito da matriz depende das propriedades físico-químicas dos HPAs, como peso molecular, estabilidade térmica e ponto de ebulição (RASCÓN *et al.*, 2019; TAN *et al.*, 2019). A composição da amostra também contribuiu para a magnitude do efeito da matriz. Portanto, as respostas do analito presentes na solução padrão e na amostra de café foram acima ou subestimadas. Outros estudos indicaram que compostos orgânicos, como fenóis, ésteres, cetonas, lactonas e pirazinas presentes no café podem interferir na extração de HPAs em

amostras de café, bem como na análise cromatográfica (CAPORASO *et al.*, 2018). No entanto, essa verificação não foi realizada neste estudo.

Além disso, durante a extração de SPME no modo *headspace*, diversos compostos, além das substâncias de interesse, podem ser co-extraídos pela fibra e saturá-los, o que reduz a extração de HPAs. Portanto, essas hipóteses provavelmente podem explicar o efeito negativo nas análises de HPAs com maior peso molecular (maior número de anéis) (RASCÓN *et al.*, 2019).

Figura 25 - Percentual de efeito matriz dos HPAs (EM,%) em amostras de café.

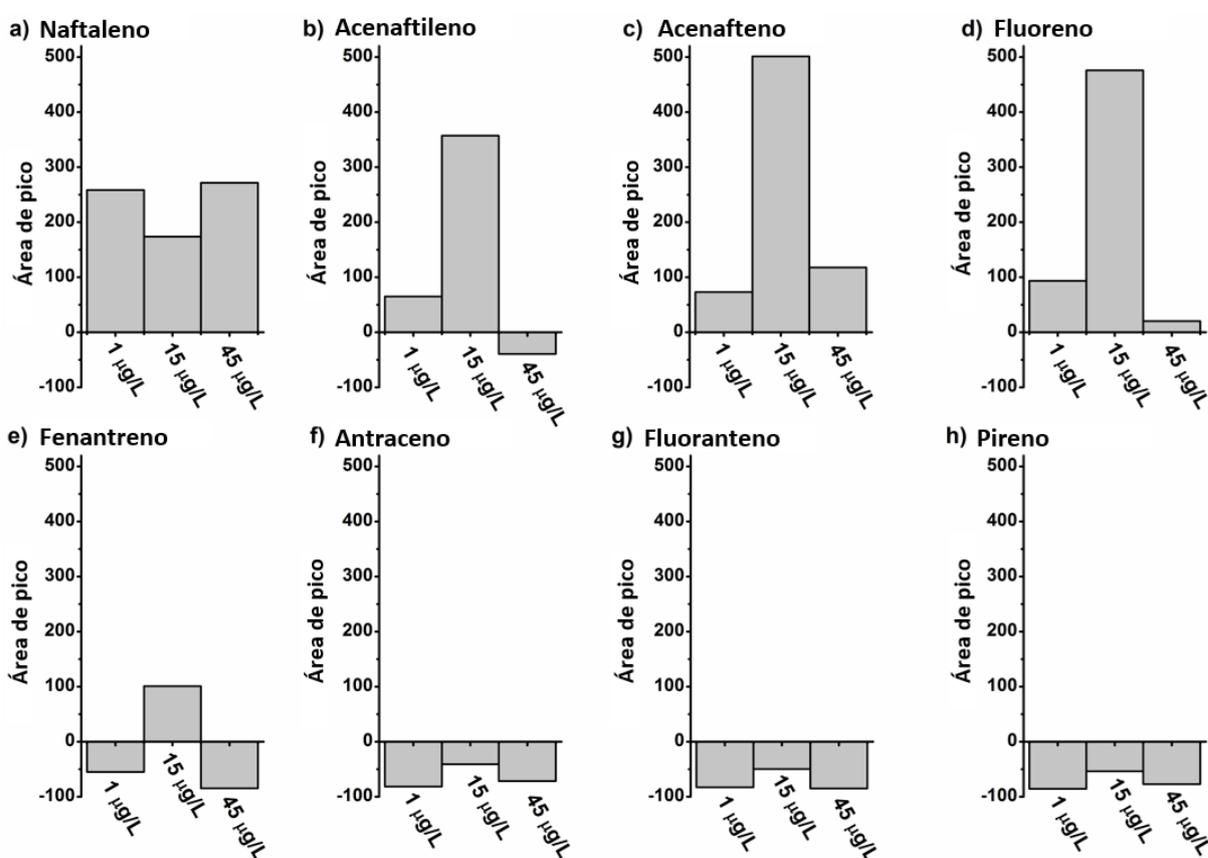
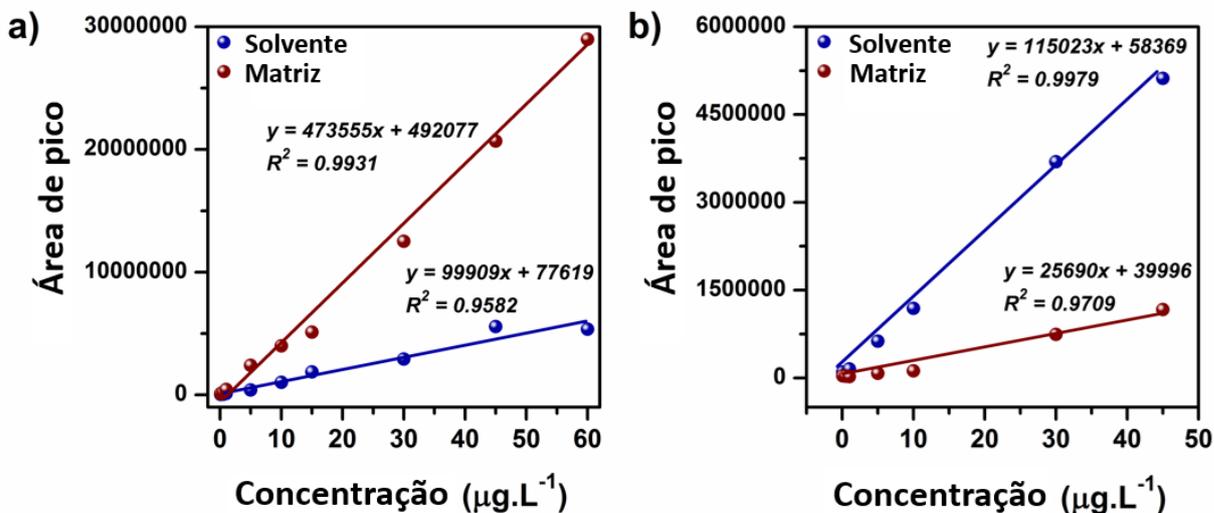


Figura 26 - Curvas de calibração obtidas pelo sistema HS-SPME-GC-MS para quantificação de naftaleno (a) e pireno (b) solubilizado em solvente puro (azul) e matriz de café (vermelho).



### 5.3.3. Linearidade e Estatística

O estudo de linearidade para os analitos compreendeu dentre os 16 compostos ajustes considerando as abordagens de análise de regressão por mínimos quadrados ordinários (OLS) e mínimos quadrados ponderados (WLS), ver tabela 16. O método apresentou melhores ajustes lineares para maioria dos HPAs através da abordagem mais usual OLS, com exceção de naftaleno (Naf), acenafteno (Aceft), antraceno (Ant) e fluoranteno (Fluo) os quais apresentaram heterocedasticidade significativa, sendo suas curvas de calibração estimadas via regressão WLS.

Tabela 16 - Parâmetros de calibração estatística da linearidade dos 16 HPAs alvo: coeficientes de correlação ( $r$ ); Teste  $t$  de Student calculado ( $t_r$ ) e  $t$  tabelado ( $t_{crit}$  com  $\alpha = 0.05$ ); faixa de linearidade; e resultados de teste  $F$  calculado ( $F_{calc}$ ) e tabelado ( $F_{crit}$ ,  $f = 2$ ;  $k$ ;  $\alpha = 0.05$ ) para avaliar a homogeneidade da variância ( $k =$  número de grupos de calibração de pontos).

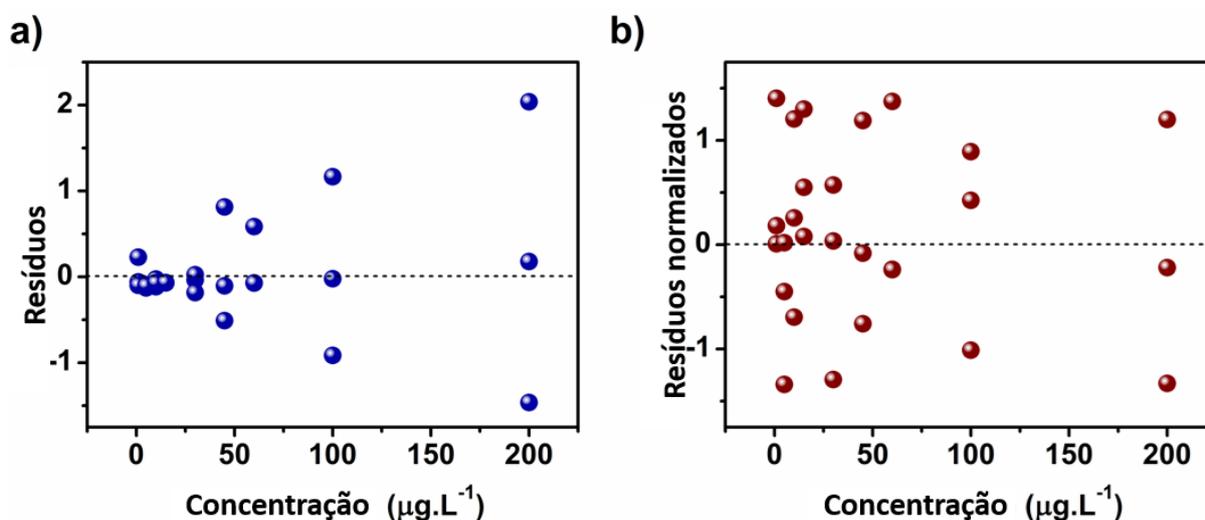
HPAs*	Modelo	Curva de calibração	$r$	$t_r$	$t_{crit}$	Faixa ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	$F_{calc}$	$F_{crit}$ ( $f = 2; k$ )
Naf	WLS	$y = 0,0021x - 0,0005$	0,9988	58,68	2,31 ( $v = 8$ )	0,50- 500	1031660,8	550 ( $k=10$ )
Aceftl	OLS	$y = 0,0174x - 0,0621$	0,9955	27,79	2,36 ( $v = 7$ )	0,65- 200	46,3	475 ( $k=9$ )
Aceft	WLS	$y = 0,0209x + 0,0021$	0,9968	33,09	2,36 ( $v = 7$ )	0,92- 200	4228,0	475 ( $k=9$ )
Flu	OLS	$y = 0,0238x - 0,0104$	0,9954	27,49	2,36 ( $v = 7$ )	0,80- 200	39,5	475 ( $k=9$ )
Fen	OLS	$y = 0,0021x - 0,0009$	0,9985	48,25	2,36 ( $v = 7$ )	4,20- 200	31,9	475 ( $k=9$ )
Ant	WLS	$y = 0,0029x + 0,0012$	0,9982	43,97	2,36 ( $v = 7$ )	3,63- 200	21070,7	475 ( $k=9$ )
Fluo	WLS	$y = 0,0043x + 0,0018$	0,9987	52,15	2,36 ( $v = 7$ )	4,22- 200	16995,7	475 ( $k=9$ )
Pir	OLS	$y = 0,0056x + 0,0016$	0,9957	30,40	2,31 ( $v = 8$ )	6,29- 500	218,4	550 ( $k=10$ )
B(a)a	OLS	$y = 0,0012x - 0,0077$	0,9950	28,18	2,31 ( $v = 8$ )	6,48- 500	108,4	550 ( $k=10$ )
Cri	OLS	$y = 0,0046x + 0,0400$	0,9911	19,70	2,36 ( $v = 7$ )	5,28- 200	199,8	475 ( $k=9$ )
B(b)f	OLS	$y = 0,0093x + 0,1705$	0,9972	37,72	2,31 ( $v = 8$ )	3,86- 500	122,4	550 ( $k=10$ )
B(k)f	OLS	$y = 0,0018x + 0,0642$	0,9943	22,84	2,31 ( $v = 8$ )	2,67- 500	158,1	550 ( $k=10$ )
B(a)p	OLS	$y = 0,0107x + 0,3816$	0,9929	23,61	2,31 ( $v = 8$ )	6,72- 500	226,3	550 ( $k=10$ )
Ind	OLS	$y = 0,0021x + 0,0789$	0,9935	21,38	2,31 ( $v = 8$ )	3,53- 500	230,9	550 ( $k=10$ )
D(a,h)a	OLS	$y = 0,0012x + 0,0485$	0,9933	21,05	2,31 ( $v = 8$ )	3,36- 500	268,2	550 ( $k=10$ )
B(g,h,i)p	OLS	$y = 0,0023x + 0,0921$	0,9929	18,66	2,31 ( $v = 8$ )	1,83- 500	261,4	550 ( $k=10$ )

\* Naf – naftaleno; aceftl – acenaftileno; aceft – acenafteno; flu – fluoreno; fen – fenantreno; ant – antraceno; fluo – fluoranteno; pir – pireno; b(a)a - Benzo(a)antraceno; cri - criseno; b(b)f - benzo(b)fluoranteno; b(k)f - benzo(k)fluoranteno; b(a)p - benzo(a)pireno; ind - Indeno(1,2,3-cd)pireno; d(a,h)a - dibenzo(a,h)antraceno; b(g,h,i)p - benzo(g,h,i)perileno).

Os parâmetros estatísticos de calibração da linearidade e ajustes lineares foram obtidos para 16 HPA's (Tabela 16), com coeficientes de correlação entre 0,9911 (criseno) e 0,9988 (naftaleno). Além disso, valores de teste da qualidade do ajuste  $t_r > t_{crit}$  foi alcançado para todas as análises sob um nível de confiança de 95%. Os compostos analisados apresentaram linearidade entre 0,50 a 500  $\mu\text{g. L}^{-1}$ .

A Figura 27 mostra os gráficos de resíduos do modelo considerando o método dos mínimos quadrados ordinários MMQO (a) e método dos mínimos quadrados ponderados MMQP (b), para o acenafteno, que apresentou heterocedasticidade estatística significativa em relação com os demais HPA's. A avaliação da dispersão dos resíduos (a) em relação aos normalizados (b) apresenta a maior homogeneidade dos resíduos normalizados alcançada pela análise de regressão ( $d_{y, norm}$ ). Além disso, nas análises de calibração de naftaleno, acenafteno, antraceno e fluoranteno, a regressão MMQP apresentou ajuste aleatório para os resíduos normalizados e, portanto, mostrou a regressão mais adequada para estimativa dos modelos de calibração.

Figura 27 - Gráficos de resíduos ( $d_y$ ) para a calibração do acenafteno via MMQO (a) e MMQP (b).



#### 5.3.4. Limite de detecção e limite de quantificação

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) do método, determinados neste estudo com base nos parâmetros da curva analítica (equações 11 a 15), apresentaram valores entre 0,39  $\mu\text{g/kg}$  a 2,02  $\mu\text{g/kg}$  e 1,20  $\mu\text{g/kg}$  a 6,48  $\mu\text{g/kg}$ , respectivamente. Resultados semelhantes foram encontrados em um estudo de GUATEMALA-MORALES et al. (2016) em que os valores de LD e LQ encontrados apresentaram-se em concentrações entre 0,38  $\mu\text{g/kg}$  a 2,60  $\mu\text{g/kg}$  e 1,27  $\mu\text{g/kg}$  a 7,20  $\mu\text{g/kg}$ , respectivamente.

Para os composto pireno, benzo(a)antraceno e benzo(a)pireno os valores de LD e LQ não foram satisfatórios considerando a abordagem de estimativa com base nos parâmetros da curva analítica uma vez que os valores de LD desses compostos se apresentam maiores que o limite mínimo das curvas de calibração expostas na tabela 16. Entretanto, considerando a razão sinal/ruído foi possível conduzir a detecção e quantificação destes analitos nos níveis mais baixos da faixa de trabalho. Para tais analitos foram definidos como LQ os valores de concentração do limite mínimo estabelecido nas suas respectivas faixas de trabalho, após estudo de linearidade.

Os Limites Máximos de Resíduos (LMRs) são estabelecidos pela legislação de algumas instituições como a União Europeia, que atuam no controle da exposição da população a substâncias tóxicas. De acordo com o Regulamento (UE) No 835/2011 da Comissão, 4 indicadores de HPAs dos 15 presentes na lista do Comitê Científico de Alimentos (SCF - *Scientific Committee on Food*) devem ser monitorados em alimentos e define os níveis máximos de HPAs (BaP e 4 HPAs) em vários grupos de alimentos. A soma dos marcadores de HPA's em alimentos não deve exceder  $10 \mu\text{g.kg}^{-1}$  para óleos e gorduras,  $35 \mu\text{g.kg}^{-1}$  para grãos de cacau e produtos derivados,  $30 \mu\text{g.kg}^{-1}$  para carne defumada, produtos cárneos, peixes, produtos da pesca e espadilha e  $1 \mu\text{g.kg}^{-1}$  para alimentos para bebês e alimentos dietéticos para fins médicos especiais (UE 2011).

Uma análise quantitativa dos HPAs no café também pode ser encontrada nos relatórios técnicos fornecidos pela Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA 2008), que propõem que apenas oito HPAs têm propriedades cancerígenas potenciais nos alimentos: benzo [a] pireno; benzo[a]antraceno; benzo[b]fluoranteno; benzo[k]fluoranteno; benzo[ghi]perileno; criseno; dibenzo[a,h]antraceno; e indeno[1,2,3-cd]pireno. Nos EUA, a Snack Food Association (SFA) determina que as quantidades de compostos aromáticos usados em condimentos durante a produção de alimentos processados não devem exceder  $10 \mu\text{g.kg}^{-1}$  de benzo[a]pireno e  $20 \mu\text{g.kg}^{-1}$  de benzo[a]antraceno. No Brasil, a legislação atual determina que a água destinada ao consumo humano deve apresentar teor de benzo[a]pireno inferior a  $0,4 \mu\text{g.L}^{-1}$ , não existindo LMR de HPAs para outros alimentos (ANVISA, 2021).

### ***5.3.5. Precisão e exatidão***

A precisão do método foi avaliada pelo desenvolvimento de seis soluções de calibração utilizando padrão nas concentrações: 5, 15 e 60  $\mu\text{g. L}^{-1}$ . A precisão intra-dia (repetibilidade) foi avaliada utilizando os dados de HPAs de seis repetições adquiridas no mesmo dia e equipamento, e feitas pelo mesmo analista. Os percentuais foram calculados para cada analito com o coeficiente de variação (CV, %) e estão descritos na Tabela 17. Todas as matrizes apresentaram precisão intra-dia aceitável para os níveis de concentração avaliados por valores de CV inferiores a 22%. De acordo com os critérios estabelecidos pela decisão 2002/657/CE,  $CV (\%) \leq 20\%$  são adequados para este método e os valores obtidos ficaram dentro do aceitável (EC, 2002). Sabe-se, ainda, que os coeficientes de variação não devem ultrapassar 30% para o nível 1 e 20% para os níveis 2 e 3, de acordo com os critérios estabelecidos pelo Ministério da Agricultura (MAPA, 2011).

Tabela 17 - Repetibilidade (CV, %), recuperação (%) para os níveis baixo, médio e alto de concentração, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) e resultados quantitativos dos HPAs determinados em diferentes amostras de preparação de café, considerando a concentração média  $\pm$  desvio padrão para  $n = 3$ , e  $\Sigma$  16 HPAs é a soma de todos os 16 HPAs.

HPAs*	Repetibilidade, CV (%)			Recuperação (%)			Concentração de HPA's em amostras de cafés				
	5 $\mu\text{g.L}^{-1}$	15 $\mu\text{g.L}^{-1}$	60 $\mu\text{g.L}^{-1}$	5 $\mu\text{g.L}^{-1}$	15 $\mu\text{g.L}^{-1}$	60 $\mu\text{g.L}^{-1}$	LD ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )	LQ ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )	<i>Expresso</i>	<i>Comum</i>	<i>Solúvel</i>
Naf	19,86	13,48	13,62	116 $\pm$ 28,1	126 $\pm$ 9,90	62 $\pm$ 0,30	0,08	0,50	< LOQ	< LOQ	< LOD
Aceftl	21,44	18,69	8,09	71 $\pm$ 14,0	75 $\pm$ 12,1	85 $\pm$ 15,3	0,12	0,65	< LOQ	0,74 $\pm$ 0,27	< LOQ
Aceft	12,51	17,01	14,45	87 $\pm$ 15,4	86 $\pm$ 14,7	93 $\pm$ 13,4	0,14	0,92	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Flu	21,43	11,47	12,93	61 $\pm$ 17,1	59 $\pm$ 12,7	67 $\pm$ 15,3	0,17	0,80	< LOD	< LOQ	< LOD
Fen	18,84	14,52	16,14	166 $\pm$ 13,9	61 $\pm$ 0,00	97 $\pm$ 8,70	1,26	4,20	< LOD	< LOD	< LOD
Ant	17,40	12,92	13,46	56 $\pm$ 2,10	59 $\pm$ 2,00	75 $\pm$ 2,40	1,09	3,63	< LOQ	< LOD	< LOQ
Fluo	21,18	17,48	18,29	61 $\pm$ 5,30	53 $\pm$ 2,20	64 $\pm$ 3,20	1,26	4,22	5,50 $\pm$ 2,5	9,07 $\pm$ 0,37	< LOQ
Pir	12,66	13,89	17,58	71 $\pm$ 9,90	88 $\pm$ 4,90	113 $\pm$ 5,30	1,89	6,29	< LOD	< LOD	7,33 $\pm$ 4,08
B(a)a	14,29	10,61	12,65	109 $\pm$ 12,7	123 $\pm$ 0,00	97 $\pm$ 7,40	1,94	6,48	< LOD	< LOD	< LOD
Cri	12,52	9,32	8,93	93 $\pm$ 11,7	108 $\pm$ 19,1	87 $\pm$ 20,7	1,58	5,28	< LOD	< LOD	< LOD
B(b)f	16,25	10,50	12,45	71 $\pm$ 9,90	123 $\pm$ 4,90	113 $\pm$ 5,30	1,46	3,86	< LOD	< LOD	< LOD
B(k)f	19,50	8,39	6,58	76 $\pm$ 5,60	68 $\pm$ 6,70	69 $\pm$ 3,40	0,80	2,67	< LOD	< LOD	< LOD
B(a)p	18,40	13,60	9,71	94 $\pm$ 5,70	68 $\pm$ 2,80	54 $\pm$ 2,00	2,02	6,72	< LOD	< LOD	< LOD
Ind	18,42	14,23	12,42	107 $\pm$ 4,20	128 $\pm$ 3,50	136 $\pm$ 1,70	1,17	3,53	< LOD	< LOD	< LOD
D(a,h)a	21,89	11,87	12,59	91 $\pm$ 5,70	110 $\pm$ 12,5	95 $\pm$ 9,30	1,11	3,36	< LOD	< LOD	< LOD
B(g,h,i)p	11,70	11,31	13,20	63 $\pm$ 2,60	79 $\pm$ 6,50	104 $\pm$ 6,20	0,55	1,83	< LOD	< LOD	< LOD
$\Sigma$ 16 HPAs									5,50	9,81	7,33

\* Naf – naftaleno; aceftl – acenaftileno; aceft – acenafteno; flu – fluoreno; fen – fenantreno; ant – antraceno; fluo – fluoranteno; pir – pireno; b(a)a - Benzo(a)antraceno; cri - criseno; b(b)f - benzo(b)fluoranteno; b(k)f - benzo(k)fluoranteno; b(a)p - benzo(a)pireno; ind - Indeno(1,2,3-cd)pireno; d(a,h)a - dibenzo(a,h)antraceno; b(g,h,i)p - benzo(g,h,i)perileno).

A exatidão do método foi alcançada pela recuperação dos HPAs, que variou de 53 a 166% (Tabela 17). A recuperação é considerada satisfatória variando de 70 a 120% (para o nível 1) e 80 a 120% (para os níveis 2 e 3), o que indicou que o método proposto poderia ser aplicado com sucesso para a determinação de HPAs em diferentes amostras de café (expresso, comum e solúvel).

Resultados semelhantes para a recuperação de PAHs podem ser encontrados na literatura. Orecchio *et al.*, (2009) relataram recuperações de 85 a 100% para 28 PAHs na mistura de café com base na saponificação e extração líquido-líquido com pequenos volumes de hexano. Shi *et al.*, (2016) encontraram de 88,2 a 102,7% para 7 PAHs em amostras de café e chá para extração magnética em fase sólida com HPLC-FLD. Tfouni *et al.* (2013) de 77 a 87% para 4 PAHs na bebida de café analisada por HPLC com detecção de fluorescência. Por fim, Santos *et al.* 2019 de 82,1 a 96,3% para 16 PAHs e alguns derivados em preparações de café usando microextração de fibra fria em fase sólida e método de espectrometria de massa por cromatografia gasosa.

#### **5.4 Aplicação do método validado para determinação dos HPAs em amostras reais de café**

A análise quantitativa de HPAs foi realizada através da aplicação de equações de calibração estimadas e ajustadas por regressões MMQO e MMQP, que são modelos adequados para a previsão das concentrações dos analitos (tabela 16). Naftaleno, acenafteno, acenaftileno, fluoreno, antraceno e fluoranteno, bem como resíduos de fenantreno e benzo[a]pireno, foram detectados nas amostras de preparação de café de diferentes tipos, café expresso, café comum e café solúvel (tabela 17).

As concentrações médias de naftaleno, acenafteno, acenaftileno, fluoreno, antraceno, fenantreno e benzo[a]pireno estão abaixo dos Limites Máximos de Resíduos (LMRs) estabelecidos por publicação anterior desses compostos, mas em outras matrizes que não o café (REAS 2016). Por outro lado, as concentrações de fluoranteno estão acima dos valores de LMRs considerados. Observamos ainda que a concentração total média de HPAs ( $\Sigma$  16 HPAs) nas preparações de café em pó comum era mais alta, seguida pelas preparações de café solúvel. A menor concentração total foi observada nas preparações de café expresso.

A maior concentração foi observada para o fluoranteno ( $9,07 \pm 0,37 \mu\text{g. L}^{-1}$ ) na amostra do café comum (coado), bem como a concentração de  $5,50 \pm 2,5 \mu\text{g. L}^{-1}$  no café expresso. Moléculas de HPAs com maior número de anéis não foram detectadas.

#### ***5.4.1 Análises das amostras das preparações (café bebida)***

Nas tabelas 18 e 19 são reportados os resultados analíticos das amostras obtidas pelos dois modos de preparo da bebida de café, cozimento e infusão, respectivamente, trazendo os resultados para os HPAs que foram efetivamente quantificados em cada amostra e os que foram apenas detectados. O critério para definir os HPAs que estavam presentes na amostra, mas que não foram passíveis de quantificação foi baseado nos parâmetros LOQ e LOD. Compostos que se apresentaram abaixo do limite de quantificação (LOQ), mas acima do limite de detecção (LOD) foram considerados presentes, porém não quantificáveis.

Na avaliação comparativa entre as classes de café foi observado um conjunto geral de HPAs detectados nas amostras, com algumas diferenças importantes. Nas amostras do grupo de alta qualidade, preparadas por cozimento, foram quantificados naftaleno ( $1,4 \pm 0,8 \mu\text{g.kg}^{-1}$ ) e fluoreno ( $0,7 \pm 0,6 \mu\text{g.kg}^{-1}$ ) e detectados os compostos acenaftileno, antraceno e o acenafteno, este último em apenas uma amostra. Nas amostras de infusão foram detectados todos os anteriores, com naftaleno ( $0,9 \pm 0,7 \mu\text{g.kg}^{-1}$ ) e fluoreno ( $0,6 \pm 0,6 \mu\text{g.kg}^{-1}$ ), exceção do acenafteno. O fluoranteno foi apenas identificado, mas se apresentou abaixo do LOQ em ambos os processos de preparação.

Tabela 18 - Resultados analíticos para as amostras preparadas via processo 1 (cozimento). Os resultados correspondem a concentração média observada em cada amostra e desvio padrão. Para resultados < LOD o analito não foi detectado; para < LOQ o analito foi detectado, porém não quantificado  $\Sigma$  PAH = concentração total de PAHs quantificados na amostra.

Amostras de Alta Qualidade ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )					
PAH	AC	H	ME	CL	O
Naphthalene	$0,6 \pm 0,20$	$0,8 \pm 0,20$	$2,1 \pm 0,20$	$2,1 \pm 0,70$	Detected
Acenaftilene	Detected	Detected	Detected	Detected	Detected
Acenaftene	< LOD	< LOD	< LOD	Detected	< LOD
Fluorene	Detected	$1,0 \pm 0,04$	$1,2 \pm 0,08$	Detected	< LOD
Phenanthrene	< LOD				
Anthracene	Detected	Detected	< LOD	Detected	Detected
Fluoranthene	$4,2 \pm 0,20$	Detected	< LOD	Detected	$4,3 \pm 0,20$
Pyrene	< LOD				
Benzo [a] anthracene	< LOD				
Chrysene	< LOD				
Benzo [b] fluoranthene	< LOD				
Benzo [k] fluoranthene	< LOD				
Benzo [a] pyrene	< LOD				
Indene [1,2,3-cd] pyrene	< LOD				
Dibenzo [ah] anthracene	< LOD				
Benzo [ghi] perylene	< LOD				
$\Sigma$ PAH	$4,8 \pm 0,30$	$1,8 \pm 0,20$	$3,3 \pm 0,20$	$2,1 \pm 0,70$	$4,3 \pm 0,20$
Amostras de Qualidade Comum ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )					
PAH	SC	ML	TC	PL	KM
Naphthalene	< LOD	$0,5 \pm 0,01$	Detected	Detected	Detected
Acenaftilene	Detected	Detected	< LOD	Detected	Detected
Acenaftene	< LOD				
Fluorene	$1,1 \pm 0,02$	< LOD	< LOD	Detected	Detected
Phenanthrene	< LOD				
Anthracene	Detected	< LOD	Detected	Detected	< LOD
Fluoranthene	< LOD	< LOD	Detected	< LOD	Detected
Pyrene	< LOD				
Benzo [a] anthracene	< LOD	Detected	Detected	< LOD	< LOD
Criseno	< LOD	Detected	< LOD	< LOD	< LOD
Benzo [b] fluoranthene	< LOD				
Benzo [k] fluoranthene	< LOD				
Benzo [a] pyrene	< LOD				
Indene [1,2,3-cd] pyrene	< LOD				
Dibenzo [ah] anthracene	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	$4,5 \pm 0,04$
Benzo [ghi] perylene	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	$2,5 \pm 0,03$
$\Sigma$ PAH	$1,1 \pm 0,02$	$0,5 \pm 0,01$	-	-	$7,0 \pm 0,07$

Nas amostras da classe de qualidade comum foram quantificados os compostos acenaftileno ( $0,3 \pm 0,40 \mu\text{g.kg}^{-1}$ ), fluoreno ( $0,4 \pm 0,60 \mu\text{g.kg}^{-1}$ ), fluoranteno ( $1,0 \pm 1,40 \mu\text{g.kg}^{-1}$ ), dibenzo[ah]antraceno ( $0,9 \mu\text{g.kg}^{-1}$ ) e benzo[ghi] perileno ( $0,5 \mu\text{g.kg}^{-1}$ ), os dois últimos apenas na amostra **KM**. Já o naftaleno, antraceno, benzo[a]antraceno e criseno (1 amostra, cozimento) foram apenas detectados, mas se apresentaram abaixo do limite de quantificação. Nas amostras de infusão foram identificados todos os anteriores, com exceção do criseno. Fluoreno e fluoranteno detectados em apenas uma amostra. Houve a detecção e quantificação

do indeno[1,2,3-cd]pireno na amostra **PL** a qual também apresentou os compostos dibenzo[ah]antraceno e benzo[ghi]perileno. Na amostra **KM** novamente observou-se os compostos dibenzo[ah]antraceno e benzo[ghi]perileno. A amostra **KM** é reconhecidamente uma marca do mercado tida como de menor qualidade e mais baixo custo, sendo também a que apresentou a maior concentração de HPAs totais nos dois modos de preparo,  $9,3 \pm 0,8 \mu\text{g.kg}^{-1}$  (fervido) e  $6,2 \pm 0,4 \mu\text{g.kg}^{-1}$  (filtrado).

Tabela 19 – Resultados analíticos para as amostras preparadas via processo 2 (infusão). Os resultados correspondem a concentração média observada em cada amostra e desvio padrão. Para resultados < LOD o analito não foi detectado; para < LOQ o analito foi detectado, porém não quantificado.  $\Sigma$  PAH = concentração total de PAHs quantificados na amostra.

Amostras de alta qualidade ( $\mu\text{g.kg}^{-1}$ )					
HPA	AC	H	ME	CL	O
Naftaleno	$0,8 \pm 0,02$	$1,9 \pm 0,60$	$1,0 \pm 0,10$	$0,9 \pm 0,50$	< LOD
Acenaftileno	Detected	Detected	Detected	Detected	Detected
Acenafteno	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
Fluoreno	< LOD	$1,2 \pm 0,10$	$1,0 \pm 0,06$	Detected	< LOD
Fenantreno	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
Antraceno	Detected	< LOD	< LOD	Detected	Detected
Fluoranteno	< LOD	< LOD	< LOD	Detected	< LOD
Pireno	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
Benzo[a]antraceno	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
Criseno	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
Benzo[b]fluoranteno	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
Benzo[k]fluoranteno	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
Benzo[a]pireno	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
Indeno[1,2,3-cd]pireno	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
Dibenzo[ah]antraceno	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
Benzo[ghi]perileno	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
$\Sigma$ HPA	$0,8 \pm 0,02$	$3,1 \pm 0,70$	$2,0 \pm 0,16$	$0,9 \pm 0,50$	-
Amostras de qualidade comum ( $\mu\text{g.kg}^{-1}$ )					
HPA	SC	TC	PL	KM	
Naftaleno	< LOD	Detected	Detected	Detected	
Acenaftileno	Detected	< LOD	Detected	< LOD	
Acenafteno	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	
Fluoreno	< LOD	< LOD	$0,9 \pm 0,10$	< LOD	
Fenantreno	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	
Antraceno	Detected	Detected	Detected	< LOD	
Fluoranteno	< LOD	$4,5 \pm 0,70$	< LOD	< LOD	
Pireno	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	
Benzo[a]antraceno	< LOD	Detected	< LOD	< LOD	
Criseno	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	
Benzo[b]fluoranteno	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	
Benzo[k]fluoranteno	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	
Benzo[a]pireno	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	
Indene[1,2,3-cd]pireno	< LOD	< LOD	$5,3 \pm 0,80$	< LOD	
Dibenzo[a,h]antraceno	< LOD	< LOD	Detected	$3,8 \pm 0,40$	
Benzo[ghi]perileno	< LOD	< LOD	$3,1 \pm 0,30$	$2,4 \pm 0,10$	
$\Sigma$ HPA	-	$4,5 \pm 0,70$	$9,3 \pm 0,90$	$6,2 \pm 0,41$	

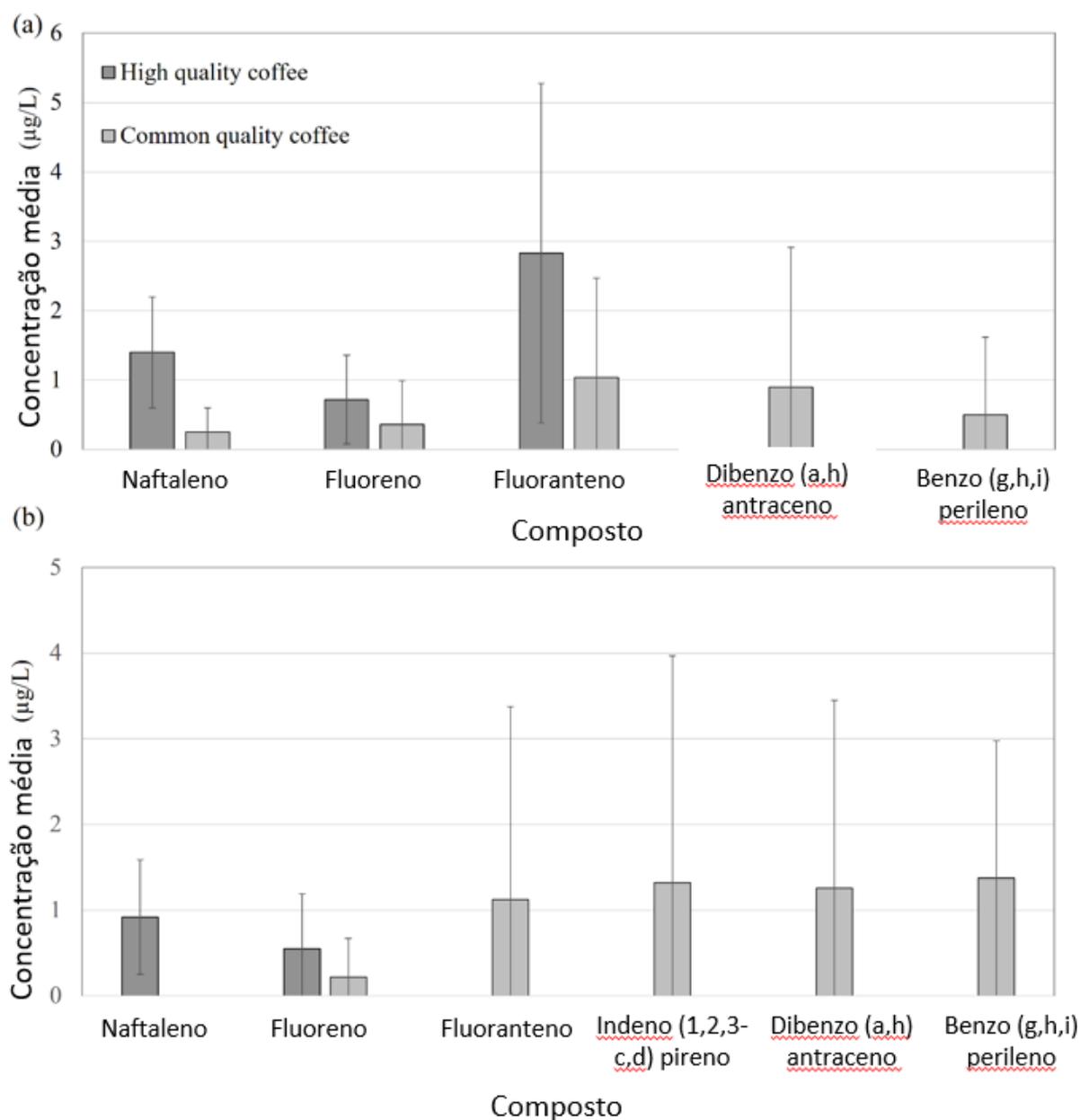
Houve certa similaridade entre os HPAs identificados e/ou quantificados entre as amostras de cada classe de qualidade, entretanto, mesmo comparando-se amostras de mesma classe, observou-se certa variabilidade entre os níveis de concentração para os compostos quantificados. Isto pode ser observado nos elevados desvios padrão estimados para as concentrações médias de cada HPA. Isto sugere que o grau de formação dos HPAs durante o processo de produção dos cafés em pó ocorre de forma aleatória, mesmo em cafés com padrões de produção e qualidade de matéria-prima semelhantes. Orecchio, *et al.* 2009 em seu estudo concluem que a presença dos HPAs em cafés é predominantemente relacionada as altas temperaturas do processo de torra na fabricação. Os autores analisaram 28 HPAs em preparações de café, obtendo como resultado valores que variaram de 0,52 a 1,8  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ . Bishnoi *et al.*, 2005 relataram que a concentração de HPAs na bebida do café indiano era 17  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ . Os resultados obtidos nesse estudo estão na mesma ordem daqueles encontrados por Rascón *et al.* 2019, que empregaram uma metodologia de SPE semi automática para estimar a presença de HPAs em diversos tipos de bebidas, quantificaram valores de até 4,8  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  de HPAs em quase todas as amostras de café analisadas.

Na figura 28 são apresentados o perfil geral de concentrações médias e variabilidade (desvios padrão) para as duas classes de cafés, preparadas por cozimento e infusão, respectivamente figuras 28(a) e 28(b). Na Fig 28(a) observamos que a classe de alta qualidade apresentou um menor número de HPAs (naftaleno, fluoreno e fluoranteno). Entretanto, as concentrações médias foram estimadas em teores relativamente elevados ( $>$  LOQ). Já a classe de qualidade comum apresentou, além dos compostos citados anteriormente, HPAs de maior número de anéis, dibenzo[a,h]antraceno e benzo[ghi]perileno em níveis quantificáveis, observados na amostra **KM**. Importante destacar que, mesmo apresentando uma menor variedade de HPAs em níveis quantificáveis, a classe de alta qualidade apresentou uma maior concentração de HPAs totais quando a bebida foi obtida no modo de preparo por cozimento.

A quantidade de HPAs totais encontrada no café filtrado (26,80  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ ) foi menor do que aquela obtida no preparo do café cozido (27,20  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ ), entretanto esses valores são estatisticamente iguais, isso pode ser observado via teste *t* de comparação de médias para 95% de nível de confiança. Os níveis de contaminação no café filtrado foram cerca de 11% mais baixos comparativamente ao café fervido, concordando com dados obtidos anteriormente por

outros pesquisadores para o somatório dos HPAs estudados (CAMARGO, TOLEDO, 2002; TFOUNI, 2013). Além disso, no processo de cozimento do café, no qual o pó foi fervido junto com a água, a quantidade de HPAs individuais e totais foi próxima da quantidade existente no pó, indicando que a técnica de preparo influencia na extração dos contaminantes.

Figura 28 - Perfil geral comparativo das concentrações médias de HPAs quantificados por grupos de amostras de café bebida (alta qualidade e qualidade comum) preparadas pelos métodos de cozimento (a) e infusão (b).



Na Fig 28 (b), para o modo de preparo via infusão observamos a ausência do composto fluoranteno em níveis quantificáveis nas amostras da classe, sendo este fato o mais significativo de mudança com relação ao preparo por cozimento. Para a classe de qualidade

comum o perfil geral de HPAs quantificáveis foi de certa forma reproduzido, com apenas reduzidas diferenças entre as concentrações médias dos compostos e a significativa presença de indeno[1,2,3-cd]pireno em uma das amostras (amostra PL), contribuindo para a média do grupo. O fluoranteno, de uma forma geral, mostrou-se o HPA presente em maior concentração em ambas as classes, com as médias de  $2,8 \mu\text{g.kg}^{-1}$  nas amostras de alta qualidade obtidas por cozimento,  $1,0 \mu\text{g.kg}^{-1}$  e  $1,1 \mu\text{g.kg}^{-1}$  nas amostras de qualidade comum obtidas por cozimento e infusão, respectivamente. O fluoranteno não foi extraído efetivamente no preparo por infusão nas amostras de alta qualidade. Este fato teve influência na concentração de HPAs totais, bem mais reduzida nas amostras de alta qualidade, quando do preparo por infusão.

Tfouni *et al.* (2013), em seu estudo sobre a presença de quatro HPAs em preparações de cafés de dois tipos de cultivares e diferentes graus de tosta, via HPLC-FLD, não observaram diferença estatisticamente significativa nos níveis de HPAs totais entre as amostras, exceto entre os cafés de torra escura preparados por filtração. Os autores encontraram valores na faixa de  $0,015$  a  $0,105 \mu\text{g.kg}^{-1}$  para a cultivar *C. arabica* e  $0,011$  a  $0,111 \mu\text{g.kg}^{-1}$  nas amostras da cultivar *C. canéfora* (TFOUNI *et al.* 2013). Em nosso estudo detectamos o composto benzo(a)antraceno em duas amostras de qualidade comum preparadas por cozimento (ML e TC) e na amostra TC preparada por infusão.

Os resultados mostraram que, para os cafés de qualidade inferior, foram identificados de uma forma geral HPAs de cadeia longa e com anéis de pentose em sua estrutura, como o fluoreno, fluoranteno e indeno[1,2,3-cd]pireno. A presença de HPAs com anéis de pentose sugere a mistura de “produtos não café” no processo de produção do café em pó. No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) estabeleceu um limite máximo permitido de 1% para o teor de substâncias estranhas no café (milho, centeio, açúcar, cevada, sementes de açaí, entre outras) (ANVISA, 1999). Tais produtos são adicionados para dar corpo e conferir menor preço ao café em pó final.

É importante destacar, que os níveis de HPAs presentes nas amostras de café podem ser considerados baixos quando comparados com os limites máximos permitidos da regulamentação europeia para diferentes alimentos, considerando que não há uma legislação que disponha dos níveis de HPAs no café (EC, 2011). Considerando que a massa específica do café coado é aproximadamente igual a  $0,990 \text{ g.mL}^{-1}$ , a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ , os resultados de

concentração em  $\mu\text{g.L}^{-1}$  são numericamente iguais a  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ , para o número de casas decimais reportadas no estudo.

### **5.5 Variabilidade dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs)**

Para as análises quimiométricas foram considerados todos os compostos detectados e não apenas os quantificados, tendo em vista que os gráficos de loadings e scores foram obtidos com base nos cromatogramas das amostras. Portanto, as figuras a seguir representam uma análise qualitativa dos analitos presentes nas amostras.

A análise multivariada por PCA foi aplicada no conjunto de dados de HPAs para explorar a variabilidade das matrizes e determinar as relações entre as diferentes qualidades de café. As Figuras 29, 30 e 31 ilustram os resultados de PCA do café em pó, cozimento e extrato de infusão de café em pó, respectivamente. Os cafés das marcas de alta qualidade são ilustrados em azul e os das marcas comuns em vermelho. Além disso, as amostras de café que apresentaram a menor capacidade de separação entre os cafés de alta qualidade e comuns foram após o processo de infusão (Fig. 29).

Figura 29 – PCA biplot de cafés em pó das marcas de alta qualidade em azul e as comuns em vermelho. Os <sup>a</sup>axes referem-se a pontuações com valores percentuais da variância explicada em cada Componente Principal, e os <sup>b</sup>axes referem-se a carregamentos representados por vetores da origem.

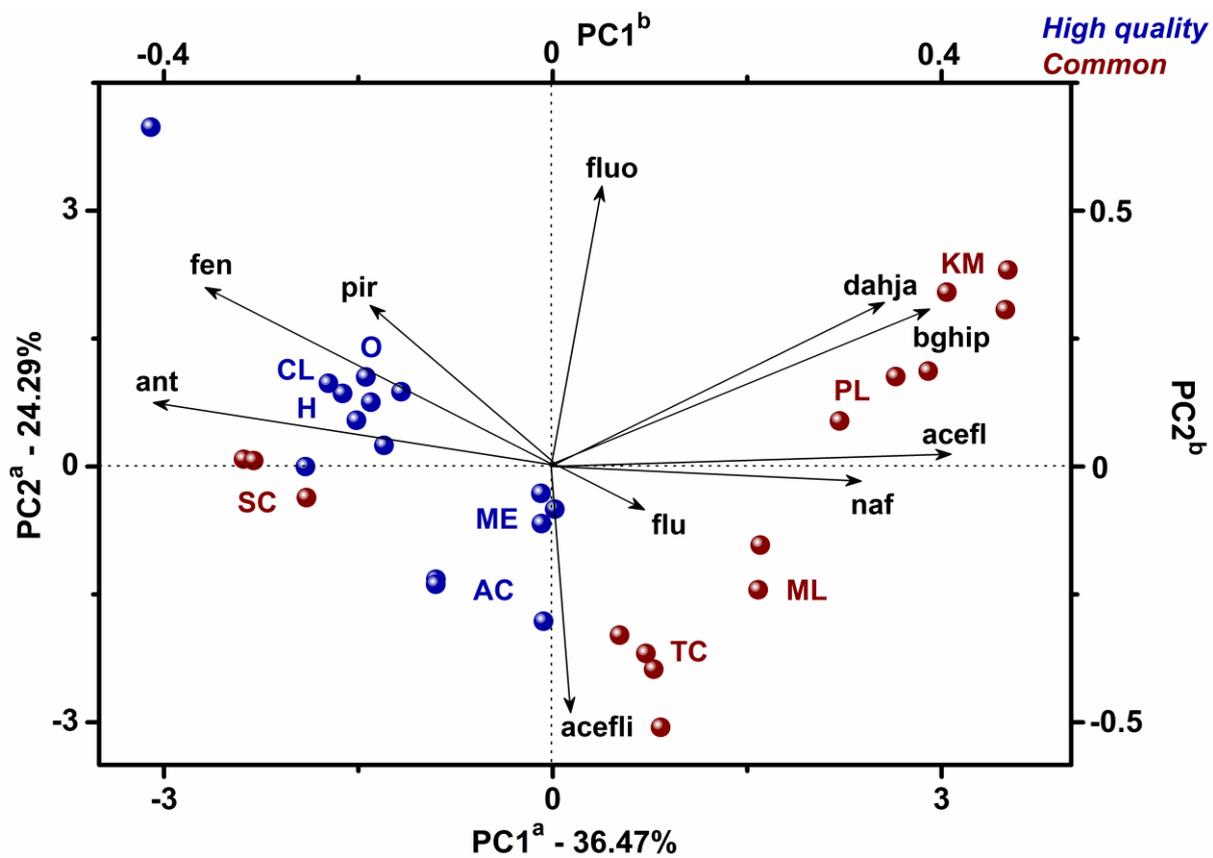
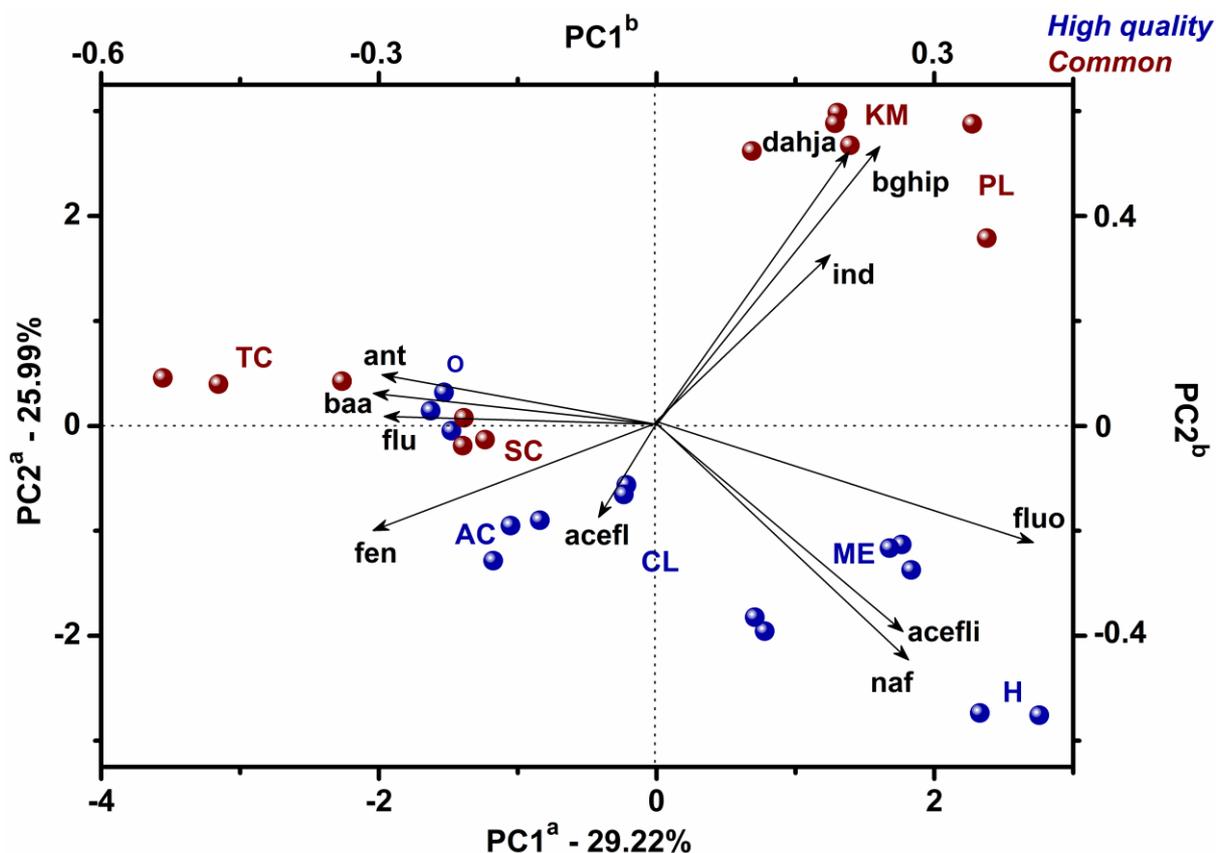


Figura 30 – PCA biplot dos extratos de cafés em pó preparados por cozimento, com marcas de alta qualidade em azul e as comuns em vermelho. Os <sup>a</sup>axes referem-se a pontuações com valores percentuais da variância explicada em cada Componente Principal, e os <sup>b</sup>axes referem-se a carregamentos representados por vetores da origem.



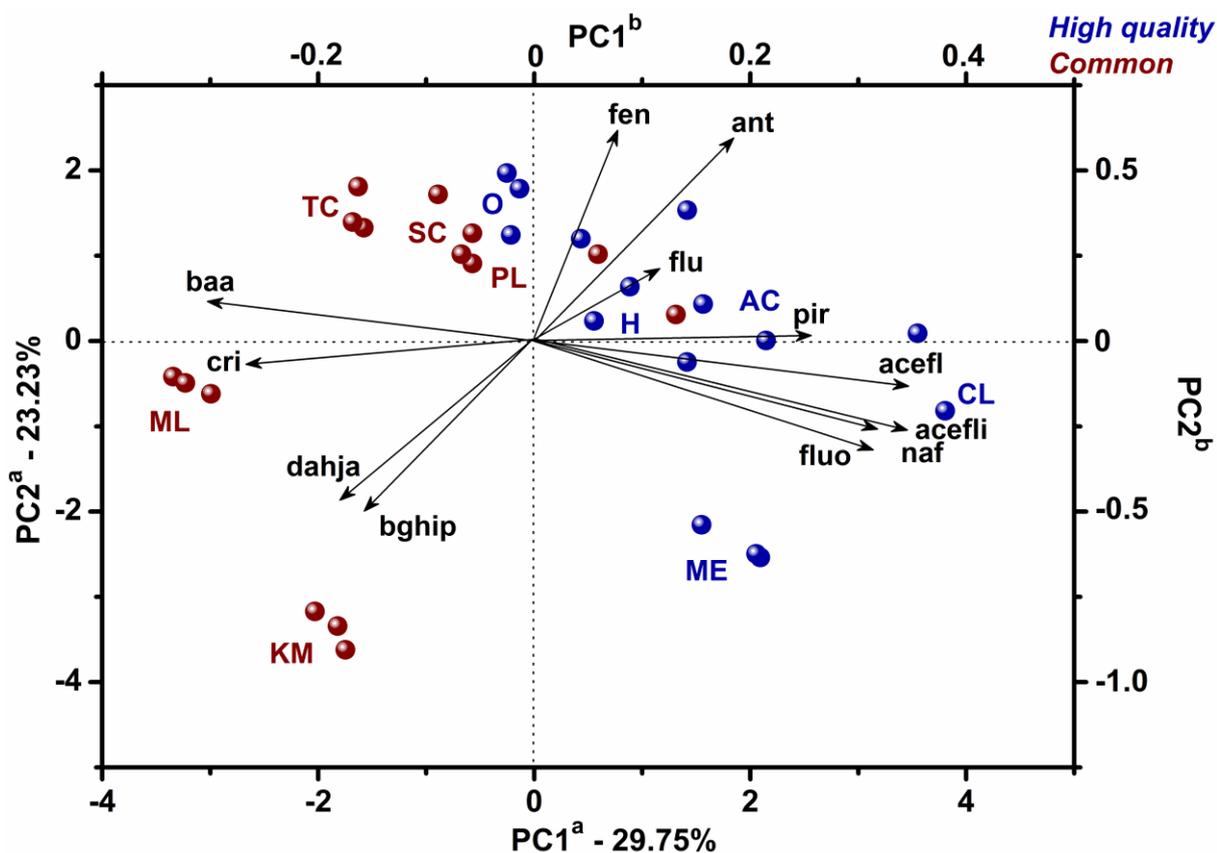
De acordo com os resultados do PCA da composição do café em pó (Fig. 29), o PC1 foi o principal eixo responsável pela separação do pó. O pó das marcas de café de alta qualidade (escores negativos) apresentou maiores teores de antraceno (ant), fenantreno (fen) e pireno (pir).

Por outro lado, o pó de marcas de qualidade comuns (pontuações positivas) apresentou maiores quantidades de dibenzo(a,h)antraceno (d[ah]a), benzo(g,h,i)perileno (b[ghi]p), acenafteno(aceft), naftaleno (naf) e fluoreno (flu). Em particular, o pó da marca comum "SC" aglomerou-se com as marcas de alta qualidade, apresentando semelhança na composição dos HPAs.

Após o cozimento (Fig. 30), o PC2 foi o principal eixo de separação dos extratos de acordo com a qualidade do café. Os extratos dos cafés comuns KM e PL localizados nos escores positivos do PC2 apresentaram maiores teores de d[ah]a, b[ghi]p e indeno (ind). Os extratos de cafés de alta qualidade (ME e H) apresentaram maiores teores de naf, fluoranteno

(fluo), acenaftileno (aceflt). Outros extratos de cafés comuns e de alta qualidade agruparam-se em escores negativos de PC1 apresentando as menores quantidades dos compostos mencionados.

Figura 31 – PCA biplot dos extratos de cafés em pó preparados por infusão, com marcas de alta qualidade em azul e as comuns em vermelho. Os <sup>a</sup>axes referem-se a pontuações com valores percentuais da variância explicada em cada Componente Principal, e os <sup>b</sup>axes referem-se a carregamentos representados por vetores da origem.



HPAs com pesos moleculares mais baixos predominaram sobre aqueles com pesos moleculares mais altos (4, 5 ou 6 anéis) nas preparações de café (Fig. 31). As maiores concentrações de HPAs com três anéis podem estar associadas à sua maior solubilidade aquosa. Compostos com mais de quatro anéis (perileno, benzo [b] fluoranteno, benzo [k] fluoranteno, dibenzo [a, h] antraceno e benzo [g, h, i] perileno) foram detectados com baixa concentração devido ao alto coeficiente de octanol ( $\log K_{ow}$ ) e baixa solubilidade aquosa (Orecchio *et al.*, 2009).

Os extratos dos cafés preparados por infusão (Fig. 31) apresentaram nítida tendência de separação entre a alta qualidade e as marcas comuns do café. Nos escores

positivos do PC1, os extratos de cafés de alta qualidade apresentaram maiores quantidades de fluo, naf, aceflt, aceft, pir, flu, formiga e fen, e os extratos nos escores negativos do mesmo eixo (das marcas comuns) apresentaram maior quantidade de dahja, bghip, crisene (cri) e benzo(a)antraceno (b[a]a).

Os resultados indicaram que metade dos HPAs analisados, aqueles classificados como de baixo peso molecular, foram encontrados em quase todas as marcas analisadas. Os HPAs de alto peso molecular só foram detectados nas marcas de café mais populares. Indicando que os cafés mais nobres possuem maior critério de produção e, portanto, menos compostos indesejáveis são detectados nestes produtos.

A diferença de concentração encontrada nas amostras de café provavelmente está relacionada à exposição e ao tempo de torra, enquanto fontes heterogêneas de contaminação são geralmente indicadas por uma variação no perfil dos HPAs identificados (ORECCHIO *et al.* 2009). A influência de fontes não necessariamente associadas ao processo de fabricação pode incorporar HPAs de estruturas moleculares caracterizadas pela presença de anéis não benzênicos, como acenaftileno, fluoreno e fluoranteno, que possuem anéis de pentose (IZABEL *et al.*, 2020; TAVARES *et al.*, 2012).

Uma série de fatores podem estar envolvidos na origem dos HPAs no próprio café torrado e moído, como também na migração destes compostos para a bebida preparada. Os níveis de HPAs encontrados nas infusões foram inferiores aos relatados por alguns autores (GUATEMALA-MORALES *et al.* 2016; THEA *et al.* 2016). Lin *et al.* (2005) estudou a transferência de porcentagens de HPAs individuais de vários tipos de chás para infusões e encontrou taxas de transferência diferentes para as diferentes variedades de chá. Neste trabalho, também foi igualmente observada certa variabilidade dos perfis de HPAs e suas concentrações nas bebidas preparadas.

Lin *et al.* (2005), sugerem que a transferência dos HPAs para a bebida pode estar relacionada à óleos essenciais, que podem atuar como co-solventes para muitas substâncias lipofílicas e, portanto, aumentar a solubilidade desses compostos na água. Além disso, sugere-se que a cafeína, substância encontrada em alta quantidade no café, aumenta a solubilidade dos HPAs em água pela formação de um complexo HPA-cafeína que facilita sua transferência para a infusão. E ainda há que considerar que a solubilidade de HPAs em água, como muitos outros compostos orgânicos hidrofóbicos, seja um processo endotérmico, será potencializada com aumento da temperatura (NAVARRO *et al.*, 2009; CAMARGO, TOLEDO, 2002; N,

2013; THEA *et al.*, 2016). Tais fundamentações podem explicar as divergências no conteúdo dos HPAs entre o pó do café e as preparações da bebida.

Adicionalmente, com relação aos maiores níveis médios de concentração dos HPAs nos cafés de qualidade comum, a Instrução Normativa nº 16, de 24/5/2010, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) que dispõe sobre a qualidade do café torrado e moído, estabelece como 1% o percentual máximo permitido de impurezas (cascas e paus), sedimento (pedras, torrões e areia) e matérias estranhas (milho, centeio, açúcar, cevada, sementes de açaí, entre outras). Este critério de permissibilidade para tal percentual de impurezas, como as cascas e paus, e outros materiais de origem vegetal, citados acima, pode também estar relacionado com um maior nível de concentração dos HPAs nos cafés torrados e moídos de qualidade comum, os quais se espera possuírem conteúdo mais elevado destes produtos “não café”, quando comparados aos cafés de alta qualidade, o que resultaria, portanto, na transferência de maiores níveis de HPAs para a bebida preparada.

Conforme os resultados apresentados, observa-se que, com base nos níveis de concentração de HPAs, é possível inferir que a presença destes contaminantes nos cafés não está relacionada com fontes ambientais. Além disso, os níveis de contaminação estão abaixo dos limites permitidos de HPAs segunda a legislação europeia (que trata de outras matrizes), com isso podemos afirmar que os cafés analisados não apresentam problemas significativos de contaminação por HPAs. Assim como destacou TFOUNI *et al.*, 2013, os níveis de HPAs presentes nas amostras de café podem ser considerados baixos quando comparado com o máximo permitido níveis da regulamentação brasileira ou com as estabelecidas na Europa para diferentes alimentos, de modo que é esperado que esses níveis não afetam a ingestão de HPAs pela população brasileira; no entanto é importante ter e fornecer informações relacionadas a compostos cancerígenos em alimentos altamente consumidos.

## 6 CONCLUSÕES

O método proposto usando HS-SPME associado ao sistema GC-MS para avaliar os 16 HPAs revelou bom desempenho em geral, sendo eficiente para a identificação e quantificação dos analitos nas amostras de café, com operação automatizada e emprego reduzido de solventes. O processo de validação revelou precisão satisfatória para todos os 16 HPAs estudados, com ampla faixa linear, baixos valores de LOD e LOQ e recuperação adequada sendo considerada viável de acordo com os regulamentos para matrizes alimentares.

Com relação a otimização do método SMPE, em função da seleção de revestimento da fibra, dentre três tipos avaliados (PDMS; PDMS/DVB; DVB/CAR/PDMS), temperatura de extração (60°C, 90°C e 120°C, o par PDMS/90°C apresentou maior eficiência de extração para um maior número compostos (HPAs) estudados, no tempo de extração de 30 min, em temperatura de dessorção de 250°C, configurando as melhores condições do método SPME-HS-GC-MS/MS para determinação dos 16 HPAs em amostras de café.

Resíduos dos HPAs, naftaleno, acenafteno, acenafteno, fluoreno, antraceno, fluoranteno, fenantreno e benzo[a]pireno dos HPAs, foram detectadas e quantificadas com sucesso em diferentes amostras de café. A concentração total média de HPAs ( $\Sigma$  16 PAHs) nas preparações comuns de café foi maior, seguida pelas preparações de café solúvel, ao passo que a menor concentração total foi observada nas preparações de café expresso. Além disso foram constatadas diferenças importantes entre as amostras de cafés de alta qualidade e de qualidade comum, tanto no café em pó como nas suas preparações.

O método proposto SPME-GC-MS apresentou vantagens importantes, uma análise rápida quando comparada aos demais métodos publicados, com grande potencial para a análise de HPAs mencionada nos cafés.

A diferenciação mais robusta das classes de café e de suas preparações foi verificada pelo método quimiométrico de análise multivariada por análise de componentes principais (PCA). A avaliação por PCA possibilitou a observação mais clara de características subjacentes entre as classes, não apenas quantitativamente, mas considerando aspectos qualitativos. O grupo que apresentou menor capacidade de separação entre os cafés de alta qualidade e qualidade comum foram as preparadas por infusão. O pó das marcas de café de alta qualidade apresentou maiores quantidades de antraceno, fenantreno e pireno. Por outro

lado, o pó das marcas de qualidade comuns apresentou maiores quantidades de dibenzo[a,h]antraceno, benzo[g,h,i]perileno, acenafteno, naftaleno e fluoreno. Em particular, o pó da marca comum “SC” apresentou-se agrupado as marcas de alta qualidade, com relação a composição de HPAs.

Nos cafés obtidos por infusão, os cafés KM e PL apresentaram os maiores níveis de dibenzo[a,h]antraceno, benzo[g,h,i]perileno e indeno[1,2,3-cd]pireno, assim como os de alta qualidade (amostras ME e H) apresentaram os maiores níveis de naftaleno, fluoranteno e acenaftileno. Outras preparações de alta qualidade agruparam-se apresentando quantidades mais baixas dos compostos mencionados anteriormente. Finalmente, destacamos o fato nas amostras de alta qualidade haver predominância de compostos com menores números de anéis aromáticos, enquanto as amostras de qualidade comum apresentaram níveis de compostos com maior número de anéis, havendo a concentrações apreciáveis de HPAs com anel de pentose nas amostras em geral, o que caracteriza a adição de “produtos não café” durante a fabricação.

## REFERÊNCIAS

- ABDEL-SHAFY, H. I.; MANSOUR, M. S. M. A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: Source, environmental impact, effect on human health and remediation. **Egyptian Journal of Petroleum**, v. 25, p. 107–123, 2016.
- ABIC – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE CAFÉ. Disponível em: [www.abic.com.br](http://www.abic.com.br). Acesso em: 08 maio 2022.
- ALCÂNTARA, D. B.; PAZ, M. S. O.; RODRIGUES, T. H. S.; FERNANDES, T. S. M.; BARBOSA, P. G. A.; LOIOLA, A. R.; GRINBERG, P.; ZOCCOLO, G. J.; BRITO, E. S. DE. Organophosphorus Pesticide in Sapodilla (*Manilkara zapota*) Fruit. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 29, n. 10, p. 2180–2188, 2018.
- ALMEIDA, L. G. B. F. **Desenvolvimento de sensor eletroquímico à base de ferroceno caboxílico para detecção de HPA's em derivados de cana-de-açúcar**. 2018. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade Federal de Alagoas, Alagoas, Al.
- ALVARENGA, S. T. **Caracterização química e sensorial de cafés especiais do sul de minas gerais**. 2017. Tese (Doutorado em Ciências de alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- ANTALICK, G.; PERELLO, M.; REVEL, G. D. Development, validation and application of a specific method for the quantitative determination of wine esters by headspace-solid-phase microextraction-gas chromatography – mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 121, p. 1236–1245, 2010.
- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. (1999). Portaria no 377, de 26 de abril de 1999. Disponível em: [http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/394219/PORTARIA\\_377\\_1999.pdf/8c15dcc6-3d04-4bea-bb9d-1799ef6e64df](http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/394219/PORTARIA_377_1999.pdf/8c15dcc6-3d04-4bea-bb9d-1799ef6e64df). Acesso em: 14 jun. 2020.
- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada RDC nº 274, de 22 de janeiro de 2005. Regulamento técnico para águas envasadas e gelo. Disponível em: [http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/394219/RDC\\_274\\_2005.pdf/19d98e61-fa3b-41df-9342-67e0167bf550](http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/394219/RDC_274_2005.pdf/19d98e61-fa3b-41df-9342-67e0167bf550). Acesso em: 03 jul. 2020.
- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 2, de 15 de janeiro de 2007. Regulamento Técnico sobre Aditivos Aromatizantes. Disponível em: [http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/RDC\\_02\\_2007\\_COMP.pdf/c966caff-1c19-4a2f-87a6-05f7a09e940b](http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/RDC_02_2007_COMP.pdf/c966caff-1c19-4a2f-87a6-05f7a09e940b). Acesso em: 03 jul. 2020.
- ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução nº166, de 24 de julho de 2017, que dispõe sobre validação de métodos analíticos. Brasília, DF, 25 jul. 2017.

ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Portaria GM/MS nº8, de 4 de maio de 2021, que dispõe sobre procedimento de controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Brasília, DF, 07 de maio de 2021.

ARTHUR, A. L.; PAWLISZYN, J.; Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. **Analytical Chemistry**. v. 62, p. 2145-2148, 1990.

BARBOSA, P. G. A.; MARTINS, F. I. C. C.; LIMA, L. K.; MILHOME, M. A. L.; CAVALCANTE, R. M.; NASCIMENTO, R. F. Statistical Analysis for Quality Adjustment of the Analytical Curve for Determination of Pesticide Multiresidue in Pineapple Samples. **Food Analytical Methods**, v. 11, p. 466–478, 2018.

BAZILIO, F. S.; BOMFIM, M. V. J.; ALMEIDA, R. J.; ABRANTES, S. M. P. Intralaboratory validation of an analytical method for determining the migration of bis (2-ethylhexyl) adipate from packaging to fat foods. **Accreditation and Quality Assurance**, v. 19, p. 195–204, 2014.

BHARDWAJ, L.K.; SHARMA, S.; JINDAL, T. Occurrence of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in the Lake Water at Grovnes Peninsula Over East Antarctica. **Chemistry Africa**, v. 4(4), p. 965-980, 2021.

BIANCOLILLO, A.; ALOIA, R.; ROSSI, L.; D'ARCHIVIO, A.A. Organosulfur volatile profiles in Italian red garlic (*Allium Sativum* L.) varieties investigated by HS-SPME/GC-MS and chemometrics. **Food Control**, v. 131, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108477>.

BISHNOI, N. R.; MEHTA, U.; SAIN, U.; PANDIT, G.G. Quantification of polycyclic aromatic hydrocarbons in tea and coffee samples of Mumbai city (India) by high-performance liquid chromatography. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 107, p. 399–406, 2005.

BLAGODATSKIKHA, I.V.; SUTKEVICH, M. V.; SITNIKOVA, N. L.; CHUROCHKINA, N. A.; PRYAKHINA, T.A.; PHILIPPOVA, O.E.; KHOKHLOV, A.R. Molecular mass characterization of polymers with strongly interacting groups using gel permeation chromatography–light scattering detection. **Journal of Chromatography A**, v. 976, p. 155-164, 2002.

BRESSANELLO, D.; LIBERTO, E.; CORDERO, C.; RUBIOLO, P.; PELLEGRINO, G.; RUOSI, M. R.; BICCHI, C. Coffee aroma: Chemometric comparison of the chemical information provided by three different samplings combined with GC–MS to describe the sensory properties in cup. **Food Chemistry**, v. 214, p. 218-226, 2017.

BSCA – BRAZIL SPECIALTY COFFEE ASSOCIATION. O que são cafés especiais? Disponível em: <https://bsca.com.br/a-bsca>. Acesso em: 06 jun. 2022.

CAJTHAML, T.; SASEK, V. Application of supercritical fluid extraction (SFE) to predict bioremediation efficacy of long-term composting of PAH-contaminated soil. **Environmental Science & Technology**, v. 39, n. 21, p. 8448-8452, 2005.

CAMARGO, M.C.R.; TOLEDO, M.C.F. Teor de cafeína em cafés brasileiros. **Food Science and Technology**, v. 18, n. 4, p. 421-424, 1998.

CAMARGO, M.C.R.; TOLEDO, M.C.F. Chá-mate e café como fontes de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) na dieta da população de Campinas. **Food Science and Technology**, v.22, p.49-53, n.1, 2002.

CANUTO, G. et al. Metabolômica: definições, estado-da-arte e aplicações representativas. **Química Nova**, v. 41, n. 1, p. 75–91, 2018.

CAPORASO, N.; WHITWORTH, M. B.; CUI, C.; FISK, I. D. Variability of single bean coffee volatile compounds of Arabica and robusta roasted coffees analysed by SPME-GC-MS. **Food Research International**, v. 108, p. 628–640, 2018.

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

CARVALHO K. R.; ZOCCOLO, G. J.; BRITO, E. S.; SILVEIRA, E. R.; CANUTO, K. M. Chemotyping the medicinal herb *Egletes viscosa* through SPME-GC-MS. **Microchemical Journal**, v. 168, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.microc.2021.106434>.

CARVALHO K. R.; ZOCCOLO, G. J.; PEREIRA, R. C. A.; MARTINS, F. I. C. C.; RIBEIRO, P. R. V.; BRITO, E. S.; SILVEIRA, E. R.; CANUTO, K. M. Development of a UPLC-ESI-MS method for simultaneous determination of flavonoids and diterpenes in *Egletes viscosa* (L.) Less herbal products. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 166, p. 155–163, 2019.

CAVALCANTE, R. M.; LIMA, D. M.; FERNANDES, G. M.; DUAVÍ, W. C. Relation factor: A new strategy for quality control in the determination of pesticides in environmental aqueous matrices. **Talanta**, v. 93, p. 212–218, 2012.

CHENG, B.; FURTADO, A.; HENRY, R. J.; SMYTH, H. E. Influence of genotype and environment on coffee quality. **Trends in Food Science & Technology**, v. 57, p. 20-30, 2016.

CHIARADIA, M. C.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos e alimentos. **Química Nova**, v.31, n.3, p. 623-636, 2008.

CHOI, S.; KIM, S.; SHIN, J. Y.; KIM, M.; KIM, J. H. Development and verification for analysis of pesticides in eggs and egg products using QuEChERS and LC-MS/MS. **Food Chemistry**, v. 173, p. 1236–1242, 2015.

CHU, X.; SASAKI, T.; AONO, A.; KUDO, Y.; TANAKA, K.; FUSE, Y. Thermal desorption gas chromatography-mass spectrometric analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in atmospheric fine particulate matter. **Journal of Chromatography A**, v. 1655, 462494, 2021.

CHUNG, S.Y.; YETTELLA, R.R.; KIM, J.S.; KWON, K.; KIM, M.C.; MIN, D.B. Effects of grilling and roasting on the levels of polycyclic aromatic hydrocarbons in beef and pork. **Food Chemistry**, v. 129(4), p. 1420-1426, 2011.

CIECIERSKA M., DEREWIAKA D., KOWALSKA J., MAJEWSKA, E. Effect of mild roasting on Arabica and Robusta coffee beans contamination with polycyclic aromatic hydrocarbons. **Journal of Food Science and Technology**, v. 56, p. 737–745, 2019.

CLARKE, H.J.; MANNION, D. T.; O'SULLIVAN, M. G.; KERRY, J. P.; KILCAWLEY, K. N. Development of a headspace solid-phase microextraction gas chromatography mass spectrometry method for the quantification of volatiles associated with lipid oxidation in whole milk powder using response surface methodology. **Food Chemistry**, v. 292, p. 75-80, 2019.

CNCAFÉ – CONSELHO NACIONAL DO CAFÉ. Disponível em: <https://www.cncafe.com.br/site/interna.php?id=8>. Acesso em: 03 jun. 2020.

CORDOBA, N.; FERNANDEZ-ALDUENDA, M.; MORENO, F. L.; RUIZ, Y. Coffee extraction\_ A review of parameters and their influence on the physicochemical characteristics and flavour of coffee brews. **Trends in Food Science & Technology**, v. 96, p. 45-60, 2020.

CORREIA, P. R. M.; FERREIRA, M. M. C. Reconhecimento de padrões por métodos não supervisionados: explorando procedimentos quimiométricos para tratamento de dados analíticos. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 481–487, abr. 2007.

COTUGNO, P.; MASSARI, M.; ARESTA, A.; ZAMBONIN, C.; RAGNI, R.; MONKS, K.; AVAGYAN, L.; BÖTTCHER, J. Advanced Gel Permeation Chromatography system with increased loading capacity: Polycyclic aromatic hydrocarbons detection in olive oil as a case of study. **Journal of Chromatography A**, v. 1639, 461920, 2021.

CRISTALE, J.; SILVA, F.S.; MARCHI, M.R.R. Desenvolvimento e aplicação de método GC-MS/MS para análise simultânea de 17 HPAs em material particulado atmosférico. **Eclética Química**, São Paulo, v.33, p.69-78, n.4, 2008.

DAL MOLIN, R.N. **Caracterização Química e qualitativa do café produzido nas condições topoclimáticas de Jesuítas, Paraná, safra 2002-2003**. 2006. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Paraná, RS.

DANZER, K.; CURRIER, L. A. Guidelines for calibration in analytical chemistry- Part 1: Fundamentals and single-component calibration. **Pure and Applied Chemistry**, Great Britain International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC), v.70, n.4, p. 993-1014, 1998.

EC, European Commission Regulation. EC n. 1881/2006 of 19 december 2006. Setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. **Jornal Oficial da União Europeia**, 20 de dezembro de 2006. Disponível em: <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2006:364:0005:0024:PT:PDF>. Acesso em: 03 julho 2020.

EC, European Commission Regulation. EC n. 835/2011 de 19 de agosto de 2011. Amending Regulation (EC) n.1881/2006 as regards maximum levels for polycyclic aromatic hydrocarbons in foodstuffs. **Official Journal of European Union**, 20 de agosto de 2011.

Disponível em: [https://eur-](https://eur-lex.europa.eu/%20LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2011:215:0004:0008:PT:PDF)

[lex.europa.eu/%20LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2011:215:0004:0008:PT:PDF](https://eur-lex.europa.eu/%20LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2011:215:0004:0008:PT:PDF).

Acesso em: 03 jul. 2020.

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

EFSA. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Food Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food. **The EFSA Journal**, [s. l.], n. June, p. 1–114, 2008.

EMBRAPA – EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Disponível em: < <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/>>. Acesso em: 08 maio 2022.

**EPA - Environmental Protection Agency. Carcinogen Assessment Group.** Evaluation and estimation of potential carcinogenic risks of polynuclear aromatic hydrocarbons. **Cincinnati, 1998.**

EURACHEM. The fitness for purpose of analytical methods – A laboratory guide to method validation and related topics. Teddington: LGC, 2014. 70 p.

FARAG, M. A.; RASHEED, D. M.; KAMAL, I. M. Volatiles and primary metabolites profiling in two Hibiscus sabdariffa (roselle) cultivars via headspace SPME-GC-MS and chemometrics. **Food Research International**, v. 78, p. 327-335, 2015.

FENG, J.; FENG, J.; LOUSSALA, H.M.; HAN, S.; JI, X.; LI, C.; SUN, H.; SUN, M. Dendritic mesoporous silica nanospheres@porous carbon for in-tube solid-phase microextraction to detect polycyclic aromatic hydrocarbons in tea beverages. **Food Chemistry**, v. 364, 130379, 2021.

**FLAMENT, I.** Coffee Flavor Chemistry. **John Wiley & Sons, Ltd, 2002.**

Food and Agriculture Organization/World Health Organization (FAO/WHO), Summary and conclusions by the sixty fourth meeting of the **Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives**. 2005, <http://www.fao.org/3/a-at877e.pdf>.

FROST-MEYER, N. J.; LOGOMARSINO, J. V. Impact of coffee components on inflammatory markers: A review. **Journal of functional foods**, v. 4, p. 819-930, 2012.

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

GBEDDY, G.; EGODAWATTA, P.; GOONETILLEKE, A.; AYOKO, G. JAYARATHNE, A.; CHEN, L.; RUSSELL, S. Optimized simultaneous pressurized fluid extraction and in-cell

clean-up, and analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), and nitro-, carbonyl-, hydroxy -PAHs in solid particles. **Analytica Chimica Acta** , v. 1125, p. 19-28, 2020.

GRIGORIOU, C.; COSTOPOULOU, D.; VASSILIADOU, I.; CHRYSAFIDIS, D.; TZAMTZIS, V.; BAKEAS, E.; LEONDIADIS, L. Monitoring of polycyclic aromatic hydrocarbon levels in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) from aquaculture farms in central macedonia region, greece, using gas chromatography–tandem mass spectrometry method. **Molecules**, v. 26(19), 5953, 2021.

GUATEMALA-MORALES, G. M.; BELTRÁN-MEDINA, E. A.; MURILLO-TOVAR, M. A.; RUIZ-PALOMINO, P.; CORONA-GONZÁLEZ, R. I.; ARRIOLA-GUEVARA, E. Validation of analytical conditions for determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in roasted coffee by gas chromatography – mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 197, p. 747–753, 2016.

HAKME, E.; LOZANO, A.; FERRER, C.; DÍAZ-GALIANO, F.J.; FERNÁNDEZ-ALBA, A.R. Analysis of pesticide residues in olive oil and other vegetable oils. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 100, p. 167-179, 2018.

HARRIS, D. C. **Análise Química Quantitativa**. 8th ed. New York: W. H. Freeman & Company, 2013. 891 p.

HARRIS, K. J.; SUBBIAH, S.; TABATABAI, M.; ARCHIBONG, A.E.; SINGH, K. P.; ANDERSON, T. A.; ADUNYAH, S. E.; RAMESH, A. Pressurized liquid extraction followed by liquid chromatography coupled to a fluorescence detector and atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry for the determination of benzo(a)pyrene metabolites in liver tissue of an animal model of colon cancer. **Journal of Chromatography A**, v. 1622, 2020.

HOUESSO, J.K.; BENAC, C.; DELTEIL, C.; CAMEL, V.C. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in coffee Brew using solid-phase extraction. **J. Agric. Food Chem.**, v. 53, p. 871-879, 2005.

HOUESSO, J.K.; MALOUG, S.; LEVEQUE, A.S.; DELTEIL, C.; HEYD, B.; CAMEL, V. Effect of roasting conditions on the polycyclic aromatic hydrocarbon content in ground arabica coffee and coffee brew. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 55, p. 9719-9726, 2007.

HUA, H.; ZHAO, X.; WU, S.; LI, G. Impact of refining on the levels of 4-hydroxy-trans-alkenals, parent and oxygenated polycyclic aromatic hydrocarbons in soybean and rapeseed oils. **Food Control**, v. 67, p. 82–89, 2016.

IARC, International Agency for Research on Cancer. Agents Classified by the IARC Monographs, v. 1-107. Disponível em:

<http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/ClassificationsAlphaOrder.pdf>. Acesso em: 05 ago. 2020.

IARC, International Agency for Research on Cancer. Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemical to Humans. Lyon, France, v.35, 1985.

IARC, International Agency for Research on Cancer. Polynuclear Aromatic Compounds. IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemical to Humans. Part 1, **Chemical, Environmental and Experimental Data**, Lyon, France, v. 32, 1983.

ICH. VALIDATION OF ANALYTICAL PROCEDURES: TEXT AND METHODOLOGY. **Statewide Agricultural Land Use Baseline 2015**, [s.l], v. 1, n. June, p. 18, 2014.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL - INMETRO. **DOQ-CGCRE-008: Orientações sobre validação de métodos de analíticos**. Revisão 08, 2020.

IZABEL, M.; LUIZ, E.; AUGUSTO, T.; PEZZA, L.; THEODORO, A.; REDIGOLO, H. Authentication of roasted and ground coffee samples containing multiple adulterants using NMR and a chemometric approach. v. 112, n. November 2019, 2020.

JALILI, V.; BARKHORDARI, A.; BAGHANI, A. N. The role of microextraction techniques in occupational exposure assessment . A review. **Microchemical Journal**, v. 150, 2019.

JALILI, V.; BARKHORDARI, A.; GHIASVAND, A. Solid-phase microextraction technique for sampling and preconcentration of polycyclic aromatic hydrocarbons\_ A review. **Microchemical Journal**, v.157, 2020.

JANISSEN, B.; HUYNH, T. Chemical composition and value-adding applications of coffee industry by-products\_ A review. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 128, p. 110-117, 2018.

JESZKA-SKOWRON, M.; FRANKOWSKI, R.; ZGO, A. Comparison of methylxantines, trigonelline, nicotinic acid and nicotinamide contents in brews of green and processed Arabica and Robusta coffee beans – Influence of steaming , decaffeination and roasting processes on coffee beans. **LWT -Food Science and Technology**. v. 125, 2020.

KONIECZKA, P.; NAMIESNIK, J. **Quality Assurance and Quality Control in the Analytical Chemical Laboratory: A Practical Approach**. 2009. p. 232.

LAMICHHANE, S.; BAL KRISHNA, K.C.; SARUKKALIGE, R. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) removal by sorption: a review, **Chemosphere**, v. 148, p. 336–353, 2016.

LANÇAS, F. M. **Cromatografia líquida moderna – HPLC/CLAE**. (2009). São Paulo: Átomo.

LEE, S. W.; CHOI, J. H.; CHO, S. K.; YU, H. A.; EL-ATY, A. M. A.; SHIM, J. H. Development of a new QuEChERS method based on dry ice for the determination of 168 pesticides in paprika using tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 28, p. 4366–4377, 2011.

LI, H.; GENG, W.; HARUNA, S. A.; ZHOU, C.; WANG, Y.; OUYANG, Q.; CHEN, Q. Identification of characteristic volatiles and metabolomic pathway during pork storage using HS-SPME-GC/MS coupled with multivariate analysis. **Food Chemistry**, v. 373, p. 131-431, 2022.

LI, Y.; QIAO, L.; LI, F.; DING, Y.; YANG, Z.; WANG, M. Determination of multiple pesticides in fruits and vegetables using a modified quick, easy, cheap, effective, rugged and safe method with magnetic nanoparticles and gas chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1361, p.77– 87, 2014.

LI, G.; WU, S.; ZENG, J.; WANG, L.; YU, W. Effect of frying and aluminium on the levels and migration of parent and oxygenated PAHs in a popular Chinese fried bread youtiao. **Food Chemistry**. v. 209, p. 123–130, 2016.

LIN, D.; TU, Y.; ZHU, L. Concentrations and health risk of polycyclic aromatic hydrocarbons in tea. **Food and Chemical Toxicology**, v. 43, p. 41–48, 2005.

LORENZO, J. M. Influence of the type of fiber coating and extraction time on foal dry-cured loin volatile compounds extracted by solid-phase microextraction (SPME). *MESC*, [s. l.], v. 96, n. 1, p. 179–186, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2013.06.017>.

MAPA - MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Manual de garantia da qualidade analítica – Resíduos e contaminantes em alimentos**. Brasília, 2011. 227 p.

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº 16, de 24/05/2010. Disponível em: [http://www.mp.sp.gov.br/portal/page/portal/cao\\_consumidor/legislacao/leg\\_produtos\\_humanos/IN-16-2010-MAPA.pdf](http://www.mp.sp.gov.br/portal/page/portal/cao_consumidor/legislacao/leg_produtos_humanos/IN-16-2010-MAPA.pdf), acessado em abril de 2020.

MARTINS, F. I. C. C.; BARBOSA, P. G. A; ZOCCOLO, G. J.; NASCIMENTO, R. F. Method Validation Using Normal and Weighted Linear Regression Models for Quantification of Pesticides in Mango (*Mangifera indica* L.) Samples. **Chromatographia**, v. 81, p. 677-688, 2018.

MCNAIR, H.; MILLER, J. M. **Basic gas chromatography**. New York: Wiley-VHC, 2009. 200 p.

MERLO, T. C.; MOLOGNONI, L.; HOFF, R. B.; DAGUER, H.; PATINHO, I.; CONTRERAS-CASTILLO, C. Alternative pressurized liquid extraction using a hard cap espresso machine for determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked bacon. **Food Control**, v. 120, 2021.

MILANI, M.; ROSSINI, E.; CATELANI, T.; PEZZA, L.; TOCI, A.; PEZZA, H. Authentication of roasted and ground coffee samples containing multiple adulterants using NMR and a chemometric approach. **Food control**, v. 112, 2020.

MILLER, James N.; MILLER, Jane C. **Statistics and chemometrics for analytical chemistry**. Harlow: Pearson, 6th ed, 2010. 273 p.

MITRA, S. **Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry**. New Jersey: Wiley-Interscience, 2003, 472 p.

MONTEIRO, P. I.; SANTOS, J. S.; BRIZOLA, V. R. A.; DEOLINDO, C. T. P.; KOOT, A.; BOERRIGTER-EENLING, R.; RUTH, S. VAN; GEORGOULI, K.; KOIDIS, A.; GRANATO, D. Comparison between proton transfer reaction mass spectrometry and near infrared spectroscopy for the authentication of Brazilian coffee: A preliminary chemometric study. **Food control**, v. 91, p. 276–283, 2018.

NAING, N. N.; YEO, K. B.; LEE, H. K. A combined microextraction procedure for isolation of polycyclic aromatic hydrocarbons in ambient fine air particulate matter with determination by gas chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1612, 2020.

NASCIMENTO, E. A.; MORAIS, S. A. L.; ROCHA, R. S. Constituintes voláteis de cafés “gourmet” e mole do cerrado do triângulo mineiro em função da torra. **Food Science and Technology**, v. 23, p. 282–284, 2003.

NASCIMENTO, P. M. **Estudo da composição química, atividade antioxidante e potencial odorífero de um café conillon, em diferentes graus de torrefação e análise comparativa com café arábica**. 2006. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG.

NASCIMENTO, Ronaldo Ferreira do *et al.* **Cromatografia gasosa: aspectos teóricos e práticos**. Fortaleza: Imprensa Universitária, 2018. 334 p.

NAVARRO, R.P.; ISHIKAWA, H.; MORIMOTO, K.; TATSUMI, K. Enhancing the release and plant uptake of PAHs with a water-soluble purine alkaloid. **Chemosphere**. v. 76, p. 1109-1113, 2009.

ORECCHIO, S.; CIOTTI, V. P.; CULOTTA, L. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in coffee brew samples: Analytical method by GC – MS, profile, levels and sources. **Food and Chemical Toxicology**. v. 47, p. 819–826, 2009.

PÁLENÍKOVÁ, A.; MARTÍNEZ-DOMÍNGUEZ, G.; ARREBOLA, F. J.; ROMERO-GONZÁLEZ, R.; HROUZKOVÁ, S.; FRENICH, A. G. Multifamily determination of pesticide residues in soya-based nutraceutical products by GC/MS-MS. **Food Chemistry**, v. 173, p. 796–807, 2015.

PAULA, E. *et al.* Development and validation of automatic HS-SPME with a gas chromatography-ion trap / mass spectrometry method for analysis of volatiles in wines. **Talanta**, v. 101, p. 177–186, 2012.

PEREIRA, G. V. D. M.; NETO, D. P. D. C.; JÚNIOR, A. I. M.; S.VÁSQUEZ, Z.; MEDEIROS, A. B. P.; VANDENBERGHE, L. P. S.; SOCCOL, C. R. Exploring the impacts of postharvest processing on the aroma formation of coffee beans – A review. **Food**

**Chemistry**, v. 272, p. 441-452, 2019.

PIETROGRANDE, M. C.; DEMARIA, G.; RUSSO, M. Determination of particulate polycyclic aromatic hydrocarbons in ambient air by gas chromatography-mass spectrometry after molecularly imprinted polymer extraction. **Journal of Environmental Sciences**, v. 124, p. 644-654, 2023.

PINHO, G. P. *et al.* Efeito matriz na quantificação de agrotóxicos por cromatografia gasosa. **Química Nova**, São Paulo v. 32, n. 4, p.987-985, 2009.

PISSINATTI, R. **Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em café torrado: otimização e validação de método por cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas**. 2013. Dissertação (Mestrado em ciência de alimentos) – Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, MG.

POOLE, C. F. Matrix-induced response enhancement in pesticide residue analysis by gas chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1158, p. 241–250, 2007.

RASCÓN, A. J.; AZZOUZ, A.; BALLESTEROS, E. Use of semi-automated continuous solid-phase extraction and gas chromatography – mass spectrometry for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in alcoholic and non-alcoholic drinks from Andalucía (Spain). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 99, p. 1117-1125, 2019.

REAS. Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) em leite e derivados: contaminação e influência na saúde dos consumidores. **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, v. 8, n. 1, p. 868–875, 2016.

RIBANI, M. *et al.* Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771–780, 2004.

ROSA, G. M. **Análise química e atividade antioxidante de quatro amostras de café (*Coffea arabica*) comerciais**. 2010. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG.

SÁNCHEZ-URÍA, J.E.; CASTILLO-BUSTO, DEL E. Microwave-assisted solvent extraction for extraction of pahs from soils. **Revista Internacional de Contaminación Ambiental**, v.34, n. 2, p. 355-366, 2018.

SANTOS, R. R. DOS; LEAL, L. D. V.; CARDEAL, Z. DE L.; MENEZES, H. C. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons and their nitrated and oxygenated derivatives in coffee brews using an efficient cold fiber-solid phase microextraction and gas chromatography mass spectrometry method. **Journal of Chromatography A**, v. 1584, p. 64–71, 2019.

SCAL, M.L.W.; SERUFF, L.A.; VERA, Y.M. Study of the separation of didymium from lanthanum using liquid-liquid extraction: Comparison between saponification of the extractant and use of lactic acid. **Minerals Engineering**, v. 148, 106200, 2020.

SHI, Y.; WU, H.; WANG, C.; GUO, X.; DU, J.; DU, L. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in coffee and tea samples by magnetic solid-phase extraction coupled with HPLC – FLD. **Food Chemistry**, v. 199, p. 75–80, 2016.

SILVA, V. P. A. **Aplicação da técnica de microextração em fase sólida na determinação de agrotóxicos e avaliação do efeito matriz em água**. 2013. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE.

SILVA, C. Q. **Avaliação do grau de torrefação e da qualidade dos grãos de café nos seus impactos sobre a saúde humana**. 2019. Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ.

SILVA, F. S. **Otimização e validação de método para a análise de HPAs em rapadura**. 2006. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual Paulista, São Paulo, SP.

SILVA, V. P. A.; PAZ, M. S. O.; CAVALCANTE, R. M.; NASCIMENTO, R. F. Strategy for Correction of Matrix Effect on the Determination of Pesticides in Water Bodies Using SPME-GC-FID. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 28, p. 1081–1090, 2017.

SINGH, L.; AGARWAL, T. Polycyclic aromatic hydrocarbons in diet: Concern for public health. **Trends in Food Science & Technology**, v. 79, p. 160–170, 2018.

SINGH, L.; AGARWAL, T.; SIMAL-GANDARA, J. PAHs, diet and cancer prevention: Cooking process driven-strategies. **Trends in Food Science & Technology**, v. 99, p. 487-506, 2020.

SINGH, L.; AGARWAL, T. Comparative analysis of conventional and greener extraction methods and method validation for analyzing PAHs in cooked chicken and roasted coffee. **Food Chemistry**, v. 364, 130440, 2021.

SKOOG et al. **Fundamentos de química analítica**. Tradução da 8ª ed. Norte-americana. 1 ed., São Paulo: Cengage Learning, 2010.

SOUZA, C. G.; MARTINS F. I. C.C.; ZOCOLO G. J.; FIGUEIREDO J. E. F.; CANUTO, K. M.; BRITO, E. S. Simultaneous quantification of lipopeptide isoforms by UPLC-MS in the fermentation broth from *Bacillus subtilis* CNPMS22. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 26, p. 6827-6836, 2018.

SUN, C.; QU, L.; WU, L.; WU, X.; SUN, R.; LI, Y. Advances in analysis of nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons in various matrices. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 127, 2020.

SUN, P.; WEAVERS, L. K.; TAERAKUL, P.; WALKER, H. W. Characterization of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) on lime spray dryer (LSD) ash using different extraction methods. **Chemosphere**, v. 62, n. 2, p. 265-274, 2006.

SUN, Y.; WU, S.; GONG, G. Trends in Food Science & Technology Trends of research on polycyclic aromatic hydrocarbons in food: A 20-year perspective from 1997 to 2017. **Trends in Food Science & Technology**, v. 83, p. 86–98, 2019.

SWIT, P.; ORZEL, J.; MASLANKA, S. Monitoring of PAHs in simulated natural and artificial fires by HPLC-DAD-FLD with the application of Multi-Component Integrated calibration method to improve quality of analytical results. **Measurement**, v. 196, 2022.

TAN, J.; LU, X.; FU, L.; YANG, G.; CHEN, J. Quantification of Cl-PAHs and their parent compounds in fish by improved ASE method and stable isotope dilution GC-MS. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 186, 2019.

TAVARES, K. M.; GUALBERTO, R.; ALVARENGA, F.; ANTÔNIO, C.; CARLA, A. Espectroscopia no infravermelho médio e análise sensorial aplicada à detecção de adulteração. **Química Nova**, v. 35, p. 1164–1168, 2012.

TFOUNI, S. A. V.; SERRATE, C. S.; LEME, F. M.; CAMARGO, M. C. R.; TELES, C. R. A.; CIPOLLI, K. M. V. A. B.; FURLANI, R. P. Z. Polycyclic aromatic hydrocarbons in coffee brew: Influence of roasting and brewing procedures in two *Coffea* cultivars. **LWT - Food Science and Technology**, v. 50, p. 526–530, 2013.

THEA, A. E.; FERREIRA, D.; BRUMOVSKY, L. A.; SCHMALKO, M. E. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in yerba maté (*Ilex paraguariensis* St. Hil) traditional infusions (*mate* and *tereré*). **Food Control**, v. 60, p. 215–220, 2016.

THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R.; Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. **Pure and Applied Chemistry**, v. 74, p. 835–855, n. 5, 2002.

TOBISZEWSKI, M.; MECHLINSKA, A.M.; ZYGMUNT, B.; NAMIESNIK, J. Green analytical chemistry in sample preparation for determination of trace organic pollutants. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 28, n. 8, p. 943-951, 2009.

VEIGA, L.L.A.; AMORIM, A.; MORAES, J.; SILVA, M.C.; RAICES, R.S.L.; QUITERIO, S.L. Quantification of polycyclic aromatic hydrocarbons in toasted guaraná (*Paullinia cupana*) by high-performance liquid chromatography with a fluorescence detector. **Food Chemistry**, v. 152, p. 612-618, 2014.

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

WALRAVENS, J.; MIKULA, H.; RYCHLIK, M.; ASAM, S.; NJUMBE, E.; DIANA, J.; MAVUNGU, D.; LANDSCHOOT, A. VAN; VANHAECKE, L.; SAEGER, S. DE. Development and validation of an ultra-high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometric method for the simultaneous determination of free and conjugated

Alternaria toxins in cereal-based foodstuffs. **Journal of Chromatography A**, v. 1372, p. 91–101, 2014.

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

WANG, T.-F.; ZHANG, W.-J.; LI, L.-Q.; ZHANG, M.-Y.; LIAO, G.-Y.; WANG, D.-S. Distribution Characteristics and Risk Assessment of Antibiotics and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Sediments of Desilting Demonstration Area in Baiyangdian Lake. **Environmental Science**, v.42(11), p. 5303-5311, 2021.

WANG, X.; ZHOU, L.; LUO, F.; ZHANG, X.; SUN, H.; YANG, M.; LOU, Z.; CHEN, Z. 9, 10-Anthraquinone deposit in tea plantation might be one of the reasons for contamination in tea. **Food Chemistry**, v. 244, p. 254–259, 2018.

WANG, X.; WANG, J.; DU, T.; KOU, H.; DU, X.; LU, X. Zn (II)-imidazole derived metal azolate framework as an effective adsorbent for double coated solid-phase microextraction of sixteen polycyclic aromatic hydrocarbons. **Talanta**, v. 214, 2020.

ZENG, Z.; GAO, Y.; CUI, J.; LIN, M.; TANG, J., WANG, F., YANG, Y., YU, Y., MA, S. Liquid-liquid extraction combined with online cleanup for the simultaneous determination of PAHs by GC–MS/MS and their hydroxylated metabolites by LC-MS/MS in human fingernails. **Journal of Chromatography B**, v. 1188, 123057, 2022.

ZHAO, X.; WU, S.; GONG, G.; LI, G.; ZHUANG, L. TBHQ and peanut skin inhibit accumulation of PAHs and oxygenated PAHs in peanuts during frying. **Food Control**, v. 75, p. 99-107, 2017.

ZIANNI, R.; MENTANA, A.; CAMPANIELLO, M.; CHIAPPINELLI, A.; TOMAIUOLO, M.; CHIARAVALLE, A.E.; MARCHESANI, G. An investigation using a validated method based on HS-SPME-GC-MS detection for the determination of 2-dodecylcyclobutanone and 2-tetradecylcyclobutanone in X-ray irradiated dairy products. **LWT – Food science and technology**, v.153, 2022, Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112466>.