



UNIVERSIDADE D  
COIMBRA

Tânia Filipa Lopes da Silva

**Avaliação do teor em hidrocarbonetos aromáticos  
policíclicos em mel da zona centro e a sua relação  
com os incêndios de 2017**

Dissertação no âmbito do Mestrado em Segurança Alimentar,  
orientada pelo Professor Doutor Fernando Jorge Ramos e co-orientada  
pelo Engenheiro e Mestre Carlos Frederico Lopes e apresentada à  
Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

Julho de 2019

Tânia Filipa Lopes da Silva

**AVALIAÇÃO DO TEOR EM HIDROCARBONETOS AROMÁTICOS  
POLICÍCLICOS EM MEL DA ZONA CENTRO E A SUA RELAÇÃO COM  
OS INCÊNDIOS DE 2017**

Dissertação no âmbito do Mestrado em Segurança Alimentar orientada pelo  
Professor Doutor Fernando Jorge Ramos e co-orientada pelo Engenheiro e  
Mestre Carlos Frederico Lopes e apresentada à  
Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Julho de 2019

## **Agradecimentos**

Agradeço ao Professor Doutor Fernando Ramos, ao Engenheiro e Mestre Carlos Lopes e à Engenheira e Mestre Maria da Graça Campos por toda a ajuda, entusiasmo e transmissão de conhecimentos que contribuíram para que eu concluísse esta etapa com sucesso e rigor.

A todos os colaboradores do Laboratório de Segurança Alimentar da ASAE por toda a ajuda e simpatia durante todo o tempo em que estive a realizar a parte experimental desta tese

Aos meus pais, por todo o apoio moral e financeiro, que nunca me impediram de sonhar e concretizar os meus sonhos.

Ao meu namorado, pela paciência e amor que sempre me deu e por me transmitir calma, segurança e confiança em todos os momentos.

À minha família, por estarem sempre comigo, perdoarem as semanas de ausência e por sempre mostrarem interesse pelo meu trabalho.

Aos meus amigos, por me manterem sempre com um sorriso no rosto e acompanharem de perto ou ao longe todo este processo

À minha tia Fátima, por durante todos estes anos me sentir como uma filha e pela preocupação que sempre mostrou em relação a mim e ao meu futuro.

À Ângela, ao Nuno e ao pequeno Diego por me fazerem sentir acolhida e em família enquanto estava numa cidade desconhecida e longe de casa.

A todos os quantos contribuíram para que este trabalho fosse realizado com sucesso, tanto pela ajuda na recolha de amostras, por uma palavra de incentivo ou até mesmo por um gesto que de algum modo me ajudou e motivou.

Do fundo do meu coração, o meu maior e sincero obrigada.

# Índice geral

Agradecimentos .....	2
Índice geral .....	3
Índice de tabelas.....	5
Índice de figuras.....	6
Lista de siglas e de abreviaturas.....	7
Resumo .....	8
Abstract .....	10
1. Contextualização e objetivos .....	11
2. Segurança Alimentar.....	12
3. Mel.....	14
3.1- As abelhas e o mel .....	14
3.2- Categorias do mel.....	15
3.3- Composição química, ingestão média diária e limites legais.....	16
3.4- Contaminação: como e com quê? .....	18
3.4.1- Botulismo.....	19
3.5- Propriedades terapêuticas e benefícios do mel.....	20
4. Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos.....	22
4.1- Características gerais.....	22
4.2- Fontes, usos e tipos de PAHs .....	24
4.3- Ocorrência de PAHs em géneros alimentícios .....	26
4.4- Efeitos dos PAH na saúde humana .....	29
4.5- Eliminação de PAHs.....	30
5. Trabalho experimental.....	32
5.1- Recolha das amostras.....	32
5.2- Seleção do método analítico.....	34
5.3- Estabelecimento das condições instrumentais de quantificação do método – curva de calibração.....	34
5.3.1- Curva de calibração.....	34
5.3.2- Validação da curva de calibração.....	37
5.3.2.1- Validação da curva de calibração com padrão independente (material interno) .....	38
5.3.2.2- Validação da curva de calibração com material de referência (material externo).....	39

5.4- Ensaio preliminares de otimização do método.....	40
5.5- Ensaio de otimização do método.....	42
5.6- Precisão e Veracidade - Critérios de desempenho do método .....	47
5.6.1- Taxas de recuperação .....	47
5.6.2- Repetibilidade.....	49
5.6.3- Precisão intermédia e Reprodutibilidade.....	51
5.6.4- Limites de quantificação e de deteção .....	51
5.7- Procedimento experimental e equipamento utilizado .....	52
6. Resultados e discussão dos resultados.....	53
7. Conclusão .....	59
8. Bibliografia.....	60
ANEXO 1 – Fórmulas de cálculo subjacentes à preparação das soluções-padrão .....	65
ANEXO 2 – Curvas de calibração das soluções-padrão .....	66
ANEXO 3 - Concentrações lidas em ng/mL dos ensaios de repetibilidade .....	68

## Índice de tabelas

<b>Tabela 1</b> - Tipos de mel.....	15
<b>Tabela 2</b> - Limites legais de alguns compostos no mel.....	18
<b>Tabela 3</b> - 16 PAHs prioritários pela EPA e os respetivos grupos da IARC.....	23
<b>Tabela 4</b> - 15 PAHs prioritários pela EFSA e os respetivos grupos da IARC.....	23
<b>Tabela 5</b> - Estrutura e massa molecular dos PAHs em estudo.....	24
<b>Tabela 6</b> - Ingestão média estimada diária por diferentes meios por um adulto não-fumador.....	27
<b>Tabela 7</b> - Teores máximos de PAHs em géneros alimentícios.....	28
<b>Tabela 8</b> - Local das amostras recolhidas, respetivo concelho e a abreviatura atribuída.....	33
<b>Tabela 9</b> - Esquema de preparação das várias soluções-padrão.....	35
<b>Tabela 10</b> - Composição e gradiente da fase móvel.....	36
<b>Tabela 11</b> - Programação do detetor de fluorescência.....	36
<b>Tabela 12</b> - Parâmetros característicos do ajuste linear para as curvas de calibração dos PAH4.....	37
<b>Tabela 13</b> - Resultados da análise do PIV – P8.....	39
<b>Tabela 14</b> - Resultados de z-score para o material de referência com as curvas de calibração a validar.....	40
<b>Tabela 15</b> - Descrição dos ensaios preliminares para a otimização do método.....	41
<b>Tabela 16</b> - Descrição dos ensaios de otimização do método.....	42
<b>Tabela 17</b> - Valores de concentração lidos na curva de calibração.....	47
<b>Tabela 18</b> - Taxas de recuperação.....	48
<b>Tabela 19</b> - Resultados, média e desvio-padrão dos ensaios de repetibilidade.....	50
<b>Tabela 20</b> - Limite de repetibilidade determinado para uma concentração de PAH de 1 µg/kg de mel .....	50
<b>Tabela 21</b> - Limites de quantificação instrumentais, com base na curva de calibração.....	52
<b>Tabela 22</b> - Novo programa com gradiente de fase móvel para a injeção.....	54
<b>Tabela 23</b> - Concentrações lidas na curva das amostras de mel analisadas – parte I.....	55
<b>Tabela A3 I</b> - Concentrações lidas dos ensaios de repetibilidade.....	68

## Índice de figuras

<b>Figura 1</b> - Exemplos de estruturas moleculares de alguns PAHs.....	22
<b>Figura 2</b> - Exemplos de PAHs com um anel de cinco carbonos (à esquerda) e com seis carbonos (à direita).....	26
<b>Figura 3</b> - Área ardida nos incêndios de outubro de 2017 e a localização das amostras recolhidas.....	32
<b>Figura 4</b> - Amostra de Mortágua do ano de 2018 (favo de mel).....	34
<b>Figura 5</b> - Cromatograma da injeção do ponto intermédio de validação (PIV).....	38
<b>Figura 6</b> - Disposição do Ultraturrax dentro do banho de ultrassons.....	46
<b>Figura 7</b> - Exemplo de uma amostra de mel cristalizado (à esquerda) e de uma tampa com sujidade (à direita).....	53
<b>Figura 8</b> - Exemplo de cromatograma de amostras de mel com sinal ao nível do ruído e interferentes.....	54
<b>Figura A2 1</b> - Curva de calibração do benzo(a)antraceno.....	66
<b>Figura A2 2</b> - Curva de calibração do benzo(b)fluoranteno.....	66
<b>Figura A2 3</b> - Curva de calibração do criseno.....	67
<b>Figura A2 4</b> - Curva de calibração do benzo(a)pireno.....	67

## Lista de siglas e de abreviaturas

° **C** – graus Celsius

**ACN** – Acetonitrilo

**B(a)A** – Benzo (a) antraceno

**B(a)P** – Benzo (a) Pireno

**B(b)F** – Benzo (b) Fluoranteno

**C. botulinum** – *Clostridium botulinum*

**CO<sub>2</sub>** – Dióxido de Carbono

**Cris** – Criseno

**DCM** – Diclorometano

**DNA** – *Deoxyribonucleic Acid* (Ácido Desoxirribonucleico)

**E. coli** – *Escherichiacoli*

**EFSA** – *European Food Security Authority* (Autoridade Europeia de Segurança Alimentar)

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** – Peróxido de Hidrogénio

**HACCP** – *Hazard Analysis and Critical Control Point* (Análise de Perigos e Controlo de Pontos Críticos)

**HMF** – Hidroximetilfurfural

**IARC** – *International Agency of Research on Cancer* (Agência Internacional para a Pesquisa do Cancro)

**LFQ** – Laboratório de Físico-Química do Laboratório de Segurança Alimentar da Autoridade de Segurança Alimentar e Económica

**LOD** – *Limit of detection* (Limite de deteção)

**LOQ** – *Limit of quantification* (Limite de quantificação)

**LSA** – Laboratório de Segurança Alimentar

**MR-COI** – Material de referência do Conselho Oleícola Internacional

**PAHs** – *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons* (Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos)

**PCBs** – *Polychlorinated Biphenyl* (Bifenilos Policlorados)

**PIV** – Padrão Independente de validação

**TNF- $\alpha$**  – Fatores de Necrose Tumoral

**US-EPA** – *United States Environmental Protection Agency* (Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos)

**UV** – Ultravioleta

**Valor CV** – Valor Convencionalmente Aceite

## Resumo

O ano de 2017 foi o mais devastador na última década em termos de área ardida. Nesse ano, e principalmente nos meses de junho e outubro, perderam-se milhares de hectares de floresta, vidas humanas, bens materiais e a segurança e a qualidade da água, dos alimentos e do ar foi afetada (1).

Os PAHs são compostos nocivos formados pela combustão incompleta de material orgânico e, com estes incêndios, foram produzidos em concentrações muito elevadas. Sendo compostos persistentes no ambiente, acumulam-se nos solos e na água e podem passar para a cadeia alimentar causando danos no ser humano. Os PAHs têm atividade carcinogénica, genotóxica e teratogénica (2).

Este trabalho teve como finalidade comparar as concentrações de PAHs em mel recolhido e extraído antes e após os incêndios, para várias regiões afetadas por estes e perceber se os fogos teriam algum impacto em termos da segurança alimentar do mel. O mel é um género alimentício produzido de forma natural e que se guarda durante vários anos sendo, por esta razão, muito fácil de recolher amostras anteriores e posteriores aos incêndios. As amostras de mel foram recolhidas em diversos concelhos da zona centro especialmente os mais afetados pelos incêndios de outubro. Foram recolhidas amostras de mel extraídas no verão de 2017 (antes dos incêndios) e do verão de 2018 (após os incêndios) do mesmo apicultor. Cada apicultor teve o cuidado de fornecer mel do mesmo local para que a contaminação base do ambiente fosse semelhante.

Com este trabalho foi otimizada e validada uma metodologia para a extração de PAHs para amostras de mel sendo os limites de deteção para cada um dos PAHs: 0,07 µg/kg para o B(a)A, 0,08 µg/kg para o Cris, 0,07 µg/kg para o B(b)F e 0,09 µg/kg para o B(a)P e os limites de quantificação 0,21 µg/kg para o B(a)A, 0,23 µg/kg para o Cris, 0,22 µg/kg para o B(b)F e 0,27 µg/kg para o B(a)P (considerando uma toma típica de mel de 10 gramas, reconstituído em 1 mL de volume final e a recuperação média determinada para cada um dos compostos). Os valores encontrados permitem que o método seja usado para controlo de mel, ao nível de valores legais já estabelecidos para outras matrizes (o teor mais baixo legislado é 1 µg/kg). Em nenhuma das amostras foram detetados PAHs e, desta forma, considera-se que na produção de mel de 2018, nas regiões estudadas, não houve contaminação do mel produzido com PAHs provenientes dos incêndios de 2017.

Apesar dos resultados obtidos não evidenciarem contaminação por PAHs, é necessário continuar a monitorizar não só o mel, mas os diversos alimentos que possam ser afetados a longo prazo por esta catástrofe.

**Palavras-chave:** hidrocarbonetos aromáticos policíclicos; mel; incêndios florestais.

## Abstract

2017 was the most devastating year in terms of burned area. In that year, and especially in June and October, thousands of forest hectares and some human lives were lost and the water, food and air quality and security were threatened (1).

The PAH are formed by the incomplete combustion of organic material and, with these fires, they were produced in high concentrations. As they are persistent in the environment, they accumulate in the soil and water, they can go through the food chain and be harmful to humans. PAH have carcinogenic, genotoxic and teratogenic activity (2).

In this thesis, the PAH concentration in honey collected and extracted before and after the fires was compared to understand their influence in food security. Honey is produced naturally and can be stored for several years. For that reason, it is easy to collect samples produced before and after de fires. The honey samples were collected in several cities of the center area, especially the most affected by the October fires. Honey samples extracted in 2017's summer (before the fires) and 2018's summer (after the fires) were collected. Each beekeeper provided honey from the same place in order to the basal contamination be similar.

With this work, it was optimized and validated a methodology to extract PAHs from honey samples with values of LOD of: 0.07  $\mu\text{g}/\text{kg}$  for B(a)A, 0.08  $\mu\text{g}/\text{kg}$  for Cris, 0.07  $\mu\text{g}/\text{kg}$  for B(b)F and 0.09  $\mu\text{g}/\text{kg}$  for B(a)P and LOQ of 0.21  $\mu\text{g}/\text{kg}$  for B(a)A, 0.23  $\mu\text{g}/\text{kg}$  for Cris, 0.22  $\mu\text{g}/\text{kg}$  for B(b)F and 0.27  $\mu\text{g}/\text{kg}$  for B(a)P (considering a typical sample weight of 10 grams, recovered in 1 mL of final volume and a mean recovery rate for each compound). These values allow the method to be used to control honey, to already established legal limits to other matrices (the lowest content legislated is 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). In none of this samples were detected PAHs and it is considered that in 2018's honey's production, in the studied regions, there was no honey contamination with PAHs because of 2017's fires.

Despite the results showing no contamination from PAHs on honey, it is necessary to continue to monitor, not only the honey, but also the several foods that could be affected in the future by this catastrophe.

**Keywords:** polycyclic aromatic hydrocarbons; honey; forest fires.

## I. Contextualização e objetivos

O ano de 2017 foi o ano mais severo em termos de área ardida dos últimos 10 anos com 442 418 hectares queimados sendo que, no mês de outubro arderam 223 901 hectares (correspondente a 51 % da área ardida total do ano). Nesse ano, existiram 116 dias em alerta amarelo ou superior devido às condições meteorológicas que eram favoráveis à propagação de incêndios florestais (1). Os dois principais incêndios ocorreram em junho e outubro, em Pedrógão Grande e na região norte e centro, respetivamente. No total morreram mais de 100 pessoas e mais de 250 ficaram feridas o que faz deste ano o pior de sempre (3) relativamente a perdas humanas.

Em grandes incêndios como estes (fogos cuja área ardida é igual ou superior a 100 hectares) (1) além das mortes que ocorrem também se verificam grandes danos, não só a nível material e de biodiversidade, mas também na saúde das populações (com a inalação de fumo) e pode existir um potencial risco na segurança da água e dos alimentos.

De modo a perceber qual é a influência de grandes incêndios na segurança alimentar é necessário que haja resultados do mesmo tipo de amostras e do mesmo local antes e depois do incêndio. Só assim se consegue fazer de um modo mais adequado a comparação de ambos os cenários.

Como a ideia deste estudo surgiu após os incêndios de 2017, seria necessário escolher um alimento para o qual fosse possível encontrar amostras existentes antes dos incêndios e amostras produzidas no ano de 2018. O género alimentício escolhido foi o mel exatamente por esta razão: era expectável encontrar amostras, no estado natural, antes e depois dos incêndios. Os PAHs são compostos persistentes e formados, principalmente, pela combustão incompleta de material orgânico, podendo presumir-se que durante estes incêndios tenham sido produzidos em elevadas quantidades.

Os principais objetivos deste trabalho são determinar as concentrações de PAHs nos méis da zona centro antes e após os fogos e perceber se os incêndios de 2017 estão relacionados com alguma possível alteração nestes valores.

## 2. Segurança Alimentar

Ao longo dos anos a segurança dos alimentos tem sido um tema cada vez mais debatido e explorado na comunidade científica com cada vez mais interesse por parte das populações. Existem vários perigos a ter em conta quando se fala sobre alimentos. Os mais comuns são os perigos biológicos, os perigos físicos e os perigos químicos (4). Os primeiros são aqueles que apresentam um maior risco na segurança dos alimentos e podem ser bactérias, parasitas e vírus, por exemplo. Estes microrganismos são eliminados, na sua maioria, quando se expõe o alimento a elevadas temperaturas e, por isso, os casos de doença ocorrem, mais frequentemente, quando a contaminação é feita depois dos alimentos estarem cozinhados ou quando são consumidos crus. Os perigos físicos são todas as matérias estranhas que estão num alimento. Estas matérias podem ser ossos, espinhas ou fragmentos de madeira, vidro ou metal, por exemplo, e provocam efeitos imediatos quando ingeridos ao causar lesões no trato gastrointestinal e/ou asfixia (5). Os perigos químicos são substâncias químicas que podem estar presentes nos alimentos resultantes da adição ou contaminação de produtos usados em qualquer momento da sua produção, processamento ou transporte, por exemplo. Dos vários perigos químicos podem enumerar-se os pesticidas, os PAHs e os metais pesados (6). Neste caso, as doenças são provocadas, normalmente, devido à acumulação destas substâncias no organismo, o que é problemático a longo prazo, podendo provocar alterações hormonais ou cancro (4).

Apesar de ser impossível eliminar todos os perigos dos alimentos que consumimos é indispensável controlar a sua contaminação, visto que uma contaminação elevada ou a propagação de microrganismos patogénicos em alimentos podem causar doenças ou perturbações nos consumidores.

De modo a evitar potenciais riscos que possam pôr em causa a saúde dos consumidores deve ser implementado um sistema de Análise de Perigos e Controlo de Pontos Críticos (HACCP) em todas as empresas do setor alimentar.

Este sistema passa pela aplicação de princípios técnicos e científicos em toda a cadeia alimentar desde a sua produção até ao momento em que o alimento está a ser consumido (“do prado até ao prato”). Estes princípios têm como objetivo identificar os perigos, estabelecer e aplicar medidas preventivas e corretivas para esses perigos, estabelecer

processos regulares de verificação das medidas aplicadas e criar um sistema de registo para todos os controlos efetuados (8).

A avaliação do risco é um dos componentes da análise do risco que permite estimar a associação entre a exposição a um perigo e a ocorrência de resultados que ponham em causa a saúde das populações. Esta análise é feita em quatro passos: a identificação e a caracterização do perigo, a avaliação da exposição e a caracterização do risco. No caso dos PAHs, a identificação e a caracterização do perigo já estão definidos (7). Isto é, sabe-se o que são PAHs, como são formados e a sua composição bem como os seus efeitos quando existe uma exposição elevada por parte dos indivíduos. É necessário agora verificar, através de dados estatísticos, com que frequência e de que modo é que os PAHs entram na cadeia alimentar das populações (neste caso em concreto, perceber qual é a ingestão média diária de mel e os níveis de contaminação médios nele presentes) para avaliar a exposição, e de seguida, estimar a probabilidade e a severidade com que estes compostos afetam a população. Finalmente, é necessário que haja uma boa gestão e comunicação do risco para que a informação chegue com a rapidez, pertinência e o cuidado necessários a essa população.

## 3. Mel

### 3.1- As abelhas e o mel

As primeiras abelhas da espécie *Apis mellifera*, que são as abelhas do mel mais estudadas e conhecidas, apareceram na era Cenozoica há cerca de cinquenta e cinco milhões de anos. A colheita de mel pelo ser humano começou com o *Homo sapiens* há cerca de trezentos e cinquenta mil anos. As provas mais antigas desta interação correspondem a gravuras do Mesolítico onde se encontram imagens de uma pessoa a subir uma rocha e outra com um saco ao pé do ninho e várias abelhas a voar à volta (9).

Cada ninho tem uma abelha-rainha cuja única função é por ovos para assegurar a continuidade da espécie. Estes ovos, ao desenvolver-se podem formar abelhas-operárias, abelhas-rainha ou zangãos. Os ovos das abelhas-operárias são colocados no favo. Estas abelhas são as mais pequenas da colmeia e são as que são normalmente encontradas nos campos e nas flores. Todas estas abelhas são fêmeas e as suas funções são guardar e construir a colmeia, recolher o néctar e o pólen, polinizar as flores e tratar das abelhas mais jovens (10). As abelhas-rainha desenvolvem-se através de larvas cujos ovos foram colocados em alvéolos construídos propositadamente com um tamanho maior e em forma de amendoim (11) e apenas comem geleia real que é produzida por glândulas das abelhas operárias. É esta alimentação que faz com que o sistema reprodutor destas abelhas se torne muito mais desenvolvido. Quando adultas, abandonam o ninho com algumas abelhas-operárias para criar um ninho novo. Os zangãos são todos os machos e apenas servem para fertilizar as abelhas-rainha (10). Quando as abelhas-rainha abandonam o ninho onde nasceram, os zangãos já estão à espera no local do novo ninho para as fecundar. No momento em que se estão a reproduzir, o aparelho reprodutor fica agarrado às abelhas e os zangãos ficam desmembrados. Por isso, quando se separam, morrem imediatamente. Os zangãos que não forem escolhidos para a copulação voltam para a colmeia, mas, ao fim de algum tempo são excluídos e expulsos pelas abelhas.

No verão, a população nas colmeias aumenta exponencialmente ascendendo até aos milhares de abelhas e é nessa altura que se desenvolvem mais abelhas-rainha e zangãos sendo, por isso, uma altura em que novos ninhos são formados.

### 3.2- Categorias do mel

Segundo o Decreto-Lei nº 214/2003 (12), o mel é uma “substância açucarada natural produzida pelas abelhas da espécie *Apis mellifera* a partir do néctar de plantas ou das secreções provenientes de partes vivas das plantas ou de excreções de insetos sugadores de plantas que ficam sobre partes vivas das plantas, que as abelhas recolhem, transformam por combinação com substâncias específicas próprias”. A esta substância não pode ser adicionado qualquer tipo de ingrediente ou aditivo alimentar nem removido algum dos seus elementos (13).

Existem diversas formas de categorizar o mel desde a sua origem, tipo e fonte do néctar, por exemplo. Na Tabela I encontram-se resumidas algumas destas categorias e a descrição de cada uma delas (12) (14).

**Tabela I - Tipos de mel**

<b>Categoria</b>	<b>Descrição</b>
<b>Segundo a sua origem</b>	
Mel de néctar	Mel obtido através do néctar das plantas
Mel de melada	Mel obtido a partir, principalmente, de excreções de insetos sugadores de plantas (como cigarras, por exemplo) que ficam nas plantas ou secreções de plantas
<b>Segundo a fonte do néctar</b>	
<b>Floral</b>	
<u>Unifloral</u>	Mel recolhido do mesmo tipo de flor
<u>Multifloral</u>	Mel recolhido de flores de vários tipos
<b>Não floral</b>	Mel de abelhas que extraem os açúcares de tecidos vivos de plantas e frutas e/ou de excreções de insetos que estão nas plantas
<b>Segundo o modo de apresentação ou produção</b>	
Mel em favos	Mel armazenado nos alvéolos dos favos
Mel com pedaços de favos	Mel que contém pedaços de mel em favos
Mel escorrido	Mel obtido pelo escorrimento de favos
Mel centrifugado	Mel obtido pela centrifugação de favos
Mel prensado	Mel obtido pela compressão de favos com aquecimento máximo de 45 °C
Mel filtrado	Mel obtido pela eliminação de substâncias estranhas da sua composição
<b>Segundo o tipo</b>	
Mel de apiário	Mel produzido por <i>Apis cerana indica</i> e <i>Apis mellifera</i> em apiários
Mel florestal	Mel produzido pelas abelhas <i>Apis dorsata</i> ou ninhos selvagens de <i>Apis cerana indica</i>

Todas as propriedades físicas e químicas tais como a cor (que pode variar desde quase incolor a castanho-escuro) (12), o aroma, a densidade, a viscosidade, o sabor e o valor nutricional são diferentes segundo o tipo de mel e influenciadas pelo tipo de flores usadas e pelas condições climáticas (14).

Existe também o mel para uso industrial. Este mel não deve ser consumido em cru e pode ter uma cor e sabor anormais, ter sido sobreaquecido e ter fermentado ou começado a fermentar. O mel para uso industrial serve para ser utilizado como ingrediente de outros géneros alimentícios (12).

### **3.3- Composição química, ingestão média diária e limites legais**

O mel é uma solução aquosa de açúcar hidrolisado com uma mistura complexa de proteínas, enzimas, aminoácidos, ácidos orgânicos, polifenóis, vitaminas, minerais e outros compostos (14). O mel não é um género alimentício comido diariamente e em grandes quantidades. Apesar da sua enorme variedade a nível de constituintes na sua composição, a contribuição do mel para a Dose Diária Recomendada de nutrientes é muito baixa. Uma colher de mel (cerca de 20 g) apenas contribui em cerca de 3 % para as necessidades energéticas recomendadas diariamente (15).

A sua composição depende da origem floral, do néctar recolhido, da fisiologia da abelha e do modo de processamento após a colheita do mel (16).

Segundo a legislação portuguesa (12), no mel de néctar, a soma do teor de frutose e glucose deve ser sempre superior a 60 % e no mel de melada e nas misturas de mel de melada com mel de néctar deve ser, no mínimo, 45 %. Estes açúcares são os que estão em maior quantidade no mel (9) e, em zonas temperadas, podem chegar até 80 % da sua composição (14). No mel em geral, o teor de sacarose não pode ultrapassar os 5 %. Um valor alto de sacarose está relacionado com a maturação do mel ou pode ser revelador de adulterações. Apesar disso, é também influenciado pela origem botânica do mel (17). Assim sendo, há exceções no que a este parâmetro dizem respeito, e há certos méis específicos em que este valor passa a ser 10 % e 15 %. Dentro destas exceções encontra-se, por exemplo, o mel de citrinos e rosmaninho, respetivamente (12).

O teor de água depende das condições climáticas, da humidade dentro do favo, do néctar e do modo de extração e armazenamento do mel (14). O mel para consumo humano deve ter, no máximo 20 % de água (12), sendo que, com valores superiores a 18 % existe o risco de ocorrer fermentação. Apenas o mel de urze tem uma exceção em que o valor máximo é de 23 % visto que, este mel tem, naturalmente, um teor de água superior (17) talvez devido ao facto de que o mel de urze é um mel com origem montanhosa e, normalmente está acompanhado de silvas – o que torna o mel com mais humidade (18). Como descrito anteriormente, apenas nos méis para uso industrial pode ocorrer fermentação. Deste modo, o mel para uso industrial tem também o valor máximo legislado de 23 % para o teor de água e o mel de urze para uso industrial de 25 % (12).

O mel tem também alguns ácidos na sua composição sendo o mais predominante o ácido glicólico. Os ácidos não são só responsáveis por conferir sabor, mas também para manter a estabilidade do mel contra microrganismos (19) como veremos no **ponto 3.5**. O pH do mel pode variar muito (há estudos que descrevem valores de pH entre 3.4 e 6.1) (14).

Apesar de ter 18 aminoácidos essenciais e não essenciais (14) estes não apresentam valor nutricional significativo porque estão em pouca quantidade. É pela quantidade de azoto que se consegue determinar o teor de proteína numa amostra. Em média, o mel tem 0,04 % de azoto e apenas 40 % a 65 % correspondem a proteína (o restante corresponde a aminoácidos livres) (19). A quantidade e distribuição de aminoácidos é característica e permite perceber a origem botânica do mel (14). Estudos indicam que a presença de valor mais elevados de proteína faz com haja uma diminuição na tensão superficial e aumenta a tendência de formar espuma e bolhas de ar. Um exemplo prático é o mel de trigo sarraceno que já tem, naturalmente, um maior conteúdo em proteína e a essa tendência de formar bolhas de ar e espuma confirma-se (19).

O mel tem também outros compostos que são úteis para detetar a origem e adulterações. É o caso dos compostos voláteis e dos polifenóis. Os primeiros são como que impressões digitais do aroma e os segundos são potenciais marcadores bioquímicos para a autenticação de propriedades antioxidantes e da origem geográfica do mel (14).

O valor de HMF é usado, muitas vezes, como indicador da qualidade do mel. Este composto é formado naturalmente através da decomposição da frutose em meio ácido, mas também pode ser resultado de um armazenamento inadequado, da adição de açúcares ao

mel e da exposição do mel a temperaturas elevadas (o que fomenta a produção de HMF) (20). Apesar de ainda não haver dados que indiquem que a ingestão de HMF seja prejudicial ao ser humano, existem limites máximos legislados para que se evitem adulterações. O mel em geral (exceto o mel para uso industrial que pode ser aquecido) tem um limite máximo estabelecido de 40 mg de HMF por kg de mel. No mel de regiões tropicais este valor passa para 80 mg/kg de mel, possivelmente por estar mais exposto ao calor e, naturalmente, produzir uma quantidade superior de HMF.

Além dos indicados, há outros limites legais que é necessário serem cumpridos como é o caso dos parâmetros enunciados na Tabela 2 (12).

**Tabela 2** - Limites legais de alguns compostos no mel (12)

<b>Critério</b>	<b>Legislação</b>
<b>Teor de matérias insolúveis na água</b>	<u>Em geral:</u> máx: 0,1 g/ 100 g mel <u>Mel prensado:</u> máx: 0,5 g/ 100 g mel
<b>Condutividade elétrica</b>	<u>Em geral:</u> máx: 0,8 mS /cm <u>Mel de melada, mel de flores de castanheiro:</u> min: 0,8 mS/cm
<b>Ácidos livres</b>	<u>Em geral:</u> máx: 50 mEq /kg de mel <u>Mel para uso industrial:</u> máx: 80 mEq /kg de mel
<b>Índice diastásico</b>	<u>Em geral</u> (exceto mel para uso industrial): min: 8 <u>Mel com baixo teor de enzima e teor de HMF não superior a 15 mg/ kg:</u> min: 3

### 3.4- Contaminação: como e com quê?

Sendo o mel um alimento ingerido, normalmente, sem qualquer tipo de processamento, todas as formas de contaminação nele presentes não são eliminadas. A contaminação do mel pode ocorrer de diversas formas. Pode ocorrer contaminação direta quando é o apicultor que, de forma não propositada, contamina o mel com que está em contacto; contaminação indireta advém das práticas agrícolas e do ambiente (21). Apesar da legislação indicar que o mel deve estar livre de “matérias orgânicas e inorgânicas estranhas à sua composição” (12) o mel pode estar contaminado de várias formas. Das diversas formas de contaminação, as mais comuns são toxinas, pesticidas, PAHs e PCBs (21).

Existem vários fatores que influenciam o tipo e o nível de contaminantes no mel, como seja o aumento do uso de produtos químicos como por exemplo pesticidas. A

contaminação do mel depende também da fisiologia da abelha e da contaminação ambiental a que estão expostas, da localização das amostras, do tratamento do mel após a sua colheita e da origem e do tipo de flora (21).

Pela cor do mel consegue-se perceber facilmente algumas características. Estudos indicam que o mel com uma cor mais escura tem maiores concentrações de cádmio, ferro e chumbo enquanto que os méis de cor mais clara têm uma concentração superior de alumínio e magnésio (10).

Tanto as abelhas como os produtos resultantes da sua atividade são bons indicadores de contaminação por muitas razões (10):

- são ubíquos no ambiente e facilmente identificáveis;
- existem em muitos habitats, incluindo os habitados e contaminados pelo Homem;
- estão presentes durante o ano todo;
- acumulam contaminantes;
- as abelhas recolhem o néctar de diversas plantas, em localizações diferentes além de sobrevoarem e recolherem néctar de áreas com uma grande extensão;
- é fácil apanhar as abelhas, porque todas as noites elas voltam às colmeias;
- são produtos fáceis de obter e a um preço baixo;
- reproduzem-se rapidamente e têm um ciclo de vida pequeno;
- adaptam-se a condições menos favoráveis.

### **3.4.1 - Botulismo**

O mel contaminado com esporos de *Clostridium botulinum* está associado a um elevado número de casos de botulismo em crianças. O botulismo é uma doença potencialmente fatal e rara, causada pela ingestão de neurotoxinas de *C. botulinum*. Esta bactéria produz esporos que, na ausência de oxigénio germinam, crescem e produzem toxinas. O botulismo é caracterizado pela paralisação muscular generalizada dos músculos que, numa fase final, levam à falha respiratória pela falta de movimentos respiratórios.

Ao contrário da bactéria, as toxinas não se degradam em meios ácidos e, por isso, mantêm-se presentes no mel. Os esporos e as toxinas são também resistentes ao calor. A ingestão de esporos e toxinas por crianças é muito perigosa, principalmente até aos 6 meses

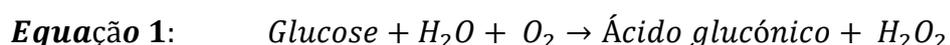
de idade porque nesta altura as defesas do organismo das crianças não estão completamente desenvolvidas e o sistema imunitário não os consegue eliminar. Por esta razão, não é recomendado a ingestão de mel por crianças até 1 ano (22).

### 3.5- Propriedades terapêuticas e benefícios do mel

Devido à composição e características típicas do mel este possui propriedades benéficas ao organismo e ao sistema imunitário. De entre estas propriedades encontram-se as atividades antimicrobianas, anti-inflamatórias e antioxidante além de ajudar na cicatrização de feridas cutâneas (14).

A composição do mel confere-lhe propriedades antimicrobianas. O mel tem tanto a capacidade de inibir o crescimento de bactérias (atividade bacteriostática) como a de as eliminar (atividade bactericida). A primeira e principal razão é o facto de este ter uma enorme quantidade de açúcar, tornando-o uma solução saturada, aumentando a concentração osmótica e, por consequência, baixando a atividade da água. Isto faz com que os microrganismos não tenham água nem suporte para o seu crescimento e acabem por morrer desidratados. A acidez também é um fator que auxilia na ação bacteriostática. O nível de acidez do mel é, normalmente, inferior ao ideal para o crescimento e propagação da grande maioria dos microrganismos patogénicos. Mais concretamente, o mel tem uma ação eficaz contra a ligação de *Salmonella* às mucosas do intestino e também é útil no combate a *Escherichia coli* O157:H7 (a estirpe mais perigosa de *E. coli*) e *Helicobacter pylori*.

Como visto anteriormente, a acidez do mel confere estabilidade contra microrganismos. Uma das reações que ocorre no organismo depois da ingestão do mel é a oxidação da glucose. A glucose resultante da conversão da sacarose (em glucose e frutose) formada pela ação da invertase sofre oxidação em meio aquoso na presença de glucose oxidase e forma ácido glucónico e peróxido de hidrogénio. De forma geral,



As propriedades terapêuticas que daqui advêm relacionam-se com decomposição do  $\text{H}_2\text{O}_2$  em radicais livres. Estes radicais são muito reativos e vão interagir e matar as bactérias (14).

A atividade antioxidante do mel provém, na sua maioria, dos compostos fenólicos presentes no mel. De uma forma geral, o que os antioxidantes fazem é inibir a formação de radicais livres e diminuir os efeitos adversos causados por oxigênio reativo e azoto. Há estudos que indicam que os méis mais escuros têm uma concentração maior de compostos fenólicos e que, por isso, têm uma atividade antioxidante maior do que os méis de cor mais clara (17).

Os componentes responsáveis pela atividade anti-inflamatória do mel são os flavonoides. Apesar dos mecanismos ainda não serem bem compreendidos sabe-se que estão relacionados com a atividade antioxidante dos mesmos e que promovem a eliminação dos agentes oxidantes (responsáveis pela inflamação) (17).

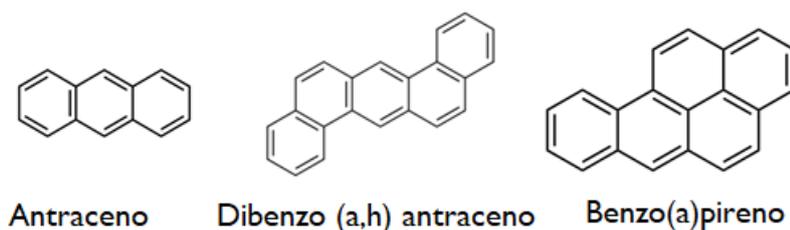
A nível celular, o mel estimula também a multiplicação de linfócitos B e T e ativa os neutrófilos, células responsáveis pela defesa do organismo contra organismos estranhos ao corpo. Também potencia a produção de TNF- $\alpha$  que são células capazes de provocar a apoptose de células tumorais. Além disso, o mel pode também ser usado no tratamento de feridas, sendo já um ingrediente de diversos medicamentos. Devido à sua natureza viscosa, o mel forma uma barreira que evita a contaminação da ferida e promove a formação de novos capilares sanguíneos em tecidos mais profundos da pele. Auxilia também a produção de fibras de colagénio, estimula o crescimento de células epiteliais e previne cicatrizes. (14)

A adição de mel a medicamentos como xaropes, por exemplo, além de todas as vantagens terapêuticas anteriormente descritas, é uma forma fácil e barata de tornar este medicamento mais doce e aceitável (23).

## 4. Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos

### 4.1- Características gerais

Os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, comumente designados por PAHs, são compostos orgânicos sem cor, brancos ou amarelados. Estas substâncias são constituídas apenas por carbono e hidrogênio organizados em dois ou mais anéis aromáticos combinados em variadas estruturas (2). Na Figura 1 encontram-se algumas destas estruturas sendo estas (da esquerda para a direita) exemplos de uma estrutura linear, angular e agrupada.



**Figura 1** - Exemplos de estruturas moleculares de alguns PAHs

Os PAHs estão divididos, essencialmente, em dois grandes grupos: os PAHs com baixo peso molecular, onde se encontram os compostos com até quatro anéis aromáticos; e os PAHs com elevado peso molecular que são os compostos com mais de quatro anéis aromáticos (24) e que, devido ao número mais elevado de anéis aromáticos são mais estáveis e tóxicos (25). Os PAHs têm pontos de ebulição e de fusão elevados, baixa pressão de vapor, fraca solubilidade na água, são sensíveis à luz e resistentes ao calor (2). Além disso, são também persistentes no ambiente (podendo acumular-se no solo durante décadas) (26), ubíquos no solo, na água e no ar (7), lipofílicos e hidrofóbicos (27). Estas duas últimas particularidades indicam que os PAHs têm elevada afinidade com tecidos lipídicos, muito pouca afinidade com a água e permitem que haja uma acumulação dos compostos nos tecidos das plantas e dos animais (26). Estes compostos apresentam fluorescência e têm um espectro no UV característico que permite que haja uma identificação simples e inequívoca (2).

Como descrito mais pormenorizadamente no **ponto 4.4**, os PAHs têm efeitos negativos nas populações. Além de ser o mais estudado, o benzo(a)pireno é o único PAH que pertence ao grupo I da IARC e que é carcinogénico para os humanos (27). Contudo, existem outros PAHs considerados prioritários pela US-EPA (28) e pela EFSA (29) que se encontram descritos nas Tabelas 3 e 4 com o grupo da IARC ao qual pertencem (30).

A IARC desenvolveu uma classificação que avalia a carcinogenicidade de substâncias. Esta classificação consiste em cinco grupos sendo o grupo 1 o que contém os compostos considerados carcinogénicos e o grupo 4 os compostos que não apresentam carcinogenicidade para o ser humano (30). Deste modo:

- Grupo 1: os compostos são carcinogénicos para os humanos;
- Grupo 2A: os compostos são, provavelmente, carcinogénicos para os humanos;
- Grupo 2B: os compostos são, possivelmente, carcinogénicos para os humanos;
- Grupo 3: os compostos não podem ser classificados como carcinogénicos para os humanos;
- Grupo 4: os compostos provavelmente não são carcinogénicos para os humanos.

**Tabela 3** - 16 PAHs prioritários pela EPA e os respetivos grupos da IARC

Composto	Grupo IARC
Naftaleno	Grupo 2B
Acenafteno	Grupo 3
Acenaftileno	-----
Fluoreno	Grupo 3
Fenantreno	Grupo 3
Antraceno	Grupo 3
Fluoranteno	Grupo 3
Pireno	Grupo 3
<b>Benzo(a)antraceno</b>	Grupo 2B
<b>Criseno</b>	Grupo 2B
<b>Benzo(b)fluoranteno</b>	Grupo 2B
<b>Benzo(k)fluoranteno</b>	Grupo 2B
<b>Benzo(a)pireno</b>	Grupo 1
<b>Benzo(a,h)antraceno</b>	Grupo 2A
<b>Benzo(g,h,i)perileno</b>	Grupo 3
<b>Indeno(1,2,3,c,d)pireno</b>	Grupo 2B

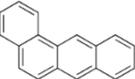
**Tabela 4** - 15 PAHs prioritários pela EFSA e os respetivos grupos da IARC

Composto	Grupo IARC
<b>Benzo(a)antraceno</b>	Grupo 2B
<b>Benzo(b)fluoranteno</b>	Grupo 2B
Benzo(j)fluoranteno	Grupo 2B
<b>Benzo(k)fluoranteno</b>	Grupo 2B
<b>Benzo(g,h,i)perileno</b>	Grupo 3
<b>Benzo(a)pireno</b>	Grupo 1
<b>Criseno</b>	Grupo 2B
Ciclopenta(c,d)pireno	Grupo 2A
<b>Benzo(a,h)antraceno</b>	Grupo 2A
Dibenzo(a,e)pireno	Grupo 3
Dibenzo(a,h)pireno	Grupo 2B
Dibenzo(a,i)pireno	Grupo 2B
Dibenzo(a,l)pireno	Grupo 2A
<b>Indeno(1,2,3,c,d)pireno</b>	Grupo 2B
5-metilcriseno	Grupo 2B

Os compostos assinalados a negrito são os que estão em comum nas duas listas e que, por este motivo, são mais estudados pela comunidade científica. Estes oito PAHs são denominados PAH8. Era prática comum a determinação destes oito compostos em géneros alimentícios. Contudo, estudos indicam que a análise de apenas quatro destes oito PAHs (designados PAH4 e que incluem o benzo(a)antraceno, benzo(b)fluoranteno, criseno e benzo(a)pireno) são suficientes. Isto é, a análise dos PAH8 não adiciona informação mais

relevante do que os PAH4 (31). Isto acontece porque os restantes quatro PAHs que completam o grupo dos PAH4 não são encontrados frequentemente nos alimentos (32). Dessa forma, neste trabalho serão analisados os PAH4. Na Tabela 5 encontra-se a estrutura molecular e a massa molecular dos quatro PAHs em questão (29).

**Tabela 5** - Estrutura e massa molecular dos PAHs em estudo

<b>Composto</b>	<b>Estrutura molecular</b>	<b>Massa molecular (g/mol)</b>
<b>Benzo(a)pireno</b>		252,316
<b>Benzo(b)fluoranteno</b>		252,316
<b>Criseno</b>		228,294
<b>Benzo(a)antraceno</b>		228,294

Todos estes compostos têm quatro ou mais anéis aromáticos e, por essa razão, pertencem ao grupo de PAHs com elevado peso molecular sendo, por isso, muito estáveis e tóxicos. Com a exceção do benzo(a)pireno, que é carcinogénico para o ser humano, todos os outros PAHs pertencem ao grupo 2B da IARC e são possíveis agentes cancerígenos.

## 4.2- Fontes, usos e tipos de PAHs

Os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos são formados, maioritariamente, pela combustão incompleta de material orgânico (33) mas existem diversas fontes e tipos de PAHs. Quanto às fontes, os PAHs podem ter origem natural ou antropogénica. Na natureza, os PAHs são formados durante erupções vulcânicas, incêndios florestais e até por algumas bactérias (2).

A responsabilidade do Homem na produção e emissão de PAHs na atmosfera passa sobretudo pela queima de madeira, óleos, gás e carvão para aquecimento residencial, para gerar energia na indústria, incineração, produção de alumínio, ferro e aço, bem como na produção de destilados de petróleo (sendo este fator cada vez menos importante por se

utilizarem sistemas fechados e de reciclagem cada vez mais eficientes). Estas fontes fixas de produção e emissão de PAHs representam cerca de 80 % do total anual das emissões de PAHs. Das fontes não fixas de produção destes compostos destaca-se o trânsito rodoviário (24).

A origem e concentração dos PAHs varia consoante a estação do ano. Estudos indicam que, normalmente, no inverno a concentração de PAHs é superior em relação às outras três estações devido ao aumento de material que é queimado para o aquecimento das casas (29). As diferentes fontes de produção e emissão de PAHs correspondem também diferentes perfis de compostos existentes (29).

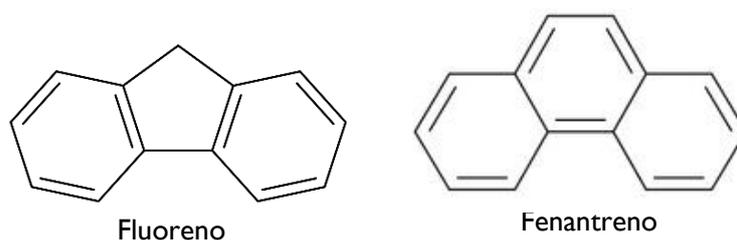
Apesar de não serem produzidos propositadamente (2), os PAHs podem ser usados em diversas indústrias como intermediários na produção de metal (24), produtos farmacêuticos e agroquímicos, pigmentos, plásticos e eletrónica após a sua refinação e purificação (2).

Quanto ao tipo, os PAHs mais comuns no ambiente são os pirogénicos, os petrogénicos e os biológicos, que diferem na forma como são formados. Os PAHs pirogénicos são originados sob condições de pouco oxigénio e temperaturas superiores a 350 °C. Estes compostos são formados, por exemplo, durante a combustão incompleta dos combustíveis motores, madeira e óleos dos sistemas de aquecimento.

Os PAHs petrogénicos são formados durante a maturação do petróleo bruto durante milhões de anos sob temperaturas na ordem dos 150 °C. Dado o elevado uso e transporte do petróleo e dos seus derivados estes PAHs são difundidos muito rapidamente por toda a atmosfera.

A temperatura à qual são formados e o número de anéis aromáticos são propriedades que ajudam a distinguir estes dois tipos de PAHs formados de diferentes modos. Temperaturas de formação superiores tendem a produzir PAHs com menos cadeias alquiladas e por isso, normalmente os PAHs pirogénicos têm menores cadeias de carbono do que os PAHs petrogénicos. Além disso os PAHs com anéis de cinco carbonos são, normalmente, mais comuns em substâncias petrogénicas do que em substâncias pirogénicas, isto porque como a formação dos PAHs petrogénicos é muito lenta, os anéis têm tempo

para se reorganizar de uma forma diferente. Por outro lado, a rápida formação dos PAH pirogênicos implica uma produção de PAHs com anéis aromáticos mais estáveis (2).



**Figura 2** - Exemplos de PAHs com um anel de cinco carbonos (à esquerda) e com seis carbonos (à direita)

Por último, os PAHs biológicos são sintetizados por algumas plantas e bactérias ou durante a degradação de matéria vegetal. Certos alimentos como o trigo e as lentilhas podem sintetizar PAHs e/ou absorvê-los através da água, do ar e do solo (2).

### **4.3 – Ocorrência de PAHs em géneros alimentícios**

Nos alimentos, a contaminação ocorre maioritariamente através do processamento, sobretudo durante o processo de assar e grelhar (quando existentes) (35). A comida crua não contém, normalmente, elevadas concentrações de PAHs sendo a contaminação nestes alimentos reflexo da contaminação do ambiente onde são produzidos. Deste modo, a vegetação e os alimentos produzidos em regiões próximas de zonas industriais ou estradas com tráfego acentuado podem apresentar teores até cerca de dez vezes superiores ao verificado em áreas rurais (2).

As características dos PAHs que mais influenciam a ocorrência destes compostos nos alimentos são: a baixa solubilidade em água, a elevada solubilidade em solventes orgânicos e a sua volatilidade, que determinam a capacidade de transporte e propagação de PAHs no ambiente, bem como a sua bioacumulação na cadeia alimentar; a reatividade química, que determina a acumulação em plantas e animais e a sua capacidade e degradação pelo ambiente.

Os PAHs com maior peso molecular (quatro ou mais anéis) encontram-se essencialmente agregados a partículas em suspensão no ar (tipicamente fuligem e cinzas), sendo por isso a sua deposição a principal via de contaminação do solo e conseqüentemente

a porta de entrada na cadeia alimentar. Os PAHs com dois ou três anéis aromáticos encontram-se na sua maioria na fase gasosa, havendo uma distribuição equilibrada entre estas duas situações para os PAHs de quatro anéis. Consequentemente vegetais de folha larga, bem como todo o tipo de animais que se alimenta destes vegetais podem ser contaminados pelos PAHs adsorvidos nas partículas que sofrem deposição no solo.

Outra potencial porta de entrada no ciclo alimentar humano é aberta pelos bivalves que, filtrando volumes elevados de água contaminada, quer por deposição de PAHs ambientais, quer por lançamento de resíduos industriais e domésticos contaminados em rios e mares, vão acumular estes compostos, podendo resultar (sobretudo em zonas perto de indústrias poluentes) em teores de PAHs elevados presentes nestes seres vivos. Estes são depois diretamente consumidos pelos humanos ou entram na cadeia alimentar através dos peixes que consomem os bivalves.

No caso de pessoas não fumadoras, apesar da inalação ter também uma grande influência (36), a alimentação é a maior fonte de exposição a PAHs (36). Dado a sua natureza lipofílica, os PAHs têm uma tendência para se acumular em gordura e, deste modo, esta categoria de alimentos é a que mais contribui para a ingestão de PAHs pelas populações (25). Nos fumadores, o tabaco contribui com 50% da exposição total (29).

A Tabela 6 indica a ingestão média diária de alguns PAHs por alimentos, água e ar (37).

**Tabela 6** - Ingestão média estimada diária por diferentes meios por um adulto não-fumador

<b>Composto</b>	<b>Alimentos (ng/pessoa)</b>	<b>Água potável (ng/pessoa)</b>	<b>Ar (ng/pessoa)</b>
<b>Benzo (a) pireno</b>	50 - 290	0,2 - 2	20
<b>Benzo (e) pireno</b>	200		20
<b>Benzo (a) antraceno</b>	<20 - 410	0,2 - 10	20
<b>Criseno</b>	200 - 1530	200	20
<b>Benzo (b) fluoranteno</b>	5 - 360	0,1 - 2	20
<b>Benzo (j) fluoranteno</b>	<30	0,02 - 0,2	
<b>Benzo (k) fluoranteno</b>	40 - 140	0,02 - 0,2	20
<b>Dibenzo (a,h) antraceno</b>	<10 - 80		2

Em termos legais, os limites máximos de PAHs em alimentos são variados. O Regulamento da Comunidade Europeia nº 1881 de 2006 (38) fixa os teores máximos de diversos contaminantes de géneros alimentícios. No caso dos PAHs, a regulamentação estabelece quais os géneros alimentícios e respetivos teores máximos para o benzo(a)pireno (individualmente) e para a soma dos PAH4:

**Tabela 7** - Teores máximos de PAHs em géneros alimentícios (38)

<b>Género Alimentício</b>	<b>Teor máximo (µg/kg)</b>	
	<b>B(a)P</b>	<b>Σ(B(a)P + B(a)A + Cris + B(b)F)</b>
<b>Óleos e gorduras (com a exceção da manteiga de cacau e óleo de coco)</b>	2,0	10,0
<b>Grãos de cacau e produtos derivados</b>	5,0 (por kg de gordura)	30,0 (por kg de gordura)
<b>Óleo de coco</b>	2,0	20,0
<b>Carnes fumadas e produtos fumados à base de carne</b>	2,0	12,0
<b>Parte comestível de peixe fumado</b>	2,0	12,0
<b>Espadilhas fumadas, moluscos bivalves (frescos ou congelados) e carne tratada termicamente</b>	5,0	30,0
<b>Moluscos bivalves (fumados)</b>	6,0	35,0
<b>Alimentos transformados à base de cereais e alimentos para bebés destinados a lactentes e a crianças jovens</b>	1,0	1,0
<b>Fórmulas para lactentes e fórmulas de transição</b>	1,0	1,0
<b>Alimentos dietéticos destinados a fins medicinais específicos</b>	1,0	1,0

Como se verifica pela Tabela 7, há diversos alimentos e grupos de alimentos que não têm um teor máximo estabelecido de PAHs (como é o caso do mel), não sendo possível avaliar assim, se há contaminação acima de um valor legal.

#### **4.3.1- Ocorrência de PAHs no mel**

Existem vários estudos que avaliam a influência da poluição ambiental na contaminação do mel com PAHs. Na grande maioria destes estudos, não são reportados casos de concentrações elevadas destes compostos que possam causar preocupação para a saúde humana. Num estudo realizado em quinze regiões da Roménia (39) verificou-se que o mel produzido nas zonas urbanas estaria mais contaminado do que o mel das zonas rurais o

que foi justificado pela maior afluência de automóveis. Também se verificou que consoante a vegetação e árvores existentes, o mel das zonas rurais apresentava níveis de contaminação diferentes.

Num outro estudo, realizado em Espanha (40), em quinze das quarenta e duas amostras de mel analisadas não foram detetados quaisquer PAHs. Neste caso, foi usado mel vendido em supermercados. O facto de algumas amostras de mel não apresentarem níveis de PAHs detetáveis foi justificado devido à baixa poluição ambiental nas zonas em questão.

Um outro estudo, realizado na República Checa (41) concluiu que não existem diferenças substanciais de concentrações de PAHs entre mel de produtores locais e méis vendidos em grandes superfícies comerciais. Neste estudo, os resultados obtidos foram muito baixos e, em diversas amostras, não foi possível quantificar a concentração dos PAHs porque os valores foram inferiores ao limite de quantificação característico do método.

#### **4.4 - Efeitos dos PAH na saúde humana**

Como descrito anteriormente, existem variadas formas de o ser humano estar exposto a PAHs e, apesar da ingestão ser a maneira mais comum de exposição, o ar respirado dentro e fora de casa, o fumo do tabaco e de lareiras e o contacto dérmico têm também uma grande importância (2).

Diariamente, a população não está exposta a apenas um PAH, mas sim a uma mistura complexa destes compostos que podem ter diferentes mecanismos de ação no organismo humano. Como descrito anteriormente, os PAHs são lipofílicos, ou seja, ligam-se a tecido lipídico. Desta forma, a sua acumulação ocorre, principalmente, nos órgãos internos com mais tecido adiposo (2). Para serem excretados, os PAHs têm de passar por diversos processos até serem libertados pelas fezes e pela urina e, apesar dos PAHs na sua forma natural terem alguma toxicidade, são os seus metabolitos que causam maiores danos no ser humano (2). No organismo, os PAHs para serem metabolizados são ativados por enzimas específicas. Passam por um processo de epoxidação, seguido de conjugação com glutathione. Caso não exista esta conjugação com a glutathione, estes são convertidos em fenóis e dióis. Os metabolitos cuja polaridade não é suficiente para a sua excreção podem ser conjugados com sulfato ou glucuronato aumentando a polaridade e permitindo, assim, a sua excreção.

Os efeitos dos PAHs na saúde humana dependem do tempo e fonte de exposição, da concentração a que a pessoa foi exposta, do seu estado de saúde e da idade (2). Os efeitos mais comuns de toxicidade a curto-prazo, ou seja, efeitos visíveis pouco tempo após a exposição, são irritações oculares, vômitos, náuseas, diarreia e sensação de desnoiteio. Normalmente isto só acontece a pessoas que trabalham em indústrias em que há formação de elevadas concentrações de PAHs (tais como indústrias de carvão), na construção e reparação de estradas, mecânicos e maquinistas, por exemplo (42). Mais a longo prazo (toxicidade crónica) os efeitos causados pela exposição a PAHs são cataratas, lesões no fígado e nos rins e problemas respiratórios e nos pulmões. Uma exposição prolongada de PAHs com a pele pode causar vermelhidão e inflamação na pele (37).

Os metabolitos dos PAHs têm a capacidade de se ligar a proteínas celulares e ao DNA e podem causar alterações genéticas que podem provocar o desenvolvimento de malformações e o aparecimento de tumores e cancro. Um longo período de exposição aumenta o risco de contrair cancro, sendo os cancros na pele, nos pulmões na bexiga e os gastrointestinais os mais comuns (2). O consumo frequente de carne e de peixe fumados ou grelhados no carvão está altamente associado à elevada incidência de cancro de estômago (40).

Estudos conduzidos em laboratório e pela observação de alguns casos específicos, indicam que a ingestão e a exposição a elevadas concentrações de PAHs durante a gravidez resultam em malformações nos fetos, partos prematuros e asma (2). Após o nascimento, os bebés também são expostos a grandes quantidades de PAHs porque o tecido mamário, sendo constituído por lípidos, acumula PAHs que são depois excretados pelo leite materno e ingeridos pelos bebés (42).

#### **4.5 - Eliminação de PAHs**

Existem diversas formas de remover os PAHs do ambiente. Como cada PAH tem uma estrutura diferenciada e propriedades específicas, cada processo de degradação afeta de forma diferente a sua eliminação (2). De forma muito geral e simplificada serão discutidos dois dos processos de eliminação de PAHs da atmosfera.

A biodegradação é o processo de degradação mais estudado (2). Este processo pode ocorrer aeróbia ou anaerobiamente sendo que o metabolismo aeróbio [com oxigénio na

forma de água (H<sub>2</sub>O) ou dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), por exemplo] (43) é muito mais eficiente do que o metabolismo anaeróbio (2) [na ausência de oxigênio, estando presente metano (CH<sub>4</sub>)] (43). Isto acontece devido à maior quantidade de oxigênio presente que serve tanto como aceitador de elétrons como fonte de oxigênio o que favorece a degradação dos PAHs. A degradação microbiana é o principal processo de dissipação de PAHs com baixo peso molecular nos sedimentos (44). Este tipo de degradação depende das condições ambientais, do número e do tipo de microrganismos presentes e do PAH em questão. Alguns dos microrganismos capazes de degradar PAHs são: *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium spp.*, *Haemophilus spp.* e *Rhodococcus spp.* (43). As enzimas têm, também, uma grande importância na degradação dos PAHs. Apesar dos PAHs com estrutura angular (como o dibenzo(a)antraceno) serem os mais estáveis termodinamicamente, devido à sua estrutura, têm zonas abertas onde se ligam as enzimas capazes de os destruir. No entanto, se no mesmo local estiverem outros compostos de carbono, estas enzimas vão ligar-se a esses compostos deixando, assim, os PAHs persistir na atmosfera (2). Algumas enzimas envolvidas na degradação dos PAHs são a oxigenase, a lacase e as enzimas ligninolíticas (43).

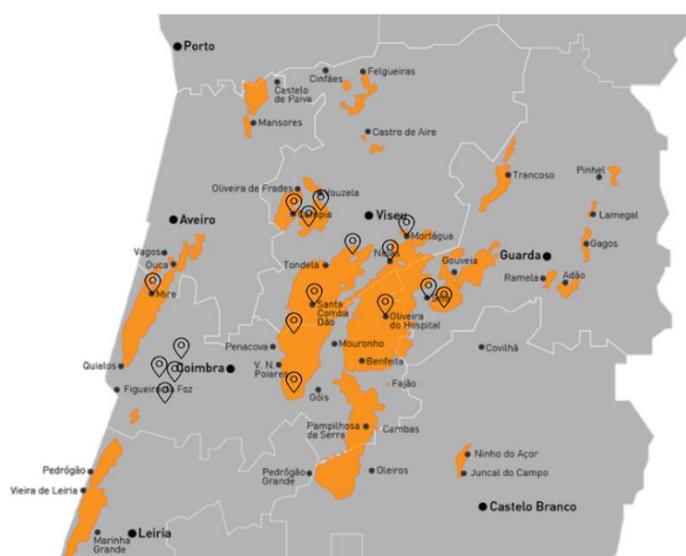
Uma outra forma de degradação dos PAHs é através da fotólise, ou seja, por reações provocadas pela absorção de luz. Quando a luz é absorvida pelos PAHs os elétrons excitam-se dentro das moléculas o que destabiliza a estrutura do PAH e induz diversos processos físicos e químicos que levam à destruição do composto. Os PAHs com uma estrutura linear são os que mais facilmente são eliminados pela ação da luz direta (2).

Existem vários aspetos que devem ser tidos em conta para reduzir as concentrações de PAHs na atmosfera: devem ser implementadas novas leis e regulamentos que limitem as emissões de PAHs, deve haver um incentivo ao desenvolvimento de novas tecnologias que melhorem as tecnologias de combustão e devem ser implementadas fontes de energia mais limpas. Em Portugal, os dados correspondentes às concentrações de PAHs são limitados. No entanto, na Europa as emissões de PAHs têm vindo a descer graças à diminuição do uso de carvão, às melhorias nas indústrias e da legislação mais rígida no setor dos transportes (24).

## 5. Trabalho experimental

### 5.1- Recolha das amostras

Todas as amostras foram recolhidas entre julho e outubro de 2018 de apicultores residentes em concelhos da região centro, especialmente nos afetados pelos incêndios de outubro de 2017. Em todos os locais foram solicitadas amostras de 2017 e de 2018, sendo que, para cada amostra de 2017 recolhida existe outra do ano de 2018 do mesmo local e do mesmo apicultor. Na Figura 3 encontra-se demarcado com a cor laranja as áreas queimadas nos incêndios de outubro de 2017 e a localização aproximada das amostras recolhidas e analisadas.



**Figura 3** - Área ardida nos incêndios de outubro de 2017 e a localização das amostras recolhidas

Como é possível perceber através da Figura 3 as 17 amostras recolhidas são provenientes de 12 concelhos diferentes sendo que 10 destes concelhos foram fortemente afetados pelos incêndios (com a exceção de Montemor-o-Velho e Soure). Na Tabela 8 estão registados os locais de onde foram recolhidas as amostras, o respetivo concelho e a nomenclatura dada a cada uma das amostras para que a sua identificação fosse o mais simples e rápida possível. De referir que, nos resultados, a indicação do ano ao qual a amostra pertence é feita com a designação “17” ou “18” (que corresponde a 2017 e 2018, respetivamente) em frente à abreviatura a seguir descrita. Todas as amostras foram preparadas em duplicado e as letras “A” e “B” têm como objetivo diferenciar estes ensaios. Assim, nos resultados podemos ver abreviaturas como “CMB18A”, por exemplo, que corresponde ao primeiro ensaio da amostra de Cambra, Vouzela do ano 2018.

**Tabela 8** - Local das amostras recolhidas, respetivo concelho e a abreviatura atribuída

<b>Local</b>	<b>Concelho</b>	<b>Abreviatura</b>
<b>Valeirinha</b>	Mira	MIR
<b>Cambra</b>	Vouzela	CMB
<b>Farves</b>	Vouzela	FAR
<b>Campia</b>	Vouzela	CMP
<b>Mangualde</b>	Mangualde	MAN
<b>Lousã</b>	Lousã	LOU
<b>Mortágua</b>	Mortágua	MOR
<b>Nelas</b>	Nelas	NEL
<b>São Pedro de Alva</b>	Penacova	PEN
<b>Fiais da Beira</b>	Oliveira do Hospital	FIB
<b>Coval</b>	Santa Comba Dão	SCD
<b>Zambujeiro</b>	Montemor-o-Velho	ZAM
<b>Montemor-o-Velho</b>	Montemor-o-Velho	MV1
<b>Montemor-o-Velho</b>	Montemor-o-Velho	MV2
<b>Seia</b>	Seia	SE1
<b>Seia</b>	Seia	SE2
<b>Granja do Ulmeiro</b>	Soure	GUL

As amostras foram mantidas nos recipientes originais, num local fresco e seco até ao momento da preparação para a análise. Todas as amostras estavam armazenadas em frascos de vidro com a exceção das amostras de Mortágua do ano de 2018 e de Montemor-o-Velho (MV1) de 2017 e 2018 que se encontravam em recipientes de plástico.

Devido ao facto de a quantidade de mel produzida no ano de 2018 ser muito inferior em relação aos anos anteriores devido aos incêndios, alguns apicultores não colheram nem extraíram mel. Por esta razão, a amostra de mel de Mortágua de 2018 cedida não foi extraída e ainda se encontrava no favo (Figura 4). De modo a conseguir recolher o mel, o favo foi pressionado com uma colher de metal e deixado na vertical para que o mel escorresse, ficasse acumulado no recipiente e fosse possível, então retirar o mel necessário.



**Figura 4** - Amostra de Mortágua do ano de 2018 (favo de mel)

## **5.2- Seleção do método analítico**

Após a recolha e a análise de diversos artigos com diferentes métodos de extração e análise de PAHs em mel, decidiu-se que se iria testar o método indicado no artigo intitulado “*Polycyclic aromatic hydrocarbons and risk elements in honey from the South Moravian region (Czech Republic)*” de Petra Batelková (41). A escolha baseou-se no facto do método ter uma preparação simples, ser rápido e o equipamento e as condições de quantificação serem compatíveis com as do método implementado no LSA, para doseamento de PAHs em outras matrizes.

Resumidamente, este método consiste em adicionar sulfato de sódio anidro a 10 g de mel, homogeneizar e adicionar à mistura 40 mL de diclorometano. A seguir, usa-se o banho de ultrassons e o Ultraturrax para a extração. Filtra-se o e evapora-se o filtrado até o balão ficar seco. Por fim, redissolve-se adicionando 1 mL de acetonitrilo e filtra-se com filtro de membrana (PTFE de 0,22  $\mu\text{m}$ ). É um método bastante simples, rápido e com apenas dois reagentes.

## **5.3- Estabelecimento das condições instrumentais de quantificação do método – curva de calibração**

Neste ponto pretende-se estabelecer as condições instrumentais de quantificação do método a implementar e validar as curvas de calibração para os PAH4.

### **5.3.1- Curva de calibração**

O LSA, por meio do seu método interno QMI 132 (45), tem estabelecidas as condições experimentais para o doseamento dos PAH4 após processo de extração, para os

vários géneros alimentícios. Neste trabalho serão usadas essas condições, já otimizadas, para o processo de quantificação dos PAH4, após a sua extração, da matriz mel.

As soluções-padrão são soluções com uma concentração conhecida e são usadas para construir curvas de calibração, com base na relação proporcional entre o sinal instrumental e a concentração do analito nas amostras. Neste caso serão preparadas soluções de padrões mistos, com os quatro PAHs em estudo. O solvente usado na preparação dos padrões é acetonitrilo.

A partir de uma solução comercial da marca *Dr. Ehrenstofer GmbH*, de concentração 10 µg/mL para os PAH4 ( $S_i$ ) foram preparadas duas soluções *stock* intermédias padrão, com as concentrações de 80 ng/mL (P80) e 100 ng/mL (P100). Da solução *stock* intermédia de 100 ng/mL prepararam-se cinco soluções padrão, de trabalho, com as concentrações de 2 ng/mL (P2), 5 ng/mL (P5), 10 ng/mL (P10), 15 ng/mL (P15) e 20 ng/mL (P20), para a construção das curvas de calibração. Da solução *stock* intermédia de 80 ng/mL preparou-se uma solução independente (de preparação) com a concentração de 8 ng/mL (P8), que se destina a ser usada para a validação das curvas de calibração. A Tabela 9 resume todos os dados necessários à preparação destes padrões e no Anexo I podem ser vistos com maior detalhe as fórmulas de cálculo subjacentes.

**Tabela 9** - Esquema de preparação das várias soluções-padrão

<b>Solução-padrão</b>	<b>Concentração inicial (ci) (ng/mL)</b>	<b>Volume inicial (vi) (mL)</b>	<b>Concentração final (cf) (ng/mL)</b>	<b>Volume final (vf) (mL)</b>
<b>P100 - stock intermédia</b>	10 000	<b>0,5</b>	100	50
<b>P80 - stock intermédia</b>	10 000	<b>0,4</b>	80	50
<b>Padrões de trabalho</b>				
<b>P2</b>	100	<b>1,0</b>	2	50
<b>P5</b>	100	<b>2,5</b>	5	50
<b>P10</b>	100	<b>5,0</b>	10	50
<b>P15</b>	100	<b>3,0</b>	15	20
<b>P20</b>	100	<b>10,0</b>	20	50
<b>Padrão com preparação independente</b>				
<b>P8</b>	80	<b>5,0</b>	8	50

As soluções-padrão foram injetadas de acordo com as seguintes condições cromatográficas de análise:

**Coluna:** Vydac C18, 250 mm x 4,6 mm

**Volume de injeção:** 20 µL

**Fluxo:** 1 mL/min.

**Temperatura da coluna:** 30 °C

**Fase móvel:** composição e gradiente de eluição

**Tabela 10** - Composição e gradiente da fase móvel

Tempo (min)	% água	% acetonitrilo
0	30	70
0 - 20	25	75
20 - 35	0	100
35 - 47	30	70
47-57	30	70

**Detetor de fluorescência:** programação:

**Tabela 11** - Programação do detetor de fluorescência

	Início	Fim	Condições detetor
<b>Passo I</b>	0 minutos	Após a eluição do B(a)A e do Cris (usualmente 18 minutos)	Ex 268 nm Em 398 nm
<b>Passo II</b>	Após a eluição do B(a)A e do Cris (usualmente 18 minutos)	Fim da injeção, usualmente 57 minutos)	Ex 290 nm Em 430 nm

As soluções-padrão foram analisadas e foram estabelecidas curvas de calibração com os valores obtidos. As curvas de calibração encontram-se no Anexo 2 e os respectivos parâmetros característicos do ajuste linear descritos na Tabela 12.

**Tabela 12** - Parâmetros característicos do ajuste linear para as curvas de calibração dos PAH4

PAH	Gama de quantificação da curva (ng/mL)	Número pontos da curva (n)	Interceção na origem $\Delta U$ sinal	Declive $\Delta U$ sinal/ $\Delta$ (ng/mL)	Erro padrão $\Delta$ sinal (ng/mL)	Coefficiente de correlação
B(a)A	2 a 20	5	1588,1	53368	4350,87	0,9999
Cris	2 a 20	5	4562,5	41315	3258,92	0,9996
B(b)F	2 a 20	5	2029,2	33655	6635,31	0,9999
B(a)P	2 a 20	5	1578,3	125515	1959,82	0,9997

O erro-padrão é uma medida que indica a dispersão dos valores do sinal instrumental em função da média. Este erro-padrão é calculado a partir das curvas de calibração (46). Com este valor é possível calcular os limites de detecção e de quantificação que são indispensáveis para validar um método. Tanto o erro-padrão como os limites de detecção e quantificação foram calculados automaticamente através de folhas de cálculo pré-estabelecidas pelo laboratório. No entanto, serão descritos os cálculos e os respetivos valores necessários para a sua determinação neste e nos pontos seguintes. Para calcular o erro-padrão é usada a equação 2:

$$\text{Equação 2: } \text{Erro}_{\text{padrão}} = \sqrt{\frac{\sum (Y_{\text{lido}} - Y_{\text{cal}})^2}{n - 2}}$$

Nesta equação,  $n$  corresponde ao número total de dados,  $Y_{\text{lido}}$  ao sinal instrumental do padrão e  $Y_{\text{cal}}$  é o sinal calculado pela reta, para esse padrão.

Como é possível verificar através da Tabela 12, os coeficientes de correlação encontrados para o ajuste são superiores a 0,9995 o que indica que, na gama de trabalho estabelecida (de 2 ng/mL a 20 ng/mL) existe uma boa relação linear entre o sinal e a concentração dos padrões.

### 5.3.2- Validação da curva de calibração

Apesar das curvas apresentarem uma boa linearidade (observação visual e bom coeficiente de correlação) é boa prática validá-las com um padrão independente de preparação e/ou um material de referência de forma a despistar algum erro sistemático que ponha em causa a veracidade das concentrações usadas. O uso de um material de referência,

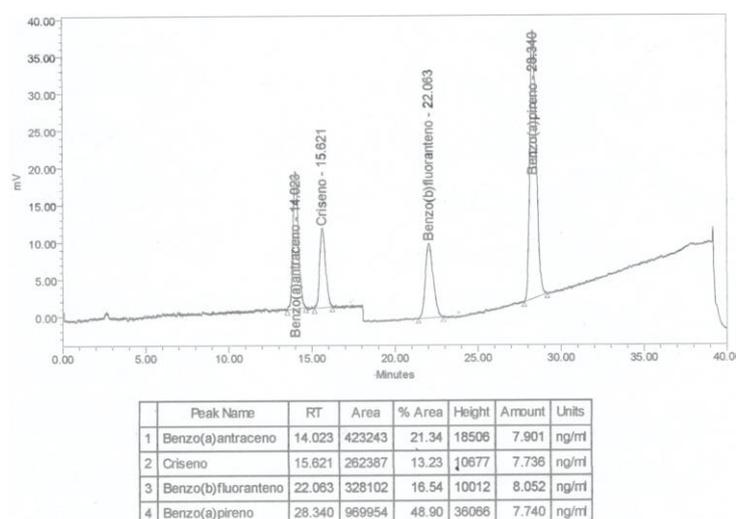
externo ao laboratório, é uma metodologia que valida com maior independência as curvas, e garante a veracidade dos resultados a produzir, com as curvas assim validadas.

### 5.3.2.1- Validação da curva de calibração com padrão independente (material interno)

Com o objetivo de validar a curva de validação preparou-se o padrão independente P8, para funcionar como padrão independente de validação (PIV) com uma concentração na zona central da curva e distinta dos pontos da curva de calibração, para uma maior facilidade na sua identificação.

Como critério para que o PIV valide as curvas de calibração é necessário que a concentração lida para os quatro PAHs tenha desvios inferiores a 10 % da concentração teórica. Neste caso a concentração teórica é de 8 ng/mL, pelo que o desvio máximo corresponderia a 0,8 ng/mL para cada um dos quatro PAHs. Assim, para que o PIV tenha desvios inferiores a 10 % é necessário que os valores estejam compreendidos entre 7,2 ng/mL e 8,8 ng/mL.

A Figura 5 corresponde ao cromatograma de injeção do PIV 8 ng/mL dos quatro PAHs.



**Figura 5** - Cromatograma da injeção do ponto intermédio de validação (PIV)

As concentrações lidas, na análise do PIV, estão na Tabela 13 e é possível verificar que todos os valores se encontram dentro do intervalo aceitável pelo que ficam validadas as curvas de calibração.

**Tabela 13** - Resultados da análise do PIV – P8

<b>PAH</b>	<b>Concentração lida (ng/mL)</b>
<b>B(a)A</b>	7,901
<b>B(b)F</b>	7,736
<b>Cris</b>	8,052
<b>B(a)P</b>	7,740

### **5.3.2.2- Validação da curva de calibração com material de referência (material externo)**

Este ensaio foi preparado com uma matriz diferente do mel (neste caso, azeite), porque no laboratório não existiam materiais de referência com matriz semelhante ao mel. Destaque-se que o objetivo é a verificação de que o teor deste material de referência, lido nas curvas a validar, está de acordo com o esperado. Neste passo não está em causa o processo de extração dos PAH, uma vez que ele está estabelecido e validado pelo LSA. O azeite usado é um material de referência usado nos ensaios interlaboratoriais do Conselho Oleícola Internacional, (MR-COI).

O processo de extração dos PAH4 do azeite é simples e passa a ser descrito:

1. Ativou-se uma coluna *SUPELLEAN* da marca *Supelco* com cerca de 7 mL de acetona;
2. Pesou-se 0,7049 g de azeite COI-MR para o cartucho;
3. Eluíram-se 15 mL de acetonitrilo (passagem feita com recurso a vácuo) divididos em 3 vezes (5 mL + 5 mL + 5 mL) e recolheu-se o eluído;
4. Evaporaram-se sob corrente de azoto os 15 mL de acetonitrilo que passaram pela coluna;
5. Adicionaram-se 0,250 mL de acetonitrilo e analisou-se o extrato.

A análise dos resultados dos materiais de referência é frequentemente realizada utilizando um parâmetro designado por *Z score*. O *Z score* é calculado através da equação 3:

$$\text{Equação 3: } Z \text{ score} = \frac{\text{valor obtido} - \text{valor CV}}{\text{desvio}_{\text{padrão}}}$$

Este teste tem como objetivo perceber se os resultados obtidos experimentalmente estão próximos dos resultados aceites como convencionalmente verdadeiros (valor CV). Neste caso, o valor CV e o respetivo desvio padrão resultam de um ensaio interlaboratorial organizado pelo COI.

A avaliação com  $z_{\text{scores}}$  é feita com a seguinte classificação:

$$|Z_{\text{score}}| \leq 2 - \text{satisfatório}$$

$$2 \leq |Z_{\text{score}}| \leq 3 - \text{questionável}$$

$$|Z_{\text{score}}| > 3 - \text{insatisfatório}$$

Na Tabela 14 estão descritos os resultados obtidos e a sua avaliação dos z-scores.

**Tabela 14** - Resultados de z-score para o material de referência com as curvas de calibração a validar

PAH	Valor CV ( $\mu\text{g/kg}$ )	Desvio padrão ( $\mu\text{g/kg}$ )	Valor obtido ( $\mu\text{g/kg}$ )	Z score
<b>B(a)A</b>	5,19	1,1429	5,65	<b>0,40</b>
<b>Cris</b>	5,05	1,1103	5,63	<b>0,52</b>
<b>B(b)F</b>	5,52	1,2149	5,20	<b>- 0,26</b>
<b>B(a)P</b>	5,51	1,2128	5,44	<b>0,06</b>

Como se verifica, o  $Z_{\text{score}}$  está, em todos os PAHs, entre -2 e 2 e bastante próximo de 0 o que significa que os resultados se encontram dentro do intervalo estabelecido para valores aceitáveis. Desta forma, também os resultados obtidos para um material de referência com os PAH4, validam as curvas de calibração estabelecidas.

#### 5.4 - Ensaio preliminares de otimização do método

Numa primeira fase foram realizados os ensaios preliminares com o objetivo de perceber se o método escolhido tinha aplicabilidade e conseguia efetivamente extrair os quatro PAHs. Cada ensaio estava contaminado de modo a que a concentração alvo fosse 2,5 ng/mL.

Este estudo tornou-se necessário porque, logo à partida, o artigo inicial escolhido não indicava qual a quantidade de sulfato de sódio anidro que deveria ser adicionada ao mel. Assim, os dois primeiros ensaios tiveram o propósito de perceber qual seria a quantidade ideal deste composto. De modo a otimizar o método escolhido, foram realizados diversos

ensaios. Os primeiros quatro ensaios e os respectivos resultados estão esquematizados na Tabela 15.

**Tabela 15** - Descrição dos ensaios preliminares para a otimização do método

Ensaio	Massa de (mel) g	Massa de sulfato de sódio / <i>QuEChERS</i> g	Volume de extração (DCM/ Água) mL	Ultrassom + Ultraturrax + Centrifuga	Concentração lida na curva de calibração (ng/mL)			
					B(a)A	Cris	B(b)F	B(a)P
PRE1	10,3024	sulfato de sódio: 15	DCM: 40	10 min Ultrassom + 45 s Ultraturrax	0,055	0,013	0,063	0,254
PRE2	5,0603	sulfato de sódio: 2,5	DCM: 20		2,316	2,227	2,249	2,340
PRE3	5,0600	-----	DCM: 20 Água: 5		0,566	0,516	0,375	0,583
PRE4	5,0044	<i>QuEChERS</i> : 3,5 g	DCM: 20 Água: 5	10 min Ultrassom + 45 s Ultraturrax	1,217	2,052	1,047	2,167

No ensaio PRE1 foram colocadas cerca de 15 g de sulfato de sódio anidro em cerca de 10 g de mel. Devido à ação do composto, o mel ficou com uma consistência muito dura sendo muito difícil adicionar e mexer o diclorometano. Por este motivo, os resultados obtidos foram muito baixos. No ensaio PRE2, decidiu-se que a massa de sulfato de sódio anidro seria metade da massa de mel. Assim, em 5 g de mel foram colocadas 2,5 g de sulfato de sódio anidro. A consistência já ficou muito mais maleável e foi possível realizar o restante procedimento sem qualquer problema.

Nos ensaios PRE3 e PRE4, o objetivo era perceber se em vez de sulfato de sódio anidro se poderia usar água, uma vez que esta é imiscível com o diclorometano. Assim, o diclorometano captaria os PAHs, separar-se-ia a água do diclorometano através de uma decantação e analisar-se-iam os PAHs sem o uso de sulfato de sódio anidro que torna a amostra mais viscosa e, possivelmente, poderá deixar resíduos de PAHs tanto no Ultraturrax como no copo de vidro onde se prepara a amostra.

No ensaio PRE4, usaram-se também *QuEChERS* para testar a sua eficácia. Os *QuEChERS* são muito usados para extrair pesticidas de alimentos de forma simples e rápida (47). Decidiu-se colocar cerca de 3,5 g para que a amostra não ficasse muito rígida. Os resultados obtidos não foram promissores, tendo-se recuperado menos quantidade do que no ensaio PRE2.

## 5.5- Ensaios de otimização do método

De modo a otimizar o método escolhido, foram realizados diversos ensaios. Nestes ensaios, vários parâmetros tais como o tempo no banho de ultrassons e do Ultraturrax, o uso ou não de uma centrifugadora, a quantidade de sulfato de sódio anidro e o número de extrações foram testados diversas vezes e de diferentes formas.

Todos os ensaios e os respetivos resultados estão esquematizados na Tabela 16. As amostras foram contaminadas de forma a que o extrato apresentasse uma concentração de 10 ng/mL de PAHs (leitura na curva). Nos ensaios cujo tempo de Ultrassons e/ou de Ultraturrax se encontra a negrito, este processo foi realizado em cada extração. Nos ensaios 16 e 18, as sucessivas extrações foram analisadas individualmente. O resultado a negrito corresponde à soma das concentrações dos extratos lidas na curva em cada ensaio e abaixo estão descritos os resultados obtidos nos extratos de cada extração.

**Tabela 16** - Descrição dos ensaios de otimização do método - Parte I

Ensaio	Massa mel (g)	Massa Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (g)	Volume extração DCM (mL)	Ultrassom + Ultraturrax	Concentração lida na curva de calibração (ng/mL)			
					B(a)A	Cris	B(b)F	B(a)P
<b>1A</b> <b>1B</b>	10,0890 10,0616	sulfato de sódio: 5	40	10 min Ultrassom 1 min Ultraturrax	7,622 7,008	7,225 7,200	7,121 7,077	7,175 6,993
<b>2A</b> <b>2B</b>	10,1059 10,1100	sulfato de sódio: 5	20		4,969 5,697	4,994 4,819	4,491 5,432	4,578 5,345
<b>3A</b> <b>3B</b>	10,0220 10,0939	sulfato de sódio: 5	30	1 min Ultraturrax	7,204 5,249	7,399 5,067	6,977 4,881	6,983 4,898
<b>4A</b> <b>4B</b>	10,0577 10,0163	sulfato de sódio: 10	40	10 min Ultrassom 1 min Ultraturrax	2,947 3,901	3,123 3,676	3,261 4,207	3,049 3,779
<b>5A</b> <b>5B</b>	10,0267 10,0276	sulfato de sódio: 10	20 + 20	<b>10 min Ultrassom</b> <b>1 min Ultraturrax</b>	7,801 9,180	8,168 10,075	7,634 9,462	7,934 8,969
<b>6A</b> <b>6B</b>	10,0438 10,0149	sulfato de sódio: 10	30	10 min Ultrassom 1 min Ultraturrax	4,265 5,380	4,121 4,693	4,071 4,716	3,994 5,104
<b>7A</b> <b>7B</b>	10,0185 10,0541	sulfato de sódio: 5	20 + 20	<b>10 min Ultrassom</b> <b>1 min Ultraturrax</b>	9,349 8,275	7,881 5,669	6,383 11,054	7,051 5,098

**Tabela 16 - Descrição dos ensaios de otimização do método - Parte 2**

Ensaio	Massa mel (g)	Massa Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> / QuEChERS (g)	Volume extração DCM (mL)	Ultrassom + Ultraturrax + Centrifuga	Concentração lida na curva de calibração (ng/mL)			
					B(a)A	Cris	B(b)F	B(a)P
<b>8A</b> <b>8B</b>	10,0393 10,0255	sulfato de sódio: 5	20 + 20	<b>8 min Ultrassom</b> <b>1 min Ultraturrax</b> <b>5 min centrif.</b>	6,167 8,361	6,268 8,302	5,671 6,947	5,671 6,838
<b>9A</b> <b>9B</b>	10,0668 10,0775	sulfato de sódio: 5	25 + 25		6,958 5,803	7,563 5,738	6,003 31,990	6,029 4,812
<b>10A</b> <b>10B</b>	10,0088 10,0418	sulfato de sódio: 10	25 + 25		6,300 6,863	6,632 6,710	33,807 20,321	5,280 5,503
<b>11A</b> <b>11B</b>	10,0833 10,0953	QuEChERS: 2 QuEChERS: 2	25 + 25		4,427 4,192	5,172 5,255	5,299 4,483	3,337 3,525
<b>12A</b> <b>12B</b>	10,0144 10,0508	sulfato de sódio: 10	25 + 25	<b>1 min Ultraturrax</b> <b>5 min centrif.</b>	5,863 5,616	5,743 9,900	4,588 5,091	6,532 11,675
<b>13A</b> <b>13B</b>	10,0307 10,0010	sulfato de sódio: 5	25 + 25	<b>1 min Ultraturrax</b>	6,688 2,334	6,807 3,108	5,768 2,319	5,475 2,193
<b>14A</b> <b>14B</b>	10,0045 10,0166	sulfato de sódio: 5	50	1 min Ultraturrax	3,093 4,607	3,102 4,236	2,653 3,723	8,328 4,292
<b>15A</b> <b>15B</b>	10,0542 10,0020	sulfato de sódio: 5	25 + 25	<b>8 min Ultrassom</b> <b>5 min centrif.</b>	0,503 0,516	0,379 0,507	0,354 0,593	0,213 0,559
<b>16A</b>	10,0333	sulfato de sódio: 5	40 + 20	<b>8 min Ultrassom</b> <b>1 min Ultraturrax</b>  (colocado em balões diferentes)	<b>7,198</b> 1 <sup>a</sup> ext:4,927 2 <sup>a</sup> ext:2,271	<b>6,854</b> 1 <sup>a</sup> ext:4,909 2 <sup>a</sup> ext:1,945	<b>5,643</b> 1 <sup>a</sup> ext:4,012 2 <sup>a</sup> ext:1,631	<b>5,783</b> 1 <sup>a</sup> ext:4,012 2 <sup>a</sup> ext:1,771
<b>16B</b>	10,0283				<b>7,011</b> 1 <sup>a</sup> ext:4,927 2 <sup>a</sup> ext:2,115	<b>6,503</b> 1 <sup>a</sup> ext:5,512 2 <sup>a</sup> ext:1,991	<b>7,066</b> 1 <sup>a</sup> ext:4,952 2 <sup>a</sup> ext:2,114	<b>5,798</b> 1 <sup>a</sup> ext:4,016 2 <sup>a</sup> ext:1,782
<b>17A</b> <b>17B</b>	10,0474 10,0326	sulfato de sódio: 5	20 + 20	<b>1 min Ultraturrax durante 8 min Ultrassom</b>	7,971 7,291	8,069 7,490	6,924 6,528	6,814 6,197
<b>18A</b>	10,0185	50 mL DCM, Ultraturrax, decantar, 5 g sulf. de sódio, decantar, evaporar <u>copo inicial:</u> 25 mL DCM, Ultraturrax, decantar, 2,5 g sulf. de sódio, decantar, evaporar <u>p/ lavar Ultraturrax:</u> 25 mL DCM, Ultraturrax, decantar, 2,5 g sulf. sódio, decantar, evaporar			<b>6,334</b> 1 <sup>a</sup> ext:3,994 2 <sup>a</sup> ext:2,340 3 <sup>a</sup> ext: -	<b>5,961</b> 1 <sup>a</sup> ext:3,766 2 <sup>a</sup> ext:2,195 3 <sup>a</sup> ext: -	<b>5,723</b> 1 <sup>a</sup> ext:3,739 2 <sup>a</sup> ext:1,984 3 <sup>a</sup> ext: -	<b>5,584</b> 1 <sup>a</sup> ext:3,515 2 <sup>a</sup> ext:2,069 3 <sup>a</sup> ext: -
<b>18B</b>	10,0753	(colocado em balões diferentes)			<b>7,325</b> 1 <sup>a</sup> ext:5,134 2 <sup>a</sup> ext:2,191 3 <sup>a</sup> ext: -	<b>6,633</b> 1 <sup>a</sup> ext:4,591 2 <sup>a</sup> ext:2,042 3 <sup>a</sup> ext: -	<b>6,754</b> 1 <sup>a</sup> ext:4,640 2 <sup>a</sup> ext:2,114 3 <sup>a</sup> ext: -	<b>6,184</b> 1 <sup>a</sup> ext:4,335 2 <sup>a</sup> ext:1,849 3 <sup>a</sup> ext: -

**Tabela 16** - Descrição dos ensaios de otimização do método - Parte 3

Ensaio	Massa mel (g)	Massa Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (g)	Volume extração DCM / ACN (mL)	Ultrassom + Ultraturrax	Concentração lida na curva de calibração (ng/mL)			
					B(a)A	Cris	B(b)F	B(a)P
<b>19A</b> <b>19B</b>	10,0679 10,0710	sulfato de sódio: 5	DCM: 20 + 20 + 20	I min Ultraturrax <u>durante 8 min</u> Ultrassom	6,324 6,984	6,131 12,064	5,359 8,055	5,224 8,466
<b>20A</b> <b>20B</b>	10,0806 10,0603	sulfato de sódio: 5 (adição <u>no fim</u> )	DCM: 20 + 20 + 20	I min Ultraturrax <u>durante 8 min</u> Ultrassom	5,880 7,350	6,335 6,233	5,607 7,026	5,074 6,671
<b>21A</b> <b>21B</b>	10,0429 10,0800	sulfato de sódio: 5	DCM: 20 + 20 + 20	I min Ultraturrax <u>durante 8 min</u> Ultrassom 30 °C	8,878 9,096	7,391 7,527	7,021 7,675	6,825 6,868
<b>22</b>	10,0988	sulfato de sódio: 5	ACN: 20 + 20 + 20	I min Ultraturrax <u>durante 8 min</u> Ultrassom	3,955	2,812	6,015	3,800

Podem-se tirar diversas conclusões com a realização destes ensaios. Para perceber a influência da massa de sulfato de sódio anidro foram realizados ensaios sob as mesmas condições, em que esta seria a única variável. Assim, enquanto que os ensaios 1, 3 e 7 foram realizados com 5 g de sulfato de sódio anidro, os ensaios 4, 6 e 5 tinham 10 g de sulfato de sódio anidro. Estes ensaios (como descrevem as tabelas), foram realizados com diferentes volumes de diclorometano de modo a perceber a influência da quantidade de reagente na quantidade de sulfato de sódio anidro. Todos os restantes parâmetros foram semelhantes, com a exceção do ensaio 3 que não esteve no banho de ultrassons. Com isto, verificou-se que existe uma melhor recuperação dos analitos nos ensaios 1 e 3 em que a massa de sulfato de sódio anidro corresponde a 5 g. Nos ensaios 5 e 7 (onde foram realizadas duas extrações com 20 mL de diclorometano em cada uma delas) os resultados foram semelhantes.

Como nos ensaios preliminares (**ponto 5.4**) o uso de *QuEChERS* foi realizado num ensaio em que foi usada água decidiu-se voltar a testar esta possibilidade em condições mais semelhantes às do método original. No ensaio II (o correspondente a esta técnica) os

resultados foram piores do que os ensaios 9 e 10 (que estavam sob as mesmas condições, mas com sulfato de sódio anidro) e rejeitou-se esta opção.

Uma outra variável importante a ter em conta seria o volume de diclorometano usada para a extração dos PAHs. Apesar de o artigo em que este método foi baseado indicar o volume a usar (40 mL) foram testados outros volumes bem como o número de extrações realizadas. O ensaio 16 teve como objetivo perceber se após uma extração com 40 mL (os indicados no artigo) todos os PAHs seriam extraídos ou se ainda ficaria uma quantidade relevante de PAHs no balão. Deste modo, foram realizadas duas extrações que foram analisadas em separado. Concluiu-se que, apesar da primeira extração retirar a grande maioria dos PAHs do balão, a segunda extração (com 20 mL) ainda conseguia recolher uma quantidade significativa (extrato com uma concentração de cerca 2 ng/mL) de cada um dos PAHs. Assim sendo, para obter melhores resultados o melhor seria realizar mais do que uma extração. Para otimizar o volume de diclorometano usado na extração foram também realizados ensaios, tais como o 2, o 8 e o 9, por exemplo. Destes ensaios, o que apresentou melhores resultados foi o ensaio 8 (em que foram realizadas duas extrações com 20 mL de diclorometano em cada uma delas).

O tempo de ultrassons e Ultraturrax e o uso de centrífuga e temperatura no banho de ultrassons também foram analisados. Com os ensaios 12 e 13 (onde não foi usado o banho de ultrassons) verifica-se que os resultados ficam aquém dos restantes e que o uso do banho de ultrassons ajuda na extração dos PAHs. O ensaio 15 foi realizado sem o uso do Ultraturrax e os resultados obtidos foram muito baixos, o que indica que o Ultraturrax é indispensável neste método. A centrífuga foi usada nos ensaios 8, 9, 10, 11, 12 e 15 de modo a facilitar a decantação do diclorometano para o balão antes da evaporação para que não passassem resíduos. Contudo, pelos resultados verificou-se que não existe uma melhoria significativa nas recuperações dos PAHs e o uso da centrífuga foi descartado. Os ensaios 19 e 21 tinham como objetivo perceber a influência da temperatura no banho de ultrassons na recuperação dos PAHs. Enquanto que o ensaio 19 não tinha qualquer fonte de calor ligada, no ensaio 21 o banho de ultrassons foi mantido a 30 °C. Através dos resultados, verifica-se que o uso da temperatura favorece significativamente a extração dos PAHs.

De modo a aumentar a recuperação dos PAHs decidiu-se experimentar uma técnica em que se usasse o Ultraturrax simultaneamente com o banho de ultrassons ligado. Desta forma, colocou-se o Ultraturrax de maneira a que pudesse ser usado dentro do banho de

ultrassons como demonstra a Figura 6. Isto foi testado nos ensaios 17, 19, 20 e 21 e verificou-se que os resultados obtidos melhoraram e eram mais concordantes.



**Figura 6** - Disposição do Ultraturrax dentro do banho de ultrassons

Também houve outros ensaios como o 18 e o 22 em que foram realizadas alterações mais drásticas no método. No ensaio 18 decidiu-se colocar o sulfato de sódio depois do diclorometano e da decantação e no ensaio 22 usou-se acetonitrilo em vez de diclorometano. Nenhum destes ensaios obteve resultados suficientemente bons para aprofundar mais estas técnicas.

Desta forma, com estes ensaios pode-se concluir que, para a obtenção de recuperações melhores e mais concordantes se deveria usar 5,0 g de sulfato de sódio anidro, realizar mais do que uma extração com diclorometano e usar o Ultraturrax com o banho de ultrassons ligado e a 30 °C, ou seja, as condições do ensaio 21.

O mel usado para os ensaios preliminares e da otimização do método foi comprado em supermercado e de modo a confirmar que não tinha presença de PAHs, foi analisado previamente nas condições PRE2. O cromatograma não identificou qualquer presença de PAHs.

## 5.6 - Precisão e Veracidade - Critérios de desempenho do método

De modo a avaliar a exatidão (48) de um método são efetuados testes de precisão e veracidade.

### 5.6.1 – Taxas de recuperação

A veracidade determina a aproximação dos resultados obtidos através de um mesmo método com o valor real do analito analisado (48) e pode ser afetada pela existência de erros sistemáticos. Estes erros podem ocorrer devido a más calibrações dos instrumentos usados ou a leituras incorretas por parte do operador (49) ou outros inerentes ao próprio desempenho do método.

A avaliação da veracidade pode ser feita determinando as taxas de recuperação que indicam a percentagem recuperada de um determinado composto por um determinado método analítico. Para isso, compara-se a concentração quantificada face à esperada.

Neste estudo, as taxas de recuperação foram calculadas em dois níveis de fortificação: 2 ng/mL e 10 ng/mL (valores de leitura na curva que correspondem a 0,2 µg/kg e 1 µg/kg de mel. Os valores obtidos através da análise aos ensaios com as fortificações de 2 ng/mL (F2A e F2B) e de 10 ng/mL (F10A e F10B) e as respetivas médias encontram-se na Tabela 17.

**Tabela 17-** Valores de concentração lidos na curva de calibração. Valores de concentração teóricos esperados: 2 ng/mL e de 10 ng/mL

Ensaio	Concentração lida (ng/mL)			
	B(a)A	Cris	B(b)F	B(a)P
F2A	2,281	2,021	2,261	1,393
F2B	2,041	1,840	2,038	1,435
Média	2,161	1,931	2,150	1,414
F10A	7,801	8,168	7,634	7,934
F10B	8,524	7,970	8,043	8,036
Média	8,163	8,069	7,839	7,985

A taxa de recuperação é dada por:

**Equação 4:**

$$\text{Taxa de recuperação (\%)} = \frac{\text{Concentração lida na curva de calibração}}{\text{Concentração teórica esperada}} \times 100$$

Na Tabela 18 estão descritas as taxas de recuperação para os PAHs em cada nível de reforço.

**Tabela 18** - Taxas de recuperação

PAH	B(a)A (%)	Cris (%)	B(b)F (%)	B(a)P (%)
<b>Concentração (ng/mL)</b>				
<b>2</b>	108,05	96,55	107,5	70,7
<b>10</b>	81,63	80,69	78,39	79,85
<b>Média dos valores</b>	95	88	93	75

Nesta fase do trabalho, e atendendo a que não são conhecidos os teores a encontrar nas amostras de mel, foi estabelecida uma taxa de recuperação média para cada um dos 4 PAHs. Quando houver quantificação poder-se-á equacionar uma determinação da taxa de recuperação a um nível mais adequado.

O intervalo aceitável para a taxa de recuperação varia de caso para caso e de método para método. Cabe ao laboratório estabelecer o intervalo aceitável para o método em questão (50). Para a determinação dos PAHs, em controlo oficial, está estabelecido no Regulamento (CE) 333/2007 que as taxas de recuperação devem ter valores compreendidos entre 50 % e 120 % (51).

Como se verifica pela análise da Tabela 18, todas as taxas de recuperação apresentadas encontram-se dentro do intervalo indicado. Pelo que se conclui que o método cumpre os critérios de desempenho de recuperação descritos no Regulamento (CE) 333/2007.

## 5.6.2– Repetibilidade

A precisão avalia a dispersão dos resultados de diferentes ensaios com a mesma amostra (ou amostras semelhantes) e o mesmo método. (52). Os fatores que influenciam a precisão de um método são denominados erros aleatórios. Nos casos dos erros aleatórios não são conhecidas, em concreto, as razões para as suas ocorrências podendo ocorrer, por exemplo, por falta de sensibilidade do equipamento e/ou do operador. Ao fazer várias repetições de um ensaio pode-se evitar a prevalência deste tipo de erros. De modo a avaliar a precisão de um método são usualmente determinados três parâmetros: a repetibilidade, a reprodutibilidade e a precisão intermédia.

A repetibilidade de um método é a sua capacidade de reproduzir os mesmos resultados em vários ensaios na mesma amostra sob as mesmas condições (com o mesmo operador, equipamento e reagentes) e em pouco tempo, idealmente no mesmo dia (50).

Para determinar o limite de repetibilidade dos PAH4, ao nível de uma concentração de 1 µg/kg de mel, foram realizados dez ensaios usando um mel (sem deteção de PAH) que foi reforçado ao nível de 1 µg/kg, para os quatro PAHs. Estes ensaios foram efetuados no mesmo dia, sob as mesmas condições e segundo o método usado no ensaio 21 da Tabela 16.

A massa de mel e os resultados da concentração presente na amostra encontram-se na Tabela 19. No Anexo 3 estão descritas as concentrações lidas nas curvas de calibração. O volume final de recuperação do extrato para injeção foi de 1 mL e usou-se como taxa de recuperação de cada PAH os descritos na Tabela 18, para o nível de leitura na curva de 10 ng/mL.

A concentração de cada PAH na amostra é dada por:

**Equação 5:**

$$\text{Concentração PAH } (\mu\text{g/kg}) = \frac{\text{Concentração lida (ng/mL)} \times \text{Volume final (mL)}}{\text{massa de mel (g)} \times \text{Recuperação}}$$

Como exemplo,

$$\text{Concentração F2A B(a)A } (\mu\text{g/kg}) = \frac{2,161 \times 1}{10 \times 0,95} = 0,23 \mu\text{g/kg}$$

Assim, todos os resultados apresentados em  $\mu\text{g}/\text{kg}$  foram calculados através desta equação.

**Tabela 19** - Resultados, média e desvio-padrão dos ensaios de repetibilidade

Ensaio	m (mel) g	Concentração na amostra ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )			
		B(a)A	Cris	B(b)F	B(a)P
Rep1	10,0429	1,083	0,912	0,892	0,851
Rep2	10,0800	1,106	0,925	0,971	0,853
Rep3	10,0474	0,972	0,995	0,879	0,849
Rep4	10,0424	1,084	0,892	0,925	0,920
Rep5	10,0468	1,034	0,969	0,904	0,910
Rep6	10,0320	1,120	1,030	0,922	0,950
Rep7	10,0603	0,895	0,768	0,891	0,830
Rep8	10,0341	0,879	0,799	0,971	0,991
Rep9	10,0283	0,880	0,914	0,887	0,872
Rep10	10,0000	1,044	0,988	1,026	1,006
<b>Média</b>		<b>1,0096</b>	<b>0,9193</b>	<b>0,9269</b>	<b>0,9032</b>
<b>Desvio-padrão</b>		<b>0,0909</b>	<b>0,0796</b>	<b>0,0455</b>	<b>0,0594</b>

O cálculo do limite de repetibilidade ( $r$ ) é feito através da equação 6 (53), com uma probabilidade de 95 % e distribuição t-Student bilateral

$$\text{Equação 6: } r = t_{0,025}^u(n-1) \times \sqrt{2} \times \text{desvio}_{\text{padrão}}$$

Em que  $t_{0,025}^u(n-1)$  é o valor crítico da distribuição *t-student*, com um nível de significância de 0,050 com  $n-1$  graus de liberdade (distribuição bilateral). Através da tabela de *t-student* (54) verifica-se que  $t_{0,025}^u(9)$  é 2,262. Na Tabela 20 estão esquematizados os resultados do limite de repetibilidade para cada um dos PAHs ao nível da concentração de 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de mel.

**Tabela 20** - Limite de repetibilidade determinado para uma concentração de PAH de 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de mel

	<b>B(a)A</b>	<b>Cris</b>	<b>B(b)F</b>	<b>B(a)P</b>
<b>r (<math>\mu\text{g}/\text{kg}</math>)</b>	0,29	0,25	0,15	0,19

Para que um método cumpra o seu limite de repetibilidade é necessário que o módulo da diferença de dois ensaios independentes (realizados em condições de

repetibilidade) seja inferior ao limite de repetibilidade, em 95 % dos casos. Conforme os valores obtidos, poderá ser necessário recalcular o limite de repetibilidade para uma concentração ao nível da contaminação encontrada.

### 5.6.3- Precisão intermédia e Reprodutibilidade

Como referido anteriormente, para avaliar a precisão, além da repetibilidade, é usual determinar também a precisão intermédia e de reprodutibilidade. A precisão intermédia, também é conhecida como reprodutibilidade intra-laboratorial, e é estimada através de ensaios no mesmo laboratório variando, por exemplo, os dias das determinações, os operadores e/ou o equipamento (50). Os testes de reprodutibilidade são efetuados com a realização de ensaios usando o mesmo método em laboratórios diferentes, ou seja, sob condições diferentes das condições originais (a nível de equipamento, reagentes e operadores).

No âmbito deste trabalho apenas se justifica estabelecer a repetibilidade, para avaliar de precisão de dados que venham a ser determinados.

### 5.6.4- Limites de quantificação e de deteção

O limite de quantificação (LOQ) na amostra está muitas vezes dependente da resposta instrumental e da qualidade do ajuste da curva de calibração, para um determinado analito.

Em termos práticos, o limite de quantificação corresponde à concentração mínima que é possível quantificar de um analito, com um grau de confiança, face ao erro *standard* do ajuste da curva de calibração. Num método em que existe uma curva de calibração linear (este caso) o limite de quantificação pode ser calculado através da equação matemática 7 (55),

$$\textit{Equação 7:} \quad LOQ = \frac{10 \times \textit{erro}_{\textit{padrão}}}{\textit{declive da curva de calibração}}$$

Na Tabela 12 encontram-se todos os valores necessários para o cálculo do dos limites de quantificação teóricos dos quatro PAHs e os valores encontrados para os LOQ que podem ser vistos na Tabela 21.

**Tabela 21** - Limites de quantificação instrumentais, com base na curva de calibração

<b>PAH</b>	<b>Limite de quantificação instrumental (ng/mL)</b>
<b>B(a)A</b>	0,82
<b>Cris</b>	0,79
<b>B(b)F</b>	1,97
<b>B(a)P</b>	0,16

Os valores encontrados são baixos, devido ao bom ajuste das curvas já anteriormente comentado. Contudo, quanto efetuamos quantificação devemos interpolar valores. Como a gama de trabalho na curva está estabelecida entre 2 ng/mL e 20 ng/mL o valor para o limite de quantificação real deverá ser maximizado para 2 ng/mL, correspondente ao primeiro ponto da curva de calibração. A Tabela 21 garante que esta maximização está tecnicamente correta, uma vez que os valores teóricos nela descritos são inferiores aos 2 ng/mL.

Quanto ao limite de deteção (LOD), ele é definido como sendo 1/3 do LOQ e corresponde a um valor que é possível detetar a presença do analito com uma certeza estatística razoável embora não seja possível quantificá-lo com exatidão. Neste caso o LOD é de 0,7 ng/mL (valor de leitura na curva) para qualquer um dos PAHs analisados.

Tendo em conta as taxas de recuperação médias previamente calculadas no **ponto 5.6.1**, os limites de deteção obtidos para cada um dos PAHs serão: 0,07 µg/kg para o B(a)A, 0,08 µg/kg para o Cris, 0,07 µg/kg para o B(b)F e 0,09 µg/kg para o B(a)P. Os limites de quantificação serão 0,21 µg/kg para o B(a)A, 0,23 µg/kg para o Cris, 0,22 µg/kg para o B(b)F e 0,27 µg/kg para o B(a)P (considerando uma toma típica de mel de 10 gramas e recuperado em 1 mL de volume final).

## **5.7 -Procedimento experimental e equipamento utilizado**

Depois de estabelecidas as curvas de calibração, determinada a repetibilidade do método e as taxas de recuperação e calculados os limites de deteção e quantificação, começou-se a preparar as amostras de mel recolhidas.

Como já descrito, o ensaio 21 (Tabela 16) foi o que apresentou melhor eficácia de extração pelo que o procedimento de extração foi:

1. Pesar 10 g de mel;
2. Adicionar 5 g de sulfato de sódio anidro e homogeneizar;
3. Adicionar 20 mL de diclorometano e colocar no banho de ultrassons a 30 °C durante 8 minutos. Durante este processo, ligar o Ultraturrax durante 1 minuto. Ao fim deste tempo, recolher o diclorometano num balão de fundo redondo. Repetir este processo mais 2 vezes. (Satisfazendo no total 60 mL de diclorometano);
4. Evaporar o diclorometano;
5. Adicionar 1 mL de acetonitrilo no balão e agitar no vórtex;
6. Colocar o acetonitrilo num *vial*, passando-o por um filtro de PTFE de 0,22 µm.

A análise instrumental decorreu nas condições descritas no **ponto 5.3.1.**

O equipamento usado neste estudo foi HPLC *Alliance* constituído por *Waters Separations Module 2690* acoplado a um detetor de fluorescência *Waters Scanning Fluorescence Detector 474*. O acetonitrilo foi *HPLC grade* de *Carlo Erba*, o diclorometano foi da marca *PESTINORM* da *VWR chemicals* e o sulfato de sódio anidro foi fornecido pela *Carlo Erba*, ativado a 490 °C durante 12 horas.

Uma das adversidades encontradas na preparação das amostras foi o facto de algumas amostras de mel se encontrarem cristalizadas (Figura 7, à esquerda). As amostras que estavam neste estado eram as seguintes: SCD18, MVA17, MOR17 e PEN18. Outro fator a ter em conta é que nas amostras SEA18, MAN17, ZAM17, ZAM18, FIB17 e FIB18 a tampa da embalagem do mel estava com alguma “sujidade”, de origem desconhecida (Figura 7, à direita).

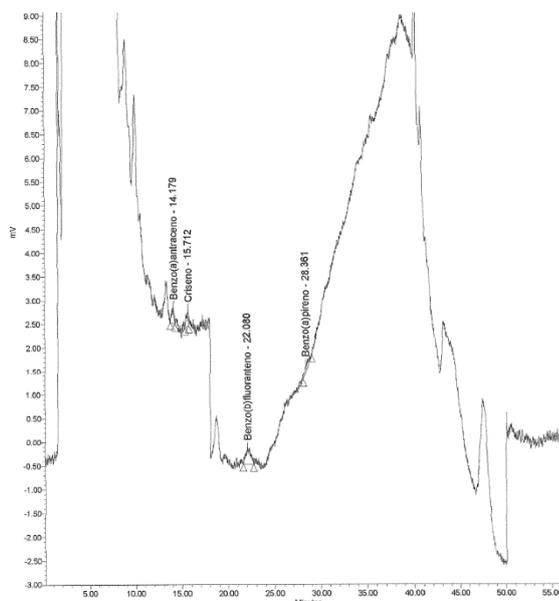
Contudo foi possível aplicar o procedimento de extração, tal como descrito.



**Figura 7** - Exemplo de uma amostra de mel cristalizado (à esquerda) e de uma tampa com sujidade (à direita).

## 6. Resultados e discussão dos resultados

Aquando da análise das amostras de mel, os cromatogramas apresentavam concentrações de PAHs muito baixas (inferiores ao LOD) ao nível do ruído e ocorriam também interferentes (Figura 8), sendo difícil delimitar os picos correspondentes aos PAHs, que correspondiam a áreas muito baixas.



**Figura 8** - Exemplo de cromatograma de amostras de mel com sinal ao nível do ruído e interferentes

Também se reparou que após a análise da primeira amostra do dia, as restantes injeções apresentavam mais interferentes. Desta forma, aumentou-se o tempo de corrida do programa para garantir que a coluna era limpa entre amostras e se eliminavam alguns dos interferentes que nela pudessem ter ficado da injeção anterior. O programa foi alterado da seguinte forma:

**Tabela 22** - Novo programa com gradiente de fase móvel para a injeção

Tempo (minutos)	Solvente	Fluxo (mL/min)
0 - 20	70 % ACN	1
20 - 35	100 % ACN	1
35 - 65	100 % ACN	1,5
65 - 87	70 % ACN	1

Sabendo que todos os PAH em análise têm um tempo de retenção inferior a 30 minutos, só a partir deste tempo é que se poderiam fazer alterações no programa. Assim, determinou-se que dos 35 minutos (para ter a certeza que o último PAH saísse por completo) aos 65 minutos, o fluxo iria aumentar progressivamente até 1,5 mL/ min. de modo a que todos os interferentes que estivessem na coluna saíssem com mais facilidade. Dos 65 minutos aos 87 minutos, tanto o fluxo como o solvente seriam repostos aos níveis iniciais e o sistema estaria pronto para uma nova injeção. Apesar desta alteração implicar um maior gasto de solvente, considerou-se que, a longo prazo, e devido à necessidade de repetições das análises com o programa anterior, isto seria uma mais valia para o estudo.

Apesar da alteração do programa para limpar a coluna entre injeções todas as amostras analisadas apresentaram valores dos quatro PAHs inferiores ao limite de deteção.

De forma a confirmar a ausência dos PAH, uma vez que as condições cromatográficas não eram as melhores, os extratos das amostras foram reforçados ao nível de 1 ng/mL de PAHs. A concentração no extrato contaminado foi propositadamente feita entre o limite de deteção e o limite de quantificação. Assim, seria possível evidenciar, para cada um dos picos dos PAHs o surgimento de uma quantidade vestigial e não quantificada o que comprovaria que o extrato original estava sem estes analitos.

Na Tabela 23 estão descritas todas as concentrações lidas (por extrapolação) das amostras analisadas sendo que todas estas amostras foram contaminadas para apresentarem uma concentração de 1 ng/mL de cada PAH.

**Tabela 23** - Concentrações lidas na curva das amostras de mel analisadas - Parte I

Ensaio	massa mel (g)	Concentração lida na curva (ng/mL)			
		B(a)A	Cris	B(b)F	B(a)P
<b>SCD17A</b>	10,0379	0,850	1,046	0,977	1,083
<b>SCD17B</b>	10,0147	1,020	1,037	1,044	1,081
<b>SCD18A</b>	10,0484	0,832	1,034	0,638	1,010
<b>SCD18B</b>	10,0046	1,072	1,097	1,099	0,996
<b>MIR17A</b>	10,0845	0,961	1,071	0,974	1,036
<b>MIR17B</b>	10,0698	0,805	0,947	0,868	0,824
<b>MIR18A</b>	10,0318	1,054	1,031	0,795	0,913
<b>MIR18B</b>	10,0046	0,913	1,015	0,973	0,839
<b>MV217A</b>	10,0771	1,035	1,111	1,075	0,927
<b>MV217B</b>	10,0606	1,010	1,015	0,995	0,964

**Tabela 23 - Concentrações lidas na curva das amostras de mel analisadas - Parte 2**

Ensaio	massa mel (g)	Concentração lida na curva (ng/mL)			
		B(a)A	Cris	B(b)F	B(a)P
<b>MV218A</b>	10,0235	0,989	1,067	0,987	0,945
<b>MV218B</b>	10,0292	0,983	1,076	0,972	0,979
<b>MOR17A</b>	10,0258	0,911	0,911	0,920	1,017
<b>MOR17B</b>	10,0222	0,954	1,001	0,987	0,956
<b>MOR18A</b>	10,0928	0,976	0,890	1,094	1,032
<b>MOR18B</b>	10,0553	0,995	0,961	0,959	0,986
<b>CMB17A</b>	10,0554	0,912	1,025	1,040	0,906
<b>CMB17B</b>	10,0520	1,002	0,905	0,997	0,968
<b>CMB18A</b>	10,0754	0,966	1,096	1,095	1,024
<b>CMB18B</b>	10,0354	0,955	1,083	1,033	0,989
<b>GUL17A</b>	10,0005	0,884	0,945	1,007	1,038
<b>GUL17B</b>	10,0233	0,949	1,052	1,052	0,966
<b>GUL18A</b>	10,0255	0,940	0,911	0,919	0,914
<b>GUL18B</b>	10,0133	1,067	1,029	0,917	0,957
<b>SE217A</b>	10,0858	0,884	0,890	1,060	0,885
<b>SE217B</b>	10,0236	0,851	0,938	1,158	0,939
<b>SE218A</b>	10,0148	0,881	0,825	1,143	0,888
<b>SE218B</b>	10,0780	1,039	1,093	1,260	0,925
<b>CMPI7A</b>	10,0437	0,988	0,950	0,997	0,913
<b>CMPI7B</b>	10,0763	0,804	0,937	0,991	0,861
<b>CMPI8A</b>	10,0701	1,001	0,933	0,978	0,882
<b>CMPI8B</b>	10,0632	0,914	0,926	0,956	0,928
<b>LOUI7A</b>	10,0022	1,021	1,597	0,810	0,843
<b>LOUI7B</b>	10,0420	1,071	1,449	0,893	0,953
<b>LOUI8A</b>	10,0361	0,996	0,943	0,965	0,919
<b>LOUI8B</b>	10,0042	1,018	0,998	1,023	0,995
<b>MVI17A</b>	10,0503	1,119	1,006	1,100	1,029
<b>MVI17B</b>	10,0271	0,953	0,980	1,004	0,936
<b>MVI18A</b>	10,0900	0,899	1,076	1,041	0,936
<b>MVI18B</b>	10,0471	0,933	1,028	0,988	0,953
<b>PENI7A</b>	10,0750	0,957	1,176	0,918	0,914
<b>PENI7B</b>	10,0420	0,966	1,965	0,923	0,966
<b>PENI8A</b>	10,0909	0,943	1,112	0,964	0,936
<b>PENI8B</b>	10,0055	0,980	1,025	0,998	0,958
<b>FARI7A</b>	10,0025	1,027	0,957	1,043	0,924
<b>FARI7B</b>	10,0210	0,921	0,935	1,039	1,007
<b>FARI8A</b>	10,0710	0,901	0,865	1,023	0,938
<b>FARI8B</b>	10,0223	1,082	0,936	1,056	0,997
<b>FIB17A</b>	10,0703	0,959	0,952	0,890	1,058
<b>FIB17B</b>	10,0037	1,136	0,959	1,177	0,989
<b>FIB18A</b>	10,0566	0,912	1,005	0,985	1,044
<b>FIB18B</b>	10,0090	0,909	1,053	1,121	0,965

**Tabela 23** - Concentrações lidas na curva das amostras de mel analisadas - Parte 3

Ensaio	massa mel (g)	Concentração lida na curva (ng/mL)			
		B(a)A	Cris	B(b)F	B(a)P
<b>ZAMI7A</b>	10,0106	1,074	1,079	0,924	0,978
<b>ZAMI7B</b>	10,0196	0,996	0,940	1,085	0,926
<b>ZAMI8A</b>	10,0106	1,005	1,090	1,036	0,931
<b>ZAMI8B</b>	10,0196	1,057	0,847	0,939	0,902
<b>MANI7A</b>	10,0901	0,963	0,938	0,979	0,938
<b>MANI7B</b>	10,0197	1,055	1,068	0,950	0,963
<b>MANI8A</b>	10,0247	0,905	0,991	1,028	0,960
<b>MANI8B</b>	10,0760	0,969	1,003	0,989	0,914
<b>SEI17A</b>	10,0087	1,085	1,195	0,973	0,978
<b>SEI17B</b>	10,0254	0,917	0,952	0,905	0,921
<b>SEI18A</b>	10,0148	1,037	1,064	1,042	0,962
<b>SEI18B</b>	10,0293	0,988	0,967	0,993	0,938
<b>NELI7A</b>	10,0526	1,076	0,955	0,917	0,951
<b>NELI7B</b>	10,0406	1,024	0,951	0,852	0,933
<b>NELI8A</b>	10,0650	0,955	0,871	1,017	0,979
<b>NELI8B</b>	10,0085	1,143	1,031	1,006	0,988

A Tabela 23 apresenta valores extrapolados da zona de quantificação, uma vez que o limite de quantificação corresponde ao ponto mais baixo da curva de calibração (2 ng/mL). Com os resultados obtidos verifica-se que é possível detetar PAHs nas amostras em concentrações aproximadas às esperadas, devido ao facto de ter sido feita a contaminação ao nível de 1 ng/mL.

Este facto valida os resultados dos cromatogramas das amostras sem reforço que não apresentavam PAHs. Assim, pode-se considerar que, neste estudo e para os quatro PAHs todas as amostras analisadas tinham valores inferiores ao limite de deteção de 0,07 µg/kg para o B(a)A, 0,08 µg/kg para o Cris, 0,07 µg/kg para o B(b)F e 0,09 µg/kg para o B(a)P.

O facto de não ser encontrado qualquer contaminação dos quatro PAHs em nenhuma das amostras de mel produzidas depois dos incêndios pode ser justificado por, na primavera e verão de 2018, as abelhas terem sido alimentadas pelos apicultores com mel de anos anteriores devido à falta de vegetação e flores locais, como foi referido por alguns dos apicultores onde foram recolhidas as amostras.

Ainda assim, estudos indicam que as plantas e vegetais que crescem em solos contaminados apresentam concentrações muito pequenas de PAHs nas suas raízes e ainda mais baixas nos rebentos e flores das plantas estudadas (56). Nesse estudo, também se concluiu, que não foram detetadas translocações de PAHs das raízes para as partes aéreas das plantas. Como as abelhas recolhem o pólen das flores, pode-se especular que, mesmo estando estas plantas em solos com uma elevada contaminação de PAHs (o que não foi avaliado) as abelhas não recolheriam pólen com elevados teores de PAHs através da contaminação do solo porque a flor não teria PAHs provenientes do solo. Assim, a possível contaminação das flores só poderia ser feita através do ar. No entanto, a vegetação só começou de novo a florescer e as abelhas saíram para recolher o pólen na primavera seguinte aos incêndios (cerca de cinco meses depois) o que talvez tenha dado tempo suficiente para dispersar e reduzir a contaminação do ar.

## 7. Conclusão

Com os resultados obtidos pode-se afirmar que nas amostras de mel analisadas não foram detetados nenhum dos quatro PAHs, cujos limites de deteção são 0,07 µg/kg para o B(a)A, 0,08 µg/kg para o Cris, 0,07 µg/kg para o B(b)F e 0,09 µg/kg para o B(a)P. A presença de qualquer um destes quatro PAHs, que são referidos como prioritários segundo a EFSA e a US-EPA (os que causam mais preocupação em termos da saúde humana) a existir, será residual e sem expressão na segurança do mel, no que aos PAHs diz respeito.

Apesar do mel não ter um limite máximo estabelecido para o teor de PAHs, pode fazer-se uma comparação com os valores mais baixos regulamentados para estes contaminantes em géneros alimentícios, que são para alimentos destinados a bebés e crianças com um teor máximo de 1 µg/kg. Usando esta referência, pode-se inferir que todas as amostras de mel analisadas têm um valor cerca de três vezes menor que o limite para alimentos destinados a bebés e crianças. Considerando ainda que o consumo de mel não é recomendado a esta faixa etária e que o mel não é consumido diariamente nem habitualmente em grandes quantidades pode então afirmar-se que não existe qualquer problema na ingestão destes méis para a saúde das populações, no que aos PAHs diz respeito.

Os resultados encontrados, que revelam a ausência de contaminação por PAHs nas amostras de mel testadas, estão em linha com o reportado nos estudos (43), (44) e (45), no entanto é necessário deixar o alerta para o facto de apesar de não haver contaminação nos méis recolhidos e extraídos no ano seguinte aos incêndios (não existindo estudos que comprovem que nos próximos anos não possam aparecer PAHs em concentrações detetáveis/quantificáveis) é importante verificar que não houve entrada destes contaminantes, *a posteriori*, no ciclo natural de produção e extração do mel sendo por isso desejável que se continue a avaliar e monitorizar a segurança, não só do mel, mas também de outros alimentos que possam ser afetados por estas catástrofes.

## 7. Bibliografia

- (1) Departamento de Gestão de Áreas Públicas e de Proteção Florestal - **10º Relatório Provisório de Incêndios Florestais - 2017**. [ICNF] Instituto da Conservação da Natureza e das Florestas [Consult. em 11 de março 2019] Disponível em: <http://www2.icnf.pt/portal/florestas/dfci/Resource/doc/rel/2017/10-rel-prov-ljan-31out-2017.pdf>
- (2) 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 25 (2016) 107-123.
- (3) SILVA, C. C. - **2017 foi o ano em que mais ardeu nos últimos dez anos – quatro vezes mais que o habitual**. Público (2017) [Consult. em 24 fevereiro 2019] Disponível em: <https://www.publico.pt/2017/11/10/sociedade/noticia/2017-foi-o-ano-em-que-mais-ardeu-nos-ultimos-dez-anos--quatro-vezes-mais-que-o-habitual-1792180>
- (4) [ASAE] Autoridade de Segurança Alimentar e Económica - **Perigos de origem alimentar**. ASAE [Consult. em 24 fevereiro 2019] Disponível em: <https://www.asae.gov.pt/cientifico-laboratorial/area-tecnico-cientifica/perigos-de-origem-alimentar.aspx>
- (5) [ASAE] Autoridade de Segurança Alimentar e Económica - **Perigos Físicos – Risco de Asfixia**. ASAE [Consult. em 24 fevereiro 2019] Disponível em: <https://www.asae.gov.pt/seguranca-alimentar/conselhos-praticos-para-os-consumidores/perigos-fisicos-risco-de-asfixia.aspx>
- (6) QUALI - **Perigos Químicos. Quali**. [Consult. em 24 fevereiro 2019] Disponível em: <https://www.quali.pt/perigos-alimentares/590-perigos-quimicos>
- (7) LEE, J. (et al.) - **Monitoring and risk assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in processed foods and their raw materials**. Food Control. 199 (2016) 768-78.
- (8) [ASAE] Autoridade de Segurança Alimentar e Económica - **HACCP**. ASAE [Consult em 24 fevereiro 2019] Disponível em: <https://www.asae.gov.pt/seguranca-alimentar/haccp.aspx>
- (9) CRANE, E. - **The world history of beekeeping and honey hunting**. New York: Routledge, 1999. ISBN 0-415-92467-7
- (10) BARGAŃSKA, Z.; NAMIEŚNIK, J. - **Pesticide Analysis of Bee and Bee Product Samples**. Critical Reviews in Analytical Chemistry 40, nº3 (2010), 159-171.

- (11) LANGSTROTH, L. L. - **The Hive and the Honey-Bee: A Bee Keeper's Manual**. Northampton: Hopkins, Bridgman & Company, 1853 ISBN 978-1908904522
- (12) Decreto-Lei nº 214/2003 de 18 de setembro de 2003. *Diário da República nº126 – Série I*. Ministério da Agricultura, Desenvolvimento Rural e Pescas. Lisboa.
- (13) Decreto-Lei nº 126/2015 de 7 de julho de 2015. *Diário da República nº130/2015, 1ª série*. Ministério da agricultura e do mar. Lisboa.
- (14) MANYI-LOH, C. E., CLARKE, A. M., NDIP, R. N. - **An overview of honey: Therapeutic proprieties and contribution in nutrition and human health**. African Journal of Microbiology Research 5 nº8 (2011) 844-852.
- (15) ALVAREZ-SUAREZ, J. (et al.) - **Contribution of honey in nutrition and human health: a review**. Mediterr J NutrMetab 3 nº1 (2010) 15-23.
- (16) CHIESA, L. M. - **The occurrence of pesticides and persistent organic pollutants in Italian organic honeys from different productive areas in relation to potential environmental pollution**. Chemosphere. 154 (2016) 482-490.
- (17) DE-MELO, A. A. M. (et al.) - **Composition and properties of *Apis mellifera* honey: A review**. Journal of Apicultural Research 57 (2017) 5-37.
- (18) PAJUELO, A. G. - **Análises Sensoriais de Méis**. [Consult. em 25 maio 2019] Disponível em: <http://www.oapicultor.com/artigos/txtsensormeis.pdf>
- (19) WHITE, J. W., DONER, L. W. - **Honey Composition and Proprieties**. Agriculture Handbook 335 (1980) 82-91.
- (20) KEPPY, N. K.; ALLEN, M. W. - **The Determination of HMF in Honey with an Evolution Array UV-Visible Spectrophotometer**. Thermo Fisher Scientific (2010) [Consult. em 7 março 2019] Disponível em: [http://www.acm2.com/prilोजना/UV-VIS\\_Applications/HMF%20in%20honey.pdf](http://www.acm2.com/prilोजना/UV-VIS_Applications/HMF%20in%20honey.pdf)
- (21) AL-ALAM, J. et al - **A multiresidue method for the analysis of 90 pesticides, 16 PAHs, and 22 PCBs in honey using QuEChERS-SPME**. Anal Bioanal Chem 409 nº21 (2017) 5157-5169.
- (22) [WHO] World Health Organization - **Botulism**. WHO (2018) [Consult. em 7 março 2019] Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/botulism>
- (23) SAMPATH KUMAR, K. P. (et al.) - **Medicinal uses and health benefits of Honey: An Overview**. Journal of Chemical and Pharmaceutical Research 2, nº1 (2010) 385-395.
- (24) ALBURQUERQUE, M.; COUTINHO, M.; BORREGO, C. - **Long-term monitoring and seasonal analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) measured**

- over a decade in the ambient air of Porto, Portugal. *Science of the Total Environment* 543 (2016) 439-448.
- (25) YOUSEFI, M. (et al.) - **Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) content of edible vegetable oils in Iran: A risk assessment study.** *Food and Chemical Toxicology* 118 (2018) 480-489.
- (26) VANE, C. H. (et al.) - **Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) and polychlorinated biphenyls (PCB) in urban soils of Greater London, UK.** *Applied Geochemistry* 51 (2014) 303-314.
- (27) BRUSHCHWEILER, E. D. (et al.) - **Generation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) during woodworking operations.** *Frontiers in Oncology* 2, n°148 (2012) 1-8.
- (28) ROGERS, S. W. (et al.) - **Natural Attenuation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons-Contaminated Sites: Review.** *Practice Periodical of Hazardous, Toxic and Radioactive Waste Management* 6 n°3 (2002) 141-155.
- (29) Committee of the Panel on Contaminants - **Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain - Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Food.** *The EFSA Journal* 724 (2008) 1-114.
- (30) LERDA, D. - **Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) Factsheet.** 4<sup>a</sup> ed. Bélgica: Comissão Europeia, 2011 [Consult. em 3 abril 2019] Disponível em: [https://ec.europa.eu/jrc/sites/jrcsh/files/Factsheet%20PAH\\_0.pdf](https://ec.europa.eu/jrc/sites/jrcsh/files/Factsheet%20PAH_0.pdf)
- (31) ZELINKOVA, Z.; WENZL, T. - **EU marker polycyclic aromatic hydrocarbons in food supplements: analytical approach and occurrence.** *Food Additives & Contaminants: Part A* 32 n°11 (2015) 1914-1926.
- (32) [EFSA] European Food Safety Agency - **EFSA opinion on suitable indicators for both the occurrence and toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in food.** (2008) [Acedido em 3 abril 2019] Disponível em: <https://www.efsa.europa.eu/en/press/news/080804>
- (33) LAMBERT, O. (et al.) - **Polycyclic aromatic hydrocarbons: Bees, honey and pollen as sentinels for environmental chemical contaminants.** *Chemosphere* 86 (2012) 98-104.
- (34) NGUYEN T. N. T. (et al.) - **Seasonal variation, phase distribution, and source identification of atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons at a semi-rural site in Ulsan, South Korea.** *Environmental Pollution* 236 (2018) 529-539.
- (35) RODA, G. (et al.) - **Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in lipstick by gas-chromatography coupled to mass spectrometry: A case history.** *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 165 (2019) 386-392.

- (36) KIM, K. (et al.) - **A review of an airborne polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and their human health effects.** Environmental International 160 (2013) 71-80.
- (37) [EFSA] European Food Safety Authority - **Opinion of the Scientific Committee on Food on the risks to human health of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Food** (2002) [Consult. em 15 maio 2019] Disponível em: [https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/sci-com\\_scf\\_out153\\_en.pdf](https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/sci-com_scf_out153_en.pdf)
- (38) Regulamento (CE) n° 1881/2006 de 10 de dezembro de 2006 – Jornal Oficial da União Europeia L364/5. Comissão Europeia. Bruxelas.
- (39) DOBRINAS, S, BIRGHILA, S, COATU, V - **Assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons in honey and propolis produced from various flowering trees and plants in Romania.** Journal of Food Composition and analysis. 21 (2008), 71-77.
- (40) CORREDERA, L. (et al.) - **Multiresidue Determination of Carcinogenic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Honey by Solid-Phase Extraction and High-Performance Liquid Chromatography.** Journal of Food Protection 74 n° 10 (2011) 1692-1699.
- (41) BATELKOVÁ, P. (et al.) - **Polycyclic aromatic hydrocarbons and risk elements in honey from the South Moravian region (Czech Republic).** Acta Vet. Brno 81 (2012), 81-174.
- (42) [ATSDR] Agency for Toxic Substances and Disease Registry - **Toxicity of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs).** Atlanta: US Department of Health and Human Services, 2009 [Consult. 27 fevereiro 2019] Disponível em: <https://www.atsdr.cdc.gov/csem/pah/docs/pah.pdf>
- (43) HARITASH, A. K.; KAUSHIK, C. P. - **Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A review.** Journal of Hazardous Materials 169 (2009) 1-15.
- (44) VALE, C. (et al.) - **The influence of Sarconiafruticosa on retention of PAHs in salt marsh sediments (Sado estuary, Portugal).** Chemosphere 71 (2008) 1599-1606.
- (45) ALEGRE, A. H. A. L. - **Quantificação por HPLC de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos em azeites presentes no mercado Português.** Lisboa: Universidade Nova de Lisboa, 2007. Dissertação de mestrado.
- (46) ALTMAN, D. G.; BLAND, J. M. - **Standard deviation and standard errors.** British Medical Journal 331 (2005) 93.

- (47) WILKOWSKA, A.; BIZIUK, M. - **Determination of pesticide residues in food matrices using QuEChERS methodology**. Food Chemistry 125 (2011) 803-812.
- (48) INMETRO - **Vocabulário Internacional de Metrologia (VIM)**. 1ª ed. Caparica: Instituto Português da Qualidade, 2012 ISBN 978-763-00-6
- (49) [ITL] Instituto Técnico de Lisboa - **Erros e incertezas experimentais**. ITL (2016) [Consult. em: 29 abril 2019] Disponível em <https://fenix.tecnico.ulisboa.pt/downloadFile/1970943312266791/MEFT-LFEB-ERROS%20E%20INCERTEZAS%20EXPERIMENTAIS%202015.pdf>
- (50) RELACRE - **Guia RELACRE 13: Validação de métodos internos de ensaio em análise química**. Lisboa: RELACRE, 2000. ISBN 972-8574-02-9
- (51) Regulamento (CE) nº 333/2007 de 28 de março de 2007. Jornal Oficial da União Europeia L 88/29. Comissão Europeia. Bruxelas.
- (52) International Organization for Standardization - **ISO 5725-1: Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results – Part 1: General principles and definitions**. 1ª ed. Genève: International Organization for Standardization, 1994 [Consult. em 26 junho 2019] Disponível em: <https://www.evs.ee/products/iso-5725-1-1994>
- (53) MARTINS, A. F. S. - **Implementação e validação de métodos analíticos**. Coimbra: Universidade de Coimbra, 2016. Dissertação de mestrado.
- (54) Department of Mathematics Massachusetts Institute of Technology - **t-Distribution Table**. MIT [Consult. em 27 junho 2019] Disponível em: [http://math.mit.edu/~vebrunel/Additional%20lecture%20notes/t%20\(Student%27s\)%20table.pdf](http://math.mit.edu/~vebrunel/Additional%20lecture%20notes/t%20(Student%27s)%20table.pdf)
- (55) SHRIVASTAVA, A.; GUPTA, V. B. - **Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods: Review Article**. Chronicles of Young Scientists 2 (2011) 21-5.
- (56) GAO, Y; ZHU, L. - **Plant uptake, accumulation and translocation of phenanthrene and pyrene in soils**. Chemosphere 55 (2004) 1169-1178.

## ANEXO I – Fórmulas de cálculo subjacentes à preparação das soluções-padrão

Os cálculos para as diluições das soluções-padrão tiveram como base equação 8:

$$\text{Equação 8: } ci \times vi = cf \times vf \Leftrightarrow vi = \frac{cf \times vf}{ci}$$

De forma a saber qual o volume inicial a usar a partir da solução com uma maior concentração para que as diluições seguintes tenham a concentração desejada é necessário saber qual a concentração da solução-inicial, a concentração final da solução que se quer preparar e o seu volume final. Como exemplo, para saber qual o volume necessário retirar da solução inicial (S<sub>i</sub>) para preparar a solução com a concentração de 100 ng/mL (P100) realizaram-se os seguintes cálculos. Sabe-se que:

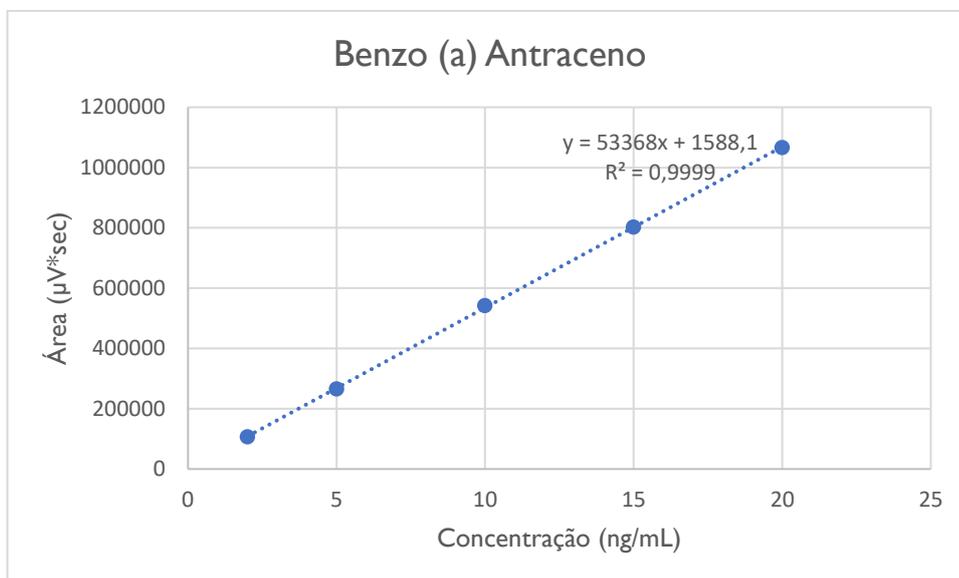
$$ci = 10 \mu\text{g/mL} = 10\,000 \text{ ng/mL}$$

Ao substituir na equação 8 os valores correspondentes [a concentração final (cf) é 100 ng/mL, o volume final (vf) é 50 mL e a concentração inicial (ci) é 10 000 ng/mL] tem-se:

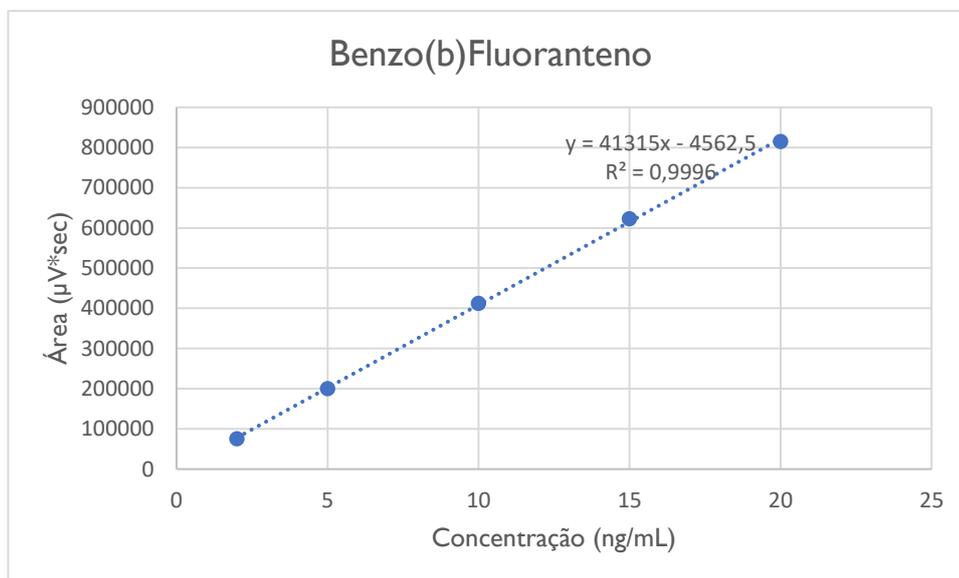
$$vi = \frac{100 \text{ ng/mL} \times 50 \text{ mL}}{10\,000 \text{ ng/mL}} \Leftrightarrow vi = 0,5 \text{ mL}$$

Deste modo, verifica-se que para preparar uma solução de 50 mL com a concentração de 100 ng/mL devem-se retirar 0,5 mL da solução inicial de 10 µg/mL para um balão volumétrico de 50 mL e aferir com acetonitrilo.

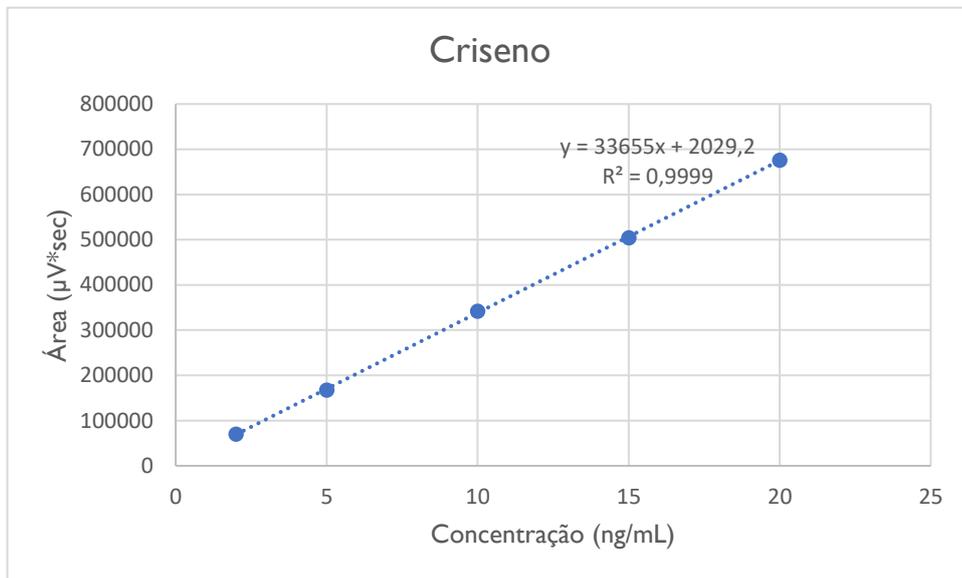
## ANEXO 2 – Curvas de calibração das soluções-padrão



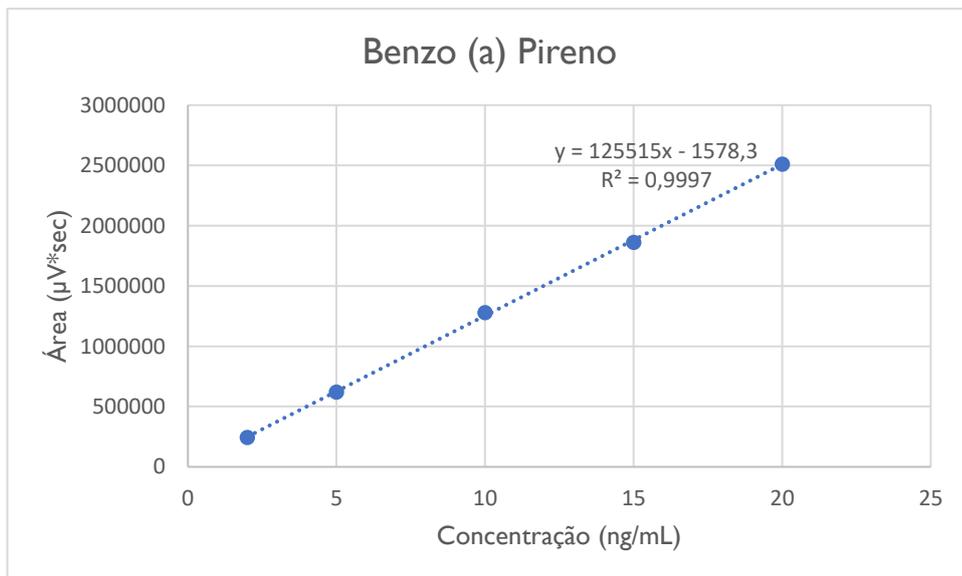
**Figura A2 1** - Curva de calibração do benzo(a)antraceno



**Figura A2 2** - Curva de calibração do benzo(b)fluoranteno



**Figura A2 3 - Curva de calibração do criseno**



**Figura A2 4 - Curva de calibração do benzo(a)pireno**

### **ANEXO 3 - Concentrações lidas em ng/mL dos ensaios de repetibilidade**

**Tabela A3 I - Concentrações lidas dos ensaios de repetibilidade**

<b>Ensaio</b>	<b>Concentração amostra (ng/mL)</b>			
	<b>B(a)A</b>	<b>Cris</b>	<b>B(b)F</b>	<b>B(a)P</b>
<b>Rep1</b>	8,878	7,391	7,021	6,825
<b>Rep2</b>	9,096	7,527	7,675	6,868
<b>Rep3</b>	7,971	8,069	6,924	6,814
<b>Rep4</b>	8,887	7,23	7,283	7,374
<b>Rep5</b>	8,477	7,853	7,121	7,297
<b>Rep6</b>	9,172	8,34	7,248	7,609
<b>Rep7</b>	7,35	6,233	7,026	6,671
<b>Rep8</b>	7,801	8,168	7,634	7,934
<b>Rep9</b>	7,204	7,399	6,977	6,983
<b>Rep10</b>	8,524	7,97	8,043	8,036