



Universidade Federal da Grande Dourados - UFGD
Faculdade de Ciências Exatas e Tecnologia - FACET
Programa de pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental



**USO DA TÉCNICA DE ESPECTROSCOPIA PARA A ANÁLISE DA
INTERAÇÃO ENTRE HPAS E O SISTEMA FOTOSINTÉTICO DA
ALFACE (*Lactuca sativa*, L).**

Mestranda

Josiane Cristina de Carvalho

Orientador

Ériton Rodrigo Botero

Dourados – MS

Junho/2019



Universidade Federal da Grande Dourados - UFGD
Faculdade de Ciências Exatas e Tecnologia - FACET
Programa de pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental



**USO DA TÉCNICA DE ESPECTROSCOPIA PARA A ANÁLISE DA
INTERAÇÃO ENTRE HPAS E O SISTEMA FOTOSINTÉTICO DA
ALFACE (*Lactuca sativa*, L).**

Mestranda

Josiane Cristina de Carvalho

Orientador

Ériton Rodrigo Botero

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Federal da Grande Dourados - UFGD, como requisito necessário para a obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia Ambiental.

Área de Concentração – Ciência Ambiental

Dourados – MS

Junho/2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

C331n Carvalho, Josiane Cristina De
USO DA TÉCNICA DE ESPECTROSCOPIA PARA A ANÁLISE DA INTERAÇÃO ENTRE
HPAS E O SISTEMA FOTOSSINTÉTICO DA ALFACE (*Lactuca sativa*, L.) [recurso eletrônico] /
Josiane Cristina De Carvalho. – 2019.
Arquivo em formato pdf.

Orientador: Eriton Rodrigo Botaro.
Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental)-Universidade Federal do Grande
Dourados, 2019.
Disponível no Repositório Institucional da UFGD em:
<http://portal.ufgd.edu.br/setor/biblioteca/repositorio>

1. Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos. 2. Espectroscopia de Fluorescência Sincronizada. 3.
Bazo(s)Pirano. 4. Alface (*Lactuca Sativa* L.). 5. Clorofila. I. Botaro, Eriton Rodrigo. II. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(s) autor(s).

©Direitos reservados. Permitido a reprodução parcial desde que citada a fonte.



Termo de Aprovação

Após apresentação, arguição e apreciação pela banca examinadora, foi emitido o parecer APROVADO, para a dissertação intitulada: **“Uso da técnica de espectroscopia para a análise da interação entre HPAS e o sistema fotossintético da alface (*Lactuca sativa*, L)”**, de autoria de **Josiane Cristina de Carvalho**, apresentada ao Programa de Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Federal da Grande Dourados.

Prof. Dr. Eriton Rodrigo Botero
Presidente da banca examinadora

Prof. Dr. Heberth Juliano Vieira
Membro Examinador (UFGD)

Prof.^a Dr.^a Claudia Andrea Lima Cardoso
Membro Examinador (UEMS)

Dourados/MS, 28 de junho de 2019.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus pela minha vida, pela certeza do seu amor para comigo, por sempre mostrar sua presença. À Minha Mãe que mesmo la bem juntinha de Deus olha por mim neste e em todos os momentos.

Ao meu orientador Prof. Dr. Ériton Botero pela oportunidade de realização deste trabalho, pela PACIÊNCIA, os conhecimentos transmitidos, confiança e convivência.

Aos amigos do laboratório, Poliane, Lene, Eliene, Dani, Higor, Patrick, Willian pela amizade, pelos cafés, pelas risadas, companheirismo. Aos amigos dos outros laboratórios e da faculdade que, direta ou indiretamente, contribuíram para a formação do meu caráter e da minha formação acadêmica, pela parceria, pelos “rolês” dos fins de semana, por me darem esperança e mostraram-me e a importância da amizade: Mônica, Michele, Mariza, Maria Joyce, e a todos os outros que não foram citados, mas que levarei em minha vida sempre.

Aos professores Kelly Brabes e Heberth Vieira, pelo apoio incondicional, pelos ensinamentos, as conversas, pelas broncas, e principalmente pelo incentivo e por não me deixarem desistir. Serei eternamente grata a vocês.

Aos amigos do grupo de WhatsApp “Bolsistas Capes”, pelas experiências trocadas, as discussões inteligentes, incentivo, pelos momentos de sofrimento com o cai não cai da bolsa, as piadas nos momentos de descontração. Vocês todos ocupam um lugar especial em meu coração.

Agradeço também a todos os professores e colaboradores do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental. À coordenação do Curso e funcionários, que possibilitaram, direta ou indiretamente, a realização deste trabalho.

E finalmente, a UFGD, que possibilitou a realização deste trabalho e a CAPES pela bolsa de mestrado concedida.

DEDICATÓRIA

À Deus.

Aos meus tios pelo apoio e compreensão incondicional nessa etapa da minha vida.

À todos os meus amigos.

Vocês são grandes responsáveis por tudo que tenho obtido ao longo dessa minha jornada acadêmica.

É com todo o meu carinho que lhes dedico este trabalho.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Carcinogenicidade, Genotoxicidade e Mutagenicidade de alguns HPAS 14

Tabela 2: Características analíticas do procedimento proposto..... 43

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) prioritários em estudos ambientais de acordo com a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA).....	7
Figura 2: Esquema mecanístico da reação de polimerização para a formação do benzo(a)pireno.	11
Figura 3: Representação esquemática da degradação dos HPAs.	12
Figura 4: a) Modelo de interação orbita-orbital do DNA-carcinógeno; (b) Formação da ligação DNA-carcinógeno.	18
Figura 5: Estrutura Química da Clorofila a e b.	22
Figura 6: Espectro de absorção de uma solução de clorofila-a e de clorofila-b.	23
Figura 7: Diagrama do nível de energia da molécula de clorofila.....	24
Figura 8: Caixas GERBOX com as sementes no início do teste de germinação e após o período de 8 dias, já crescidas e prontas para serem transferidas.....	32
Figura 9: Perfil hidropônico com as mudas já inseridas nas bandejas de germinação...	33
Figura 10: Perfil hidropônicos com as mudas já em tamanho para coleta e análises.	34
Figura 11: Mudas de alface transferidas para vasos individuais.	35
Figura 12: Estufa de plantio das alfaces	35
Figura 13: Espectro de emissão de fluorescência sincronizada do B(a)P em solução metanólica para um $\Delta\lambda$ de 40nm. A concentração do B(a)P era de 0.97 ng/mL.....	39
Figura 14: Espectro de emissão de fluorescência sincronizada da solução nutritiva com concentrações diferentes de HPA	39
Figura 15: Espectro de emissão de fluorescência sincronizada de uma solução de benzo(a)pireno acondicionada em temperatura ambiente (26°C) e na geladeira (-10°C).	41
Figura 16: Intensidade de fluorescência do B(a)P em função do tempo	41
Figura 17: Intensidade de fluorescência em função da concentração de B(a)P, representando uma curva analítica do procedimento proposto.	43
Figura 18: Espectro de emissão do efeito da adição de B(a)P sobre o extrato da clorofila extraída de plantas de alface cultivadas através do sistema de convencional.	44
Figura 19: Espectro de emissão do efeito da adição de B(a)P sobre o extrato da clorofila extraída de plantas de alface cultivadas através do sistema de hidropônico.	45
Figura 20: Intensidade de Fluorescência em função da concentração de B(a)P adicionado nas soluções nutritivas e absorvidos pela clorofila de plantas de alface cultivadas através do sistema convencional.....	45

Figura 21: Intensidade de Fluorescencia em função da concentração de B(a)P adicionado nas solucoes nutritivas e absorvidos pela clorofila de plantas de alface cultivadas através do sistema hidroponico.....	46
Figura 22: Intensidade de fluorescência sincronizada da extração líquido-líquido clorofila para o sistema de cultivo convencional	47
Figura 23: Intensidade de fluorescencia sincronizada da extração liquido-liquido clorofila para o sistema de cultivo hidropônico.	47
Figura 24: Imagens de QY_Max durante período de análise, obtidas por meio da cinética de fluorescência da clorofila.....	49
Figura 25: Imagens de FV/Fm_Lss durante período de análise, obtidas por meio da cinética de fluorescência da clorofila.	Erro! Indicador não definido.
Figura 26: Imagens de NPQ_Lss durante período de análise, obtidas por meio de imagem de fluorescência da clorofila.....	Erro! Indicador não definido.
Figura 27: Raiz de plantas de Lactuca sativa com diferentes concentrações de Benzo(a)pireno, da esquerda para a direita, planta controle, concentração 5,09ng/mL e concentração 50,9 ng/mL.	50
Figura 28: Valores médios de comprimento, em função do tempo, para duas concentrações de benzo(a)pireno, comparadas com as medias do comprimento da controle (solução nutritiva).....	51
Figura 29: Espectro de emissão do benzo(a)pireno presente na Raiz da alface cultivada por meio de hidroponia.....	52

RESUMO

Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) são compostos orgânicos apolares formados exclusivamente por átomos de carbono e hidrogênio e organizados sob a forma de anéis aromáticos fusionados entre si. São poluentes carcinogênicos formados a partir da combustão incompleta e/ou pirólise da matéria orgânica, sendo a queima de combustíveis fósseis uma das principais fontes destes contaminantes na atmosfera. A contínua presença desses contaminantes no meio ambiente é consequência direta de sua baixa solubilidade em água e de sua associação à matéria orgânica de solos e sedimentos, ocasionando a incorporação dessas substâncias em diversos níveis da cadeia alimentar. Considerando que a ingestão de alimentos é o meio mais direto para a exposição humana à várias substâncias nocivas, o presente estudo avaliou possíveis interações entre o benzo(a)pireno absorvido pela alface (*Lactuca sativa*, L.) e as possíveis influências em sua estrutura fisiológica e aparato fotossintético. Para isso foram utilizadas amostras de alfaces que estiverem em contato com água e/ou solução nutritiva contendo diferentes quantidades/concentrações de benzo(a)pireno como contaminante, concentrações essas baseadas nos dados obtidos em trabalhos anteriores (OLIVEIRA et al., 2015; RODRIGUES, 2011; ROSA, 2017). Escolheu-se como técnica de prova para a análise das influências do aparato fotossintético a espectroscopia de fluorescência sincronizada (EFS), uma técnica de baixo custo e que já é usada em nosso grupo de pesquisa para análises de HPAs se mostrando bastante eficiente. Outro parâmetro avaliado foi a biometria da planta, que afere o tamanho da parte aérea e de raízes em plantas. A técnica avalia o crescimento normal e irregular e a relação dessas alterações/anomalias relacionadas com o estresse causado pela incorporação de contaminantes. Os resultados experimentais mostraram que o benzo(a)pireno é capaz de induzir alterações significativas no comportamento fisiológico e fotossintético da alface. Sendo assim, a presença de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos nas folhas de alface e consequentemente no extrato da clorofila, exerce sim uma influência no seu desenvolvimento quando se compara apenas a intensidade de fluorescência.

Palavras-chaves: Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos; Espectroscopia de Fluorescência Sincronizada; Benzo (a) Pireno; Alface;

ABSTRACT

Aromatic Polycyclic Hydrocarbons (HPAs) are nonpolar organic compounds formed exclusively of carbon and hydrogen atoms and organized as aromatic fused rings. They are carcinogenic pollutants originated from incomplete combustion and/or pyrolysis of organic matter, being the burning of fossil fuels one of the main sources of these contaminants in the atmosphere. The continuous presence of these contaminants in the environment is a direct consequence of their low water solubility and also their association with soil and sediment organic matter, leading to the incorporation of these substances at various levels of the food chain. Considering that food intake is the most direct means for human exposure to various harmful substances, the present study evaluated possible interactions of benzo (a) pyrene absorption by lettuce (*Lactuca sativa*, L.) and their possible influences on its physiological structure and photosynthetic apparatus. We used samples of lettuces that are in direct contact with water and/or nutrient solution containing different amounts/concentrations of benzo(a)pyrene as a contaminant. The concentrations are based on data obtained in previous works (OLIVEIRA et al., 2015; RODRIGUES, 2011; ROSE, 2017). As a probe technique for the analysis of photosynthetic apparatus influences, synchronized fluorescence spectroscopy (EFS) was chosen as a low cost and efficient technique. Another parameter evaluated was plant biometrics, which measures the size of shoots and roots in plants. The technique evaluates normal and irregular growth and the relationship of these stress-related changes/anomalies caused by the incorporation of contaminants. Experimental results showed that benzo(a)pyrene is capable of inducing significant changes in lettuce physiological and photosynthetic behavior. Thus, the presence of aromatic polycyclic hydrocarbons in the lettuce leaves and consequently in the chlorophyll extract has an influence on its development when comparing only the fluorescence intensity.

Keywords: Aromatic Polycyclic Hydrocarbons; Synchronized Fluorescence Spectroscopy; Benzo(a)Pyrene; Lettuce;

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	4
2.1 Objetivos gerais.....	4
2.2 Objetivos Específicos	4
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
3.1 Os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs)	5
3.1.1 Aspectos Históricos.....	8
3.1.2 Propriedades Físico-Químicas	9
3.1.3 Emissão, formação e degradação dos HPAs	10
3.1.4 Toxicidade dos HPAs.....	12
3.2 Utilização da Espectroscopia de Fluorescência Molecular Sincronizada para Identificação de HPAs.	18
3.3 Produção e consumo de Hortaliças no Brasil	20
3.4 Clorofila	21
3.5 Alterações fisiológicas	24
4. PARTE EXPERIMENTAL	27
4.1 Amostras para estudo.....	27
4.2 Preparação das soluções com HPA	27
4.3 Espectro de Emissão do Benzo(a)pireno.....	28
4.3.1 Figuras de mérito e elaboração da curva analítica.....	29
4.4 Efeito do tempo e temperatura na degradação do benzo(a)pireno	31
4.5 Cultivo da Alface (<i>Lactuca sativa, L</i>)	31
4.5.1 Sistema Hidropônico	31
4.5.2 Sistema Convencional.....	34
4.6 Extração da Clorofila	35
4.7 Medidas de Fluorescência do extrato de clorofila	36
4.8 Outros Parâmetros da fisiologia da planta.....	37
4.9 Estudo sobre o efeito direto do B(a)P sobre a clorofila	37
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	38
5.1 Espectro de emissão do benzo(a) pireno.....	38
5.3 Obtenção da curva analítica e figuras de mérito	42
5.4 Determinação do Teor de Clorofila.....	43
5.5 Estudo sobre o efeito direto do B(a)P sobre a clorofila	47

5.6 Influência do benzo(a)pireno sobre a fisiologia da planta	48
6. CONCLUSÕES.....	53
7. REFERÊNCIAS.....	54

1. INTRODUÇÃO

No cenário atual, com atenções voltadas para as questões ambientais, os impactos da degradação e da influência humana na natureza vêm sendo cada vez mais levados em consideração. Tornou-se também crescente, nas últimas décadas, a conscientização ambiental em que se trata o meio ambiente como um complexo carregado de vida e interações diretas com o próprio homem, dotado de valor, não só econômico, mas cultural e social (ZULAUF, 2000).

A preocupação e o cuidado com o meio ambiente vêm de encontro com a necessidade de produção de alimentos, tendo em vista o aumento crescente da população, evidenciada por uma produção cada vez maior de produtos agrícolas, incluindo a produção de hortaliças destinadas ao consumo *in natura* (JUNQUEIRA, 2000). Dentre as hortaliças que são mais consumidas *in natura*, estão incluídas a alface, o tomate, o pepino, o agrião, o pimentão e etc. (COELHO, 2007).

Pode-se dizer que o número crescente no consumo de hortaliças decorre não só do aumento da população, mas também pela tendência de mudança no hábito alimentar do consumidor que está sendo voltado para uma alimentação baseada em produtos naturais (FRANÇA *et al.*, 2012). O consumidor em si tem se tornado mais exigente, havendo necessidade de produção de produtos em larga escala e com extrema qualidade, além de manter o seu fornecimento o ano todo.

Assim, assuntos como a segurança alimentar vem se tornando um tema de discussão cada vez mais relevante, pois a presença de contaminantes (químicos ou biológicos) em alimentos pode constituir risco à saúde humana. Nesse contexto a produção de hortaliças teve que se adequar às necessidades e exigências do mercado consumidor, tal que o cultivo protegido em túneis, estufas e hidropônias vem se tornando quase que a única alternativa para essa demanda (POTRICH, 2012).

Contudo, a ingestão de alimentos é o meio mais direto para a exposição humana à várias substâncias nocivas. Algumas substâncias biológicas (vírus, fungos, bactérias, protozoários ou parasitas) ou químicas (metais pesados, micotoxinas, ficotoxinas, agrotóxicos, fármacos, aditivos alimentícios, pesticidas, e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos) adicionadas intencionalmente, ou não, ao processo produtivo dos alimentos, podem estar presentes como resíduo até ao seu consumo (LIN *et al.*, 2007). Diante disso, surge a necessidade de desenvolvimento de sistemas de cultivos e monitoramento das

plantações que assegure o equilíbrio do ambiente e de seus recursos e amplie o desafio em gerar soluções e práticas culturais ambientalmente desejáveis.

Verifica-se que nas últimas décadas, tal contaminação de alimentos por substâncias tóxicas tem sido objeto de pesquisas (NASCIMENTO, 2010). Diversas classes de compostos químicos de diferentes origens vêm sendo detectadas em alimentos e bebidas, dentre elas e o que vale mais destaque, os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) (CARUSO, 2008; RIGOLIN-SÁ, 2002).

Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) são substâncias apolares, formados exclusivamente por átomos de carbono e hidrogênio e organizados sob a forma de anéis aromáticos fusionados entre si. Essa classe de substâncias tem sua origem na combustão incompleta da matéria orgânica regida principalmente por diferentes fatores físicos, como temperatura e pressão. São considerados poluentes orgânicos prioritários (POPs) em estudos ambientais, sendo algumas dessas substâncias consideradas como precursoras de ações mutagênicas e tumorais em sistemas biológicos. Essas substâncias são considerados, por programas de biomonitoramento, como sendo carcinogênicos, mutagênicos e genotóxicas porque possuem uma ação nociva que afeta a integridade do material genético de uma célula (DNA), todavia não constituem necessariamente uma prova de periculosidade em relação à saúde (RIBEIRO *et al.*, 2003).

Nos últimos anos, a constatação da presença de HPAs no meio ambiente e seus efeitos nocivos sobre os organismos que nele vivem, motivaram o interesse da comunidade científica pelo assunto, sobretudo, quanto à comprovação do potencial carcinogênico, mutagênico e citotóxico de alguns componentes desse grupo mesmo em concentrações muito baixas, em especialmente aqueles capazes de causar uma mutação genética (alteração da molécula de DNA que não é reparada durante a divisão celular), contribuindo para o desenvolvimento de tumores (ROCHA, 2016).

A contínua presença desses contaminantes no meio ambiente é consequência direta de sua baixa solubilidade em água e de sua associação à matéria orgânica de solos e sedimentos, ocasionando a incorporação dessas substâncias em diversos níveis da cadeia alimentar. Além disso, essas substâncias apresentam uma ampla distribuição no meio ambiente, são compostos lipofílicos altamente persistentes e possuem elevada tendência à bioacumulação (RESENDE *et al.*, 2017). Um dos HPAs mais tóxicos é o benzo(a)pireno, que é normalmente aplicado como um indicador de HPA nas soluções.

Visto esta problemática, uma avaliação toxicológica para identificação de HPAs nas hortaliças de um modo geral se torna essencial e uma prática desejável para o

monitoramento e controle ambiental (ROSA, 2017). Dentre as mais diversas hortaliças, a escolhida para o desenvolvimento deste estudo foi a alface (*Lactuca sativa, L.*) pois é a mais consumida no Brasil e normalmente são consumidas de forma *in natura* e, muitas vezes sem lavagem adequada, o que aumenta o risco de contaminação por substâncias contaminantes ou micro-organismos. Para isso foram utilizadas amostras de alfaces cultivadas em sementeiras e transplantadas posteriormente para vasos/jardineiras e também cultivadas no sistema hidropônico. Essas amostras foram expostas à soluções contendo diferentes quantidades/concentrações de benzo(a)pireno como contaminante, concentrações essas baseadas nos dados obtidos em trabalhos anteriores de acordo com as referências (OLIVEIRA et al., 2015; RODRIGUES, 2011; ROSA, 2017). Escolheu-se como técnica de prova para a análise das alterações no aparato fotossintético a espectroscopia de fluorescência sincronizada (EFS), uma técnica de baixo custo e que já se mostra sensível aos HPA's de acordo com as referências (RODRIGUES, 2011; ROSA, 2017). Fatores fisiológicos do próprio desenvolvimento das plantas foram também considerados como meios para se determinar a influência dos HPAs em seu desenvolvimento.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Cultivar amostras de alface sujeitas à contaminação com Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs), mais especificamente o benzo(a)pireno (B(a)P) e utilizar técnicas de caracterização por Espectroscopia de Fluorescência, aliada à métodos de extração e recuperação de solventes, bem como técnicas de análise fisiológicas para identificar e quantificar a influência desses nos aspectos de seu desenvolvimento.

2.2 Objetivos Específicos

- Cultivar amostras de alface sujeita à contaminação com diferentes teores de benzo(a)pireno;
- Extrair a clorofila das plantas;
- Usar a técnica de Espectroscopia de Fluorescência para a análise do teor de B(a)P e suas influências na fluorescência da clorofila;
- Correlacionar os parâmetros físicos e fisiológicos das amostras de alface com os resultados encontrados para a fluorescência da clorofila.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs)

Os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos, também conhecidos por HPA, pertencem a uma família de moléculas diversificadas de mais de cem compostos orgânicos já identificados. Estão amplamente distribuídos na natureza (ar, solo, plantas, água) e são, por definição, compostos químicos binários formados apenas por carbono e hidrogênio com estrutura que consiste de pelo menos 2 anéis aromáticos de 5 ou 6 átomos de carbonos que estão arrançados em forma hexagonal, com ligações duplas alternadas entre si. Estes anéis aromáticos podem ser isolados ou condensados entre si (MAGRINI, 2012).

Os HPAs têm origem natural como em depósitos de carvão e petróleo, vulcões, além disso, uma ampla variedade de compostos contendo sistemas de anéis poliaromáticos fusionados é sintetizada por organismos, particularmente bactérias, fungos, plantas superiores e alguns insetos. Os HPAs são gerados naturalmente, e de forma contínua, pela combustão incompleta de substâncias orgânicas, como resíduos vegetais, madeira, matéria orgânica, etc. Porém, as fontes mais importantes para o ambiente têm origem nas diversas atividades antrópicas como efluentes industriais e urbanos, derramamentos acidentais de petróleo, atividades de agricultura, incineração de resíduos, mas principalmente a combustão incompleta de combustíveis fósseis, derivados do petróleo (gasolina e óleo diesel) ou de carvão e madeira (VIANA, 2008). A produção de carvão vegetal, a extração e gaseificação do carvão mineral e aos processos de extração, transporte, refino, transformação e utilização do petróleo e de seus derivados (JACQUES *et al.*, 2007) são outras atividades antropogênicas responsáveis pela produção e liberação de HPAs no meio ambiente. Independentemente da atividade industrial, os centros urbanos são os locais com maior potencial de contaminação dos HPAs, devido aos postos de combustíveis, que podem contaminar o ar, o solo, o subsolo e as águas subterrâneas com hidrocarbonetos resultantes dos vazamentos nos tanques subterrâneos de armazenamento de combustíveis. Além disso, motores veiculares, oficinas mecânicas e garagens de automóveis são também fontes geradoras de HPAs nas cidades (LIMA *et al.*, 1998). Assim, devido a estas atividades, o solo recebe anualmente quantidades consideráveis dos HPAs que, em função da complexidade da sua estrutura química, da sua baixíssima solubilidade em água (como exemplo, a do antraceno é de somente

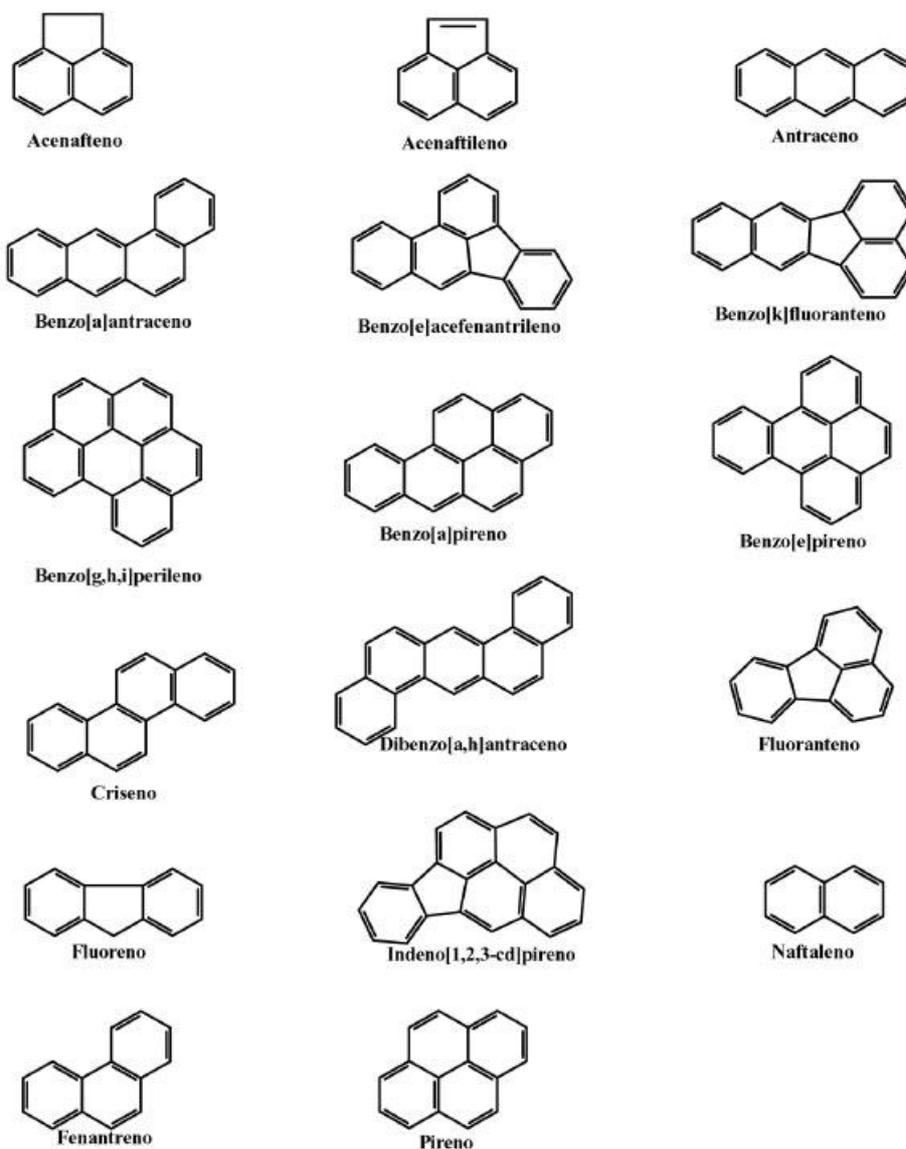
0,073mg/L) e da forte tendência de sorção à fase sólida do solo, tornam-se recalcitrantes e permanecem por longos períodos no ambiente, o que aumenta a possibilidade de exposição de humanos e animais a esses compostos. A incorporação dos hidrocarbonetos pelos animais e as plantas representa um impacto na cadeia alimentar pois se concentram nos organismos e são transferidos para outros níveis tróficos sem alteração de sua estrutura (CARDODO, 2017).

Desde que os HPAs foram reconhecidos como uma classe de compostos carcinogênicos no final da década de 1920, muitos estudos foram desenvolvidos para identificar e quantificar as fontes de exposição humana (CAMARGO, 2003). Órgãos nacionais como: Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Renováveis (IBAMA), Agência Nacional das Águas (ANA) e internacionais como o World Health Organization (WHO), Food and Agriculture Organization (FAO), International Agency for Reserach on Cancer (IARC) e United States Environmental Protection Agency (US EPA), responsáveis pela regulação ambiental no Brasil e em outros países, reconhecem os perigos em potencial da ocorrência dos HPAs no ambiente. Uma vez que mais de 30 HPAs e seus derivados apresentam efeitos carcinogênicos, isto faz deles a maior classe conhecida de compostos carcinogênicos (RISK INFORMATION SYSTEM, 2017).

Embora tenham sido isolados e estudados dezenas de HPAs, os principais avaliados em alimentos e reconhecidos por essas organizações foram divididos e classificados como poluentes B-2, poluentes orgânicos de controle primário (Figura 1) e prováveis carcinogênicos humano. Estes poluentes devem ser monitorados em vários ambientes, como sedimentos, água, solo e biota, sendo o benzo(a)pireno um dos HAPs mais tóxicos e que é normalmente aplicado como um indicador de contaminação por essas substâncias. Além disso, o fato de serem compostos lipofílicos altamente persistentes, possuem elevada tendência à bioacumulação (CARUSO, 2008), o que os tornam ainda mais prejudiciais à saúde.

Desses compostos classificados como B-2, estão 17 dos HPA's: benzo(a)antraceno [B(a)A], criseno [ChR], benzo(b)fluoranteno [B(b)F], benzo(j)fluoranteno [B(j)F], benzo(k)fluoranteno [B(k)F], benzo(a)pireno [B(a)P], dibenzo(a,h)antraceno [DhA], dibenzo(a,e)pireno [DeP], dibenzo(a,h)pireno [DhP], dibenzo(a,i)pireno [DiP], dibenzo(a,l)pireno [DlP], indeno (1,2,3- c,d)pireno [IcP], 5-metilcriseno [5MC], pireno [Pyr], fenantreno, naftaleno e fluoreno. A estrutura desses compostos podem ser observadas na Figura 1.

Figura 1: Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) prioritários em estudos ambientais de acordo com a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA)



FONTE: Adaptado da referência (SOLANGE *et al.*, 2008)

A USEPA regulamenta como valor limite de $0,2 \text{ ng.ml}^{-1}$ de benzo[a]pireno em água potável. No Brasil, somente o Estado de São Paulo possui legislação que trata da contaminação do solo e das águas subterrâneas pelos HPAs. Nesta legislação, o naftaleno apresenta um Valor de Referência (VR) de $0,2 \text{ mg.kg}^{-1}$, o que significa que, em concentrações iguais ou menores a esta, o solo pode ser considerado “limpo” e possível de ser utilizado para qualquer finalidade. Outro fator a ser considerado é o Valor de Intervenção (VI), que indica que há riscos para a saúde humana e para o ambiente, sendo

que a ultrapassagem desse valor em um volume de solo de 25m³, ou em 100m³ de água subterrânea, impõem a necessidade de implementação de ações voltadas para a sua remediação. Para o naftaleno, o VI é de 15mg.kg⁻¹ em solos agrícolas, de 60mg.kg⁻¹ em solos residenciais e de 90mg.kg⁻¹ em solos industriais. Na água subterrânea, o VI para este HPA é de 100µg.L⁻¹ (CETESB, 2009).

3.1.1 Aspectos Históricos

Pode-se considerar como o início da química dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) o isolamento do benzo(a)pireno (B(a)P) a partir do carvão em 1931 e, subsequente, a sua síntese no mesmo ano. A sua identificação como nova substância química, em 1931, permitiu demonstrar que o B(a)P é um forte agente cancerígeno em animais (COTTA, 2008).

As primeiras provas dos riscos ocupacionais e ambientais dos HPAs foram obtidas em 1922 pela demonstração de que extratos orgânicos de fuligem são cancerígenos em animais e, em 1942, também pela atividade cancerígena do extrato de material particulado ambiental (LOPES, 1996).

Em 1949 o B(a)P foi identificado em fuligem doméstica e, em 1952, em material particulado ambiental. Em 1970 o B(a)P e outros HPAs foram caracterizados como agentes carcinogênicos de distribuição mundial, em ambientes respiráveis, como constituintes de aerossóis urbanos. Neste mesmo ano, é reconhecido o excesso de carcinogenicidade atribuído aos HPAs e demonstrado que a atividade cancerígena dos extratos de partículas atmosféricas não é devida somente aos HPAs mas, também, a outras substâncias orgânicas ainda não conhecidas. Estas estão presentes, também no material orgânico poluente (MOP) de fontes de contaminação primária (COSTA, 2001).

Desde que os HPAs foram reconhecidos como uma classe de compostos carcinogênicos no final da década de 1920, muitos estudos foram desenvolvidos para identificar e quantificar as fontes de exposição humana. Dentre todos os compostos HPAs, o B(a)P tem sido o composto mais amplamente avaliado. Em fevereiro de 2005 a Comissão da Comunidade Européia, através do Regulamento (CE) nº 208 de 04 de fevereiro de 2005, estabeleceu níveis máximos para B(a)P em alguns alimentos, tais como: peixes, óleos e gorduras (2,0µg.kg⁻¹); crustáceos, carnes e peixes defumados (5,0µg.kg⁻¹); moluscos bivalves (10,0µg.kg⁻¹) e alimentos infantis (1,0µg/kg) (COMMUNITIES, 2005). No Brasil, a legislação vigente somente determina que os

aromatizantes/aromas de fumaça não poderão fornecer mais de $0,03\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ de B(a)P no alimento final e estabelece limite máximo de $0,7\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de B(a)P em águas potáveis (ANVISA, 2007).

3.1.2 Propriedades Físico-Químicas

HPAs são compostos orgânicos que são principalmente incolores, brancos ou amarelos pálido. Eles são um grupo onipresente de várias centenas de compostos quimicamente relacionados, ambientalmente persistentes com várias estruturas e toxicidade variada (MANSOUR, 2016).

As propriedades físicas e químicas dos HPAs são amplamente determinadas pelo sistema de duplas ligações conjugadas presentes nas estruturas desta classe de compostos, o que confere o caráter de estabilidade química, mas são suscetíveis à oxidação e fotodegradação pela luz (DRESCH *et al.*, 2011). À temperatura ambiente todos os HPAs são sólidos e apresentam, comumente, altas temperaturas de fusão e ebulição, baixas pressão de vapor e solubilidade em água. As duas últimas características tendem a diminuir com o aumento do peso molecular, pelo contrário, a resistência à oxidação e redução aumenta (LOPES, 1996). A solubilidade aquosa dos HPAs diminui para cada anel adicional. Enquanto isso, os HPAs são muito solúveis em solventes orgânicos porque são altamente lipofílicos. Esses compostos também manifestam várias funções como sensibilidade à luz, resistência ao calor, condutividade; capacidade de emissão, resistência à corrosão e ação fisiológica (MANDOUR, 2016).

Os HPAs possuem espectros de absorção de UV muito característico. Cada estrutura de anel tem um espectro de UV exclusivo, portanto, cada isômero tem um espectro de absorbância de UV diferente. Isso é especialmente útil na sua identificação. A maioria dos HPAs também é fluorescente, emitindo comprimentos de onda característicos de luz quando eles estão excitados (quando as moléculas absorvem luz). A principal fonte de HPAs é a combustão incompleta de material orgânico, como carvão, petróleo e madeira. HPAs não são sintetizado quimicamente para fins industriais.

As meias vidas no ar variam numa faixa de poucas horas à dias; já, no solo, estima-se que as meias vidas possam ser de vários meses à muitos anos. Os HPAs com 4 anéis aromáticos são biodegradáveis sob condições aeróbias e a velocidade de degradação diminui com o aumento do número de anéis. A biodegradação sob condições anaeróbias é lenta para todos os compostos (CARUSO, 2008).

Eles são principalmente utilizados como intermediários em produtos farmacêuticos, produtos fotográficos, plásticos termoendurecíveis, materiais lubrificantes e em outras indústrias químicas. Contudo, os usos gerais de alguns HPAs são:

- acenafteno: fabricação de pigmentos, corantes, plásticos, pesticidas e produtos farmacêuticos.
- antraceno: diluente para conservantes de madeira e fabricação de corantes e pigmentos.
- fluoranteno: fabricação de agroquímicos, corantes e produtos farmacêuticos.
- fluoreno: fabricação de produtos farmacêuticos, pigmentos, corantes, pesticidas e plástico termofixo.
- fenantreno: fabricação de resinas e pesticidas.
- pireno: fabricação de pigmentos.

Outros HPAs podem estar contidos no asfalto usado para construção de estradas, além de alcatrão de telhados. Além disso, produtos refinados específicos, de HPAs precisos, são usados também no campo da eletrônica, plásticos funcionais e líquidos cristalinos (KLAASSEN, 2008).

3.1.3 Emissão, formação e degradação dos HPAs

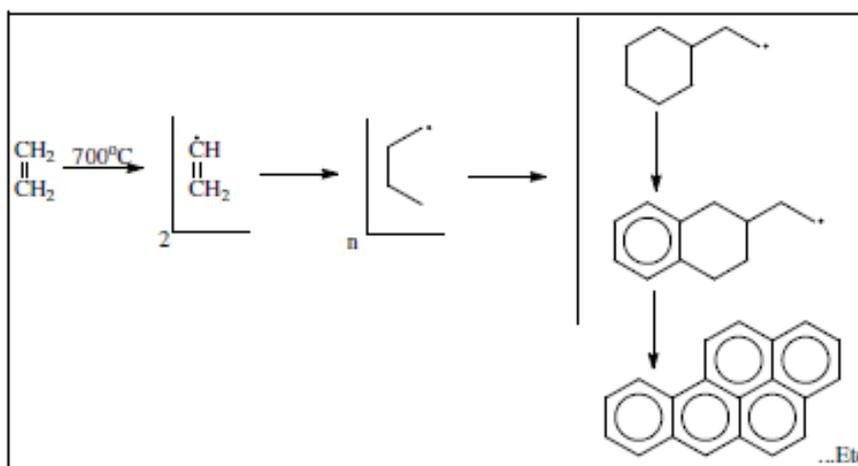
Os HPAs são resultantes de processos de combustão incompleta, tanto de biomassa quanto de combustíveis fósseis, além das fontes petrogênicas. Podem ser originados de fontes domésticas, móveis, industriais, agrícolas e naturais e são formados a partir da combustão incompleta e pirólise da matéria orgânica, sendo a queima de combustíveis fósseis uma das principais fontes antropogênicas de HPAs na atmosfera. Os HPAs de baixo peso molecular, com dois ou três anéis aromáticos, são emitidos na fase gasosa, enquanto que, os de peso molecular elevado, com cinco ou mais anéis, são emitidos na fase particulada, associados às partículas em suspensão (AZEVEDO *et al.*, 2013).

O mecanismo de formação de HPAs se dá pela combustão incompleta de substâncias orgânicas a altas temperaturas, através de processos de pirólise e pirossíntese, deste modo são essencialmente emitidos por todo tipo de combustão (COTTA, 2008). Em altas temperaturas, compostos orgânicos são convertidos em moléculas pequenas não estáveis (pirólise), na qual por sua vez recombina-se originando os hidrocarbonetos

policíclicos que são relativamente estáveis. Uma vez formados os HPAs podem sofrer reações pirossintéticas, originando estruturas mais complexas com anéis altamente condensados. Os HPAs não são obrigatoriamente fracionados em fragmentos menores antes da pirossíntese, podendo resistir a fragmentação parcial seguida pela hidrogenação dos seus radicais primários. Em geral, todos os compostos orgânicos contendo carbono e hidrogênio, podem servir como precursores de HPAs (BETTIN, 2005).

O esquema mecanístico aceito para esta reação envolve a polimerização via radicais livres, em várias etapas, até a formação de núcleos aromáticos condensados como mostra a Figura 2.

Figura 2: Esquema mecanístico da reação de polimerização para a formação do benzo(a)pireno.

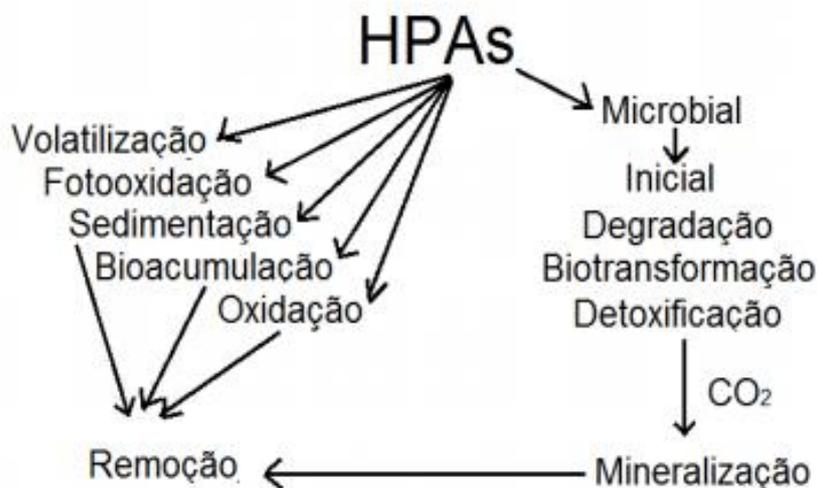


FONTE: Extraído da Referência (COTTA, 2008).

A degradação biológica é a principal via de eliminação dos HPAs no solo e na água. Mas a degradação no ambiente pode ocorrer através de processos físico-químicos como a volatilização, sedimentação, bio-acumulação, oxidação química, fotooxidação e outros. Estes processos de degradação são lentos e incompletos.

A fotooxidação é um processo pelo qual por efeito da luz e da temperatura se produz a desestabilização da molécula e ao rompimento das ligações, dos HPAs (CHAVÉZ, 2015).

Figura 3: Representação esquemática da degradação dos HPAs.



FONTE: Extraído da Referência (Chavéz, 2015)

3.1.4 Toxicidade dos HPAs

A industrialização da sociedade moderna tem originado uma variedade de poluentes que se relacionam intimamente com o aparecimento de diversos tipos de câncer (ZHANG *et al.*, 2009) e, dentre estes contaminantes, estão os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs). Nesta classe, estão incluídos mais de cem compostos químicos, que podem penetrar no organismo através do trato gastrintestinal, dos pulmões e/ou serem absorvidos pela pele. Contudo, 16 HPAs são considerados prioritários pela Agência de Proteção Ambiental Americana (USEPA) e classificados, segundo a Agência Internacional para Pesquisa do Câncer (IARC), de acordo com suas propriedades carcinogênicas e mutagênicas (Tabela 1) (PAZ *et al.*, 2017).

O interesse pelo estudo da contaminação por HPAs e seus derivados reside no fato de que muitos deles são potencialmente carcinogênicos e mutagênicos. Além disso, os HPAs apresentam uma ampla distribuição no meio ambiente, são compostos lipofílicos altamente persistentes e possuem elevada tendência à bioacumulação. A magnitude da bioacumulação é influenciada pela insolubilidade da substância química em água, propriedade que interfere na eliminação corporal do contaminante por meio de excreção ou biotransformação.

De maneira geral, tanto os HPAs quanto seus derivados estão associados ao aumento da incidência de diversos tipos de cânceres no homem (NETTO *et al.*, 2000). São, em geral, insolúveis em água e semi-voláteis, porém podem ser transportados por longas distâncias até ser absorvido em materiais particulados (SOLANGE *et al.*, 2008).

Os HPAs são considerados poluentes orgânicos persistentes (POPs) que são compostos altamente estáveis e que persistem no ambiente, resistindo à degradação química, fotolítica e biológica (GREENPEACE, 2012). Tem a capacidade de bioacumular em tecidos gordurosos dos organismos vivos, sendo toxicologicamente preocupantes para a saúde humana e o meio ambiente sendo tóxicos (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2015), pois muitos apresentam propriedades carcinogênicas e/ou mutagênicas para homens e animais, pois precisam de ativação prévia das enzimas do citocromo P450. Segundo a Agência Internacional de Pesquisas sobre o Câncer (IARC), os HPAs são classificados de acordo com a evidência de carcinogenicidade em humanos e em animais experimentais (CARUSO, 2008).

Resultados de testes laboratoriais realizados com diversos HPAs para a verificação de suas atividades carcinogênicas, mutagênicas ou genotóxicas mostraram que os efeitos dos diferentes compostos são variáveis como mostrado na Tabela 1 (COSTA, 2001). Também pode se identificar na Tabela 1, que a capacidade carcinogênica e mutagênica dos diferentes HPAs é significativa para aqueles que possuem mais de 4 anéis aromáticos fundidos e, ainda maior, para os que têm 5 ou 6 anéis. A substituição de hidrogênio por grupos químicos, também pode afetar drasticamente a atividade dos HPAs, dependendo da posição onde a substituição se dá e do grupo substituinte. Sendo assim, a presença simultânea de vários destes compostos no ambiente faz com que a avaliação de suas genotoxicidades a partir de amostras ambientais seja muito difícil. Isto também dificulta estudos de correlação pois a via de introdução desses compostos no organismo influencia seu poder carcinogênico/mutagênico bem como a localização dos tumores.

O benzo(a)pireno (BaP) é o único HPA classificado pela IARC como carcinogênico para humanos (IARC, 2017). Devido a suas características físico-químicas que são facilmente absorvidos e distribuídos pelo organismo humano.

Tabela 1: Carcinogenicidade, Genotoxicidade e Mutagenicidade de alguns HPAS

HPA	Carcinogenicidade	Genotoxicidade	Mutagenicidade
<i>Fluoreno</i>	I	L	-
<i>Fenantreno</i>	I	L	+
<i>Antraceno</i>	N	N	-
<i>Fluorantreno</i>	N	L	+
<i>Pireno</i>	N	L	+
<i>Benzofluorenos</i>	I	I	?
<i>Benzofluorantrenos</i>	I	I	?
<i>Benzo(a)antraceno</i>	S	S	+
<i>Criseno</i>	L	L	+
<i>Benzo(e)Pireno</i>	I	L	+
<i>Benzo(a)pireno</i>	S	S	+
<i>Perileno</i>	I	I	+
<i>Indeno(1,2,3-cd)pireno</i>	S	I	+
<i>Antantreno</i>	L	I	+
<i>Coroneno</i>	I	I	+
<i>Dibenzopireno</i>	S	I	+
<i>2-nitronaftaleno</i>	N	L	-

S = suficientes; I = insuficientes; L = limitados; N = não carcinogênico.

Genotoxicidade foi avaliada através dos testes de deterioração do DNA; aberração cromossômica e mutagenicidade.

Mutagenicidade (teste de Ames): + (positivo), - (negativo).

FONTE: COSTA, 2001, a partir de dados do IARC (1986).

A exposição humana aos HPAs pode ocorrer por diferentes vias, como inalação, pele ou por ingestão (NETTO, *et al.*, 2000). A ação exercida pelos HPAs é ativada durante o seu processo metabólico, visando à formação de compostos hidrossolúveis para facilitar a sua excreção. O mecanismo de eliminação envolve a formação de epóxidos, seguidos de compostos polihidroxilados, os quais são mais solúveis em água, viabilizando a sua eliminação pela via urinária. Um destes intermediários pode reagir com a guanina do DNA e formar um aduto dando origem a processos de tumoração (SOLANGE *et al.*, 2008).

A elevada taxa de mortalidade (cerca de 6,5 milhões de pessoas morrem de câncer anualmente) e o fato de que os tratamentos para estas doenças são dispendiosos, demorados e normalmente trazem muito sofrimento aos doentes, expõem claramente os benefícios potenciais que o entendimento, a avaliação e o controle da exposição humana a substâncias que possuam atividade carcinogênica/mutagênica podem trazer, particularmente quando sabe-se que a grande maioria dos cânceres resulta de interações genéticas e ambientais, sendo as causas externas (ambientais), em conjunção com fatores de suscetibilidade adquirida, as mais importantes. No caso dos HPAs e seus derivados, isto é feito geralmente através do monitoramento dos níveis ambientais destas substâncias, do conhecimento das suas vias de penetração no organismo, de seu metabolismo, bem como da avaliação precoce de seus efeitos biológicos. Vários componentes deste grupo são capazes de reagir diretamente, ou após sofrerem transformações metabólicas, com o DNA, tornado-se potenciais carcinógenos e eficientes mutágenos (NETTO *et al.*, 2000).

Essas substâncias são consideradas genotóxicas porque possuem uma ação nociva que afeta a integridade do material genético de uma célula (DNA), todavia não constituem necessariamente uma prova de periculosidade em relação à saúde. Vale ressaltar que desses compostos genotóxicos existem alguns que podem ser mutagênicos e/ou cancerígenos, especialmente aqueles capazes de causar uma mutação genética (alteração da molécula de DNA que não é reparada durante a divisão celular), contribuindo para o desenvolvimento de tumores (SOUSA, 2010).

São considerados poluentes orgânicos persistentes (POPs) que são compostos altamente estáveis e que persistem no ambiente, resistindo à degradação química, fotolítica e biológica (GREENPEACE, 2012). Têm a capacidade de bioacumular em tecidos gordurosos dos organismos vivos, sendo toxicologicamente preocupantes para a saúde humana e o meio ambiente (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2015), sendo consideradas genotóxicas porque possuem uma ação nociva que afeta a integridade do material genético de uma célula (DNA) por meio da ativação da enzima do citocromo P450 que é um grupo de enzimas que atua no metabolismo da maioria dos medicamentos (HABENSCHUS, 2016).

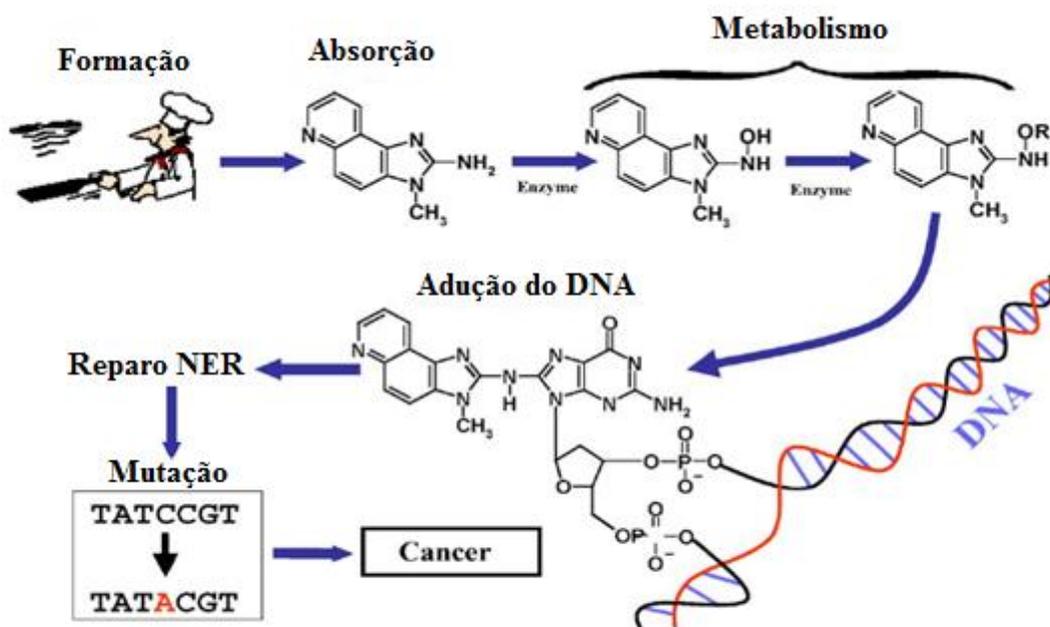
Devido a suas características físico-químicas são facilmente absorvidos e distribuídos pelo organismo humano. De maneira geral, tanto os HPAs quanto seus derivados estão associados ao aumento da incidência de diversos tipos de cânceres no homem (NETTO *et al.*, 2000).

Os HPAs não interagem diretamente com o material genético, eles entram no organismo através da pele, boca e outros pontos de entrada, mas depois sofrem ativações enzimáticas através do citocromo P450, formando metabólitos com elevada natureza eletrolítica denominados carcinógenos efetivos. Os novos compostos podem então interagir com o DNA e RNA e possibilitar o surgimento de tumores (BERNARDO *et al.*, 2016).

Estudos realizados mostram que compostos com um, dois e três anéis aromáticos são acentuadamente tóxicos, enquanto que os HPAs de alto peso molecular são conhecidos por seus efeitos genotóxicos e carcinogênicos, ou seja, podem interagir com o DNA e causar mutações que contribuam para o desenvolvimento de tumores.

A Figura 4 representa o processo de agentes contaminantes, a sua formação, como ele chega ao DNA e suas consequências. Nesta figura, podemos observar a formação de HPAs através do cozimento alimentar, por meio da exposição da matéria orgânica. O organismo ingere e o HPA passa pelo metabolismo e enzimas sem sofrer alterações estruturais, como são lipofílicos e também por causa da estabilidade das moléculas não sofrem degradação. Assim, atravessam as membranas celulares, podendo reagir com o DNA e consequentemente mudar a sequência do DNA, adquirindo assim, o tumor cancerígeno (OLIVEIRA, 2015).

Figura 4: Esquema representativo da inserção de agentes causadores de câncer, através do DNA.

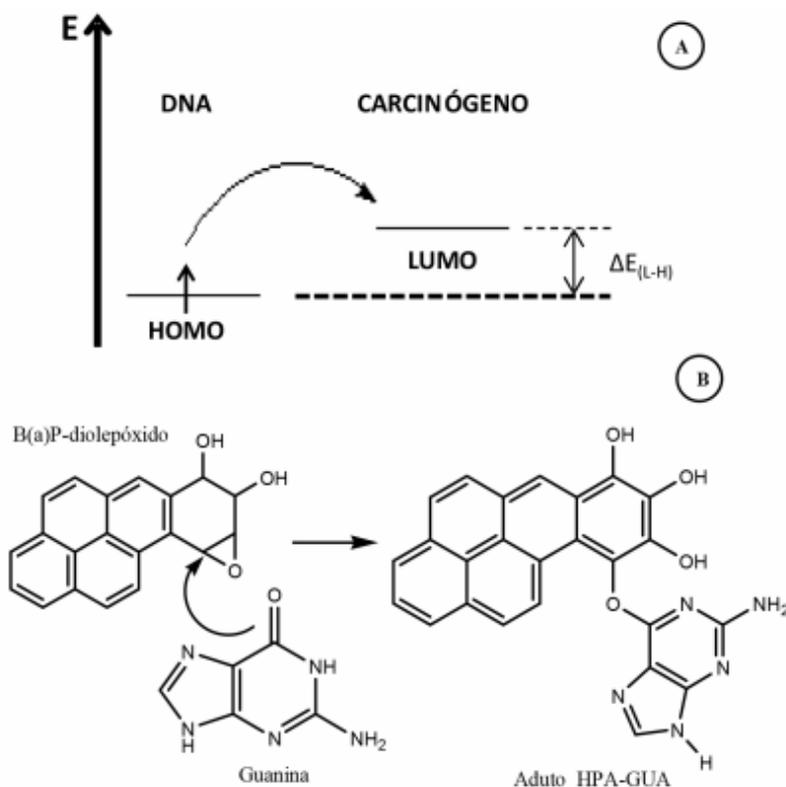


Fonte: Adaptada em português da referência (QUEIROZ, 2014).

Podemos descrever a interação HPA-DNA também utilizando os parâmetros eletrônicos do modelo de interação DNA-carcinógeno que combina a Teoria do Orbital Molecular de Fronteira e a Teoria da Ressonância Não-Sincronizada das Ligações Covalentes de Pauling. O modelo descreve a interação HPA-DNA como sendo uma transferência de elétron do HOMO (Orbital Ocupado de Maior Energia) da base do DNA para o LUMO (Orbital Desocupado de Menor Energia) do carcinógeno e a consequente formação de uma ligação covalente entre essas espécies (BERNARDO, *et al.*, 2016).

A primeira transformação química que ocorre após a entrada do HPA no organismo é a formação de um anel epóxi sobre uma ligação (C=C) do HPA (CAVALVANTE *et al.*, 2007). No processo de interação, o DNA apresenta um caráter nucleofílico, utilizando o poder do seu par de elétrons, enquanto o HPA, que tem caráter eletrofílico, recebe esse par de elétrons. O resultado da interação HPA-DNA é a formação da ligação covalente entre essas moléculas, formando um aduto com o material genético. Assim, quanto maior o caráter eletrofílico do HPA, mais forte será a ligação formada. Do ponto de vista da interação HOMO-LUMO (ΔE_{L-H}), quanto menor a diferença de energia entre eles (entre os orbitais), mais efetiva será a interação (Figura 4-a). A outra ligação dupla que ainda existe no anel que contém os grupos (-OH) sofre nova epoxidação, produzindo assim a verdadeira espécie carcinogênica (Figura 4-b). Esta molécula pode formar um cátion estável por adição de H⁺, capaz de unir-se ao DNA, induzindo assim mutações e câncer (BERNARDO, 2014).

Figura 5: a) Modelo de interação orbita-orbital do DNA-carcinógeno; (b) Formação da ligação DNA-carcinógeno.



FONTE: Adaptado da Referência (BERNARDO, 2014)

3.2 Utilização da Espectroscopia de Fluorescência Molecular Sincronizada para Identificação de HPAs.

Os HPAs normalmente fluorescem de modo muito eficiente em meios homogêneos, o que torna a fluorescência uma propriedade extremamente útil para o desenvolvimento de métodos analíticos na determinação de HPA. Desde os anos 50 vêm sendo desenvolvidos métodos para determinação de HPA por fluorescência devido à alta sensibilidade ($\sim 10^2 - 10^3$) se comparada com a espectroscopia de absorção na região no UV-Vis. Os HPAs absorvem na região actínea do UV, $\lambda > 290$ nm. Suas transições do tipo $\pi \rightarrow \pi^*$ são fortes (muito mais intensas que as transições correspondentes $n \rightarrow \pi^*$ em compostos carbonílicos aromáticos). Assim, os HPA apresentam coeficientes de extinção molares (ϵ) relativamente altos (a exceção é o naftaleno, em que a transição $\pi \rightarrow \pi^*$) (ROSA, 2017).

Atualmente, a detecção de HPAs no meio ambiente é utilizada como indicador de poluição ambiental. Entre as técnicas instrumentais convencionais utilizadas para a determinação destes compostos destacam-se a cromatografia gasosa (GC) e a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detecção fluorimétrica. Entretanto, estas técnicas espectroscópicas convencionais envolvem elevados custos e tempo no processo de análise das amostras. Técnicas menos onerosas como Espectroscopia de Fluorescência Molecular demonstrou também ser uma forma eficiente para análise de poluentes químicos em amostras ambientais (RODRIGUES, 2011). Assim, a procura por métodos e técnicas versáteis para identificação de HPAs torna-se algo de importância ambiental e de preocupação quanto à saúde, pois poderiam apresentar maior sensibilidade, menor custo ou mesmo uma forma alternativa para trabalhar o problema.

Entre as técnicas utilizadas para identificar HPAs, a Espectroscopia de Fluorescência Sincronizada (EFS) é uma técnica promissora para análise de moléculas orgânicas, devido sua simplicidade, seletividade e seu baixo custo de operação (RODRIGUES *et al.*, 2014). A Espectroscopia de Fluorescência Sincronizada (EFS) é uma variação da técnica de fluorescência convencional, e proporciona maior seletividade através do estreitamento de largura da banda espectral, definição dos espectros por meio da diminuição da sobreposição dos espectros de diferentes compostos, redução da gama espectral para um dado analito e evita o surgimento de espalhamento principalmente provocado pela fonte de radiação eletromagnética do equipamento. Estes fatores são muito importantes quando a análise é realizada em solução onde se encontra misturas de diferentes compostos (NETTO *et al.*, 2000).

A EFS é uma técnica onde uma varredura simultânea dos comprimentos de onda de excitação e de emissão é feita a uma diferença de comprimento ($\Delta\lambda$) de onda constante. Esta técnica tem sido proposta para a determinação de adutos de HPA com macromoléculas e pode ser usada à temperatura ambiente. O método é simples, seletivo, sensível e tem sido aplicado com sucesso a análise simultânea de HPAs. (OLIVEIRA, 2015; RODRIGUES, 2011; RODRIGUES *et al.*, 2014; ROSA, 2017). A EFS é conhecida por ser um método de escolha para a determinação simultânea de multicomponente de amostras sem uma prévia separação.

3.3 Produção e consumo de Hortaliças no Brasil

Existe hoje um crescente interesse do consumidor por novidades na área alimentar, o que influencia também o mercado das hortaliças destinadas ao consumo in natura (JUNQUEIRA *et al.*, 2000).

As hortaliças ocupam o segundo maior volume de alimentos consumido pela população brasileira, representando 7,81% do orçamento familiar. No Brasil, esta estatística de consumo de hortaliças é de difícil construção, principalmente quando se considera que, nas cidades do interior, pelo menos 30% destas são transferidas diariamente ao consumidor através de supermercados e pequenos comércios (MOTA, 1999).

O consumo de hortaliças vem aumentando não só pelo crescimento populacional, mas também pela tendência de mudança no hábito alimentar do consumidor, tornando-se inevitável o aumento da produção. Esta crescente demanda mundial em alimentos associada à má distribuição das chuvas está exigindo, cada vez mais, a utilização de água, antes considerada restritiva ou imprópria para a agricultura. Dentre as hortaliças que são consumidas in natura, estão incluídas a alface, o tomate, o pepino, o agrião, o pimentão e muitas outras (COELHO, 2007).

Dentre as hortaliças, a de maior consumo no Brasil é a alface, *Lactuca sativa*, considerada a sexta hortaliça em importância econômica e oitava em termos de volume produzido (RICARTE, *et al.*, 2012).

A planta do alface é típica de inverno, capaz de resistir a baixas temperaturas e a geadas leves, sendo as temperaturas amenas, essenciais durante toda a fase vegetativa de seu ciclo, especialmente durante o desenvolvimento da cabeça. Temperaturas elevadas (20-30° C) aceleram o ciclo cultural resultando em plantas menores e também induzem a presença de um indesejável sabor amargo (FILGUEIRA, 1982). No Brasil, apesar do clima e de solos favoráveis ao cultivo natural de alimentos, a hidroponia é altamente viável, pois não necessita de rotação de cultura, uso quase que nenhum de defensivos agrícolas e tempo reduzido do plantio até a colheita.

A hidroponia hoje em dia é utilizada em todos os países, e a grande preocupação com a saúde, a alimentação e o bem-estar do homem, tem levado os pesquisadores a estudar e buscar novas técnicas de produção de alimentos, além do aumento da produção utilizando a mesma área. A alface hidropônica contém os mesmos nutrientes da forma tradicional e ela é cultivada em uma solução nutritiva. Nela são dissolvidos todos os

nutrientes de que a planta necessita e que normalmente retira da terra, como o nitrogênio, manganês, fósforo, potássio e outros. No Brasil, tem crescido nos últimos anos o interesse pelo cultivo hidropônico, predominando o sistema NFT (Nutriente Film Technique). Neste sistema, as plantas crescem em canais de cultivo por onde a solução nutritiva circula, intermitentemente, em intervalos definidos e controlados por um temporizador. Através de perfis hidropônicos próprios para este sistema de cultivo, também podem ser utilizados tubos de PVC inteiros ou cortados ao meio, longitudinalmente (POTRICH *et al.*, 2012). Muitos dos cultivos hidropônicos não obtêm sucesso, principalmente em função do desconhecimento dos aspectos nutricionais desse sistema de produção que requer formulação e manejo adequados das soluções nutritivas. Outros aspectos que interferem igualmente nos resultados relacionam-se com o tipo de sistema de cultivo.

A contaminação de hortaliças pode ocorrer diretamente através da utilização de esterco ou esgotos não tratados ou tratados inadequadamente, utilizados como fertilizantes, embalagem e temperatura de mostruário inadequados e etc. (RIGOLIN-SÁ *et al.*, 2002).

3.4 Clorofila

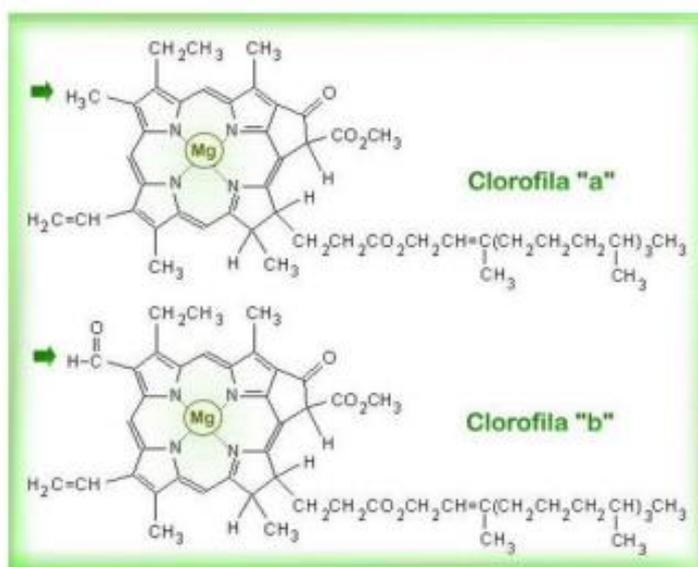
Um dos fatores ligado à eficiência fotossintética de plantas e, conseqüentemente, ao crescimento e adaptabilidade a diversos ambientes é a clorofila, presente em todos os vegetais verdes. Estruturalmente as clorofilas são moléculas complexas, pertencentes à classe das porfirinas, formadas por 4 anéis pirrólicos e um quinto anel isocíclico, localizado ao lado do terceiro anel pirrólico. Os anéis estão ligados entre si por pontes metilênicas e a molécula contém um átomo de magnésio no seu interior, coordenado aos anéis (QUEIROZ, 2014).

As clorofilas e os carotenoides são pigmentos presentes nos vegetais, capazes de absorver a radiação visível, desencadeando as reações fotoquímicas da fotossíntese, processo essencial para a sobrevivência vegetal e por isso denominado metabolismo primário. A qualidade espectral é fator importantíssimo na fisiologia da fotossíntese. O tipo, quantidade e incorporação de carotenoides dentro do aparato fotossintético dependem da qualidade e quantidade de luz. As clorofilas são os pigmentos naturais mais abundantes presentes nas plantas e ocorrem nos cloroplastos das folhas e em outros tecidos vegetais. Estudos em uma grande variedade de plantas caracterizaram que os pigmentos clorofilianos são os mesmos. As diferenças aparentes, na cor do vegetal são

devidas à presença e distribuição variável de outros pigmentos associados, como os carotenóides, os quais sempre acompanham as clorofilas (VICTOÓRIO *et al.*, 2007).

A clorofila *a* corresponde a aproximadamente 75% dos pigmentos verdes encontrados nos vegetais. A clorofila *b* difere da clorofila *a* pela substituição de um grupo metil, no anel pirrólico², por um grupo aldeído. Uma representação das moléculas de clorofila pode ser observada na figura 5.

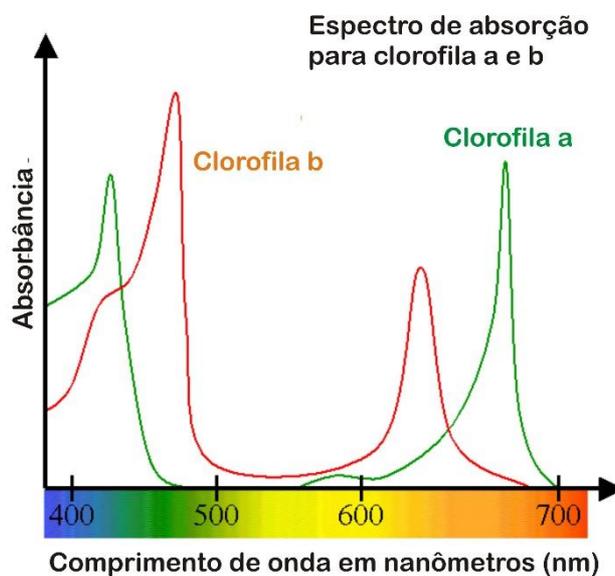
Figura 6: Estrutura Química da Clorofila *a* e *b*.



FONTE: Extraído da Referência (QUEIROZ, 2014).

Os pigmentos fotossintéticos (clorofilas (*a+b*) e carotenóides), localizados nas membranas dos tilacóides dos cloroplastos, absorvem a energia luminosa que é utilizada no processo fotossintético. Quando uma luz branca incide sobre cada solução de clorofila, as clorofilas *a* (maior quantidade) e *b* (pigmento acessório) têm o ponto máximo de absorção dos fótons (λ_{max}) na região de 428 e 660 nm (clorofila *a*) e na região de 452 e 641,8 nm (clorofila *b*), em éter dietílico, metanol e acetona 80%. Estes pontos de λ_{max} , os quais variam com o tipo de solvente utilizado, correspondem à região do azul e do vermelho, respectivamente, como pode ser observado na figura 7. Este fato mostra que a luz verde que não foi absorvida é refletida e transmitida, o que evidencia a coloração verde destes pigmentos. Esta luz verde refletida caracteriza a coloração verde das folhas (CAMPOSTRINI, [2014]).

Figura 7: Espectro de absorção de uma solução de clorofila-a e de clorofila-b.



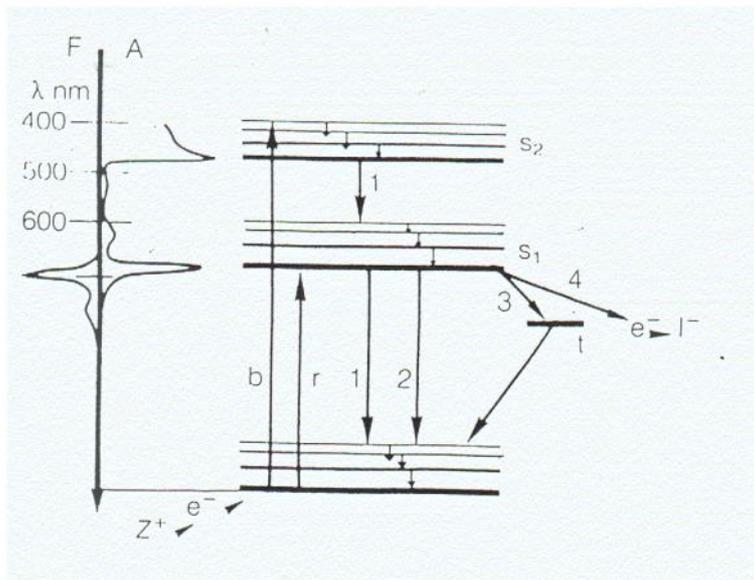
FONTE:Extraído da referência (CAMPOSTRINI, [sd])

Em solução, a clorofila *a* apresenta uma cor azul-esverdeada, enquanto a clorofila *b* uma cor amarelo-esverdeada. Esta diferença pode ser quantificada por três métodos: espectrofotometria, fluorimetria e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A fluorimetria é mais sensível do que a espectrofotometria e requer um menor volume de amostra, podendo ser utilizada para determinações *in vivo*. A quantificação do conteúdo de clorofilas em folhas pode ser realizada via maceração com acetona, metanol ou outro solvente orgânico, e posterior leitura em espectrofotômetro ou, no caso realizado neste trabalho, em Fluorímetro (STREIT *et al.*, 2005).

A fluorescência da clorofila tem sido utilizada como uma técnica precisa e não destrutiva no estudo da eficiência fotossintética, indicando direta ou indiretamente os reflexos dos impactos de fatores ambientais e mudanças no estado fisiológico das plantas (PINHEIRO *et al.* 2012). A eficiência fotossintética de muitas plantas diminui quando são submetidas a condições de estresse. Portanto, a fluorescência da clorofila tem sido usada como um método eficaz para investigar o conteúdo de clorofila em plantas, identificar classes de plantas e para detectar estresse causado pela deficiência de nutrientes, agentes poluidores, etc (MAXWELL, 2018).

A Figura 7 mostra um diagrama de Jablonski típico para a clorofila, que ilustra os estados de energia de uma molécula e as transições entre eles.

Figura 8: Diagrama do nível de energia da molécula de clorofila.



FONTE: Extraído da Referência (Campostrini [s.d.])

Uma vez que a fluorescência emitida ao meio ambiente pela clorofila da folha depende da concentração de clorofila na amostra e da captura de fótons pelos fotossistemas, pode-se dizer que estudar a fluorescência da clorofila implica estudar, indiretamente, os estados dos aparatos fotossintéticos da planta, e dessa forma é possível identificar a influência das condições ambientais sobre o seu rendimento bioquímico, por exemplo. Como as clorofilas estão em abundância nas plantas adultas, seu estudo se torna uma alternativa viável para observar mudanças na planta causadas por agentes bióticos ou abióticos como os HPAs por exemplo (MAXWELL, 2018).

3.5 Alterações fisiológicas

A alface é uma planta que se adapta às condições de menor fluxo de energia radiante, pelo fato da intensidade luminosa afetar diretamente o seu crescimento e desenvolvimento. Dessa forma, modificações nos níveis de luminosidade, podem condicionar diferentes respostas fisiológicas em suas características bioquímicas, anatômicas e de crescimento.

As alterações na quantidade e na qualidade luminosa no ambiente de cultivo proporcionam ajustes do aparato fotossintético das plantas, os quais resultam na maior ou menor eficiência na absorção e transferência de energia para os processos fotossintéticos. Nesse contexto, os teores dos pigmentos cloroplastídicos, clorofila e carotenoides podem

ser utilizados como importantes marcadores de ambientação do vegetal (PINHEIRO *et al.*, 2012).

Em condições naturais ou sob cultivo, as plantas estão frequentemente expostas a estresses ambientais que, em geral, exercem uma influencia desvantajosa sobre a planta afetando seu crescimento e produtividade. O estresse luminoso, nutricional, hidrico, as temperaturas extremas, a salinidade e os gases poluentes são os principais fatores adversos, que restringem o crescimento das plantas.

A luz, um dos principais fatores do ambiente fisico, e junto com a disponibilidade de nutrientes no solo e de outros fatores no meio ambiente, agem de forma isolada ou conjuntamente no controle do desenvolvimento das plantas, interferindo no crescimetno por meio do processo fotossintetico e na diferenciação durante a morfogenese (CONTIN, 2009).

A luz é absorvida, sobretudo, pelos complexos antena, os quais são compostos por clorofilas, pigmentos acessórios (carotenóides) e proteínas, estandolocalizados nas membranas dostilacóides dos cloroplastos. Os pigmentos antena transferem a energia para um complexo clorofila-proteína especializado, conhecido como centro de reação. As plantas possuem dois centros de reação localizados, respectivamente, nos fotossistemas I (PSI) e fotossistemas II (PSII) (MARTINAZZO *et al.*, 2007).

A partir das clorofilas (*a* e *b*), a energia pode ser direcionada para a fotossíntese na dissipação fotoquímica, pode ainda ser dissipada como calor ou ser re-emitida como luz na dissipação não fotoquímica (fluorescência). Estes três processos de dissipação competem entre si, de tal forma que qualquer incremento na eficiência de um resultará na diminuição do rendimento dos outros dois.

A fotossíntese consiste no processo pelo qual as plantas verdes transformam a energia radiante do sol em energia química (ARAUJO; DEMINICIS, 2009). Plantas de ambientes mais ensolarados tendem a apresentar maiores taxas fotossintéticas e de transpiração, devido às altas taxas de radiação fotossinteticamente ativa e de temperatura a que estão sujeitas. Outras formas de dissipação de energia luminosa ainda não transformada são: através da fluorescência da clorofila, que é a re-emissão de luz através de pigmentos protetores (carotenóides), que dissipam a energia de excitação como calor. A proporção de energia emitidana forma de fluorescência é baixa sob condições ótimas para a planta (PEREIRA *et al.*, 2000), no entanto, como resultado da foto inibição, há um aumento na dissipação de calor e na emissão de fluorescência pelas folhas das plantas. Os parâmetros de fluorescência da clorofila *a* pode, portanto, ser usada para evidenciar a

foto inibição sofrida pelas plantas, sendo um método não destrutivo e muito sensível. A fluorescência da clorofila permite estimar como o PSII está utilizando a energia absorvida pelas clorofilas e como ele está sendo danificado pelo excesso de luz.

A assimilação e alocação de nutrientes nas plantas são alteradas por fatores ambientais como luminosidade, água, disponibilidade de nutrientes e concentrações atmosféricas de CO₂. Entre os fatores que regulam a quantidade de nutrientes absorvidos pelas raízes das plantas estão: concentração de nutrientes, profundidade da camada superficial do solo, textura e estrutura do solo, tipo de subsolo, pH e compactação do solo (CONTIN, 2009).

De acordo com a quantidade exigida pelas plantas, os nutrientes são conhecidos como macro: N, P, K Ca, Mg, S e micronutrientes: B, Cl, Cu, Fe, Mn, Mo, Zn e Nisendo osmacro nutrientes N, P e K, de modo geral, usados em maior proporção na adubação (FURLANI, 2004). Se a planta receber os nutrientes em quantidade adequada, pode sintetizar todos os compostos que necessita para um crescimento normal, e assim servir ao homem como fonte de alimento, medicamento, fibras, entre outros.

Apesar de todos os esforços, sabe-se que mesmo sob condições normais e mais próximas do natural, o estresse nutricional é quase sempre uma norma. As plantas podem ficarsujeitas as condições de disponibilidade sub ou supra-ótima de nutrientes. Os limites da faixa de concentração considerada adequada variam amplamente com vários fatores, como o elemento mineral, o genótipo, o órgão, entre outros, podendo ser mais estreita ou mais larga. O suprimento inadequado de um nutriente essencial, por deficiência ou excesso, além de modificações no metabolismo celular, crescimento, desenvolvimento e produtividade, pode se manifestar por meio de sintomas visuais, sendo muitas vezes assim identificado.

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Amostras para estudo

O estudo foi conduzido na Universidade Federal da Grande Dourados, durante os meses de março de 2018 a Abril de 2019. Sementes de um mesmo lote da Alface (*Lactuca sativa L.*) crespa, marca Horticeres, foram plantadas de acordo com os procedimentos descritos na literatura [inserir referências] nos sistemas de cultivo hidropônico e convencional (vasos plantados) de forma que o ponto de colheita foi atingido no mesmo período de tempo para os 2 sistemas.

4.2 Preparação das soluções com HPA

Para o preparo da solução estoque de HPA, utilizou-se 0,1g de um padrão de Benzo(a)pireno (Sigma-Aldrich; PM= 252,31g/mol;98%) dissolvido em 50mL de Acetona PA (Proquimios). A solução foi transferida para balão volumétrico de 100mL e ajustado o volume com Álcool Metílico PA (99.9% UV/HPLC - VETEC®), tal que a solução estoque final possuía uma concentração de $3,84 \times 10^{-3}$ mol/L de B(a)P.

Para o preparo das soluções padrão de B(a)P fez-se uma diluição a partir da solução estoque, onde 2mL desta solução ($C = 3,84 \times 10^{-3}$ mol/L) foi transferida para um balão volumétrico de 100mL e ajustado o volume até o menisco com metanol, obtendo-se assim, uma solução padrão (SP) com concentração igual a $7,5 \times 10^{-5}$ mol/L ou $1,89 \times 10^{-5}$ g/mL. Esta solução que será utilizada na preparação das soluções nutritivas no sistema hidropônico e na solução para regar as plantas no sistema convencional. A concentração de B(a)P usada nas soluções foi baseada nos dados de concentração de B(a)P obtidos por (ROSA, 2017) em águas do sistema fluvial da cidade de Dourados-MS

A solução nutritiva comercial, a ser utilizada no sistema hidropônico, foi adquirida em lojas de produtos agropecuários na cidade de Dourados/MS, e contém ferro, nitrato de cálcio e Hidrogood Fert (composto pelos macronutrientes: Nitrogenio 10%, Fósforo 9%, Potássio 28%, Magnésio 3,3%, Enxofre 4,3% e micronutrientes: Boro 0,06%, Cobre 0,01%, Molibdênio 0,07%, Manganês 0,05% e Zinco 0,02%). Utilizou-se a concentração de 660g/1000litros de Hidrogood Fert, 400g/1000litros de Nitrato de Cálcio e 30g/1000litros de Ferro para a sua composição, todas preparadas com água da torneira dos laboratórios da FACET/UFGD. e o manejo da solução foi realizado diariamente através da reposição da água consumida. Preparou-se quatro concentrações diferentes de soluções nutritiva, para serem usadas em 4 sistemas

diferentes para irrigação das mudas de alface. O primeiro sistema continha somente a solução nutritiva, sem contaminação com B(a)P. Este sistema foi adotado como controle. O segundo sistema utilizado, continha a solução nutritiva contaminada com 0,15mL da solução padrão de benzo(a)pireno para cada 1 Litro de solução nutritiva, obtendo-se uma solução com concentração de B(a)P igual a 2,54ng/mL. O terceiro sistema montado continha a solução nutritiva contaminada com um volume de 0,300mL de solução padrão de B(a)P para cada 1 Litro de solução nutritiva, obtendo-se uma solução com concentração de B(a)P igual a 5,09ng/mL. O quarto sistema montado, continha a solução nutritiva contaminada com 3mL de benzo(a)pireno para cada 1 Litro de solução nutritiva, obtendo-se uma solução com concentração de B(a)P igual a 50,9 ng/mL.

Essas soluções foram utilizadas no sistema hidropônico para irrigação das mudas de *Lactuca Sativa L.* até atingirem tamanho para colheita. Para o sistema de plantio convencional utilizou-se soluções contendo água da torneira, com as mesmas concentrações de B(a)P descritas no parágrafo anterior.

4.3 Espectro de Emissão do Benzo(a)pireno

Primeiramente foi realizado a medida de fluorescência da solução de Benzo(a)pireno, afim de definir as melhores condições experimentais, bem como comprimentos de onda de excitação e emissão para se conduzir o estudo. Para obtenção dos espectros de fluorescência sincronizados do B(a)P tomou-se uma alíquota da solução de B(a)P, preparada como no item 4.2, embora com concentração igual a 0,97 ng/mL. Esta alíquota foi transferida para uma cubeta de quartzo com as quatro faces transparentes de 1 cm de largura. As medidas foram realizadas no espectrofluorímetro CARY ECLIPSE (Varian), que possui como fonte de excitação uma lâmpada pulsada de Xenônio (80 Hz), com a largura a meia altura do pulso de aproximadamente 2 μ s e potência de pico equivalente a 75 KW; dois monocromadores, um para a seleção do comprimento de onda de excitação e outro para a seleção do comprimento de onda emitido pela amostra.

Neste estudo foram utilizados o $\Delta\lambda$ e as fendas fundamentados pelo trabalho dos autores (PATRA, & MISHRA, 2001). Os espectros de emissão foram obtidos utilizando comprimento de onda de excitação de 200 a 600 nm, delta lambda ($\Delta\lambda$) em 40 nm, com fendas de excitação em 2,5 nm e emissão em 5 nm (PATRA, & MISHRA, 2001) e a identificação dos picos foi feita na região de 366nm, conhecida como típica do B(a)P. A quantificação da análise

foi realizada através do software Origin 8.5, bem como para a realização da curva analítica e medidas do extrato da clorofila.

Conhecendo as propriedades físico-químicas dos HPAs, sabe-se que estes compostos apresentam baixa solubilidade em água impossibilitando assim uma análise eficiente diretamente nesta matriz. Entretanto, este problema pode ser minimizado com a adição de solventes polares que facilitam sua solubilização em água.

A presença ou adição de solventes orgânicos mais polares que são completamente miscíveis em água (como o metanol, etanol e acetona) em uma mistura ou solução de hidrocarbonetos e água tem um potencial efeito co-solvente, resultando num aumento da concentração aquosa dos hidrocarbonetos (KAIPPER, 2003). Co-solvência é definida como o efeito de solventes orgânicos altamente solúveis em água na solubilidade e sorção de compostos orgânicos hidrofóbicos. Essa miscibilidade do metanol em água reduz a polaridade da água, causando uma redução no coeficiente de atividade de fase aquosa e permitindo altas concentrações de compostos orgânicos hidrofóbicos (COH) em tal fase. (D'AGOSTINHO; FLUES, 2006). Sendo assim, a EFS do benzo(a)pireno foi realizada na solução metanólica com concentração de B(a)P de 0,97 ng/mL para $\Delta\lambda$ de 40nm.

4.3.1 Figuras de mérito e elaboração da curva analítica

Foram utilizados os parâmetros de comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade como indicadores da qualidade dos resultados de análises químicas, conforme (VALDERRAMA, 2009). A validação é um processo de averiguação do desempenho de um método, com o intuito de avaliar se este apresenta um desempenho adequado para as condições no qual será aplicado. A validação pode ser atestada através da determinação de parâmetros conhecidos como as figuras de mérito, que, dependendo de onde o método será aplicado, do seu propósito e ou do órgão de fiscalização a que estará sujeito, o número de figuras de mérito ou nível que deve ser atingido em cada uma delas, pode variar.

Foi gerada uma curva analítica para obter a equação de correlação entre a intensidade de fluorescência e a concentração de B(a)P. A curva de calibração para o sistema de interesse foi construída a partir da diluição de 1mL da solução estoque em metanol. Os parâmetros avaliados neste caso foram:

- Linearidade (intensidade de fluorescência, em função da concentração do analito): a linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente

proporcionais à concentração da substância de interesse, dentro de uma determinada faixa de aplicação (RIBANI *et al.*, 2004). Recomenda-se que a linearidade seja determinada pela análise de, no mínimo, 5 concentrações diferentes. Se houver relação linear aparente após exame visual do gráfico, os resultados dos testes deverão ser tratados por métodos estatísticos apropriados para determinação do coeficiente de correlação, intersecção com o eixo Y, coeficiente angular, soma residual dos quadrados mínimos da regressão linear e desvio padrão relativo. Se não houver relação linear, realizar transformação matemática. Normalmente a linearidade pode ser inferida pela observação de parâmetros como o coeficiente de regressão “b”, o intercepto “a” e o coeficiente de correlação “R”. A ANVISA recomenda um R=0,99 e o INMETRO um valor de R>0,90.

- Limites de Detecção (LD): equivale à menor concentração da substância de interesse que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada. O LD pode ser calculado através do método visual, método da relação sinal-ruído ou pelo método baseado em parâmetros da curva analítica utilizando a Equação 1:

$$LD = \frac{s \cdot 3}{S} \quad (\text{Equação 1})$$

Onde: s é o desvio padrão do intercepto com o eixo do Y e S é a inclinação (*slope*) ou coeficiente angular da curva analítica.

- Limite de Quantificação (LQ): representa a menor concentração da substância de interesse que pode ser medida com uma incerteza máxima de 10%. O LQ, assim como o LD, pode ser calculado através do método visual, da relação sinal-ruído ou com base em parâmetros da curva analítica utilizando a equação 2:

$$LQ = \frac{s \cdot 10}{S} \quad (\text{Equação 2})$$

onde: s é o desvio padrão e S é a inclinação (*slope*) da curva.

- Precisão: é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. Expressa o grau de concordância entre os resultados de uma série de medidas realizadas para uma mesma amostra homogênea em condições determinadas. A precisão é calculada através da Equação 3, pela estimativa do desvio padrão relativo (RSD), também conhecido como coeficiente de variação (CV). Em geral, a precisão pode ser obtida nos níveis de repetibilidade (mesmas condições e um curto intervalo de tempo), precisão intermediária (diferentes dias ou diferentes analistas, por exemplo) e reprodutibilidade (ensaios interlaboratoriais).

$$RSD(\%) \text{ ou } CV(\%) = \frac{s}{\bar{x}} 100 \quad (\text{Equação 3})$$

onde: s é o desvio padrão e \bar{x} é a média aritmética de um pequeno número de determinações, sendo uma estimativa de μ a média da população.

O valor máximo aceitável deve ser definido de acordo com a metodologia empregada, a concentração do analito na amostra, o tipo de matriz e a finalidade do método, não se admitindo valores superiores a 5%.

4.4 Efeito do tempo e temperatura na degradação do benzo(a)pireno

Os HPAs são quimicamente estáveis, mas são suscetíveis à oxidação e fotodegradação pela luz. Suas meias vidas no ar variam numa faixa de poucas horas a dias (CARUSO, *et al.*, 2008). Sendo assim, torna-se importante o estudo de sua degradação e acompanhamento de sua estabilidade, uma vez que a solução a ser preparada pode ficar muitos dias armazenadas. Para o estudo de estabilidade do B(a)P utilizou-se uma solução metanólica com concentração de $4,5 \times 10^{-7}$ mol/L de B(a)P. A amostra foi armazenada em vidro âmbar, acondicionada tanto em temperatura ambiente quanto na geladeira e foi monitorada durante intervalos de tempo definidos perfazendo um período total de 100 horas. As alíquotas das amostras foram analisadas no espectrofluorímetro em intervalos de tempo de: 1 hora, 3 horas, 5 horas, 7 horas, 24 horas, 30 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas até o tempo de 100 horas de preparo da solução, considerando também o tempo zero.

4.5 Cultivo da Alface (*Lactuca sativa*, L)

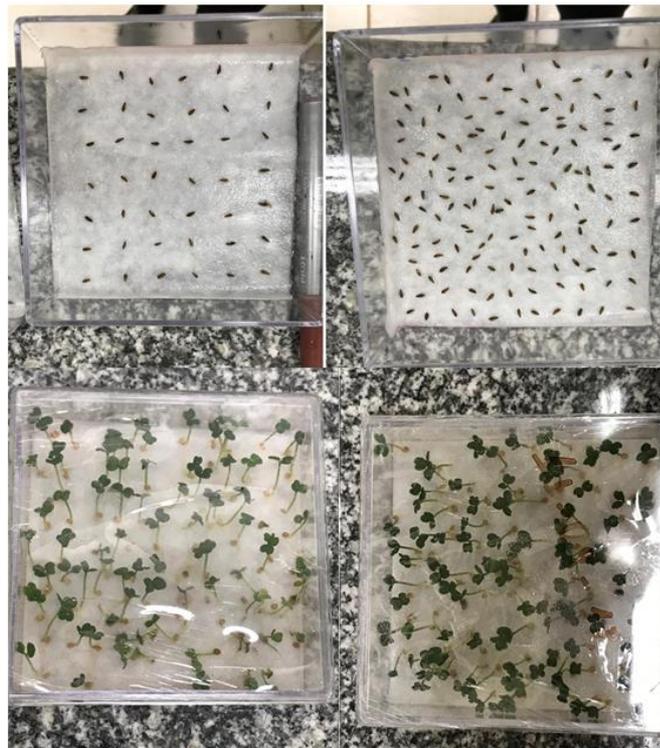
4.5.1 Sistema Hidropônico

Inicialmente 150 sementes foram distribuídas em caixas do tipo GERBOX forradas com papel germitest ou papel filtro embebidos em água. Essa caixa foi fechada e envolvida com papel filme, e mantida em estufa incubadora BOD de 7 a 10 dias (Figura 8), até que o número de amostras geminadas ficasse equilibrado.

Após a germinação das sementes, as mudas foram transferidas para os perfis hidropônicos (Figura 9). Para o sistema de hidroponia foram utilizadas 4 bancadas de cultivo em bandeja de polipropileno e nove células de 100 mm cada e, introduzidos, em vasilhames de

polipropileno, onde ficariam imersos em solução nutritiva por um período de até 15 dias, garantindo que suas raízes ficassem em contato com a solução nutritiva composta com água e os nutrientes. O sistema hidropônico adotado foi o NFT (Nutriente Film Technique). Este sistema, é uma técnica de cultivo em água, no qual as plantas crescem tendo o seu sistema radicular dentro de um canal ou canaleta através do qual circula uma solução nutritiva composta de água e nutrientes.

Figura 9: Caixas GERBOX com as sementes no início do teste de germinação e após o período de 8 dias, já crescidas e prontas para serem transferidas



FONTE: Aatoria Própria

Figura 10: Perfil hidropônico com as mudas já inseridas nas bandejas de germinação.



FONTE: Autoria Própria

Os quatro sistemas com as mudas foram mantidas em estufa incubadora BOD com parâmetros de temperatura (25°C para dia e 20°C para noite), luminosidade (12hs/12hs), irrigação (diariamente) e umidade (60%), controladas diariamente, por um período de 15 a 18 dias, até verificar o fim do desenvolvimento. Quando todas as plantas atingiram o tamanho desejado (Figura 10), foi feita a colheita de cinco amostras centrais de cada bandeja e realizou-se as medidas de fluorescência e extração da clorofila para posterior quantificação.

Figura 11: Perfil hidropônicos com as mudas já em tamanho para coleta e análises.



FONTE: Autoria Propria.

4.5.2 Sistema Convencional

Foram utilizadas mudas de alfaces e o solo preparado para o cultivo obtidas comercialmente. As mudas se encontravam em bandejas de cultivo com placas de espuma fenólica em cada célula e foram transferidas para vasos individuais. Foram utilizadas 4 bancadas de trabalho, com 20 mudas em cada bancada, totalizando 80 mudas (Figura 11).

As bancadas com as mudas foram deixadas em ambiente protegido (estufa) que era do tipo capela (Figura 12). A irrigação utilizada foi do tipo borrifamento direto sob a planta, duas vezes ao dia, durante um período de 7 dias, quando as plantas atingiram tamanho satisfatório para as análises.

Figura 12: Mudas de alface transferidas para vasos individuais.



FONTE: Autoria Própria

Figura 13: Estufa de plantio das alfaces



FONTE: Autoria Propria

4.6 Extração da Clorofila

Após a coleta as amostras de alface foram limpas, lavadas com água potável e em seguida enxaguadas com água destilada. O processo de extração de clorofila foi realizado baseando-se na metodologia proposta por (RICHARDS & THOMPSON, 1952). Para a

obtenção do extrato da planta, pesou-se 5g de folha de alface picadas em pequenos pedaços. Adicionou-se, para cada 1g de folha, 10 mL de álcool metílico PA (VETEC), perfazendo um volume total de 50mL. A mistura foi macerada durante dois minutos e após esse período, mantido, em frasco âmbar na geladeira por 72 horas. Após esse período, o extrato obtido foi filtrado e armazenado longe do abrigo da luz.

4.7 Medidas de Fluorescência do extrato de clorofila

O uso de espectroscopia de fluorescência convencional é limitado devido ao alargamento das bandas de emissão causado pela multiplicidade de estados vibracionais e rotacionais, tem pouca seletividade e não consegue distinguir moléculas semelhantes (RODRIGUES, 2011). Devido a essa limitação na técnica de espectroscopia de fluorescência convencional, a espectroscopia de fluorescência sincronizada (EFS), foi a escolhida para a realização deste estudo, pois possui grande sensibilidade e seletividade na análise de multicompostos e tem sido aplicada satisfatoriamente na determinação simultânea de vários HPAs.

As medidas de fluorescência sincronizada do extrato de clorofila também foram realizadas no espectrofotômetro Cary Eclipse modelo (Varian), ajustando o sistema às mesmas condições descritas no item 4.3.

Os extratos de clorofila obtidos foram submetidos à extração líquido-líquido para um melhoramento da banda de emissão do B(a)P absorvido pela planta. Para tal, cada alíquota do extrato é transferida para um frasco Erlenmeyer, onde foi adicionado 10 mL de Hexano HPLC. Considerando as indicações das referências (OLIVEIRA, 2015; RODRIGUES, 2013). A extração do analito é feita através de agitador magnético por rotação durante 20 minutos. Após esse tempo, o sistema foi mantido em repouso por mais 10 minutos. Em seguida, o extrato foi transferido para o balão de fundo redondo do roto-evaporador (IKA-RV10) e adicionou-se então 10 mL de metanol HPLC. A solução, então, foi aquecida a uma temperatura próxima a 60°C, processo realizado com o auxílio de um rotoevaporador, que resultou em um extrato final de ± 2 mL.

O sistema experimental foi ajustado e selecionou-se o $\Delta\lambda$ de 40 referente ao BaP obtido em trabalhos anteriores por (ROSA, 2017). As amostras foram excitadas em dois comprimentos de onda: em 405 nm coletando os espectros de fluorescência entre 420 e 900 nm; e em 532 nm analisando a emissão de fluorescência de 540 a 900 nm de acordo com as

referências (FALCO, 2012) e (ROSA, 2017). Nas análises do extrato de clorofila as medidas foram realizadas utilizando-se uma cubeta de quartzo de 3,5 mL (caminho ótico de 1,0 cm) com as quatro faces polidas.

4.8 Outros Parâmetros da fisiologia da planta

Foi aplicada a técnica de fluorescência cinética por imagem, utilizando o equipamento Closed FluorCam FC 800-C da marca Photon Systems Instruments, para realizar o estudo da influência do HPA sobre o aparato fotossintético das plantas “*in vivo*”. Antes das medidas, as plantas foram adaptadas ao escuro por 30 minutos garantindo que todos os centros de reação estejam abertos, obtendo com isso, uma medida mais eficaz da fluorescência. Para a cinética, foi utilizada a luz branca como fonte de excitação, foi empregado um filtro para selecionar somente a emissão da clorofila a, na região de 680 nm e as medidas foram realizados em um dos lados da folha. Os parâmetros observados na análise da fluorescência da clorofila foram F_v/F_m_Lss , $Q_y_máx$ e o NPQ_Lss .

Um outro parâmetro utilizado para o monitoramento foi a biometria da raiz, que afere o tamanho da parte aérea e de raízes em plantas. A técnica avalia o crescimento normal e irregular e a relação dessas alterações\anomalias relacionadas com o estresse. Para este estudo, as plantas foram coletadas após o período de crescimento e o comprimento da raiz foi medido com auxílio de uma régua e algumas imagens foram feitas.

4.9 Estudo sobre o efeito direto do B(a)P sobre a clorofila

Os extratos de clorofila obtidos foram submetidos a um preparo de amostra por meio de uma extração líquido-líquido para um melhoramento da banda de emissão do B(a)P absorvido pela planta. Para tal, cada alíquota é transferida para um frasco Erlenmeyer, onde foi adicionado 10 mL de Hexano HPLC. Considerando as indicações das referências (OLIVEIRA, 2015; RODRIGUES, 2013). A extração do analito é feita através de agitador magnético por rotação durante 20 minutos. Após esse tempo, o sistema foi mantido em repouso por mais 10 minutos. Em seguida, o extrato foi transferido para o balão de fundo redondo do rotoevaporador (IKA-RV10) e adicionou-se então 10 mL de metanol HPLC. A solução, então, foi aquecida a uma temperatura próxima a 60°C, processo realizado com o auxílio de um rotoevaporador, que resultou em um extrato final de ± 2 mL. Esse procedimento foi igualmente executado para todas as amostras do extrato de clorofila.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

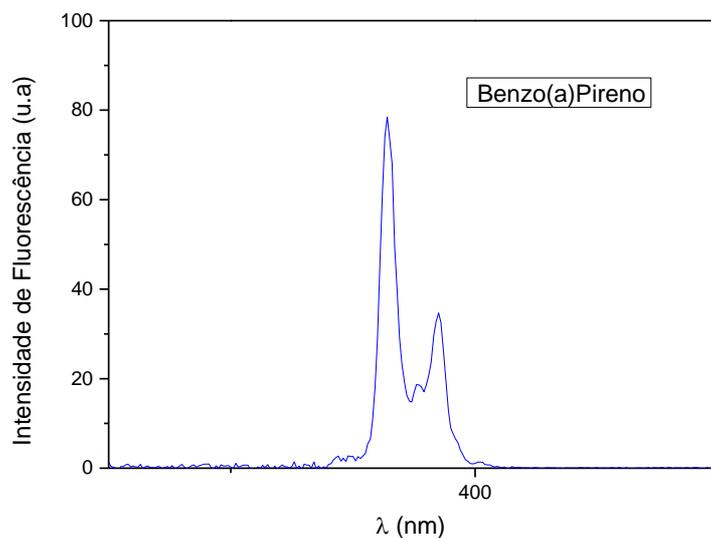
5.1 Espectro de emissão do benzo(a)pireno

Considerando que um dos objetivos deste trabalho é a determinação da concentração de B(a)P no extrato da clorofila do alface, foram selecionadas apenas as regiões do espectro que contêm informações relativas ao B(a)P, que é na região de 366 nm. A identificação usando a EFS utilizou-se parâmetros de instrumentação já avaliados por (PATRA; MISHRA, 2001).

Conhecendo as propriedades físico-químicas dos HPAs, sabe-se que estes compostos apresentam baixa solubilidade em água impossibilitando assim uma análise eficiente diretamente nesta matriz. Entretanto, este problema pode ser minimizado com a adição de solventes polares que facilitam a solubilização dos HPAs em água. A presença ou adição de solventes orgânicos mais polares que são completamente miscíveis em água (como o metanol, etanol e acetona) em uma mistura ou solução de hidrocarbonetos e água tem um potencial efeito co-solvente, resultando num aumento da concentração aquosa dos hidrocarbonetos (KAIPPER, 2003). Co-solvência é definida como o efeito de solventes orgânicos altamente solúveis em água na solubilidade e sorção de compostos orgânicos hidrofóbicos. Essa miscibilidade do metanol em água reduz a polaridade da água, causando uma redução no coeficiente de atividade de fase aquosa e permitindo altas concentrações de compostos orgânicos hidrofóbicos (COH) em tal fase. (D'AGOSTINHO; FLUES, 2006).

Sendo assim, a EFS do benzo(a)pireno foi realizada na solução metanólica com concentração de B(a)P de 0,97 ng/mL, utilizando um $\Delta\lambda$ de 40nm. A figura 13 mostra um espectro de fluorescência sincronizada de uma amostra padrão, onde o pico referente à emissão do benzo(a)pireno pode ser identificado em 366nm.

Figura 14: Espectro de emissão de fluorescência sincronizada do B(a)P em solução metanólica para um $\Delta\lambda$ de 40nm. A concentração do B(a)P era de 0.97 ng/mL

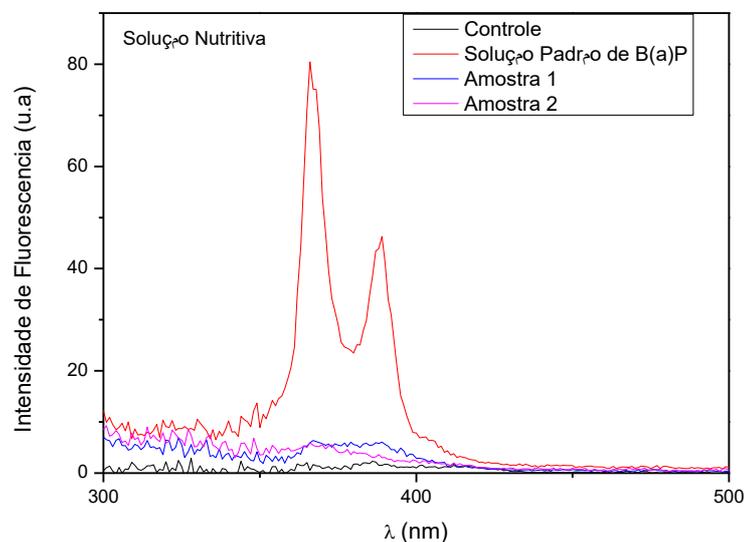


As soluções nutritivas utilizadas no sistema hidropônico, também foram analisadas pelo mesmo sistema de fluorescência sincronizada utilizando os mesmos descritores por Patra & Mishra, 2001.

A Figura 14, nos mostra o espectro de emissão de fluorescência sincronizada das soluções nutritivas preparadas, antes de serem adicionadas nas plantas.

A Figura 15 mostra o espectro de emissão de fluorescência sincronizada das soluções nutritivas preparadas e utilizadas nas plantas. As medidas foram realizadas após o experimento, mostrando que há traços de B(a)P nessas soluções.

Figura 15: Espectro de emissão de fluorescência sincronizada da solução nutritiva com concentrações diferentes de HPA

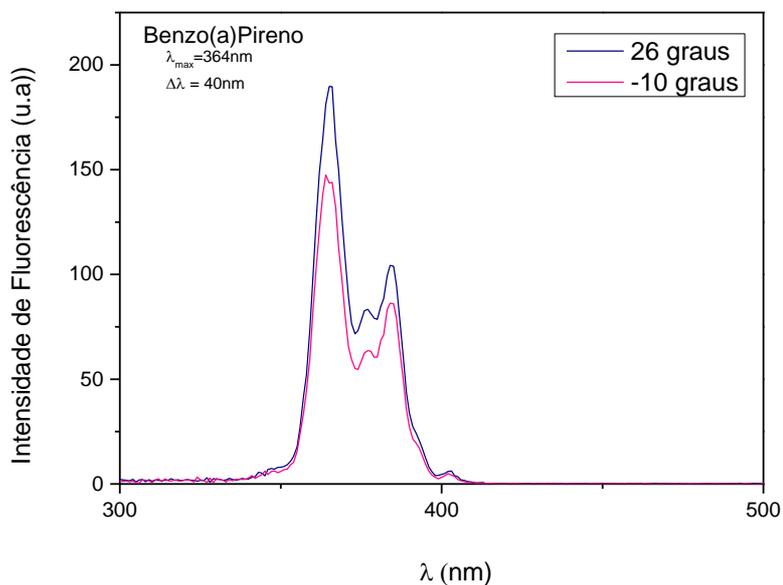


A figura 14 nos mostra um sinal de intensidade de fluorescência na região de 366nm que é a região de emissão do B(a)P quando se compara com a solução controle, ou seja, sem a presença de HPA. A presença de sinal nos diz que nem todo HPA adicionado na solução foi absorvido pela planta e a dinâmica de interação entre a fisiologia da planta é tema de estudo de outro trabalho que ainda não está concluído. Contudo, o fato do B(a)P em solução poder tanto interagir com o componentes do meio reacional e assim, ser degradado, ou transformado quimicamente em outro composto, além de poder ser degradado por processos de biodegradação, fotoxidação, oxidação química e oxidação avançada, foram realizadas medidas da estabilidade do B(a)P em solução. Sabe-se que o tempo necessário para que estes processos ocorram pode variar entre horas a anos, dependendo do seu estado físico e do material ao qual está adsorvido. A degradação dos hidrocarbonetos aromáticos pode ocorrer numa faixa de temperatura relativamente grande, de 0 a 70°C (BENTO, 2005).

Para o estudo de estabilidade do benzo(a)pireno utilizou-se uma solução com concentração de $4,5 \times 10^{-7}$ mol/L em metanol. A amostra armazenada em vidro âmbar, acondicionada tanto em temperatura ambiente e na geladeira e foi monitorada durante intervalos de tempo definidos perfazendo um período total de 100 horas.

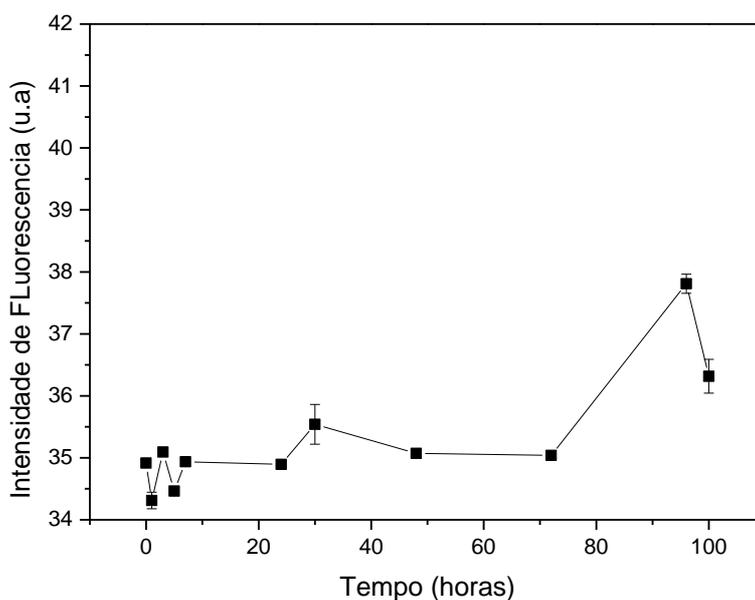
A figura 16 nos mostra o espectro de emissão de fluorescência sincronizada para as amostras de B(a)P acondicionadas em 26°C e -10°C (temperatura ambiente e geladeira). Percebe-se uma diminuição na intensidade de fluorescência da amostra acondicionada em geladeira para amostra acondicionada em temperatura ambiente, mas nada fora do esperado (SKOOG, 2006).

Figura 16: Espectro de emissão de fluorescência sincronizada de uma solução de benzo(a)pireno acondicionada em temperatura ambiente (26°C) e na geladeira (-10°C).



O fato de todos os experimentos serem realizados a temperatura controlada, próxima à ambiente e após verificar que não há degradação do material nessa temperatura, optou-se por realizar o estudo sobre a estabilidade do B(a)P em função do tempo. A figura 17 nos mostra um gráfico da intensidade de fluorescência do B(a)P como uma função do tempo após o preparo da solução.

Figura 17: Intensidade de fluorescência do B(a)P em função do tempo



Observa-se que a intensidade de fluorescência mantém valores estáveis por todo o período de análise, apenas uma pequena variação de ~1%, indicando que a concentração de B(a)P na solução permanecerá estável em todo o intervalo de um experimento.

5.3 Obtenção da curva analítica e figuras de mérito

Para a obtenção da curva analítica que representará a concentração do B(a)P, em função da intensidade de fluorescência, obtida pela análise por espectroscopia de fluorescência sincronizada (EFS), realizou-se medidas utilizando a solução padrão como descrito no item 4.2 do procedimento experimental. A curva analítica que mostra a faixa linear de quantificação do benzo(a)pireno puro, sem estar dissolvido na solução nutritiva, é mostrada na Figura 18.

A equação da reta ajustada mostra valores de correlação entre a intensidade de fluorescência (Y) e a concentração do HPA (C), e é mostrada na equação 4:

$$Y=2,48442 + 9,209 \times 10^7 \times C \quad (\text{equação 4}),$$

onde C é a concentração de B(a)P em mol/L, Y é a intensidade de fluorescência obtida para o comprimento de onda de 366nm (Patra & Mishra, 2001).

Com os resultados da curva analítica calculou-se a linearidade (a intensidade de fluorescência, em função da concentração do analito); limites de detecção (LD) e quantificação (LQ); precisão (coeficiente de variação com base no desvio padrão, repetitividade e reprodutibilidade), que são mostrados na Tabela 2.

Figura 18: Intensidade de fluorescência em função da concentração de B(a)P, representando uma curva analítica do procedimento proposto.

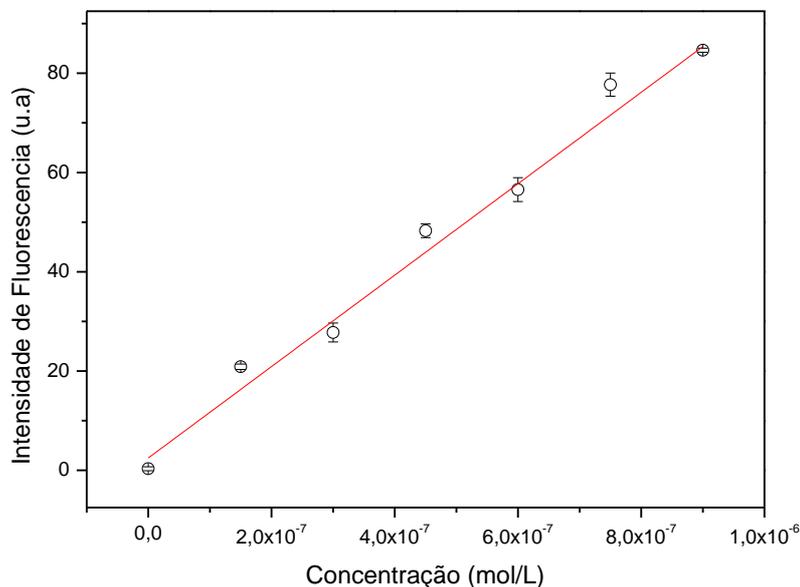


Tabela 2: Características analíticas do procedimento proposto

Limite de detecção (LD)	$3,77 \times 10^{-8} \text{ mol/L}$
Limite de Quantificação (LQ)	$6,29 \times 10^{-8} \text{ mol/L}$
Faixa Linear	$6,29 \times 10^{-8} \text{ a } 7,5 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$

5.4 Determinação do Teor de Clorofila

Todos as medidas de fluorescência sincronizada no extrato de clorofila fora feitas em triplicatas. De acordo com dados obtidos em trabalhos anteriores, o máximo da excitação da clorofila ocorre entre 430 e 450nm, com emissão em torno de 670 nm para a clorofila a e 632 nm para a clorofila b (FALCO, 2012). Na maioria dos extratos clorofílicos a excitação ótima é conseguida em 430 nm, onde a luz azul e a luz ultravioleta são as mais indicadas como fonte de excitação (COSTA-NETO et al., 2002).

A maior parte da fluorescência da clorofila ocorre nas moléculas de clorofila a e os elétrons que são excitados e voltam para o estado não excitado são aqueles localizados nas ligações duplas dos anéis pirrólicos da parábola da clorofila.

Nas Figuras 19 e 20 são apresentadas os espectros de emissão dos extratos da clorofila a da alface cultivada no método convencional e por hidroponia sujeitas às contaminações com

B(a)P. Esses espectros nos mostram que a adição de BaP na amostra, seja sob a forma de irrigação ou hidroponia, teve influências na intensidade de luz absorvida/emitada pela planta. Os valores da intensidade de fluorescência da clorofila em função da concentração de HPA estão explícitos nas figuras 21 e 22.

Figura 19: Espectro de emissão do efeito da adição de B(a)P sobre o extrato da clorofila extraída de plantas de alface cultivadas através do sistema de convencional.

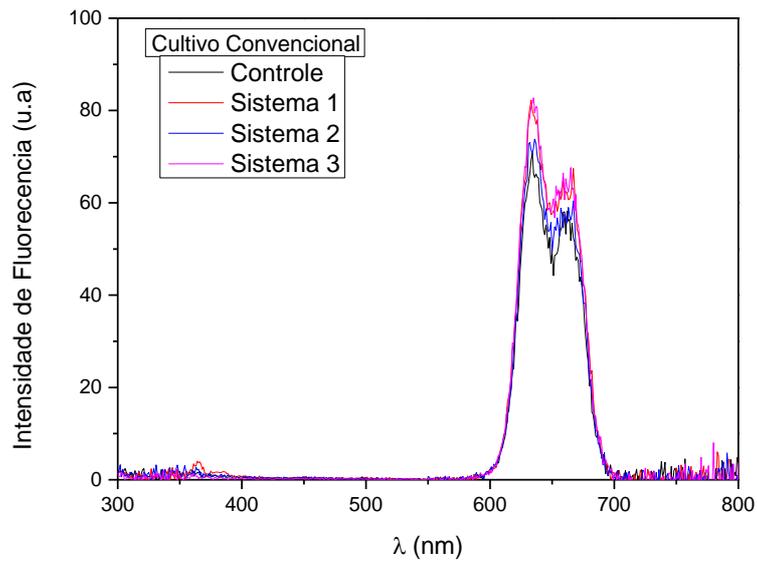
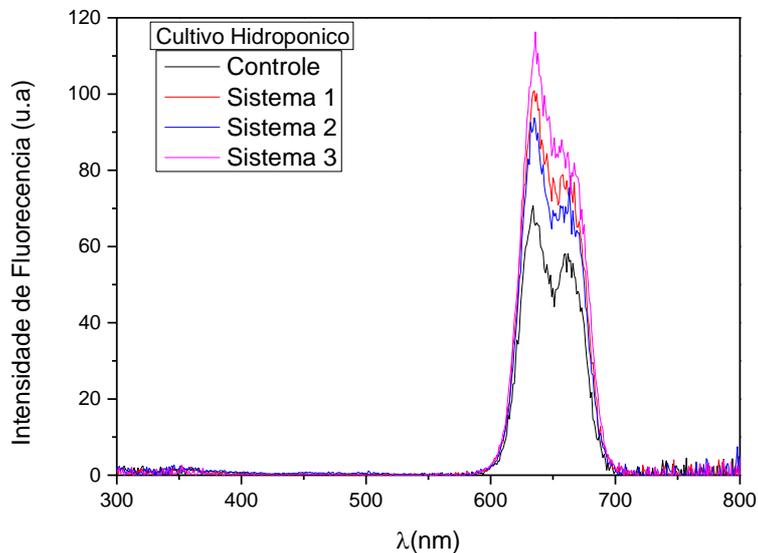


Figura 20: Espectro de emissão do efeito da adição de B(a)P sobre o extrato da clorofila extraída de plantas de alface cultivadas através do sistema de hidropônico.



Quando analisamos a intensidade de fluorescência em função da concentração do B(a)P presente nas soluções de irrigação (Controle, Sistema 1, Sistema 2 e Sistema 3) vemos que houve alterações na intensidade de luz absorvida/emitida pela planta, tal que evidencia que o HPA pode ter sido absorvido pela planta, afetando assim o teor de clorofila nelas.

Figura 21: Intensidade de Fluorescência em função da concentração de B(a)P adicionado nas soluções nutritivas e absorvidos pela clorofila de plantas de alface cultivadas através do sistema convencional.

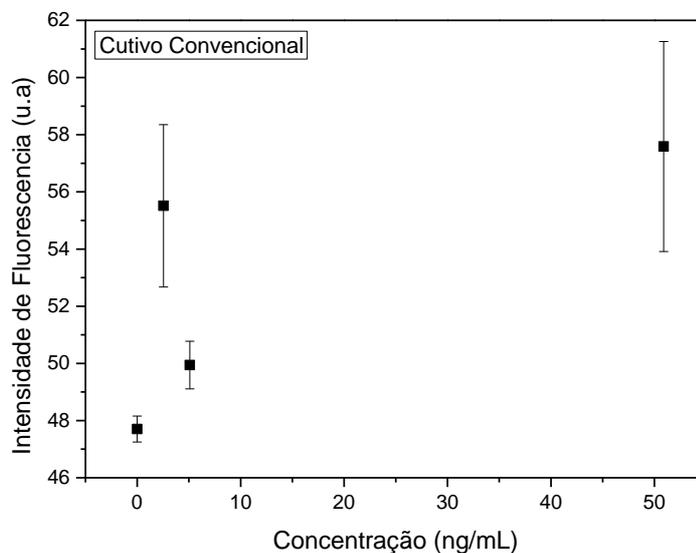
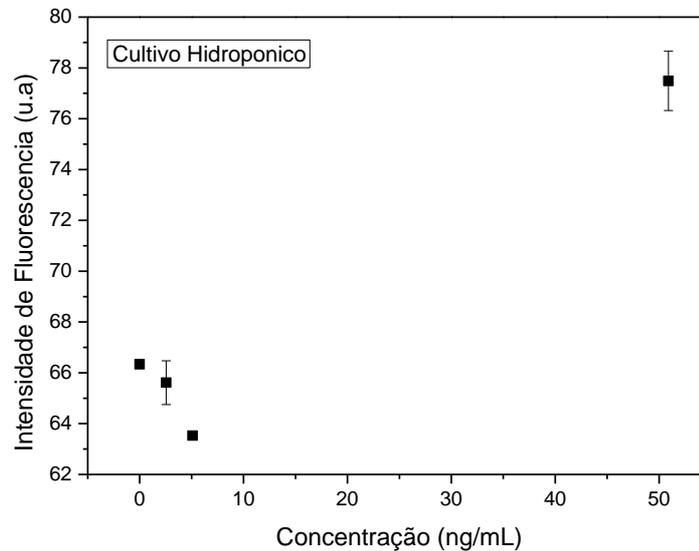


Figura 22: Intensidade de Fluorescência em função da concentração de B(a)P adicionado nas soluções nutritivas e absorvidos pela clorofila de plantas de alface cultivadas através do sistema hidroponico.



Para o cultivo convencional, percebe-se uma alteração na intensidade de fluorescência já com a variação em pequenas concentrações de HPA, porém esta alteração se estabiliza para maiores concentrações de HPA, indicando que houve uma saturação no sistema a partir de 10ng/ml de HPA.

Já para o sistema hidropônico, percebe-se uma diminuição linear da intensidade de fluorescência a medida que a concentração de HPA presente na solução nutritiva aumenta, para o limite de pequenas concentrações de HPA. Essa diminuição pode se dar por causa da presença do metanol na solução, ocasionando assim o efeito de co-solvença entre o HPA e a solução. Uma vez que o B(a)P possui uma sua alta hidrofobicidade o que pode afetar a quantidade de partículas dissolvidas e disponível para reação. A propriedade hidrofóbica favorece a sorção dos compostos orgânicos à matéria orgânica do solo (no caso do cultivo convencional com mudas plantadas). O que não ocorria nas amostras do sistema convencional, visto que as características húmicas do solo apresentam complexidade estrutural e composição química pouco definida e, portanto, as interações entre o B(a)P e a matéria húmica do solo podem ocorrer por diferentes processos, ainda não completamente conhecidos.

5.5 Estudo sobre o efeito direto do B(a)P sobre a clorofila

Desde que se encontrou influências do HPA na fluorescência da clorofila, realizou-se o estudo dos extratos de clorofila obtidos, visando identificar a presença desses HPAs no próprio extrato. Assim, os extratos de clorofila foram submetidos a extração líquido-líquido, afim de se tentar estabelecer uma relação de quanto de B(a)P foi adicionado na solução e quanto foi absorvido significativamente pela planta. As figuras 23 e 24 mostram as intensidades de fluorescência, obtidas pro EFS dos extratos de clorofila obtido do processo de roto-evaporação.

Figura 23: Intensidade de fluorescência sincronizada da extração líquido-líquido clorofila para o sistema de cultivo convencional

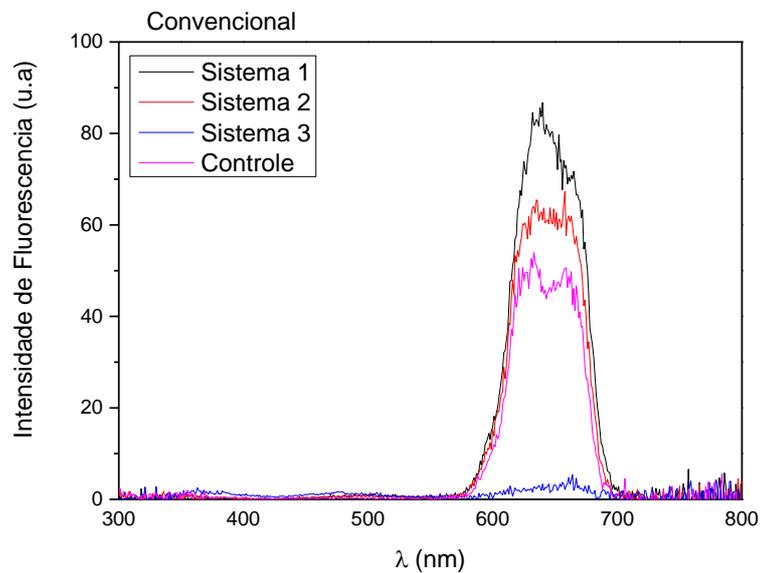
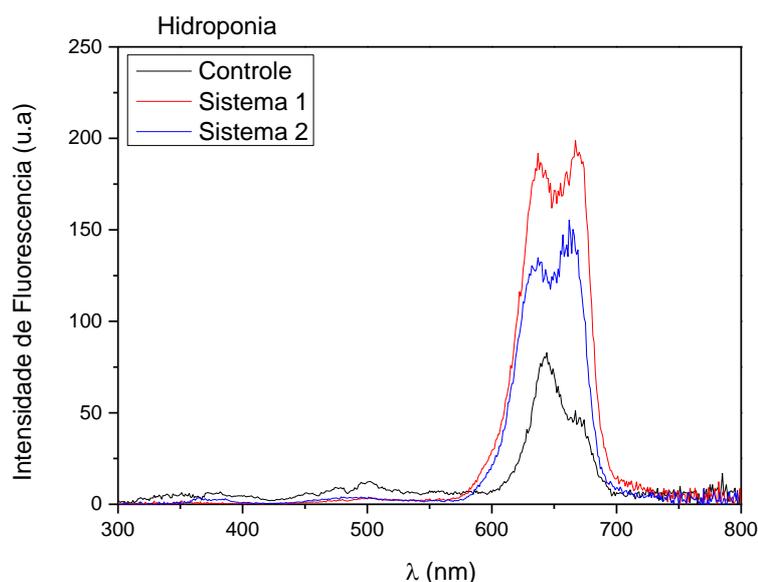


Figura 24: Intensidade de fluorescência sincronizada da extração líquido-líquido clorofila para o sistema de cultivo hidropônico.



Como podemos observar nas figura 22 e 23, não encontramos picos significativos na região de 366nm referente ao B(a)P presente no extrato clorofílico das plantas, o que significa que as o BaP não influencia no processo de fotossíntese e portanto deve estar concentrado em outra região das amostras e não nas folhas. Estudo sobre a concentração de BaP nas folhas, caule e raízes foram feitos e apresentados no próximo item, 5.6.

5.6 Influência do benzo(a)pireno sobre a fisiologia da planta

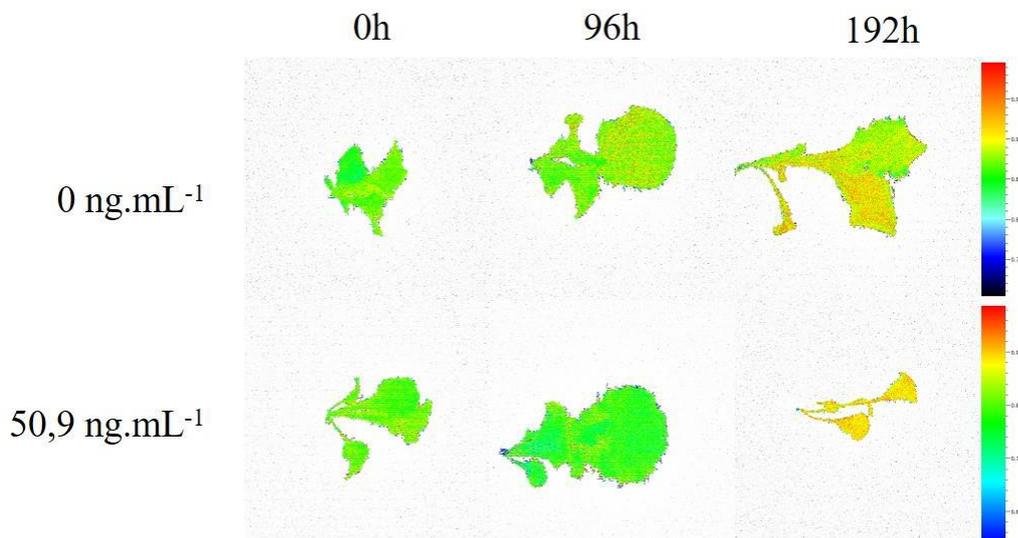
As plantas apresentam diferentes respostas quanto à tolerância ao sombreamento, refletindo no crescimento e no desenvolvimento. Dessa forma, a eficiência do crescimento pode estar relacionada à habilidade de adaptação das plantas às condições luminosas do ambiente, sendo o crescimento satisfatório de algumas espécies em ambientes com baixa ou alta luminosidade atribuído à capacidade da espécie ajustar rapidamente seu modelo de alocação de biomassa e comportamento fisiológico

Além disso, os estudos existentes exploraram a influência da morfologia das folhas das plantas e suas camadas de cera, mas não consideraram as características de adsorção na superfície das folhas como a rugosidade superficial (Ra) e energia livre de superfície (SE), que pode refletir as substâncias líquidas e sólidas na atmosfera. Em suma, a captação e acumulação de HPAs pelas folhas das plantas é afetada por muitos fatores, e as correlações entre as contribuições desses diferentes fatores continuam a ser explorados.

A capacidade das plantas para obter água e nutrientes minerais do sistema de cultivo, esteja está relacionada com sua capacidade para desenvolver um extensivo sistema radicular. A absorção de íons é mais pronunciada em raízes jovens. Além disto, a taxa de absorção de íons das raízes diminui na região mais distante do ápice radicular. No entanto, esta tendência varia bastante, dependendo de fatores, como tipo de íon (nutriente), estado nutricional e espécie vegetal.

A figura 24 nos mostra as imagens da fluorescência cinéticas da parte superior das folhas uma planta de alface do primeiro parâmetro avaliado, após 192h na solução nutritiva contaminada com benzo(a)pireno, para as concentrações de 0 e 50,9ng/mL. As imagens mostram as intensidades do parâmetro QY_Max, que quantifica o rendimento máximo do fotossistema II da planta após a adaptação ao escuro. Analisando a figura é possível notar que inicialmente, em 0 horas, as plantas estão nas mesmas condições e o rendimento fotoquímico máximo é semelhante entre as folhas das plantas de ambos os tratamentos. No entanto essa similaridade se perde ao longo do estudo e ao final das 192 horas, o QY_Max apresenta valores maiores para a folha da amostra contaminada com B(a)P.

Figura 25: Imagens de QY_Max durante período de análise, obtidas por meio da cinética de fluorescência da clorofila.



A Figura 25 apresenta a imagem das amostras, após 8 dias (192h) do início de seu desenvolvimento e plantio nas caixas de crescimento, para os três sistemas hidropônicos, com

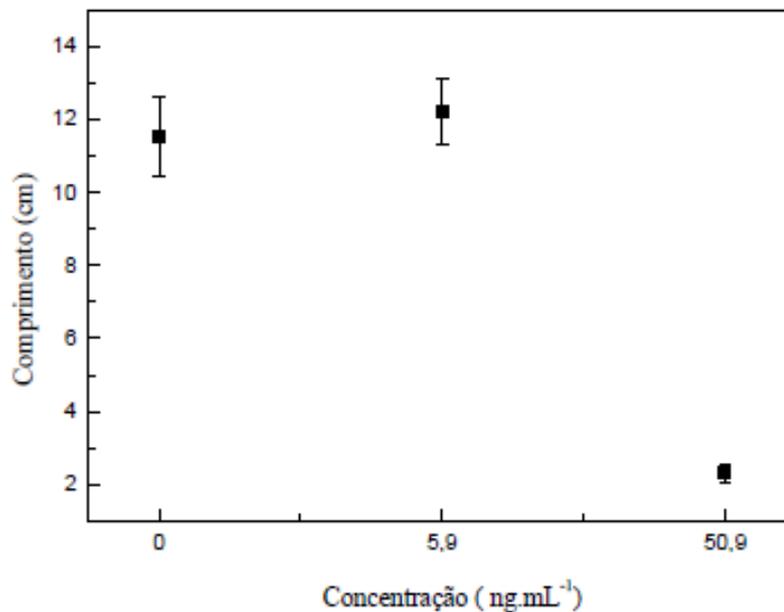
concentrações de B(a)P de 0 ng/mL (controle), 5,09 ng/mL e 50,9 ng/mL adicionadas nas soluções nutritivas,

Figura 26: Raiz de plantas de Lactuca sativa com diferentes concentrações de Benzo(a)pireno, da esquerda para a direita, planta controle, concentração 5,09ng/mL e concentração 50,9 ng/mL.



A figura 26, mostra o resultados das análises da biometria das raízes realizadas por (Comunicação Pessoal de Poliane Guerino, 2019) onde pode ser observado que para a menor quantidade de HPA inserido na solução nutritiva (5,09ng/mL) não se nota diferença significativa no valor médio do tamanho das raízes se comparada com a amostra controle (0 ng/mL), o que interfere no crescimento da planta, como visto na imagem anterior. Já para a maior concentração houve uma redução no tamanho das raízes de em torno de 60%, mostrando que apenas quando são submetidas ao estresse muito agudo de benzo(a)pireno, as plantas tendem a diminuir o tamanho da raiz.

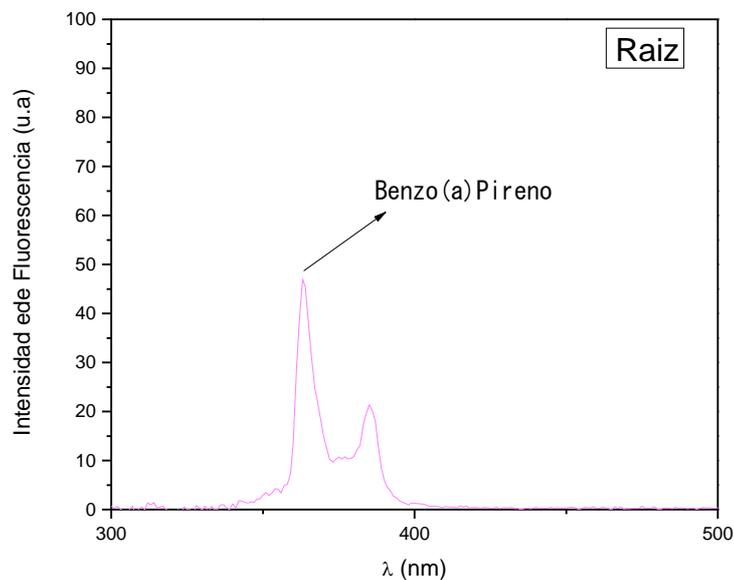
Figura 27: Valores médios de comprimento, em função do tempo, para duas concentrações de benzo(a)pireno, comparadas com as medias do comprimento da controle (solução nutritiva).



FONTE: Poliane Guerino*

Os HPAs por serem voláteis podem evaporar das folhas por causa das altas temperaturas em primavera e verão, enquanto fenômenos de condensação notáveis são causada por baixas temperaturas no outono e inverno. Afim de avaliar onde estaria presente o B(a)P na planta, uma vez que as análises realizadas até aqui nas folhas da planta não mostraram uma diferença muito satisfatória nos resultados, foi realizado uma extração líquido-líquido de uma solução das raízes das plantas submetidas ao contato com o benzo(a)pireno. A figura 27 mostra o resultado da medida de fluorescência sincronizada do extrato da raiz da planta do alface cultivada por meio de hidroponia.

Figura 28: Espectro de emissão do benzo(a)pireno presente na Raiz da alface cultivada por meio de hidroponia.



Pode-se observar neste espectro um pico de emissão característico para o benzo(a)pireno na região de 364-366nm, o que nos mostra que o B(a)P adicionado na soluções nutritivas foram absorvidas e permaceram em partes nas raízes das plantas, com concentração de $4,66 \times 10^{-7}$ mol/L ou 117 ng/mL.

6. CONCLUSÕES

A identificação desses HPAs nas amostras analisadas merece importância sob o aspecto ambiental e de saúde. A presença de B(a)P, classificado pelo IARC como carcinogênico para seres humanos, em alguns dos resíduos analisados deve ser destacada pelo interesse que este fato representa para a saúde pública, uma vez que estas substâncias podem atingir seres humanos em qualquer uma das etapas de gerenciamento dos resíduos em questão.

De acordo com os resultados obtidos concluiu-se que o teor de HPAs nas matrizes estudadas podem ser determinadas satisfatoriamente pela técnica de EFS. As calibrações confirmaram que a técnica é viável. Dentro de todos resultados apresentado, foi possível observar que a fluorescência da clorofila aumenta com o aumento das concentrações de B(a)P adicionados nas soluções de irrigação. Sendo assim, a presença de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos nas folhas de alface e conseqüentemente no extrato da clorofila, exerce sim uma influência no seu desenvolvimento quando se compara apenas a intensidade de fluorescência.

Os HPAs são voláteis e podem evaporar das folhas por causa das altas temperaturas em primavera e verão, enquanto fenômenos de condensação notáveis são causada por baixas temperaturas no outono e inverno. Entretanto, os estudos realizados por Guerrino, 2019, que complementam este trabalho, pode-se concluir que os resultados experimentais obtidos sugerem que o HPA B(a)P é capaz de induzir alterações significativas no comportamento fisiológico bem como na morfologia das plantas de alface, contudo somente em altas concentrações. Contudo, baixas concentrações experimentais, que não significam que não sejam baixas para influenciar a saúde humana, não foram detectadas diferenças significativas no desenvolvimento das plantas. Tais resultados servem de alerta, pois nota-se que o HPA possui interação com o sistema, porém em concentrações baixas não alteram o desenvolvimento das plantas de modo que seja perceptível sua influência.

7. REFERÊNCIAS

- ANVISA. **Guia para Qualidade em Química Analítica: Uma Assistência a Acreditação**. 1. ed. Brasília: [2004.]. v. 1
- ANVISA. **Resolução de diretoria colegiada – rdc nº 2, de 15 de janeiro de 2007. Regulamento técnico sobre aditivos aromatizantes**. In: Diário Oficial da União. [s.l: s.n.]. v. 2007.
- ARAUJO, S. A. DO C.; DEMINICIS, B. B. **Fotoinibição da Fotossíntese**. v. 4, p. 463–472, 2009.
- AZEVEDO, J. A. H.; ARAÚJO, R. S.; SILVA, G. M. M. **Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos atmosféricos de fontes automotivas: uma breve revisão**. v. 29, n. 1, 2013.
- BENTO, D. M. . **Análise química da degradação dos hidrocarbonetos de óleo diesel no estuário da Lagoa dos Patos–Rio Grande/RS**. [s.l.] Universidade Federal do Rio Grande, 2005.
- BERNARDO, D. L. **Estudo teórico do potencial carcinogênico de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e seus metabólitos**. [s.l.] Uiversidade Federal de Pernambuco, 2014.
- BERNARDO, D. L.; BARROS, K. A.; SILVA, R. C.; PAVÃO, A. C. **Carcinogenicidade de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos**. *Quim. Nova*, v. 39, n. 7, p. 789–794, 2016.
- BETTIN, S. M.; FRANCO, D. W. **Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (hpas) em aguardentes**. v. 25, n. 2, p. 234–238, 2005.
- CAMARGO, M. C. J; TOLEDO, M. C. F. **Polycyclic aromatic hydrocarbons in Brazilian vegetables and fruits**. *Food Control*, v. 14, n. 1, p. 49–53, 2003.
- CAMPOSTRINI, P. E. **Fluorescência da clorofila a: considerações teóricas e aplicações**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <http://www.uenf.br/Uenf/Downloads/CENTRO_CCTA_1629_1112121492.pdf>. Acesso em: 4 jun. 2019.
- CARDOSO, J. E. T.; LODI, P. C.; BARROS, A. M. T. C. DE. **Técnicas associadas de remediação de contaminação da água e do solo por hidrocarbonetos: Estudo de Caso em Posto de Combustível**. *Revista Nacional de Gerenciamento de Cidades*, v. 5, n. 36, p. 18–28, 2017.
- CARUSO, M. S. F.; ALABURDA, J. **Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos - benzo(a)pireno: uma revisão***Revista do Instituto Adolfo Lutz*. [s.l.] Instituto Adolfo Lutz, 2008. Disponível em: <http://periodicos.ses.sp.bvs.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0073-98552008000100001&lng=pt>. Acesso em: 26 ago. 2017.
- CAVALCANTE, R. M. et al. **Utilização da extração em fase sólida (SPE) na determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em matrizes aquosas ambientais**. *Química Nova*, 2007.

CETESB. **Relatório de estabelecimento de valores orientadores para solos e águas subterrâneas no Estado de São Paulo**. Disponível em: <<https://cetesb.sp.gov.br/solo/valores-orientadores-para-solo-e-agua-subterranea/>>. Acesso em: 4 jun. 2019.

CHÁVEZ. I. P. A.; **Dos teores de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPA`s) em aguardentes acondicionadas em tonéis de Carvalho**. Dissertação de Mestrado – Universidade de São Paulo – São Carlos, 2015.

COELHO, K. DE S. **Perfil do consumidor de hortaliças frescas e processadas no município de Campos dos Goytacazes –RJ**. Tese de Doutorado - Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense, 2007.

COMMUNITIES, E. EC. **Commission of the European Communities. Commission Regulation (EC) nº 208/2005 of 4 February 2005a amending Regulation (EC) nº 466/2001 as regards polycyclic aromatic hydrocarbons**. OFFICIAL JOURNAL, n. 208, p. 3–5, 2005.

CONTIN, D. R. **Alterações anatômicas e fisiológicas em plantas de Mikania glomerata Sprengel e Mikania laevigata Schultz Bip. ex Baker, sob diferentes condições luminosas e nutricionais**. Dissertação de Mestrado – Departamento de Biologia. Universidade de São Paulo - Ribeirão Preto – SP, 2009.

COSTA A. de F.. **“Avaliação da Contaminação Humana por Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (PAHS): 1-Hidroxi-pireno Urinário**. [s.l.] Centro de Estudos de Saúde do Trabalhador e Ecologia Humana da Fundação Oswaldo Cruz, 2001.

COSTA-NETO, J. P. . et al. **Limnologia de três ecossistemas aquáticos característicos da baixada maranhense**. Bol. Lab. Hidrobiol, v. 38, p. 19–38, 2002.

COTTA, J. A. DE O. **Aplicação de vermicompostagem para a biorremediação de solos contaminados por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos**. Tese de Doutorado – Instituto de química de São Carlos. Universidade de São Paulo – São Carlos, SP - 2008.

D’AGOSTINHO, A., FLUES, M. **Determinação do coeficiente de distribuição (Kd) de benzo(a)pireno em solo por isotermas de sorção**. Quimica Nova, v. 29, n. 4, p. 657–661, 2006.

DRESCH, M. R.; OLIVEIRA, E. C.; SOUZA, C. F. V. DE. **Avaliação da contaminação por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos nas etapas de fabricação da cerveja**. Revista Destaques Acadêmicos - CETEC/UNIVATES, p. 8, 2011.

FALCO, W. F. **Aplicação da fluorescência da clorofila a induzida por luz laser no processo de caracterização da interação nanopartícula-plantas**. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal da Grande Dourados. Dourados - MS, 2012.

FRANÇA, F. C. O. . et al. **Mudanças dos hábitos alimentares provocados pela industrialização e o impacto sobre a saúde do brasileiro**. Anais I Seminário Alimentação e Cultura na Bahia, 2012.

GREENPEACE. **Poluentes Orgânicos Persistentes: Poluição invisível e global**. Disponível em: <<http://greenpeace.org.br/toxicos/pdf/poluentes.pdf>>. Acesso em: 26 ago. 2017.

HABENSCHUS, M. D. ; OLIVEIRA, A. R. M. de; **Estudos de inibição das enzimas do citocromo P450 pelo produto natural (-)-grandisina utilizando microssomas hepáticos de humanos.** Tese de Doutorado - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto – SP, 2016.

INMETRO. DOQ-CGCRE-008. **Orientação sobre validação de métodos analíticos.** [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://www.ufjf.br/baccan/files/2011/05/Validacao-Inmetro.pdf>>. Acesso em: 17 jul. 2019.

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

JUNQUEIRA, A. H.; DE FÁTIMA, R.; LUENGO, A. A **Mercados diferenciados de hortaliças.** Horticultura Brasileira, v. 18, n. 2, p. 95–99, 2000.

KAIPPER, B. I. A. **Influência do etanol na solubilidade de hidrocarbonetos aromaticos em aquíferos contaminados por óleo diesel.** Tese de Doutorado - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas. Florianópolis – SC, 2003.

KLAASSEN, C. D. **Toxicology - The Basic Science of Poisons.** 17. ed. Kansas City: [s.n.]. v. 12

LIN, H. et al. **Uptake of polycyclic aromatic hydrocarbons by maize plants.** Environmental Pollution, 2007.

LOPES, A. W.; ANDRADE, J. B. **Fontes, formação, reatividade e quantificação de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPA) na atmosfera.** Química Nova, v. 19, n. 1678–7064, p. 20, 1996.

MAGRINI, M. J. **Degradação de hpas e produção de enzimas ligninolíticas por fungos basidiomicetos derivados de esponjas marinhas.** Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de biologia. Campinas – SP, 2012.

MARTINAZZO, E. G. et al. **Efeito do Sombreamento sobre o Crescimento Inicial e Teor de Clorofila Foliar de Eugenia uniflora Linn (Pitanga) – Família Myrtaceae.** p. 162–164, 2007.

MANSOUR, M. S. M.; ABDEL-SHAFY, H. I.; **A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: Source, environmental impact, effect on human health and remediation.** Egyptian Journal of Petroleum, v. 25, n. 1, p. 107–123, 2016.

MAXWELL, K. **Fluorescência da clorofila - um guia prático.** v. 51, n. 345, p. 1–2, 2018.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **Convenção de Estocolmo sobre Poluentes Orgânicos Persistentes.** Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/seguranca-quimica/convencao-de-estocolmo>>. Acesso em: 26 ago. 2017.

MOTA, J. H.; SOUZA, R. J.; CARVALHO, J. G.; YURI, J. E.; RESENDE, G. M. **Efeito do cloreto de potássio via fertirrigação na produção de alface americana em cultivo**

protegido. Horticultura Brasileira, v.20, n.2, julho 2002.

NETTO, A. D. P. et al. **Evaluation of human contamination with polycyclic aromatic hydro- carbons (pahs) and their nitrated derivatives (nhpas): a review of meth.** Quimica Nova, v. 23, n. 6, p. 765–773, 2000.

OLIVEIRA, L. A. D. A. et al. **Viabilidade agrônômica de policultivos de rúcula/cenoura/ alface sob quantidades de flor-de-seda e densidades populacionais .** Revista Caatinga, Mossoró, v. 28, n. 4, p. 116–126, out.-dez., 2015.

OLIVEIRA, R. A. N. . **Determinação dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos pireno e benzo[a]pireno em amostras de água com aplicação da técnica de espectroscopia de fluorescência sincronizada com diferentes extrações.** Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal da Grande Dourados, Faculdade de Ciências Exatas e Tecnologia, Dourados – MS, 2015.

PATRA, D.; MISHRA, A. K. **Investigation on simultaneous analysis of multicomponent polycyclic aromatic hydrocarbon mixtures in water samples : a simple synchronous fluorimetric method.** TALANTA, v. 55, p. 143–153, 2001.

PAZ, A. P. S. DA *et al.* **Presença de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em produtos alimentícios e a sua relação com o método de cocção e a natureza do alimento.** Brazilian Journal Food Technology, Campinas, v. 20, p. 13, 2017.

PINHEIRO R.R. *et. al.*; **Determinação do teor de clorofila em folhas de alface em diferentes telas de sombreamento.** Horticultura Brasileira, v. 30, n. 2, Julho, 2012.

PINHEIRO, F. C. et al. **Alteração do status fisiológico de plantas de soja induzido por nanopartículas de prata: avaliação via espectroscopia de fluorescência.** Anais 8º ENEPEX e 5º EPEX, 2014. Disponível em: <<http://eventos.ufgd.edu.br/enepex/anais/arquivos/129.pdf>>. Acesso em: 4 jun. 2019.

POTRICH, C. A. G.; PINHEIRO, R. R.; SCHMIDT, D. **Alface hidropônica como alternativa de produção de alimentos de forma sustentável.** Goiânia: [s.n.]. Disponível em: <<http://www.conhecer.org.br/enciclop/2012b/ciencias agrarias/alface.pdf>>. Acesso em: 10 jan. 2019.

QUEIROZ, A, M. . **Interação nanopartícula-clorofila: uma análise via espectroscopia óptica.** Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Exatas e Tecnologia. Universidade Federal da Grande Dourados, 2014

RESENDE, L. L. et al. **Nível De Contaminação Por Hidrocarbonetos Na Baía De Guanabara , Rio De Janeiro – RJ.** Revista Brasileira de Iniciação Científica, Itapetininga, RJ. v. 4, n. 1, 2017

RIBANI, M. ; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, U. C. S. F.; MELO, L. F. DE. **Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos.** Quím. Nova, v. 27 n. 5. São Paulo – SP. Sept./Oct. 2004.

RIBEIRO, *et al.* **Mutagênese ambiental**. 1. ed. Canoas, RS: ULBRA, 2003.

RICARTE, F. da S. *et al.* **Análise parasitológica das amostras de alface (*Lactuca sativa*) comercializadas em um município do nordeste brasileiro**. *Journal of Medicine and Health Promotion* v. 1, n. 3, p. 233-253, Jul/Set 2016.

RICHARDS, F.; G. THOMPSON, T. **A Spectrophotometric Method for the Estimation of Plankton Pigments**. *J. Marine Res.* 11:156-72, 1952.

RIGOLIN-SÁ, O.; PEREIRA, K. C. **Avaliação da qualidade higiênico-sanitária de hortaliças e da água utilizadas em hortas na cidade de passos - MG**. *Medicinal Spices and Vegetables from Africa*, p. 5–18, 2002.

RISK INFORMATION SYSTEM, I. **Toxicological Review of Benzo[a]pyrene (Final Report)**. 2017.

ROCHA, S. M.; NISHIO, F. Y. **Contaminação por Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) em Mananciais: evidências de risco à saúde no Município de São Paulo**. *Revista Meio Ambiente e Sustentabilidade*, v. 11, n. 1, p. 19, 2016.

RODRIGUES, J. M. **Caracterizações por Espectroscopia de Fluorescência Sincronizada, na região do Ultra-Violeta e visível para Identificação Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) na Sub-Bacia do Rio Ivinhema**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Grande Dourados, Faculdade de Ciências Exatas e Tecnologia. Dourados – MS, 2011.

RODRIGUES, J. M. . **Estudo de Viabilidade da Técnica de Espectroscopia de Fluorescência Sincronizada para Identificação Simultânea de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) em matrizes líquidas**. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal da Grande Dourados, 2013.

ROSA, L. DOS S. **Determinação de HPAs no sistema fluvial do município de Dourados**. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal da Grande Dourados, 2017.

SKOOG, D. A; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de Análise Instrumental**, 5ª ed. Porto Alegre: Bookman, 2006, 836p.

SOLANGE, M. *et al.* **Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos -benzo(a)pireno: uma revisão Polycyclic aromatic hydrocarbons -benzo(a)pyrene: a review**. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, v. 67, n. 1, p. 1–27, 2008.

SOUSA, M. DE M.; NASCIMENTO, V. L. V. DO. **Benzo(a)pireno em alimentos**. *Revista ACTA Tecnológica - Revista Científica*, p. 16, 2010.

STREIT, N. M. . *et al.* **As Clorofilas**. *Ciência Rural*, v. 35, n. 3, p. 748–755, 2005.

VALDERRAMA, P.; BRAGA, J. W. B.; POPPI, R. J. **Figuras de mérito em calibração multivariada**. *Quim. Nova*, v. 32, n. 5, p. 10, 2009.

VIANA, F. V. **Acumulação de HPAs pela spartina alterniflora cultivada em solo de landfarming**

de indústria petroquímica. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande, Programa de Pós-Graduação em Oceanografia, física, Química e Geologia, 2008.

VICTÓRIO, C. P. .; KUSTER, R. M. .; LAGE, C. L. S. . **Qualidade de Luz e Produção de Pigmentos Fotossintéticos em Plantas In Vitro de Phyllanthus tenellus Roxb.** Revista Brasileira de Biociências, v. 5, p. 213–215, 2007.

WILSON A. L.; ANDRADE J. B. DE. **Fontes, formação, reatividade e quantificação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA`s) na atmosfera.** Química Nova, v. 19(5), 1996.

ZHANG, Y.; TAO, S. **Global atmospheric emission inventory of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) for 2004.** Atmospheric Environment, v. 43, n. 4, p. 812–819, 1 fev. 2009.

ZULAUF, W. E. **O meio ambiente e o futuro.** Estudos avançados, v. 14, n. 39, p. 85–100, 2000.