

Campus Rio de Janeiro

Mestrado Profissional em Ciência
e Tecnologia de Alimentos

Henrique Barbosa Rocha

**Queijo de coalho
assado em
churrasqueira: Uma
investigação sobre a
formação e a ingestão
de Hidrocarbonetos
Policíclicos
Aromáticos**

Rio de Janeiro

2018

Henrique Barbosa Rocha

**QUEIJO DE COALHO ASSADO EM CHURRASQUEIRA: UMA INVESTIGAÇÃO
SOBRE A FORMAÇÃO E INGESTÃO DE HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS
AROMÁTICOS**

Dissertação apresentada ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientadoras: DSc. Simone Lorena Quiterio de Souza
DSc. Renata Santana Lorenzo Raices

Rio de Janeiro – RJ

2018

Ficha catalográfica elaborada por

Sergio Pinheiro Rodrigues

CRB7-3684

R672 Rocha, Henrique Barbosa.

Queijo de coalho assado em churrasqueira: uma investigação sobre a formação e a ingestão de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos / Henrique Barbosa Rocha. – Rio de Janeiro, 2018.

164f. ; 21 cm.

Dissertação (Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro, 2018.

Orientadora: Prof. D.Sc. Simone Lorena Quiterio de Souza

Henrique Barbosa Rocha

**QUEIJO DE COALHO ASSADO EM CHURRASQUEIRA: UMA INVESTIGAÇÃO
SOBRE A FORMAÇÃO E INGESTÃO DE HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS
AROMÁTICOS**

Dissertação apresentada ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Aprovado em 09/07/2018.

Banca Examinadora



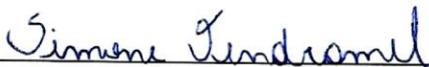
Prof. Dra. Simone Lorena Quiterio (Orientadora)
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro



Prof. Dra. Renata Santana Lorenzo Raices (Orientadora)
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro



Prof. Dr. Sergio Machado Correa
Universidade do Estado do Rio de Janeiro – *Campus Resende*



Prof. Dra. Simone Maria Ribas Vendramel
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro



Prof. Dr. Adriano Gomes da Cruz
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro – RJ

2018

Dedico esta dissertação Deus, a minha esposa, a toda minha família, professores e amigos que de muitas formas incentivaram e ajudaram para que fosse possível a concretização deste trabalho, certo de que sem eles as dificuldades seriam enormes e intransponíveis.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus por todos os benefícios que têm me proporcionado e a todas as pessoas do meu convívio familiar, principalmente a minha esposa, pessoas que acreditaram e contribuíram direta ou até mesmo indiretamente para a conclusão deste projeto. Aos professores da pós-graduação, em especial as orientadoras, Simone Lorena e Renata Raices, o meu apreço, carinho e admiração pelo empenho em tudo que fizeram e proporcionaram ao crescimento das informações compostas no presente trabalho. Não posso deixar de mencionar os conselhos, palavras e a confiança depositada na indicação dos professores do programa da pós graduação – PCTA, Adriano e Márcia, que concederam a honra de trabalhar com um dos projetos de pesquisa do IFRJ, a estes, o meu sincero obrigado e consideração. Ao professor Sérgio do Laboratório de Química Ambiental da unidade UERJ-Resende, meu agradecimento é enorme, por tudo que fez, pois sem a sua contribuição nesta investigação não teríamos vencido os problemas químicos e analíticos que enfrentamos durante os experimentos. Assim como, não posso deixar de citar com muito apreço, os técnicos e bolsistas dos laboratórios do IFRJ, Jeremias, João, Ana Carolina, Shelda, Rayssa, Daniel e Davi, pois com paciência, perseverança, vontade e conhecimento técnico-científico dedicaram esforços ao andamento dos resultados desta árdua pesquisa, mesmo quando as dificuldades apareceram, estes também não desistiram.

“Todas as substâncias são venenos, não existe nada que não seja veneno. Somente a dose correta diferencia o veneno do remédio.”

(Paracelsus)

ROCHA, H B. *Queijo de Coalho assado em churrasqueira: uma investigação sobre a formação e ingestão de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos*. p. 164. Dissertação. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro (IFRJ), *Campus* Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, 2018.

RESUMO

A tradição na produção de queijo coalho se destaca devido à grande relevância social, econômica e cultural no Brasil. Sua origem em grande parte está ligada ao processamento artesanal, onde não são utilizados controle e inovações tecnológicas na produção, ou mesmo, fiscalização por agências sanitárias, contudo existe atualmente, expressiva produção de modo industrial. Esta fabricação industrial tem permitido a difusão popular do QC na região Sudeste do Brasil, sendo observado pelo consumo na forma de espeto preparado em churrasqueira, cujas formas de cozimento distinguem-se pelo uso de diferentes tipos de combustíveis sendo o principal, carvão vegetal. Esta forma de processamento pode elevar aos riscos de contaminação, na qual a sociedade pode estar exposta devido ao consumo irregular destes queijos contendo HPA. Dado este que ainda no Brasil são de menor divulgação e impacto, levando em consideração os efeitos carcinogênicos, mutagênicos e teratogênicos causados por tais compostos. Com o intuito de investigar a contaminação e formação de queijo de coalho (QC) amostras desse produto foram preparadas em churrasqueiras em diferentes alturas (5, 15 e 20 cm). Estas foram trituradas e pesadas, saponificadas, passaram por extrações líquidas sucessivas, filtradas, concentradas em rotaevaporador, ressuspensas em acetona para posterior evaporação no evaporador em fluxo de nitrogênio. Feito isso, os concentrados foram ressuspensos em diclorometano, filtrados e analisados por CG-EM. As concentrações encontradas de 16HPA variaram de 0,006 – 0,030 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (LQ), em um N=31 amostras, todas em duplicatas. O intervalo do limite de detecção (LD) foi estabelecido experimentalmente entre 0,002 – 0,010 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Nas amostras de queijo de coalho assadas foram encontrados 16 HPA monitorados pela USEPA e os 8 HPA mais tóxicos, conforme alertado pela mesma autoridade sanitária. De acordo com os resultados encontrados, as concentrações de HPA nas diferentes alturas variaram na faixa de 78,1 a 833 $\mu\text{g kg}^{-1}$. A legislação brasileira referente aos aromatizantes/aromas de fumaça em alimentos, aponta o valor de 0,03 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para benzo(a) pireno. Pode-se inferir que o valor encontrado neste estudo (h = 20 cm) é cerca de 4348 vezes superior ao valor limite. O Σ 4 HPA B (a) P, B (a) A, Cry, B (b) F também alcançou valores médios muito superiores (541,6 $\mu\text{g kg}^{-1}$) ao nível máximo fixado para vários produtos alimentares no regulamento europeu, onde o maior valor encontrado se refere a moluscos bivalves (35 $\mu\text{g kg}^{-1}$). Para o Σ 8 HPA (B (a) P, B (a) A, Cry, B (b) F, B (k) F, B (ghi) P, D (ah) A, IND) na (h=20 cm) foi observado 1079,08 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Embora não existam ainda limites máximos estabelecidos para queijos (Brasil e Europa), estes valores do Σ 4 HPA e Σ 8 HPA são muito elevados e constitem risco grave para a saúde dos consumidores, conforme parâmetro observado pela OMS e EFSA. Os valores de toxicidade foram calculados e este estudo mostra que a exposição humana aos HPA no preparo e consumo do QC classifica-se em grave risco ou risco potencial para causar câncer em humanos. O índice do risco de causar câncer, pela estimativa

de consumo de QC ao longo da vida adulta foram constatados > 83 % para B (a) P e > 69 % para D (a,h) A, os compostos com maior índice de carcinogenicidade.

Palavras Chaves: Queijo de coalho. Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos. Segurança alimentar. Cromatografia em Fase Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM). Toxicidade.

ROCHA, H B. *Cheese curd roasted in barbecue: an investigation into the formation and ingestion of polycyclic aromatic hydrocarbons*. p. 164. Dissertação de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu*, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro (IFRJ), *Campus* Rio de Janeiro, RJ, 2018.

ABSTRACT

The tradition in the production of rennet cheese stands out due to the great social, economic and cultural relevance, as well as the increase in the source of income and generation of employment in certain regions of Brazil. Its origins are largely linked to the processing of artisans, where technological innovations are not used in the production of QC, or even inspection by sanitary agencies, however there is currently a significant industrial production. This manufacturing industry has allowed the popular diffusion of QC in the Southeast region of Brazil, being observed by consumption in the form of skewer prepared in barbecue, whose forms of cooking are distinguished by the use of different types of fuels being the main, charcoal. This form of processing can raise the risks of contamination, in which the company may be exposed due to the irregular consumption of these cheeses containing HPA. Given that still in Brazil are of less dissemination and impact, taking into account the carcinogenic, mutagenic and teratogenic effects caused by such compounds. In order to investigate the contamination and formation of rennet cheese samples of this product were prepared in grills at different heights (5, 15 and 20 cm). These were crushed and weighed, saponified, passed through successive liquid extractions, filtered, concentrated in rotavaporator, resuspended in acetonitrile for later evaporation in the evaporator in nitrogen flow. After this, the concentrates were resuspended in dichloromethane, filtered and analyzed by GC-MS. The concentrations of 16 HPA ranged from 0.006-0.030 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (LQ), in an N = 31 samples, all in duplicates. The detection limit range (LD) was experimentally established between 0.002 - 0.010 $\mu\text{g kg}^{-1}$. In the samples of roasted cheese, 16 PAHs were monitored by the USEPA and the 8 most toxic HPA, as alerted by the same sanitary authority. According to the results found, HPA concentrations at different heights ranged from 78,1 to 833 $\mu\text{g kg}^{-1}$. The Brazilian legislation on flavorings / smoke flavorings in food, points the value of 0.03 $\mu\text{g kg}^{-1}$ to benzo (a) pyrene. It can be inferred that the value found in this study (h = 20 cm) is about 4348 times higher than the limit value. The Σ 4 HPA (B (a) P, B (a) A, Cry, B (b) F) also reached much higher average values (541,6 $\mu\text{g kg}^{-1}$) at the maximum level set for various food products in the European Regulation, where the highest value found refers to bivalve molluscs (35 $\mu\text{g kg}^{-1}$). For Σ 8 HPA (B (a) P, B (a) A, Cry, B (b) F, B (k) F, B (ghi) P, D (ah) A, IND) at (h = 20 cm) 1079.08 $\mu\text{g kg}^{-1}$ was observed. Although there are still no established ceilings for cheeses (Brazil and Europe), these values of Σ 4 HPA and Σ 8 HPA are very high and constitute a serious risk to the health of consumers, according to the parameters observed by WHO and EFSA. Toxicity values have been calculated and this study shows that human exposure to PAH in the preparation and consumption of QC is classified as a serious risk or potential risk to cause cancer in humans. The index of the risk of causing cancer by the estimation of consumption of QC throughout the adult life was verified > 83 % for B (a) P and > 69 % for D (a h) A, the compounds with the highest carcinogenicity index.

Key Words: Cheese. Aromatic Polycyclic Hydrocarbons. Food safety. Gas-phase chromatography coupled to Mass Spectrometry (GC-MS). Toxicity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Mercado de queijos no Brasil	23
Figura 2: Os 12 compostos orgânicos sintéticos considerados como POP, segundo a Conveção de Estocolmo - Adrina, Dieldrina, endrina, clordano, DDT, Heptacloro, HCB, mirex, Toxafeno, PCB, TCDF, PeCDF	41
Figura 3: Formação de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromaticos por meio da pirólise	44
Figura 4: Metabolismo e interação de HPA	61
Figura 5: Formulário de pesquisa de opinião sobre o consumo e preparo de QC	77
Figura 6: Esquema dos experimentos em churrasqueira segundo Rose <i>et al.</i> (2015) modificado	81
Figura 7: Sequência de imagens do procedimento de testes de combustão com carvão vegetal e preparo final da amostra	82
Figura 8: Fluxo do procedimento de extração de HPA em QC	87
Figura 9: Dados obtidos da pesquisa de opinião sobre o perfil dos participantes	98
Figura 10: Perfil de preparo do QC segundo pesquisa de opinião dos participantes.	101
Figura 11: Cromatograma obtido do CG-EM, pela injeção de amostra do extrato de QC assado a 5 cm e triturado	104
Figura 12: Cromatograma obtido do CG-EM pela a injeção de amostra do extrato de QC assado a 15 cm e triturado	105
Figura 13: Cromatograma obtido do CG-EM pela a injeção da amostra 32 do extrato de QC assado a 20 cm e triturado	105
Figura 14: Gráfico do percentual de recuperação HPA em $\mu\text{g kg}^{-1}$, das amostras fortificadas e analisadas por CG-EM	107
Figura 15: Concentração média em $\mu\text{g kg}^{-1}$ das amostras fortificadas com 0,1 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de padrão dos 16 HPA	110
Figura 16: Média das concentrações recuperadas nas amostras fortificadas dos 8HPA (em $\mu\text{g kg}^{-1}$)	111
Figura 17: Cromatograma obtido do CG-EM, pela injeção da amostra 29 do extrato de QC assado a 5 cm, sob influência do calor a 100 % do tempo normal e triturada	113
Figura 18: Cromatograma obtido do CG-EM pela a injeção da amostra 31 do extrato de QC assado a 15 cm, sob influência do calor a 100 % do tempo normal e triturada	113
Figura 19: Cromatograma obtido do CG-EM pela a injeção da amostra 57, do extrato de QC assado a 20 cm, sob influência do calor a 100 % do tempo normal e triturada	114
Figura 20: Concentrações reais das amostras não forficadas em $\mu\text{g Kg}^{-1}$	117
Figura 21: Somatório das concentrações dos 8 HPA prioritários no monitoramento pela OMS e CE para alimentos	121

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Composição química mínima do QC segundo a IN nº 30/2001	27
Tabela 2:	Valores médios das análises físico-químicas do QC comercializado em seis estados da região nordeste	33
Tabela 3:	Aditivos relacionados na lista que indica a classe de queijo para a qual ou as quais estão autorizadas na Portaria nº146/96.	35
Tabela 4:	Identificações dos HPA: abreviação, massa molecular e estrutura química	48
Tabela 5:	Limite de HPA em alimentos de diversos países	51
Tabela 6:	Quantificações recentes de HPA em alimentos citados em diversos estudos	53
Tabela 7:	Níveis máximos de HPA em determinados alimentos, conforme, Regulamento nº 1881/2006 da CE	54
Tabela 8:	Nível da dose e o índice de tumores provocados em ratos	65
Tabela 9 :	Fator de Equivalência de Toxicidade propostos individualmente por HPA e classificação carcinogênica segundo critérios da USEPA	66
Tabela 10:	Limite de Detecção determinados em diferentes matrizes por diversos autores	70
Tabela 11:	As recentes utilizações da técnica de CG-EM na análise de alimentos para o monitoramento de HPA.	72
Tabela 12:	Concentração de HPA na mistura do padrão da <i>Supelco Analytical</i>	84
Tabela 13:	Diluição do padrão de dopagem das amostras	85
Tabela 14:	Condições operacionais por CG-EM	89
Tabela 15:	Monitoramento dos íons característicos de acordo com o tempo de retenção dos analitos	90
Tabela 16:	Faixa dos MOE segundo EFSA (2008) 101	95
Tabela 17:	Faixa dos valores de ILCR segundo USEPA (2005)	95
Tabela 18:	Precisão intermediária de amostras fortificadas com padrão	106
Tabela 19:	Recuperação (%) das amostras fortificadas com padrão de 16 HPA na concentração 1 - 20 µg mL ⁻¹	107
Tabela 20:	Figuras de mérito estimadas nas análises das amostras de QC20 µg mL ⁻¹	111
Tabela 21:	Concentrações em µg Kg ⁻¹ de HPA encontradas nas amostras queijo de coalho assadas nas diferentes alturas	115
Tabela 22:	Teores máximos de HPA presentes em gêneros alimentícios	120
Tabela 23:	Valores de CDI calculados para as concentrações obtidas de 8 HPA nas diferentes alturas de processamento do QC na churrasqueira	123

Tabela 24:	Valores mínimo e máximo de CDI e TEQ _{B(a)P} de Lee <i>et al.</i> (2018) comparados aos de QC	125
Tabela 25:	Cálculo de MOE e ILCR, baseados nas concentrações indicadas em QC assado em churrasqueira	126
Tabela 26:	Valores de referência de MOE e ILCR, segundo a agência internacional	127

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1:	LD: Limite de detecção	91
Equação 2:	LQ: Limite de quantificação	91
Equação 3:	Rec.%: Recuperação percentual	93
Equação 4:	TEQ _{B(a)P} : Equivalência tóxica ao B (a) P	94
Equação 5:	CDI: Ingestão diária crônica	95
Equação 6:	MOE: Margem de Exposição segundo OMS	96
Equação 7:	Risco de causar câncer em tempo de vida	96

LISTA DE APÊNDICE

APÊNDICE A: Tabulação dos dados obtidos da pesquisa de opinião aplicada aos consumidores e vendedores de QC.	148
APÊNDICE B: Percentuais de gordura observado como critério de escolha da melhor amostra para análise química.	151
APÊNDICE C: Parâmetros registrados na dopagem das amostras e os métodos utilizados	152
APÊNDICE D: Cromatogramas obtidos nas análises realizadas por CG-E	157
APÊNDICE E: Resultados completos da avaliação da toxicidade de 8HPA em QC baseado nos cálculos de CDI, TEQ _{B(a)P} , MOE e ILCR	160

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	20
1 REFERENCIAL TEÓRICO	22
1.1 REGULAMENTAÇÃO E PRODUÇÃO DE QUEIJO DE COALHO.....	22
1.2 CARACTERÍSTICAS QUÍMICA, ESTRUTURAS E ORGANOLÉPTICAS.....	24
1.2.1 Estrutura do queijo.....	24
1.2.2 Composição.....	26
1.2.3 Umidade.....	29
1.2.4 Substâncias iônicas.....	30
1.2.5 Potencial Hidrogeniônico.....	31
1.2.6 Solubilidade	33
1.2.7 Aditivos.....	35
1.3 CONSUMO DO QUEIJO DE COALHO	37
1.4 CONTAMINANTES QUÍMICOS.....	38
1.4.1 Contaminantes orgânicos e inorgânicos.....	38
1.4.2 Poluentes Orgânicos Persistentes (POP)	40
1.5 HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS (HPA)	44
1.5.1 Formação e características químicas dos HPA	44
1.5.2 HPA em alimentos	49
1.5.3 Toxicidade.....	54
1.5.4 Análise química de HPA em alimentos.....	67
2 JUSTIFICATIVA	74
3 OBJETIVOS	76
3.1 OBJETIVOS GERAL.....	76
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	76
4 MATERIAIS E MÉTODOS	77
4.1 PERFIS DE CONSUMO E COZIMENTO DO QUEIJO DE COALHO.....	77
4.2 ANÁLISES ESTATÍSTICA DA PESQUISA DE OPINIÃO.....	78
4.3 AMOSTRAGEM.....	78
4.4 MATERIAIS.....	78
4.4.1 Reagentes.....	79

4.4.2 Utensílios e vidrarias.....	79
4.4.3 Equipamentos.....	79
4.5 PREPARO DA AMOSTRA.....	80
4.6 PREPARO DA SOLUÇÃO PADRÃO.....	84
4.6.1 Padrão utilizado.....	84
4.6.2 Diluição do padrão.....	85
4.7 EXTRAÇÃO.....	85
4.8 MÉTODO CROMATOGRÁFICO.....	89
4.9 PROTOCOLO DE AVALIAÇÃO DO MÉTODO.....	90
4.10 CÁLCULO DE TOXICIDADE E INGESTÃO.....	92
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	96
5.1 PESQUISA DE OPINIÃO DOS CONSUMIDORES E VENDEDORES.....	96
5.2 RESULTADOS DAS ANÁLISES QUÍMICAS.....	102
5.2.1 Procedimentos de Extração.....	102
5.2.2 Análises em CG-EM.....	103
5.2.2.1 Dados analíticos.....	103
5.2.2.2 Avaliação do método analítico.....	106
5.2.2.3 Concentrações das amostras de queijo de coalho.....	112
5.3 RESULTADOS DO CÁLCULO DE TOXICIDADE COM BASE EM FET (FATOR DE EQUIVALÊNCIA TÓXICA) - B (a) P.....	122
5.4 INGESTÃO DE HPA POR QC.....	125
CONCLUSÃO.....	128
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	130
APÊNDICES.....	148

INTRODUÇÃO

No Brasil originalmente tanto a produção como o consumo de queijo de coalho (QC) predominam na região nordeste. Ainda que o processamento deste produto não esteja definido, quanto ao resultado final, tanto no Nordeste como em outros estados e sua fabricação seja também, o queijo de coalho processado industrialmente tem alcançado de forma promissora o mercado consumidor.

A complexidade da tecnologia de produção do QC reside no envolvimento de diversas etapas de transformações bioquímicas interligadas, além da conservação do QC como produto final, independente da sua fabricação ser artesanal ou industrial.

Apesar do processamento industrial do leite para obtenção do QC estar em construção para que haja uma padronização, a forma principal de produção continua sendo, em algumas regiões do Brasil, a artesanal. Isto reflete na capacidade de difusão do produto ao mercado, sem parâmetros de qualidade estabelecidos e monitorados, assim como na forma de consumo regional e cultural em determinado nicho populacional.

Certas regiões consomem o QC como um produto para degustação, tanto cru como cozido. Diversos grupos utilizam-no como alimento em refeições principais. Já na região sudeste e nordeste predominam a forma de consumo assado em churrasqueira, usando em geral, como combustível lasca de madeira e carvão vegetal. Tal processo de combustão pode acarretar em uma tendência e alta probabilidade a intoxicações.

A Agência Internacional de Pesquisas em Câncer aponta indício da exposição humana a compostos tóxicos, relacionadas ao consumo de alimentos de origem animal processados e cozidos na forma assada, grelhada, tostada ou defumada. Compostos estes denominados hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA), que são gerados pela queima incompleta de matéria orgânica, ou combustão incompleta de substâncias químicas (pirólise).

Buscando enfatizar a importância da segurança alimentar e saúde pública, este trabalho tem como objetivo determinar a concentração de HPA em amostras de QC assadas em churrasqueiras, utilizando como combustível, carvão vegetal, e

quantificar esses compostos através do uso da técnica de Cromatografia em Fase Gasosa acoplado à Espectrometria de Massas (CG-EM).

No primeiro capítulo deste estudo, foram apresentados os aspectos teóricos redigidos com base em uma revisão de literatura, apontando características de produção, regulamentação, breve descrição sobre o processamento típico (industrial/artesanal), inovações e alternativas na produção de QC, bem como do consumo, que tem alcançado de forma promissora o mercado.

Foram expostos, também diversos contaminantes de alimentos incluindo os HPA, caracterizados como poluentes orgânicos persistentes (POP), formados a partir das atividades antrópicas e ambientais. Verificou-se a importância de se identificar e quantificar substâncias com tais características que levam a prejuízos à saúde a longo prazo. Desta forma, abordaram-se os indícios da formação de HPA em certas matrizes alimentícias, bem como a definição de processos de cozimento que possivelmente poderiam originar tais compostos tóxicos, carcinogênicos e mutagênicos. Estes compostos são gerados pela queima incompleta de matéria orgânica, ou combustão incompleta de substâncias químicas (pirólise), constituídas principalmente de carbono e hidrogênio, formando anéis aromáticos condensados ramificados ou não. E por fim, apresentaram-se as tendências mais frequentes e eficientes de análises químicas voltadas para a identificação de HPA presentes em alimentos processados ou não.

No segundo capítulo formulou-se a justificativa na qual o presente trabalho se fundamenta e que permite o seu prosseguimento. E, no terceiro capítulo são apresentados o objetivo geral e os específicos deste estudo.

O quarto capítulo prosseguiu com a fase de preparo e escolha do material, como solventes, reagentes e amostras de QC para iniciar os experimentos de preparo e extração de HPA. E, posterior análise química, com a expectativa de determinar a presença e concentração de HPA nas amostras de QC. A fim de divulgar estes dados à comunidade científica, em âmbito nacional e internacional, e de alertar a sociedade brasileira, bem como agências reguladoras sobre a possibilidade dos riscos à saúde.

No quinto capítulo, os resultados são apresentados e discutidos. E, finalmente são apresentadas as conclusões e recomendações para trabalhos futuros.

1 REFERENCIAL TEÓRICO

1.1 REGULAMENTAÇÃO E PRODUÇÃO DE QUEIJO DE COALHO

O QC tem sido originalmente consumido com maior predominância na Região Nordeste do Brasil, cujo processo de produção não está definido e padronizado. Sabe-se que o produto é resultado da coagulação do leite pasteurizado ou cru, e que atualmente vem sendo substituído pelo uso do processamento do coalho industrial (DE FREITAS FILHO, 2009; CAVALCANTE *et al.*, 2007).

O Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária, pela Portaria nº146, de 7 de março de 1996, atribuiu ao queijo identidade e qualidades técnicas como, produto fresco ou maturado obtido por segregação parcial do soro do leite ou leite constituído (integral, parcial ou totalmente desnatado), ou soros lácteos, coagulados pela ação física do coalho, de enzimas, bactérias específicas, ácidos orgânicos, isolados ou combinados, apto a alimentação, com ou sem substâncias químicas alimentícias, condimentos, aditivos específicos, compostos aromatizantes, e materiais contaminantes (BRASIL, 1996).

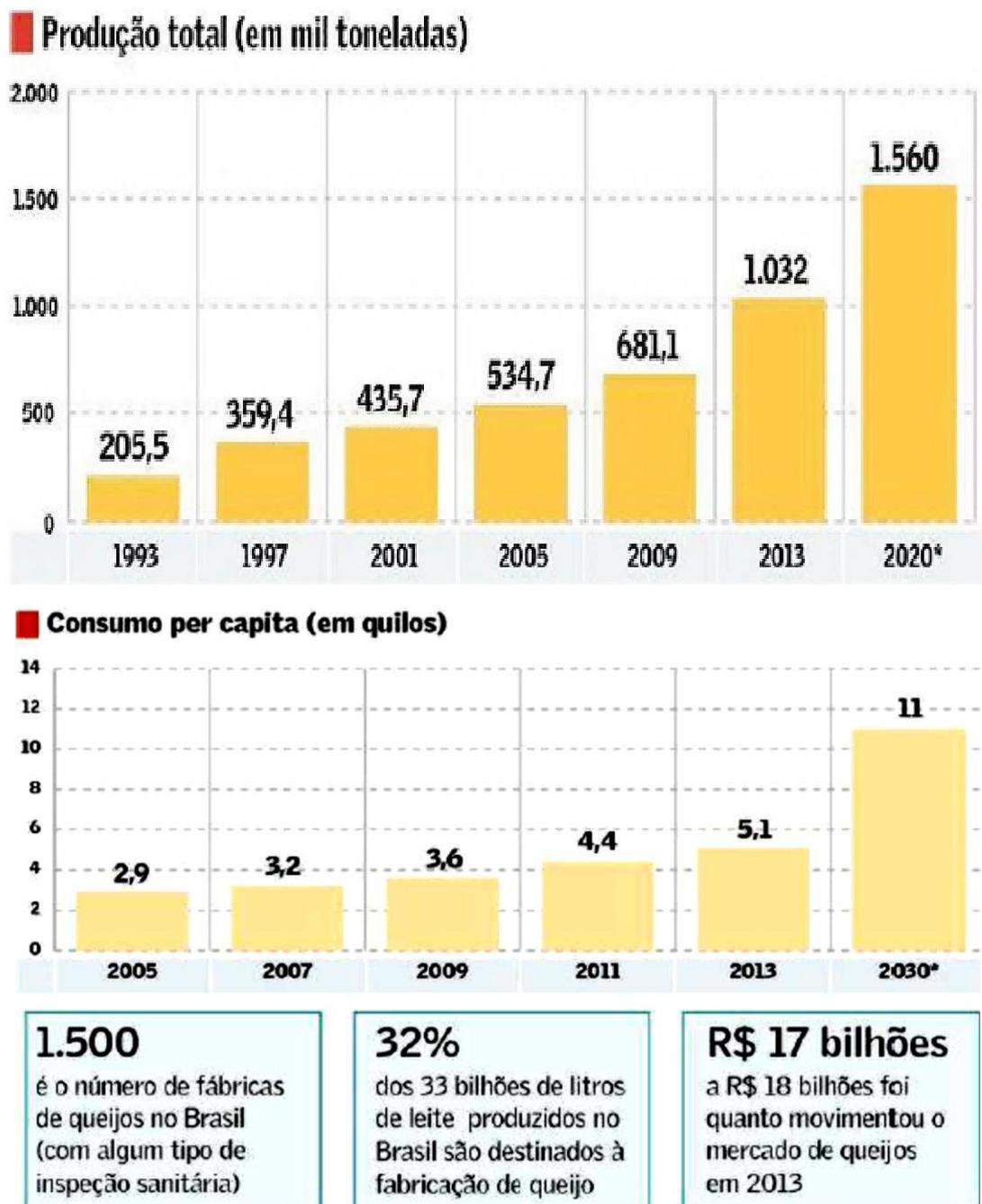
A Instrução Normativa nº 30, de 26/06/01, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), estabelece como QC, produto obtido pela coagulação do leite, através do coalho ou por ação enzimática específica, pela ação de bactérias lácteas de forma complementar ou não, cujas características organolépticas e aspectos físicos podem apresentar-se, semiduro, elástico, de textura compacta, cor uniforme, de paladar moderado, levemente ácido, salgado, e casca fina, porém não definida (BRASIL, 2001).

Estudos sobre a produção nacional de queijo avaliaram dados relevantes como a crescente produção, a ampla distribuição de mercado e consumo que reflete em aumento da renda para produtores rurais. Produção essa de maior impacto na economia regional nordestina, conduzida por fontes artesanais de processamento, sendo observado que os parâmetros de qualidade, de boas práticas de fabricação e higiene não são controlados e fiscalizados (SANTANA *et al.*, 2008).

Segundo Rocha (2014), em entrevista com o presidente da Associação Brasileira de Indústrias de Queijo ao Jornal Valor Econômico, o aumento da produção

e consumo de queijo no país pode ser constatada ao longo dos anos, permitindo estima-los como na Figura 1:

Figura 1 — Mercado de queijos no Brasil.



Fonte: Rocha (Jornal Valor Econômico), 2014.

Apesar da produção de QC ser considerada para alguns pesquisadores uma prática de manipulação de leite cru antiquíssima, e grande parte do processamento no Brasil ainda ser artesanal, o uso do leite industrializado para a produção do QC vem se difundindo na produção nacional. Diferenças não foram encontradas na produção artesanal e industrial que seja relevantemente significativa, porém a fiscalização e monitoramento tem sido a problemática maior para o consumo do QC de forma segura (MAMEDE *et al.*, 2010).

1.2 CARACTERÍSTICAS QUÍMICA, ESTRUTURAIS E ORGANOLÉPTICAS

1.2.1 Estrutura do queijo

As características estruturais do queijo por muitos anos estiveram relacionadas ao modo como se desenvolveu, em baixa umidade, reduzida acidez, com coalhada fresca sem sal, resultando em instabilidade no armazenamento em prateleira, e conseqüentemente menor vida útil para o consumo. Essas características têm-se aperfeiçoado ao longo dos anos, pois novas tecnologias na produção de queijo atualmente são empregadas como forma de melhoramento nos processos, de sanitização, purificação, obtenção do coalho, separação das estruturas sólidas do leite e uso de teores adequados de sal. Com isso, as reduções da variabilidade das estruturas dos queijos surtiram resultados como, melhor qualidade na textura e sabor do produto final (EVERETT; AUTY, 2008).

Carvalho, Prazeres e Rivas (2013) abordaram que o tipo de leite utilizado na produção de queijo como de vaca, cabra, ovelha, búfalo e outros mamíferos com capacidade de produção em grande volume, também influencia nos aspectos de produção de soro do queijo e sua parte sólida. Nesse caso, em uma base seca, no soro do leite bovino pode se observar um teor de 70-80% de lactose, 9% de proteínas, 8-20% de minerais, bem como outros presentes de menor expressão, como alguns péptidos hidrolisados de K-caseína, lipídios e bactérias. Segundo os autores do estudo, a coagulação ácida ocorre próximo ao ponto isoelétrico da caseína (pH 4,6), que conseqüentemente, acarreta em precipitação de mais proteína do leite. Isso determina as características finais do produto, devido o soro do leite ácido possuir

limitação na utilização, pois há uma predominância do gosto ácido e de alto teor de sal.

Lima *et al.* (2012), apontaram o queijo com características estruturais propícias para ser utilizado como alimento funcional. Os autores destacam o caráter bioquímico das proteínas do leite. Cerca de oitenta por cento da composição da matriz, causam efeitos fisiológicos adicionais devido aos numerosos péptidos bioativos presentes na caseína. Além, disso por ser muito bem aceito ao paladar dos brasileiros, e difundido por diversas regiões do Brasil, em especial o QC, levemente salgado, de consistência apreciável, e por permitir o cozimento na forma de assado ou outras maneiras de preparo, o produto tem um mercado promissor aplicado ao consumo como alimento funcional.

Avaliações tecnológicas realizadas por Cavalcante *et al.* (2007) possibilitaram produzir QC com bactérias ácido lácticas distintas. Cultura de microrganismos essas que melhoram a eficiência de segregação do soro da composição sólida ou pastosa (coalho) Segundo a autora, na produção de queijos com bom valor e rendimento industrial é necessário o fato de processar com maior controle de qualidade. Entretanto, Cavalcante *et al.* (2007) destaca ainda excelente produção, melhor rendimento e rapidez na obtenção de queijo com fermento TAUA-2, quando comparados aos queijos obtidos por culturas de bactérias *Lactococcus Lactis ssp.* tanto atípico como cremoris. Apesar disso, não houve diferença significativa quanto ao teste de fritura em panela ao fogo moderado, pois tais queijos não derreteram, permanecendo estruturalmente sólidos.

Nesse contexto, Sousa *et al.* (2013) descrevem que tanto QC fabricado artesanalmente como de forma industrial em diversos estados da Região Nordeste apresentaram níveis de pH, umidade, atividade de água e acidez percentual de ácido láctico fora das especificações do Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Produtos Lácteos previstos pelo MAPA. Desses parâmetros avaliados, o pH e índice de acidez percentual ao ácido láctico foram determinados como valores de controle significativos, pois a separação do coalho, a coagulação do leite e a textura, influencia diretamente para formação e produção de queijo. Embora, fatores avaliados como a atividade de água e umidade encontrados na pesquisa fossem abaixo do esperado, os autores consideraram como positivo para conservação e vida de prateleira mais longa, desde que armazenados de forma correta e em ambiente controlado.

1.2.2 Composição

Análises físico-químicas realizadas por Viana *et al.* (2010), demonstraram que existe diversidade entre tipos de QC quanto sua composição, principalmente quanto aos queijos fabricados artesanalmente. Os autores ressaltaram que a composição do QC é variável em distintos lugares do país, e que isso se deve, não só a forma de processamento, o que é fundamental na fabricação em grande escala, mas também, ao tipo de leite empregado, o uso de bactérias produtora ácido láctica, microrganismos fermentadores produtores de compostos aromáticos, do fermento se utilizado, do teor de gordura e umidade presentes no leite cru ou pasteurizado.

Segundo Bergamini, Perotti e Zalazar (2010), em um estudo realizado no Instituto de Lactologia Industrial da Universidade Nacional do Litoral da Argentina, os queijos diferem quanto a sua característica e principalmente na composição devido as diferenças de espécies de animais rebanhados, como ocorre na produção de queijo em que a matéria prima se origina de ovelhas, o qual é produzido em diversos países como França, Portugal, Grécia, Espanha e Itália. Os pesquisadores destacam, a importância do processo de maturação do queijo derivado de leite de ovelha, bem como o cultivo de determinadas bactérias na produção da massa final, cujas características típicas dependem da intensidade da proteólise, lipólise e glicólise realizada por tais microrganismos *Streptococcus thermophilus* ou *Lactobacillus hevicium*. Os autores destacam ainda, que processos envolvidos com bactérias empregadas na produção contribuem diretamente para o sabor do queijo, e mais importante que isso conferem indiretamente a produção de substratos para novas reações catabólicas, das quais grandes quantidades de compostos orgânicos voláteis são gerados.

Yegin *et al.* (2011), apontaram o emprego de proteinases no processo de produção de queijos como um relevante fator de contribuição na composição do produto final, destacando que se empregado de forma correta, a atividade enzimática permite altos rendimentos de caseína em queijos, proteína essencial e de maior proporção em derivados láctios sólidos.

Nos estudos de Garcia *et al.* (2011), os resultados da composição bruta e físico-químico das características do QC de leite de cabra utilizando como microrganismos produtores, as bactérias ácido láctico distintas, demonstraram após 1 e 7 dias de

armazenamento em 108°C pouca ou nenhuma diferença significativa quanto a umidade, cinza e teor de cloreto de sódio, independentemente do tratamento ou tempo de armazenamento. Determinados queijos possuíam uma matéria seca mais reduzida, conteúdo este que comparado a outros queijos, pode ser associado a quantidade de proteína total mais baixa.

De acordo com Souza *et al.* (2011), diferenças foram observadas quanto a umidade e lipídeos quando comparados aos diferentes tipos de queijos mencionados no estudo com leite de cabra, sendo essas expectativas esperadas devido aos fatores relacionados à composição do leite utilizado. Tal composição pode sofrer influência de diversos aspectos, como a raça do animal, a idade, o estado de saúde e o período de lactação. Os procedimentos de separação da coalhada, tipo de acondicionamento e tempo de prensa podem também corroborar com mudanças na capacidade dos produtos em reter gordura e água.

Silva *et al.* (2012), em pesquisas com queijos de coalho de origem nordestina, esclarecem que a proteólise do leite por ocasião da produção de queijo é fundamental para estabelecer sua composição final, já que interfere na maturação da matriz sólida, permite a geração de peptídeo e de cadeias de aminoácidos ligadas, cujas propriedades determinam a textura, maciez, plasticidade e consistência. Os autores observaram diferença na composição qualitativa de peptídeos presentes nos queijos de diversas cidades do Nordeste, diferença essas não bem elucidadas, mas os pesquisadores sugerem a diferença de colonização de microrganismos no leite empregado e nas formas de processamento distintos.

A Instrução Normativa nº30 do Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento descreve um Regulamento Técnico sobre os requisitos mínimos para a composição do QC produzido no Brasil, apesar de ser estritamente sucinto e pouco explicativo quanto a tais requisitos, observa-se tais parâmetros na Tabela 1:

Tabela 1 — Composição mínima do QC segundo a IN nº 30/2001.

Composição do QC	
Ingredientes obrigatórios	Ingredientes opcionais
<ul style="list-style-type: none"> • Leite Integral a 3% (m m⁻¹) de gordura • Leite padronizado a 3% (m m⁻¹) de gordura • Coalho ou outras enzimas coagulantes apropriadas 	<ul style="list-style-type: none"> • Cloreto de cálcio • Cultivo de bactérias lácteas selecionadas. • Sólidos de origem láctea. • Condimentos e especiarias. • Cloreto de sódio.

Fonte: MAPA, 2001.

Segundo Perry (2004) o queijo é considerado, após processado, um produto com grande quantidade de ácido láctico, estruturado por macromoléculas contendo proteínas, lipídeos, carboidratos, sais minerais complexados e elementares de, cálcio, fósforo magnésio, além disso, estão presentes vitaminas principalmente em maior concentração o retinol (vitamina A) e as do complexo B, tiamina, piridoxina, riboflavina, ácido pantotênico por exemplo, e portanto com relevante valor nutricional como fonte de alimentação, já que as proporções de gordura e proteínas presentes podem ser comparadas a carne. Perry (2004) ainda relata, que os oligoelementos corroboram para o processamento do queijo pois atuam em etapas da coagulação da matéria prima que é o leite cru ou pasteurizado, contudo a fase líquida do leite é retirada em grande parte e aproveitada como fonte material para a produção de outros derivados alimentícios para o homem como, o iogurte, ricota e outros produtos.

Lima *et al.* (2012), relataram que apesar do QC ter origem primaria de produção na Região Nordeste, existe diferenças significativas quanto ao teor de peptídeos solúveis em água, na capacidade de formação de complexos proteicos e da formação de substâncias antioxidantes de cidades distintas nas quais foram produzidos os queijos artesanais, traduzindo-se portanto, que o processamento do leite para obter tal produto influencia essencialmente no potencial funcional que se pode ter nesse produto.

1.2.3 Umidade

A tecnologia de produção do queijo está fundamentada em como separar a fase sólida (proteínas, gordura e carboidratos) da porção líquida (soro) do leite, esta última com maior parte constituída de água e outras substâncias no estado líquido. Coagular o leite depende diretamente da etapa de acidificação, tanto na produção de queijos frescos como maturados. Esse fator é de extrema importância, porque permite menores variações de pH, com a adição direta de ácido láctico, sem deixar, portanto, que bactérias do meio possam alterar a acidez do produto com a liberação de metabólitos frequentemente produzidos. Isso é fundamental para a produção de um coalho com maior capacidade de retenção de umidade, ocasionando maior rendimento no fabrico de queijo (MACHADO *et al.*, 2011).

De acordo com Prazeres, Carvalho e Rivas (2012), a umidade é um dos principais, dentre outros fatores, que deve ser controlado na fabricação de queijo, pois o teor de umidade reflete na qualidade do produto, quando comparados em estudos de proliferação de microrganismos patogênicos ou não. Bem como, permite-se mensurar a capacidade de hidrogênios livres no meio, fator que define interferentes que podem ser formados durante o processamento da matéria prima e no produto acabado.

Diversos estudos apontam a umidade como um fator limitante na produção de distintos queijos, e para o QC não se diferencia, porquanto, para tal parâmetro existe variação, pois o QC pode assumir a classificação de média e alta umidade através de análises propostas. Apesar de existir divergências quanto ao teor de umidade encontrados, esse fator é intrinsecamente atrelado ao processamento que deve ser monitorado e controlado para que o produto seja obtido com qualidade esperada, textura, paladar adequado e não perca suas características típicas (MACHADO *et al.*, 2011; SILVA *et al.*, 2010; CAVALCANTE *et al.*, 2007).

Dos Santos *et al.* (2012) destacaram em pesquisas com queijo coalho produzidos a partir do leite de cabra, que a umidade de aproximadamente 92% favoreceu a viabilidade probiótica obtida na etapa de maturação com *Lactobacillus acidóphillus*.

Segundo Nassu *et al.* (2006), em um guia da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) para a produção de QC, define-se esse produto como de

média a alta umidade após o completo processamento. De acordo com Viana *et al.* (2011) o percentual de umidade interfere no rendimento da produção, demonstrando, portanto, diferenças na textura, quantidade de pasta e aromas distintos encontrados no produto final, em experimentos envolvendo o processamento com cepas de *Lactobacillus ssp* (acidófilos) e *Lactobacillus ssp* (aromáticos), para obter o QC. Alguns fatores incluindo a umidade encontrada na faixa de 46 a 54,9 % estavam dentro dos valores percentuais especificados na legislação que orienta sobre a qualidade do QC, a IN nº 30 do MAPA, quando comparados ao processamento industrial elucidado por Nassu *et al.* (2006).

1.2.4 Substâncias iônicas

A presença de íons é essencial na produção de QC, pois estes interferem na solubilidade, pH, consistência e aparência do produto final, a exemplo do cálcio, que é o elemento de maior presença neste tipo de derivado do leite. A ocorrência do cálcio se deve tanto da origem da matéria prima quanto do processamento do queijo, nesse caso, da adição de cloreto de cálcio 50 %, como ingrediente no fabrico do queijo antes da etapa de segregação da parte sólida da líquida. Logo, obtém-se uma massa com maior dureza ao ser formar o complexo paracaseinato de dicálcio, solúvel quando submetidos à alta temperatura e na presença de ácido láctico, essa solubilização é conferida por formar paracaseinato de monocálcio em solução salina de cloreto de sódio e água moderadamente quente (CAVALCANTE *et al.*, 2007).

Os íons possuem papel fundamental no processo de fabricação de todos os tipos de queijos, pois esses elementos estão presentes no leite, empregado como matéria alimentícia e insumo principal. Esses estando dissolvidos, solubilizados ou em sua forma sólida de sais, devido as suas propriedades, são capazes de atribuir valores nutricionais e estruturais a determinado queijo como o de coalho (COPPA *et al.*, 2011; BENJAMIM *et al.*, 2010; CAVALCANTE *et al.*, 2007).

Os regulamentos sobre qualidade do QC mencionam o cloreto sódio e de cálcio, como coadjuvantes opcionais dos requisitos de produção na composição desse produto. Outras normas citam como estudo, os limites de sódio em queijo como mozzarella, prato, minas frescal e parmesão, sem, portanto, levar em consideração o QC como forma de alimento a ser controlado e regulamentado em relação ao limiar

de sódio presente na sua composição final. Assim como, há regulamentos vigentes para rotulagens de alimentos que não especificam o padrão de rotulagem dos queijos. Bem como existem normas para controle de oferta, propaganda, publicidade e informação e outras práticas correlatas cujo objetivo seja a divulgação e a promoção comercial de alimentos considerados com quantidades elevadas de sódio, que mais uma vez não contemplam os queijos, pois são considerados intrínsecos a este alimento (BRASIL 2015; 2010; 2003; 2001).

Diversos estudos dos quais, Bezerra *et al.* (2016), Bemfeito *et al.* (2016) e Han *et al.* (2011) citaram o cálcio como elemento a ser adicionado na produção de queijos antes do processo de coagulação do leite ou maturação. Pois, na forma de cloreto de cálcio age como facilitador ou em conjunto com ácido láctico e fermentos, como cofator que permite separação de fases do leite, e confere maior quantidade de caseína precipitada presente no queijo.

Lima *et al.* (2012), destacaram outras propriedades como o aumento da biodisponibilidade de zinco para o organismo, uma vez que a absorção intestinal desse elemento é afetada por diversos fatores relacionados a dieta, que incluem o aumento da concentração de proteínas, cálcio, fosforo e outras substâncias, bem como a complexação de elementos com caráter metálico. Além disso, o zinco desempenha um papel fundamental em conjunto com várias enzimas que colaboram para a divisão celular, expressão gênica envolvidas nos processos fisiológicos de crescimento celular e desenvolvimento da transcrição gênica. Os pesquisadores ressaltaram ainda, que péptidos fosforilados são traduzidos a Alfa s1-, Alfa s2- e β -caseína podendo formar complexos solúveis com minerais como, cálcio e ferro em pH intestinal, modulando portanto biodisponibilidade. Esses péptidos atuam como solubilizantes de minerais e são conhecidos como caseinofosfopeptídeos (CPPs), sendo liberado "in vitro" ou "in vivo" pela atividade de enzimas presentes em produtos lácteos ou durante o processamento.

1.2.5 Potencial Hidrogeniônico

Segundo Perry (2004) a variação da diminuição do pH a determinados valores permite maior rendimento no processo de produção de queijos, e, portanto, reduzindo o tempo de fermentação do leite e da concentração de coagulante necessário a

segregação de fases. Além disso, a reação de hidrólise exercida por peptidases, para a formação de paracaseína, sendo conseqüentemente essencial para o processamento da coalhada. Portanto, a autora ressalta uma importante etapa da produção de queijos, em que o controle do pH ótimo, permite a ativação enzimática, pela modulação do ponto isoelétrico (pH 4,5) das proteínas em sua constituição bioquímica do leite, que juntamente com a temperatura e o teor de cálcio, possibilitam a agregação de micelas e precipitação das estruturas sólidas da matéria prima na fase de coagulação.

Mamede *et al.* (2010) realizou uma análise apurada de parâmetros físico-químicos cujos valores de pH foram monitorados devido à presença de bactérias produtoras de ácido láctico, esse ácido foi titulado nos estudos com NaOH 0,1 M, e o resultado foi descrito em percentual de ácido láctico, para avaliar o quanto esse fator interferiu nas propriedades sensoriais do produto final, quanto a consistência, textura, elasticidade, maciez e sabor.

Em análises de pH realizadas por Sousa *et al.* (2014) nos queijos comercializados na região nordeste, tanto artesanal, sem inspeção, como os industrializados inspecionados e fiscalizados, não diferiram sobremodo aos de outras pesquisas. Assim como outros fatores como atividade de água, teor de umidade e acidez percentual foram considerados no estudo como fundamentais no processamento do leite pasteurizado ou cru, para produção de QC, em vários Estados do Nordeste do Brasil, determinando, portanto, diferenças mínimas nas características de queijo para cada lugar, dependentes o não da inspeção realizada por órgão regulador. Os parâmetros elencados na pesquisa de Sousa *et al.* (2014) estão na Tabela 2:

Tabela 2 — Valores médios das análises físico-químicas do QC comercializado em seis estados da região nordeste.

Variável		ESTADOS					
		SE	CE	PI	RN	PB	PE
pH	Com Inspeção	5,68	6,21	6,23	6,20	6,04	5,56
	Sem inspeção	5,18	6,02	6,20	5,90	6,22	5,54
Umidade %	Com Inspeção	21,00	16,67	14,38	24,08	20,43	21,56
	Sem inspeção	29,38	25,33	15,00	17,86	21,33	26,36
Aa	Com Inspeção	0,91	0,91	0,91	0,91	0,92	0,96
	Sem inspeção	0,89	0,91	0,91	0,92	0,91	0,96
Acidez %	Com Inspeção	0,74	0,49	0,16	0,37	0,33	0,42
	Sem inspeção	1,01	0,64	0,12	0,40	0,31	0,60

(SE – Sergipe; CE – Ceará; PI – Piauí; RN – Rio Grande do Norte; PB – Paraíba; PE – Pernambuco; Aa – Atividade da água (água totalmente livre, disponível e presente na matriz); pH – Potencial de Hidrogênio).

Fonte: Sousa *et al.*, 2014.

Os fatores físico-químicos na produção de QC e a capacidade destes em interferir na produção, no caráter sensorial e rendimentos da fabricação, destacando pH, associado ou não a esses fatores, como umidade, temperatura, concentração de íons catiônicos e de peptídeos é um relevante critério que deve ser monitorado para obter um produto com qualidade esperada, e de melhor aceitação quanto ao aspecto, paladar, odor, aparência, capacidade de cozimento, e conseqüentemente maior aceitação de mercado, aliado a isso, à escolha e fiscalização correta da matéria-prima (DO EGYPTO *et al.*, 2013; GARCIA *et al.*, 2012; MACHADO *et al.*, 2011; MAMEDE *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2010 e PERRY, 2004).

1.2.6 Solubilidade

A solubilidade do QC é um fator a ser analisado mencionado no estudo de Bartolomeu *et al.* (2014) segundo o autor, a característica lipofílica e hidrofílica desse produto é conferida segundo sua composição química, pH, peroxidases lipídicas,

presença aminoácidos e conteúdo de água. Onde apesar do conteúdo em maior proporção conter proteínas e lipídios, outro estudo, de Everett e Auty (2008) demonstraram diversos avanços em tecnologia e desenvolvimento no intuito de aumentar o rendimento dos componentes e para melhorar a conservação de queijos. Dessa forma, a proteção do produto com nanopelículas, segundo Bartolomeu *et al.*, pode ser usada para prevenir o efeito degenerativo causado pela microbiota presente no queijo, e possivelmente a solubilização com perda de massa de queijo.

De acordo com Coppa *et al.* (2012) queijos de vários tipos são solúveis em solução salina com aquecimento até fervura, assim como em solução ácida, ou em acetato de sódio, pois ocorre prevalentemente a desnaturação de proteínas, catálise de polissacarídeos e lipídios de baixo peso molécula.

A solubilização do queijo tanto o de coalho como os de outras características semelhantes, fora investigado em relação ao perfil microbiológico da superfície e da massa interna que colonizam o produto acabado. Levou-se em consideração nas avaliações, os métodos de produção artesanal e industrial em regiões distintas, bem como os tipos específicos de leites utilizados como matéria-prima. Além disso, em pesquisas foi enfatizado, que a capacidade de formação de massa sólida de proteínas, concentração de nitrogênio total, pH e a quantidade de sal presentes na composição dos queijos são parâmetros de investigação físico-químicos atrelados a microbiota da matriz (VIEGAS *et al.*, 2010; VAZEK, MAZZA e GIORI 2010; FILHO *et al.*, 2009; SANTANA *et al.*, 2008).

A adição de culturas de microorganismos influenciam na fabricação de queijo e resulta em um maior teor de proteína solúvel e liberação de aminoácidos no primeiro dia após o processamento. Contudo, durante os 28 dias, o queijo suplementado com *Bifidobacterium lactis*, na sua forma isolada mostrou-se com maior atividade proteolítica, particularmente na hidrólise das frações alfa-s2 e kappa-caseína. Estudos analisaram ainda, a capacidade de solubilização do queijo comparados aos níveis de desencadimento da proteólise, pelos índices de nitrogênio proteico livre, não-proteico e ligados a caseína (BEZERRA *et al.*, 2016).

1.2.7 Aditivos

Aditivos são constantemente empregados em produtos processados, há casos em que a extensão da quantidade está mais pronunciada em queijos do que em outros tipos de alimentos, estabelecendo assim uma relação de dependência com tipo de alimento. O QC é regulamentado quanto aos padrões de identidade e qualidade pela IN nº 30/2001, que destaca a aplicação de aditivos a tal produto de forma industrial, parâmetros esses referidos na Portaria nº 146/96 – MAPA, que estabelece a aplicação da seguinte forma:

Poderão ser utilizados na elaboração de queijos aditivos relacionados na lista a que indica a classe de queijo para a qual ou as quais estão autorizadas. A utilização de outros aditivos poderá estar autorizada nos padrões individuais de certas variedades particulares de queijos (BRASIL, 1996, p.4).

Da lista referida pode se destacar os aditivos relacionados ao QC, por classificar-se como de média a alta umidade, a saber na Tabela 3:

Tabela 3 — Aditivos relacionados na lista a que indica a classe de queijo para a qual ou as quais estão autorizadas na Portaria nº146/96.

ADITIVO	FUNÇÃO	LIMITE MÁXIMO/ CONCENTRAÇÃO.
Nisina	Conservador	12,5 mg kg ⁻¹
Ácido sórbico e seus sais de sódio, potássio e cálcio	Conservador	1000mg kg ⁻¹ (em ácido sórbico)
Nitrato de sódio ou potássio (isolados ou combinados)	Conservador	50 mg kg ⁻¹ (em nitrato de sódio)
Carotenóides naturais, beta caroteno, bixina, nobixina, urucum, annatto, rocu	Corante	10 mg kg ⁻¹ de queijo
Clorofilina, clorofila, clorofilina crúpica, sais de sódio e potássio em clorofila	Corante	15 mg kg ⁻¹ de queijo
Lipases	Agente de Maturação	De acordo com as BPF
Proteases	Agente de Maturação	De acordo com as BPF

Fonte: BRASIL, 2006.

Penasa *et al.* (2010), destacaram avanços biotecnológicos na modificação do leite na formação β e κ -caseína, durante o processo de coagulação. Através das modificações de genótipos ocorreu uma redução no tempo de coagulação e formação coalho, traduzindo-se expressivamente como forma de melhoras na variância aditiva no tempo de coagulação do leite, e, portanto, a β e κ -caseína modificadas são importantes genótipos para melhor produção de queijo.

Queijos com aditivos probiótico foram testados por Brito *et al.* (2011) para verificar atividade dos *Lactobacillus paracasei ssp.* frente a adição do microrganismo como cultura inicial ou no princípio do cozimento do coalho para a formação da massa do queijo Gouda, produzido nesse caso com menor percentual de gordura quando comparados ao grupo controle estudado, que não foi adicionado o probiótico.

Conforme Silva *et al.* (2016) e Paumgarten *et al.* (2002), o *annatto*, um corante extraído de sementes de *Bixa orellana*, é usado como um aditivo de cor em manteiga, queijos e em uma variedade de outros alimentos, bem como em drogas e cosméticos. Ambos verificaram que não ocorreu pouco ou nenhuma alteração ou anomalia embrionária em fetos de ratos no uso deste corante em alimentos, apesar de poucos estudos serem encontrados quanto a atividade tóxica do principal pigmento carotenóide deste aditivo.

Pesquisas de Zalazar *et al.* (2002), Mistry (2001) e Reis *et al.* (2000), revelaram a capacidade de influência dos aditivos utilizados no processo de tecnologia de produção de queijos de baixo teor de gordura, cujos fatores principais alterados no produto ao final do processo estavam atrelados a consistência e durabilidade do queijo, como teor de umidade, índice de amadurecimento e maciez. Segundo os referidos pesquisadores, os aditivos podem ser inclusos para reduzir a atividade dos microorganismos que produzem enzimas e compostos responsáveis pela proteólise na matéria-prima usada na fabricação de distintos tipos de queijos de origem bovina, assim como visa preservar o conteúdo nutricional do leite empregado no fabrico do queiejo para consumo.

Zalazar *et al.* (2002), enfatiza ainda que aditivos permitem alterar as caracteirsticas sensorias de amargor, aroma e acidez através da modulação do ambiente favoravel ou não aos microorganismos produtores de ácido láctico, modificando portanto o potencial hidrogeniônico dos queijos produzidos.

Nesse contexto, de mudanças das características de acidez dos queijos, Iammarino *et al.* (2011), destacam a presença de ácido benzoico como preservante químico pela ação de alteração do pH ao ser adicionado na produção ou em sua ocorrência natural, não apenas em queijos em determinados limites, mas em diversos alimentos. Tanto Zalazar *et al.* (2002), como Iammarino *et al.* (2011) ressaltam a importância de se controlar aditivos à limites aceitáveis na produção de queijos, pois estes causam alterações expressivas sensoriais e no aspecto do produto final, bem como em sua vida útil.

1.3 CONSUMO DO QUEIJO DE COALHO

O fato de não existir um processo de fabricação de um modo padronizado artesanalmente, permite-se a adequação deste à região e forma de consumo mais empregada à cultura popular. Dessa forma, diferenças na composição físico-química, por apresentar pouca capacidade de derretimento, permitem a continuidade do formato original durante o tempo necessário a ser assado em churrasqueira. Essa diferença na capacidade de derretimento pode ser conferida às características físico-químicas do queijo como, teores de gordura, proteína, umidade, sal, pH e cálcio, e pelas alterações ocorridas durante a proteólise, a capacidade de hidratação das proteínas e distribuição dos seus componentes através da rede proteica e da interação entre os componentes (MACHADO *et al.*, 2011).

No Nordeste, o QC é consumido cru e assado em forma de pedaços ou fatias. Já no Sudeste, comercializado em espeto e preparado propriamente para churrasqueira. Forma de preparo, que através da queima de carvão vegetal pode ocasionar a formação de compostos altamente indesejáveis, como os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA), gerados no processo de pirólise, depositados na superfície do queijo (LUZ *et al.*, 2016).

Matrizes gordurosas como a do QC e outras, possuem alta afinidade química a compostos, como HPA por apresentarem elevado grau de lipofilicidade, do ponto de vista químico, favorecendo a extensão de contaminação de tais compostos em alimentos com características estruturais predominantemente lipídica (PURCARO *et al.*, 2013).

1.4 CONTAMINANTES QUÍMICOS

1.4.1 Contaminantes orgânicos e inorgânicos

O QC, assim como em outros derivados do leite, possui limites de substâncias que podem ser diferentes dos constituintes normais do produto primário. Esses compostos podem apresentar-se na composição conforme estabelece a Portaria nº 146/96, MAPA, que cita na IN nº30/01 do MAPA a forma de controle, identidade e qualidade de QC. Sobre tal Instrução Normativa fica preconizado que:

Os contaminantes orgânicos e inorgânicos não devem estar presentes em quantidades superiores aos limites estabelecidos pelo Regulamento específico (BRASIL, 1996, p.151).

Além da contaminação de queijos e de outros alimentos com substâncias orgânicas geradas pelo processamento industrial, a contaminação ambiental por elementos inorgânicos, também foi considerada pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). O órgão sanitário ao destacar limites máximos de contaminantes inorgânicos em alimentos, sendo este fato, fundamental para a fiscalização na produção de matrizes alimentícias. A agência, visa dessa forma, a proteção da saúde pública ao obter níveis máximos de poluentes, bem como níveis aceitáveis as boas práticas de fabricação, logo possibilitando estimar o risco relacionado ao consumo de alimentos contaminados. Nesse contexto, a ANVISA por meio de resolução específica, estabelece tais limites máximos de elementos inorgânicos e metais pesados em queijos como: o Arsênio(As) $0,5 \text{ mg kg}^{-1}$, Chumbo (Pb) $2,0 \text{ mg kg}^{-1}$ e Cádmio (Cd) $0,5 \text{ mg kg}^{-1}$ (BRASIL, 2013).

O fato dos metais traços permanecerem no ambiente em sua forma química inalterada, faz desses elementos como Cd, Mn, Cr e Pb serem potencialmente perigosos para saúde humana, pois esses metais complexam-se com outros compostos orgânicos permanecendo em materiais biológicos. A fonte principal de contaminação está ligada à cadeia alimentar. Tais elementos podem causar quando em altas concentrações, consequências desastrosas a saúde, por isso o controle deles é realizado em países europeus, assim como o monitoramento de sua origem,

já que, grande parte está atrelada às atividades antrópicas, como constatado em estudos realizados por pesquisadores italianos (CAGGIANO *et al.*, 2004).

Estudos de Schecter *et al.* (2010) nos Estados Unidos da América, demonstraram níveis elevados de contaminação em diversos alimentos, incluindo queijos de origem norte-americana e outros, os quais aqueles com alto teor de gordura e umidade revelaram contaminação por dicloro-difenil-tricloetano (DDT), bifenila policloradas (PCB) e compostos perfluorados, hidrocarbonetos derivados da pirólise de matéria orgânica, bem como organoclorados de diversas espécies, muitos não identificados pela estrutura química, caracterizando portanto, risco de exposição frequente da população americana consumidora tanto de leite como do queijo. Contaminantes esses, com elevado grau carcinogênico, causadores de distúrbios endócrinos e genotóxico.

Holderbeke *et al.* (2014) relataram em seus estudos, extensa contaminação em alimentos, principalmente em óleos vegetais, peixes, produtos embutidos, condimentos, vegetais, derivados do leite semidesnatados ou com alto teor de gordura, e de queijos por ftalatos de distintas origens e formações. Os mais investigados foram os ftalatos provenientes do desprendimento de embalagens e do processamento típico de cada produto ou naturalmente presentes nas amostras coletadas contendo, dimetilftalato (DMP), ftalato de dietilo (DEP), ftalato de diisobutilo (DiBP), ftalato de di-n-butilo (DnBP), benzilbutilo ftalato (BBP), ftalato de dicitlo-hexilo (DCHP), ftalato de di (2-etil-hexilo) (DEHP) e di-octil ftalato (DnOP).

A Agência Europeia em Segurança de Alimentos, através de um relatório técnico, registrou preocupantes dados em casos de uso do propionato de sódio e de potássio em alimentos envasados, incluindo queijos e outros derivados do leite. Segundo a autoridade sanitária, alguns limites são aceitáveis em alimentos, já que, a substância é considerada como aditivo de propriedades principalmente conservante. Porém, usado indiscriminadamente pode atingir níveis tóxicos para o organismo humano, e portanto a autoridade sanitária destacou diversos estudos reportando níveis relacionados não só ao propionato de sódio, mas também na sua forma de ácido propiônico em quantidades elevadas em muitos alimentos (EFSA, 2016).

Ao considerar contaminantes orgânicos, deve-se propor em discussão a exposição pelo consumo de bioacumuladores, como hidrocarbonetos e outros compostos cíclicos derivados tanto do processamento industrial, como de

subprodutos da queima de combustíveis fósseis, além de pesticidas, concentrações não-típicas de substâncias inorgânicas e elementos como Cádmio (Cd), Cromo (Cr), Ferro (Fe), Potássio (K), Sódio (Na), Fósforo (P), Zinco (Zn), Manganês (Mn) e Magnésio (Mg) (KIRA; AKIKO-MAIHARA, 2007; PERRY, 2004; MICHALSKI *et al.*, 2003).

1.4.2 Poluentes Orgânicos Persistentes

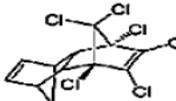
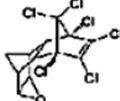
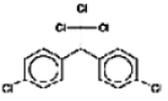
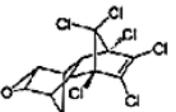
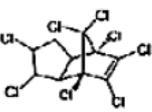
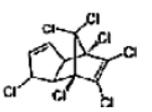
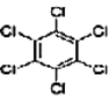
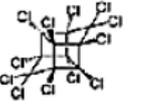
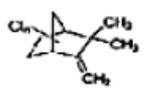
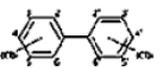
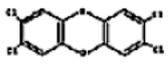
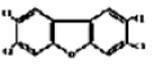
Atualmente a preocupação da comunidade científica e médica estão nos efeitos a longo prazo que os Poluentes Orgânicos Persistentes (POP) que podem ser observados no organismo humano. Dentre os mais evidentes compostos destacaram-se, os carcinogênicos, os desreguladores endócrinos, as distintas mutações que causam ao DNA, e conseqüentemente doenças degenerativas desencadeadas que no presente século tem alta prevalência em determinadas populações de vários países, atingindo números alarmantes (GASULL *et al.*, 2011; FABRE, ROTH e KERGARAVAT, 2005; D'AMATO, TORRES E MALM, 2002).

De acordo com Casull *et al.* (2011), POP são produtos químicos gerados sinteticamente, com caráter altamente lipofílico, e possuem elevada resistência à degradação ao bioacumular-se no meio ambiente, pelos diversos veículos biológicos, tecidos de animais e de humanos, ou qualquer organismo vivo. Os autores relataram vários estudos de concentrações corporais da presença dos POP em seres humanos, bem como em amostras biológicas. Segundo eles, os seres humanos bioacumulam POPs nos diversos tecidos, mais especificamente no adiposo e hepático. Apesar das diferenças que possam existir para cada indivíduo, as concentrações na maioria dos casos das populações em todo o mundo é substancial.

Segundo Borges (2015), POP são importantes substâncias a serem controladas quanto à liberação no meio ambiente. A autora destaca que devem ser monitoradas em suas concentrações limites, pois o fato de serem estáveis, lipofílicas e bioacumuladoras em tecidos de organismos vivo, estes compostos permanecem por longos períodos na atmosfera, solo e água sem sofrerem fotólise, oxidação, hidrólise ou qualquer outro tipo de degradação que acontece naturalmente no ambiente. Segundo o estudo da pesquisadora, o avanço da tecnologia e produção industrial aumentou os

níveis desses compostos sintéticos, assim como no objetivo de extermínio de pragas e pestes de lavouras e de unidades agrícolas para melhor obtenção de alimentos ao consumo humano na utilização de pesticidas e agrotóxicos. Porém a capacidade de estabilidade química dos POP está atrelada a estrutura intra e intermolecular de formar anéis aromáticos, e caracterizar-se por um elevado grau de hidrofobicidade, como ilustrado, na Figura 2, as estruturas químicas dos 12 compostos inicialmente julgados como POP pela Convenção de Estocolmo:

Figura 2 — Os 12 compostos orgânicos sintéticos considerados como POP, segundo a Convenção de Estocolmo - Aldrina, Dieldrina, endrina, clordano, DDT, Heptacloro, HCD, mirex, Toxafeno, PCB, TCDF, PeCDF.

Aldrina		Lindrina		Diclorodifenil-tricloroetano DDT	
Diclordrina		Clordano		Heptacloro	
Hexaclorobenzeno HCD		Mirex		Toxafeno	
Bifenilapoliclorada		Dioxinas TCDF		Pentacloro-dibenzofurano PeCDF	

Fonte: Adaptado de Borges, 2015.

Os compostos orgânicos alifáticos, cíclicos, heterocíclicos, aromáticos e halogenados tem sido estudado por diversos pesquisadores do mundo. A capacidade de persistência, bioacumulação e a toxicidade ainda não são bem elucidadas. Sabe-se que organoclorados foram amplamente utilizados em lavouras europeias por muitos anos no combate a ectoparasitas, mas o seu uso encontra-se com restrições em diversos países, não só da Europa, mas também nos EUA, em toda América Central e do Sul (FLORES *et al.*, 2004; D'AMATO, TORRES e MALM, 2002).

No Brasil o uso de DDT, organoclorados, PCB e outras substâncias pesticidas e inseticidas começou na Segunda Guerra Mundial, e continuou após esta, empregando-se em diversas maneiras de combate a pragas em unidades agrícolas.

Nesse mesmo período nos EUA, estudos comprovaram que compostos organoclorados após 10 anos da Segunda Guerra permaneceram no organismo de cidadãos americanos, principalmente por causa da ingestão através de alimentos em quantidades estimadas de $0,28 \text{ mg dia}^{-1}$ (FLORES *et al.*, 2004).

Em 1985 no Brasil, por razões diversas devido ao controle de doenças importantes envolvidas na saúde pública, ficou proibido o uso de organoclorados na atividade agropecuária. Entretanto, a utilização no combate a vetores causadores da malária e leishmaniose foi permitida como medida de controle endêmico em caráter emergencial, na agricultura (FLORES *et al.*, 2004; D'AMATO, TORRES; MALM, 2002).

Além do uso permitido, porém com limites e restrições do emprego de compostos organoclorados, cíclicos, heterocíclicos e aromáticos, existe ainda a preocupação por pesquisadores sobre o mecanismo de atuação destes no organismo, o tempo que permanecem no ambiente contaminando o solo, ar e água, consequentemente vegetais e animais. Estudos estes investigados amplamente no continente Europeu (BORGES, 2015; FABRE, ROTH; KERGARAVAT, 2005).

Segundo vários pesquisadores, podem ser listados 20 ou mais compostos orgânicos com potencial toxicidade em animais e no homem, dos quais os hexacloro-ciclohexano e seus isômeros, hexaclorobenzeno, hexabromobifenilo, derivados do cloro, difeniletano (DDT, DDD, DDE) e metoxicloro, ciclodienos (heptacloro-epóxido, heptaclor, nonaclor, dieldrin, aldrin, endrin, clordano), hidrocarbonetos clorados. (D'AMATO, TORRES; MALM, 2002).

Desses compostos, ainda há alguns que não foram totalmente evidenciados em sua capacidade ou não de causar efeitos tóxicos como é o caso dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) e nitro-hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (NITRO-HPA) (BORGES, 2015; FABRE; ROTH; KERGARAVAT, 2005; FLORES *et al.*, 2004; D'AMATO, TORRES; MALM, 2002).

A contaminação de alimentos também tem sido foco de estudos e preocupação para diversos órgãos de fiscalização sanitária. Grupos de alimentos processados, como laticínios e outros, devido aos distintos processos de cozimento e técnicas de processamento, como torrefação, churrasco, grelhar, defumação, aquecimento continuamente a altas temperaturas, secagem, cozimento por aquecimento ôhmico,

contribuem para a formação de compostos tóxicos como os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPA) (LEDESMA; RENDUELES; DÍAZ, 2016).

O nível de HPA depende de fatores como distância da fonte de calor, combustível utilizado, nível de processamento, duração e método de cozimento, enquanto processos de reutilização, concentração, prensagem e armazenamento aumentam a quantidade de HPA em algumas matrizes alimentícias, como em derivados lácteos e carnes processadas (SINGH; VARSHNEY; AGARWAL, 2016; LEDESMA; RENDUELES; DÍAZ, 2016).

Foram relatados por alguns autores, que alguns fatores contribuem para formação de HPA e a concentração desses em diversos alimentos como, o processo de defumação utilizando a pirólise, o fluxo de ar no processamento, a distância e posição entre os alimentos e a fonte de calor, os produtos contendo gordura, a temperatura, o procedimento de limpeza e manutenção dos equipamentos, o desenho e estrutura da câmara de defumação são fatores importantes a serem considerados (SINGH; VARSHNEY; AGARWAL, 2016; ROSE *et al.*, 2015, ESPOSITO *et al.*, 2015).

Uma nova variável foi evidenciada em estudos com produtos defumados, o tipo de invólucro de proteção da matéria alimentícia. Um número expressivo de discussões tem sido publicadas, relativo aos principais aspectos da contaminação por HPA em produtos cárneos, e outros alimentos na história do processamento por defumação (SINGH; VARSHNEY; AGARWAL, 2016; ROSE *et al.*, 2015, ESPOSITO *et al.*, 2015).

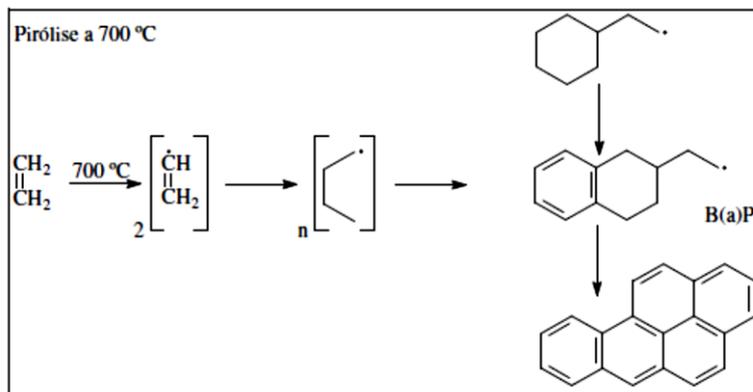
O tipo de defumação e a composição do defumado, o mecanismos de formação e veiculação de HPA em alimentos, métodos analíticos para determinação desses compostos tem sido amplamente estudados, além da determinação da concentração e da presença de HAP em produtos cárneos em todo o mundo, bem como a sua regulamentação entre diversas organizações internacionais são temas frequentemente encontrados na literatura científica (SINGH; VARSHNEY; AGARWAL, 2016; LEDESMA, RENDUELES; DÍAZ 2016).

1.5 HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS (HPA)

1.5.1 Formação e características químicas dos HPA

Os HPA por serem compostos orgânicos que fluorescem, formados por dois ou mais anéis aromáticos fundidos, podem apresentar ou não substituintes ou ramificações nas cadeias dos anéis. Em temperatura ambiente estão adsorvidos em material sólido, podendo variar desde moléculas semi-voláteis até moléculas com alto ponto de ebulição, com elevada solubilidade em solventes orgânicos que tende elevar-se com o aumento da massa molecular e em água são insolúveis. São quimicamente inertes no ambiente e estão sujeitos a reações de fotodegradação, reações oxidação, com nitração, com ácido nítrico, óxidos de enxofre, ácido sulfúrico, ozônio e radicais hidroxila e alquila (PURCARO *et al.*, 2013; REY-SALGUEIRO *et al.*, 2008). A formação de HPA pode ser demonstrada através da Figura 3:

Figura 3 — Formação de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromaticos por meio da pirólise



Fonte: Lopes e Andrade (1996 *apud* Agarcia *et al.* 2014).

Diversos estudos caracterizaram os HPA como ampla classe de compostos gerados por ação da pirólise de material orgânico, e com grande relevância na contaminação ambiental, encontrando-se frequentemente na fração orgânica de material particulado pulverizado (ISHIZAKI *et al.*, 2010; CARUSO; ALABURDA, 2008; WHO, 1998; CIECIERSKA; OBIEDZINSKI, 2010).

Os HPA podem ser classificados também conforme o número de anéis aromáticos. Aqueles com maior número de anéis aromáticos (4, 5 e 6 anéis), em geral

apresentam alta massa molar, caracterizando fontes de origem pirolíticas, enquanto que os HPA de poucos anéis aromáticos (2 e 3 anéis) são de baixa peso, e caracterizam fontes diretas derivada do petróleo. Estes apresentam maior solubilidade e potencial pouco menor de causar toxicidade aguda em organismos aquáticos (ISHIZAKI *et al.*, 2010; POLAKIEWICZ, 2008).

Além de serem formados por meio da pirolise de matéria orgânica, existem mecanismos de origens diversas não elucidadas completamente, porém sabe-se que se desencadeiam através de reações de polimerização de radicais livres em múltiplas etapas, até produzirem anéis aromáticos condensados. A formação destes compostos depende de distintos fatores como tipo de concentração de substâncias orgânicas na massa biológica, oxigênio presente disponível livremente, pressão de vapor ideal e aquecimento como forma principal de agitação molecular para formação de radicais devido a cisão inter e intramolecular. Dessa maneira a concentração de HPA aumenta de forma linear com índices de temperatura entre 400 a 1000°C (CARUSO, 2008).

De acordo com Silvério, Barbosa e Piló-Veloso (2008) espécies primárias são formadas com a pirólise, essencialmente, são produtos de eliminação simples ou de radicais formados por clivagem homolítica de ligações químicas covalentes.

Silvério, Barbosa e Piló-Veloso (2008) destacaram que se radicais dissiparem rapidamente da zona de aquecimento, estes não permaneceram em um período necessário para a reação com o material não-pirolisado ou entre si, evitando reações secundárias indesejáveis. Nessas condições, os resultados são mais reprodutíveis, o que é ideal para análises quantitativas. Se o aquecimento for lento, ou as amostras com grande extensão de matéria orgânica estiverem disponíveis, existe a probabilidade de substâncias iniciais da pirólise (radicais) reagirem entre si ou com outros compostos não-pirolisados, à medida que se difundirem fora do material que sofre o aquecimento.

Na degradação térmica de polímeros diversos e outras substâncias orgânicas, ocorrem três tipos de reações de fragmentação: a despolimerização, a cisão aleatória de cadeia e as cisões em cadeias laterais. O polietileno, como exemplo, ao ser aquecido de forma constante, produz principalmente hidrocarbonetos em grande quantidade, com diferentes números de átomos de carbono. Na cisão de cadeia hidrocarbonetos poliméricos são transformados em radicais terminais, podendo estes serem estabilizados pela eliminação de um hidrogênio molecular próximo, formando

assim um novo radical que também pode ser estabilizado de diversas maneiras, e assim sucessivamente. A cisão beta é o principal mecanismo de estabilização dos radicais. O processo acontece de modo contínuo, resultando em hidrocarbonetos saturados e insaturados, com uma ou duas ligações duplas (SILVÉRIO; BARBOSA; PILÓ-VELOSO, 2008).

Grupos laterais das cadeias principais são modificados e separados, levando a alterações na cadeia constituinte principal. Desse modo, consequências ocorrem como, o rompimento de ligações em altas temperaturas. A pirólise do policloreto de vinila, é o exemplo de maior frequência, na qual esse modo de degradação acontece. Nesse caso, ocorre a eliminação de ácido clorídrico (como grupo lateral), liberação de hidrogênio, acompanhada da clivagem da cadeia carbônica (principalmente cisão de cadeia- β), com formação de compostos aromáticos, hidrocarbonetos diversos e compostos voláteis. (SILVÉRIO; BARBOSA; PILÓ-VELOSO, 2008; PÉRÈS, VIALON; BERDAGUÉ, 2001; RADOVIC; GOODACRE; ANKLAM, 2000).

Esses produtos foram caracterizados por pesquisadores, através da Espectrometria de Massa (EM), em um laboratório de análise de flavorizantes na França, onde foram estudados compostos formados a partir da pirólise de matéria orgânica em alimentos como o queijo. Outros estudos foram realizados para comparar o “*flavor*” de produtos de degradação do mel, antes e após a pirólise. A técnica de EM foi importante e eficiente na identificação de compostos formados através da pirólise, e na determinação de substâncias poliméricas (SILVÉRIO; BARBOSA; PILÓ-VELOSO, 2008; PÉRÈS, VIALON; BERDAGUÉ, 2001; RADOVIC; GOODACRE; ANKLAM, 2000).

Simulações em escala laboratorial testada por Kmita *et al.* (2017), verificaram a degradação térmica complexa de aglutinante comercial. A escolha de uma resina como material base foi o fenol-formaldeído endurecido por uma mistura de ésteres orgânicos. Os produtos de degradação identificados obtidos durante as experiências variaram de acordo com mecanismo utilizado para realizar a pirólise. Nos testes denominado, lento, compostos simples tais como: CO, CO₂, NH₃, H₂O, fenol e metano foram gerados. Durante a pirólise a (500, 700, 900 e 1100 °C) principalmente fenol e seus derivados, metil e etil, bem como benzeno foram gerados, além de HPA diversos, terem sido encontrados e determinados por Kmita *et al.* (2017), os produtos da pirólise

formados em relação ao aquecimento, dependiam da temperatura e duração do processo de degradação.

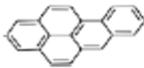
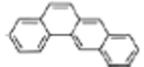
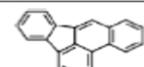
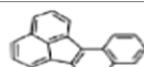
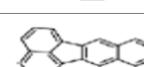
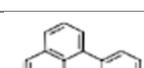
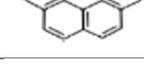
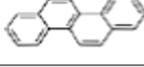
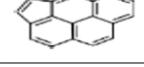
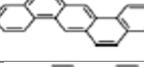
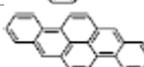
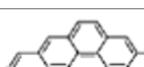
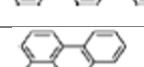
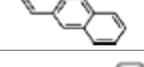
A técnica de Pirólise acoplada a Cromatografia em fase Gasosa e Espectrometria de Massas CG-EM, segundo Le Quéré e Molimard (2002), tem sido amplamente utilizada na caracterização de compostos aromáticos, pois através dos dados obtidos da análise sobre tais substâncias foi possível determinar a identidade de queijos pelo sabor e odor gerados de tais produtos. Os autores relataram que a produção de substâncias aromáticas características de amostras de queijos foram pirolizadas a 500°C.

Em pesquisas com o polietileno de alta densidade e uma biomassa (amostras de caule em pó) verificou-se após a pirólise das matérias primas contendo material orgânico e constitutivamente formados de hidrogênio e carbono, a formação de benzeno, tolueno, xileno, etilbenzeno, hidrocarbonetos e indeno (KMITA *et al.*, 2016; ZHANG *et al.*, 2015).

No estudo constatou-se diferenças expressivas na concentração dos compostos formados, devido a diferença de temperaturas testadas no pirolisador. De acordo com a investigação realizada, à 650 e 700°C observou-se por CG-EM grande quantidade de hidrocarbonetos, olefinas e compostos aromaticos diversos, quando comparados a outras temperaturas testadas, 500, 550, 600 e 800°C (KMITA *et al.*, 2016; ZHANG *et al.*, 2015)

Na Tabela 4, em estudo realizado por Ledesma, Rendueles e Díaz *et al.* (2016) sobre a presença de HPA em alimentos, apresenta-se a descrição de alguns destes compostos identificados por nome, abreviação, massa molecular e estrutura química conforme a União Europeia estabelece como principais a serem monitorados.

Tabela 4 — Identificações dos HPA: abreviação, massa molecular e estrutura química.

HPA	ABREVIÇÃO	MASSA MOLECULAR	ESTRUTURA QUÍMICA
Benzo[a]pireno	BaP	252	
Benzo[a]antraceno	BaA	228	
Benzo[b]fluoranteno	BbF	252	
Benzo[j]fluoranteno	BjF	252	
Benzo[k]fluoranteno	BkF	252	
Benzo [ghi] perileno	BghiP	276	
Criseno	Ch	228	
Ciclopenta[cd]pireno	CPP	226	
Dibenz[a,h]antraceno	DBahA	278	
Dibenzo[a,e]pireno	DBaeP	302	
Dibenzo[a,h]pireno	DBahP	302	
Dibenzo[a,i]pireno	DBaiP	302	
Dibenzo[a,l]pireno	DBalP	302	
Indenol[1,2,3-cd]pireno	IP	276	
5-metilcriseno	5MeCh	242	
Benzo[c]flureno	BcF	216	

Fonte: LEDESMA *et al.*, 2016

1.5.2 HPA em alimentos

A ocorrência de HPA tem sido observado em alimentos devido a poluição ambiental (ROSE *et al.*, 2015; WHO, 2005), sendo de maior frequência quando existe o processamento dos alimentos e o cozimento (assar, grelhar e fritar) (ZHANG *et al.*, 2010), com base nisso, diversos estudos têm voltado o foco quanto a presença de HPA em uma diversidade de matrizes alimentícias (VEIGA *et al.*, 2014; SILVA *et al.*, 2011; MARTORELL *et al.*, 2010; REY-SALGUEIRO *et al.*, 2008).

O *International Agency for Research on Cancer* (IARC) publicou em anos anteriores características relevantes como fontes de exposição dos HPA, no consumo de certos tipos de alimentos como, cereais torrados e carnes grelhadas. Os níveis analisados em alimentos, de benzo (a) pireno e de outros HPA produzem efeitos carcinogênicos aos seres humanos. Sendo observado indícios significativos de que alguns destes compostos, incluindo o benzo (a) pireno, induzem a formação de tumores no trato digestivo, quando administrados via digestiva em animais experimentais (IARC, 2010).

Sabe-se através de pesquisas neste campo, que o processo térmico de alta intensidade pode iniciar a pirólise de compostos orgânicos gerando HPA em alimentos ou devido a um efeito cumulativo de HPA presente na fumaça produzida por meio da combustão incompleta de diferentes agentes térmicos, o que é relevantemente observado no processamento de carne quando se frita, assa ou tosta, colaborando para a produção de compostos traços de alto grau mutagênico ou carcinogênico (YEBRA-PIMENTEL *et al.*, 2015).

Verificou-se na Holanda a presença de dezessete HPA nos principais grupos alimentícios que fazem parte da dieta da população, sendo a ingestão de açúcar e correlatos uma das maiores fontes de HPA. Nesses produtos foi observada uma elevada concentração de criseno, equivalente a $36 \mu\text{g kg}^{-1}$ (CARUSO e ALABURDA, 2008).

Análises de dezesseis HPA em aguardente da cana revelaram resultados indicativos da presença de HPA, em concentrações variáveis em grupos de amostras, os compostos aromáticos encontrados em maior concentração foram antraceno, pireno, benzo (a) antracito, crise no, benzo (g, h, i) perileno e benzo (a) pireno (BETTIN; FRANCO, 2005).

A presença de HPA em queijos dos mercados da Ilha da Espanha, foi avaliada por pesquisadores em alimentos que perceberam uma concentração moderada em 54 amostras de queijo, cujo composto predominante foi o benzo (a) pireno de 4,8 mg g⁻¹, aproximadamente o dobro da concentração pesquisada em amostras de leite (LUZARDO *et al.*, 2014).

A identificação da presença de HPA em queijos defumados realizada por Gol *et al.* (2015), demonstraram que o processo de defumação determina a característica de sabor, odor, cor e textura de vários tipos de queijo. Entretanto, nesse processo há vários fatores que podem afetar e potencializar a formação de HPA, como a temperatura, o tipo de combustível, a concentração de oxigênio livre e o tipo de defumação (OZCAN *et al.*, 2011; ESPOSITO *et al.*, 2015).

Existem evidências da presença HPA em queijo Circassiano defumado e não defumado disponíveis em mercados turcos. Os HPA de maior predominância e de maior concentração foram naftaleno e acenafteno. Já o benzo (a) pireno, foi encontrado em 90% e 30% das amostras de queijo defumado e não defumado, respectivamente (GUL *et al.*, 2015).

A determinação da concentração de em amostras de queijo defumado Herreño foi demonstrada pela comparação com amostras de queijo não defumado. Em tal estudo avaliou-se a interferência da altura em que os queijos permanecem nos defumadores. Foram detectados nos queijos defumados benzo (a) antracito, crise no + trifenileno em todas as amostras defumadas e especialmente naquelas onde os queijos foram colocados exatamente na pluma da fumaça (GUILLÉN *et al.*, 2011).

De acordo com Luz *et al.* (2016), foi demonstrado limites da presença de HPA em diversos alimentos e água em países Europeus, nos Estados Unidos e no Brasil, os quais foram estipulados por sua respectivas agências reguladoras ambientais e sanitárias, conforme mostrado na Tabela 5.

Tabela 5 — Limite de HPA em alimentos de diversos países.

Paises	HPAs	Limite	Alimento
(1) Alemanha, Austria, República Tcheca, Eslováquia, Italia e Polónia	B[a]P	$1\mu\text{g.kg}^{-1}$	Alimentos defumados
(1) Alemanha (Germany society for fat Science)	HPAs totais/HPAs de massa molecular elevada	$25\mu\text{g.kg}^{-1}$ e $5\mu\text{g.kg}^{-1}$	Alimentos defumados
(2) Itália (Italian ministry of health) e Espanha (Concil regulation, ordem 25 de julio 2001)	I[1,2,3-c,d]P, B[g,h,i]P, B[e]P, B[b]F, B[a]A, B[k]F, B[a]P, e DB[a,h]A	$2\mu\text{g.kg}^{-1}$ e $\Sigma = 5\mu\text{g.kg}^{-1}$	Resíduos de óleo de oliva
(3) União europeia (Directive 98/83/EC)	B[b]F, B[k]F, B[g, h,i]P e I[1,2,3-c,d]P	100ng.L^{-1}	Água potável
(4) União europeia (Directive 98/83/EC)	B[a]P	$10,0\text{ng.L}^{-1}$	Água potável
(5) União europeia (Directive 83/388)	B[a]P	$0,03\mu\text{g.kg}^{-1}$	Alimentos defumados
(6) EUA (Snack food association, SFA)	B[a]P B[a]A	$10\mu\text{g.kg}^{-1}$ $20\mu\text{g.kg}^{-1}$	Aromas, aromatizante e condimentos
(7) Brasil	B[a]P	$0,7\mu\text{g.kg}^{-1}$	Água envasada

Fonte: Venturini Filho (2011 *apud* Luz *et al.* 2016).

Os HPA ao serem formados durante o processamento industrial e doméstico de alimentos, na forma de churrasco, defumação, secagem em alta temperatura, assar, cozinhar, fritar ou grelhar, bem como no processo direto de aquecimento utilizado na produção de alguns óleos de origem vegetal e, em particular, o óleo do bagaço da azeitona (extrato da pasta de azeitona após prensagem inicial), podem resultar em níveis elevados de HPA. Medidas de controle adequadas podem evitar a formação destes compostos, juntamente com a conscientização sobre o modo como os HPA são formados em alimentos (FSAI, 2015; IARC, 2012).

Níveis máximos (NM) de HPA foram estabelecidos em determinados alimentos, por exemplo, em carnes defumadas, produtos carneos defumados, peixes e derivados, óleos e gorduras, através do Regulamento da Comissão Europeia n.º 1881/2006, fixando portanto, níveis máximos de contaminantes químicos nos gêneros

alimentício. Essa medida foi realizada a fim de reduzir os efeitos adversos sobre a saúde dos consumidores de tais produtos (FSAI, 2015).

A *Food Safety Authority of Ireland (FSAI)*, demonstrou que os NM de HPA não estão sendo excedidos, conforme rotinas de vigilância em alimentos. Segundo ela, e outros organismos responsáveis pela segurança alimentar irlandesa, incluindo o Serviço de Saúde Ambiental, e analistas de laboratórios públicos do *Health Service Executive (HSE)* e o Instituto Marítimo, verificações regulares dos níveis de HPA na cadeia alimentar são realizadas com periodicidade. Os resultados dessas verificações revelaram que os níveis de HPA em alimentos na Irlanda são geralmente baixos e, são considerados como de menor risco à saúde para o consumidor irlandês, embora ocasionalmente tenha sido observado elevados níveis em alguns alimentos (FSAI, 2015).

Em pesquisas realizadas com extratos de azeite virgem relatadas por Moret e Conte (2000), concentrações consideráveis de HPA foram quantificadas. O método utilizado pelos autores permitiu a análise direta de amostras de óleo após diluição simples com pentano para evitar a sobrecarga da coluna de Cromatografia Líquida (LC) com triglicerídeos. De acordo com os autores, os limites de detecção de vários HPA ficaram cerca de 20 ppb no modo de varredura completo e cerca de 0,5 ppb com monitoramento seletivo de íons.

De acordo com estudos recentes, os HPA podem estar presentes como poluentes orgânicos persistentes em vários alimentos como é possível observar na Tabela 6:

Tabela 6 — Quantificações recentes de HPA em alimentos citados em diversos estudos.

Matriz	HPA	Quantificação	N (amostras analisadas)	Citado por
Óleos de canola, girassol e milho	13 HPA + (4HPA-USEPA)	17,88 $\mu\text{g kg}^{-1}$ - 38,23 $\mu\text{g kg}^{-1}$	70 amostras	MOLLE <i>et al.</i> , 2017
Peixe, carne bovina e frango defumados	(4 HPA-USEPA)	36,51 $\mu\text{g kg}^{-1}$ a 73,01 $\mu\text{g kg}^{-1}$	120 amostras	ZACHARA, GAŁKOWSKA e JUSZCZAK, 2017
Papas Industriais (prontas para crianças)	15 HPA +1 (4 HPA-USEPA)	1 $\mu\text{g kg}^{-1}$ – 7,5 $\mu\text{g kg}^{-1}$	40Kg de amostra	HUERTAS-PÉREZ, 2015
Frutas e vegetais crus	16 HPA Halogenados	0.466–0.751 ng g^{-1}	80 amostras	WANG, 2018
Leite	14 HPA + (4HPA-USEPA)	52.25 $\mu\text{g kg}^{-1}$	20 amostras de diferentes marcas	SANTONICOLA <i>et al.</i> , 2017
Arroz polido ou com casca	9 HPA	15,9 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e 45,7 $\mu\text{g kg}^{-1}$	20% da colheita de Puita -RS úmidas após irrigação	BERTINETTI <i>et al.</i> , 2018
Milho, processado por processo de secagem ou torra	7 HPA	1.0 $\mu\text{g kg}^{-1}$ a 6.8 $\mu\text{g kg}^{-1}$	30g de 22 sacos de toda colheita	DE LIMA, 2017
Canes bovina e suína grelhada	4 HPA-USEPA	0,09 $\mu\text{g kg}^{-1}$ – 0,21 $\mu\text{g kg}^{-1}$	6 kg	LEE <i>et al.</i> , 2016
Salsicha defumada e não defumada	16 HPA + (4 HPA-USEPA)	0,0003 ng kg^{-1} – 0,0015 ng kg^{-1}	10 g de 50 kg de amostras	MALARUT e VANGNAI, 2018
Queijo Herreño	17 HPA + as formas isoméricas	33.65 $\mu\text{g kg}^{-1}$	8 amostras em diferentes alturas	GUILLÉN <i>et al.</i> , 2011
Queijo Mozzarella	(4 HPA-USEPA) + BkF, dBahA	4.4 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e 26,2 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (4HPA-USEPA)	50 amostras	ESPOSITO <i>et al.</i> , 2015
Guaraná em pó	16 HPA	0.642 $\mu\text{g kg}^{-1}$ a 2.32 $\mu\text{g kg}^{-1}$	2 Kg	VEIGA <i>et al.</i> , 2014

Nota: *4 HPA-USEPA (BaA, Cry, BbF e BaP), são àqueles com maior probabilidade de serem carcinogênicos citados pelo IARC e pela USEPA como prioridade para o monitoramento em alimentos.

Fonte: Dados da pesquisa bibliográfica, 2018.

Os limites estabelecidos no regulamento n.º 1881/2006 são apresentados na Tabela 7. Outros grupos de alimentos atualmente, estão em discussão. Em 2017, a CE declarou pretender reavaliar a situação com base nas informações disponíveis afim de resultar em uma lista mais detalhada dos níveis de HPA em produtos defumados (FSAI, 2015).

Tabela 7 - Níveis máximos de HPA em determinados alimentos, conforme Regulamento n.º 1881/2006 da CE.

Produto alimentício	HPA	Nível Máximo $\mu\text{g Kg}^{-1}$
Alimentos dietéticos para fins médicos especiais destinado à bebês	Benzo (a) pireno	1,0
	Σ 4 HPA	1,0
Óleos e gorduras, exceto manteiga de cacau e óleo de côco destinado ao consumo ou uso humano direto ou como ingrediente em alimentos	Benzo (a) pireno	2,0
	Σ 4 HPA	10,0
Produtos derivados do cacau	Benzo (a) pireno	5,0
	Σ 4 HPA	30,0
Óleo de coco destinado ao consumo humano direto ou use como ingrediente em alimentos	Benzo (a) pireno	2,0
	Σ 4 HPA	20,0
Carne defumada e produtos à base de carne defumada	Benzo (a) pireno	2,0
		5,0
	Σ 4 HPA	30,0
Carne de peixe e crustáceos defumados, caranguejos (<i>Brachyura</i> , <i>Anomura</i>) e moluscos	Benzo (a) pireno	2,0
		5,0
	Σ 4 HPA	12,0
Espadins defumados enlatados, molusco (frescos, refrigerados ou congelados), carne processada termicamente	Benzo (a) pireno	2,0
		5,0
	Σ 4 HPA	30,0
Moluscos bivalves	Benzo (a) pireno	6,0
	Σ 4 HPA	35,0
Alimentos à base de cereais processado; Alimentos para bebês, lactantes e crianças pequenas	Benzo (a) pireno	1,0
	Σ 4 HPA	1,0
Fórmulas infantis, incluindo leite infantil	Benzo (a) pireno	1,0
	Σ 4 HPA	1,0

Fonte: FSAI, 2015.

1.5.3 Toxicidade dos HPA

Os HPA por incluírem compostos que variam quanto ao massa molar e números de anéis aromáticos condensados, podem ser divididos em fluorescentes

(partindo do naftaleno ao benz (a) antraceno) e os de maiores massas, como do benz (a) antraceno em diante. O perigo de contaminação por estes compostos tem importância especial em alimentos gordurosos tais como queijo e óleos, devido à característica lipofílica desses contaminantes (GUILLÉN *et al.*, 2011; BARRANCO *et al.*, 2003).

Grande parte dos HPA liberados no meio ambiente ocorrem por intermédio dos processos antrópicos, como a queima induzida de carvão, madeira, lixo municipal, emissões de indústrias (como por exemplo do: alumínio, petróleo), e atividades domésticas (EL-SHAHAWIA *et al.*, 2010).

Dados importantes relatados pela Organização Mundial de Saúde revelam a presença de HPA no organismo humano por serem altamente lipofílicos, esses compostos são dissolvidos rapidamente e transportados por lipoproteínas das membranas celulares (WHO, 1998).

Por esse motivo, a distribuição tecidual de tais substâncias é ampla, podendo ser encontradas em vários órgãos, e mais precisamente em tecido adiposo e no trato gastro-intestinal, devido a reabsorção do produto na excreção hepatobiliar. Informações do mesmo órgão indicam que os HPA podem causar efeitos sistêmicos no organismo como, anemias agudas, náuseas, vômitos, distúrbios neurológicos, letargias e dermatites diversas (WHO, 1998).

As exposições ocupacionais como por exemplo, a inalação e a absorção cutânea são as principais vias de exposição. Estudos apontam exposição de humanos a HPA, como as principais meios, a inalação da fumaça do cigarro e de poluentes atmosféricos das grandes cidades, e pela ingestão de água e alimentos (DOMINGO; NADAL, 2015; NARDOCCI, 2010).

Análises realizadas em produtos de origem aquática identificaram 12 HPA dentre eles, o benzo(a)pireno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, dibenzo(a, h)antraceno, benzo(g,h,i)perileno, fluoranteno, antraceno, benzo(a)antraceno, criseno, fluoreno, fenantreno e pireno. Foi demonstrado o nível de contaminação desses compostos nos produtos avaliados utilizando-se a técnica de Cromatografia Líquida de Alto Performace com Detector de Fluorescência (CLAE-DF) (ZHANG *et al.*, 2010). Sendo o benzo(a)pireno (BaP) indicado como cancerígeno ao homem pela *International Agency for Research on Cancer* (IARC, 2012).

A *United States Environmental Protection Agency* (USEPA) tem priorizado uma regulação e monitoramento de 16 HPA como poluentes importantes, dos quais, sete HPA são conhecidos como agentes carcinogênicos, e 4 HPA com prioridade para serem monitorados. A Agência ressalta ainda, HPA que podem ser classificados como poluentes orgânicos persistentes e bioacumuladores (PARRISH *et al.*, 2006).

A Comissão Europeia (CE) conjunto a Agência Europeia em Segurança de Alimentos (EFSA) solicitou que reexaminasse o parecer do Comitê Científico de alimentação Humana (CCAH), para que fossem levados em consideração novos dados sobre a ocorrência de informações científicas pertinentes, bem como a abordagem da margem de exposição (ME) de BaP e outra HPA ((EFSA, 2015).

O pedido dos órgãos ressaltara a importância do monitoramento de 4HPA como prioridade, e que estes não fossem, mas avaliados juntamente com BaP, desconsiderando este como marcador da espécie química, já que estudos do Comitê Científico consideraram exposição humana por cada HPA com riscos individuais para ocasionar o câncer, bem como toxicidade particular independente da presença do BaP (EFSA, 2015; 2011).

O fato da presença dos HPA no ambiente em concentrações ínfimas, foi relatado por diversos estudos em epidemiologia constatando-se que grande parte desses compostos são mutagênicos, sendo também considerados potencialmente genotóxicos e carcinogênicos para os humanos (BRODY *et al.*, 2007; LEE e SHIM, 2007; YOON *et al.*, 2007).

Organizações e agências de investigação ambiental consideraram a partir de 2001, 16 HPA que sugerem prioridade e atenção como poluentes ambientais. Alguns desses compostos têm sido relacionado ao câncer de pulmão em trabalhadores expostos à fumaça de escapamento proveniente da combustão do diesel, em contato com forno de cozimento a base de combustível derivado do petróleo e do carvão vegetal (IARC, 2012; WHO, 1998; TFOUNI, 2005).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) publicou informações referentes à avaliação realizada pelo JECFA (Comitê Conjunto FAO/OMS de Peritos em Aditivos Alimentares), relatando que 13 HPA são compostos com evidência de atuação carcinogênica e genotóxica, incluindo: benzo(a)antraceno, benzo(b)fluoranteno, benzo(j)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, criseno,

dibenzo(a,h)antraceno, dibenzo(a,e)pireno, dibenzo(a,h)pireno, dibenzo(a,i)pireno, dibenzo(a,l)pireno, indeno(1,2,3-c,d)pireno e 5-metilcriseno (WHO, 2005).

A ocorrência doméstica e industrial de HPA nos alimentos, deve-se as técnicas de preparação e processamento de alimentos ou à entrada na cadeia alimentar quando culturas ou plantas são cultivadas em solo contaminado. Também são evidenciados, formas de vida marinha como os peixes vivos em águas contaminadas (HUANG; PENNING, 2014).

Os metabólitos de HPA denominados, adutos de ácido desoxirribonucleico (DNA-HPA), são geralmente detectados por Cromatografia Líquida acoplada Espectrometria de Massa ou a imunoensaios diversos. Os riscos significativos de câncer têm sido amplamente aceitos como índices preocupantes de saúde pública, associados aos alimentos contaminados com HPA. Estudos toxicológicos demonstraram certos HPA geradores de efeitos mutagênicos, genotóxicos, teratogênicos, imunotóxicos, causadores de doenças cardiovasculares e neurológicas (HUANG; PENNING, 2014).

A literatura científica tem demonstrado que a resposta inflamatória e oxidativa ao estresse, medeiam os resultados adversos relacionados à obesidade e doenças degenerativas (ESSER *et al.*, 2014). Além disso, a inflamação sistêmica persistente relacionada a obesidade abdominal pode contribuir para o desenvolvimento da resistência à insulina e distúrbios metabólicos, condições agravadas pela presença de HPA (KIM *et al.*, 2013; ALSHAARAWY *et al.*, 2013).

Os HPA por serem POP, quando liberados da queima doméstica de carvão e madeira, da fumaça do tabaco e óleo de cozinha, podem ser a causa do elevado número de casos de doenças metabólicas (MATSUDA; SHIMOMURA, 2013; KHALIL *et al.*, 2010).

Estudos experimentais demonstraram que a exposição crônica aos HPA pode aumentar o risco de desenvolvimento do Diabetes tipo 2, por induzir a produção de citocinas pró-inflamatórias sobre as células beta-pancreáticas. Esse fator é desencadeado pelo aumento do risco de doenças metabólicas, o que foi constatado na identificação do subproduto do metabolismo dos HPA, os monoidroxi-HPA (OH-HPA ou 1-OH-HPA), ligados a ocorrência do Diabetes (HOU *et al.*, 2017; HOU *et al.*, 2016; ALSHAARAWY *et al.*, 2014; KIM *et al.*, 2013; ALSHAARAWY *et al.*, 2013).

A facilidade do organismo humano de absorver os HPA deve-se principalmente à composição das membranas biológicas, as quais possuem caráter anfótero, mas que em sua camada exterior interagem mais facilmente com substâncias lipofílicas, como os hidrocarbonetos (HOU *et al.*, 2017; GACIA *et al.*, 2014).

O acúmulo desses compostos em fígados de peixes, em glândula digestiva de crustáceos, anelídeos e moluscos, e em diversos órgãos de mamíferos e no homem foram citados em diversos estudos. Para que HPA exerçam efeitos tóxicos, faz-se necessário que estes sejam metabolizados (HOU *et al.*, 2017; GACIA *et al.*, 2014)

Na biotransformação os HPA tornam-se hidrofílicos, e geram outras substâncias como subprodutos de alta reatividade, formando epóxidos, di-idrol gerando quinonas, grupos alquílicos radicalares com carbocátions, ésteres benzílicos, tornando possível a interação com substratos endógenos como, enzimas catalisadoras de reação de síntese de membranas de diversos tecidos e na ligação com as bases nitrogenadas do DNA, bem como em receptores hormonais (GACIA *et al.*, 2014)

Os HPA e seus derivados precisam de ativação prévia das enzimas citocromo P450 do fígado no organismo humano. Essa ativação gera substâncias capazes de reagir com diversas macromoléculas, causando injúria tissular, lesão por processos inflamatórios, distúrbios imunológicos e endócrinos (COSTA, 2001).

Em estudo sobre o Diabetes e a exposição de ratos aos HPA, verificando-se nesse caso, a relação do diabetes com a exposição crônica pelo ar. Os resultados levantaram a hipótese da necessidade de desenvolver medidas de controle para reduzir o risco ao diabetes e obesidade central em indivíduos expostos ao alto nível de poluição, na qual se presencia os HPA (HOU *et al.*, 2017).

Segundo Yebra-Pimentel *et al.* (2013) o índice de absorção de HPA se deve principalmente ao tamanho da molécula (quanto maior o número de anéis aromáticos condensados), ao coeficiente de partição (lipofílico-hidrofílico), a solubilidade em líquidos biológicos, a presença de suco biliar no intestino, a dose ingerida e o conteúdo lipídico da dieta, sugerindo portanto, um ciclo entero-hepático desses compostos. Conforme Yebra-Pimentel *et al.* (2013), avaliando-se a biodisponibilidade dos HPA ingeridos com alimentos de forma experimental, demonstrou-se um aumento na faixa de 20-50% na circulação sistêmica de ratos.

Com aumento do conteúdo de componentes lipofílicos nos alimentos, a absorção de HPA no trato gastrointestinal varia por espécies, nos casos de animais testados de forma controlada em laboratório como relatado Yebra-Pimentel *et al.* (2013) e Agarcia *et al.* (2014).

O benzo (a) pireno parece ser absorvido numa relação diretamente proporcional aos alimentos com caráter de maior lipofilicidade, o que não foi evidenciado com outros HPA (AGARCIA *et al.*, 2014; YEBRA-PIMENTEL *et al.*, 2013; SHAHAWI *et al.*, 2010).

A complexidade que envolve a interação dos HPA com organismo e seus prejuízos causadores pela toxicidade, levados por uma exposição crônica a esses compostos, tem sido amplamente investigada, apesar de nenhum método ainda ter sido padronizado para o monitoramento biológico em seres humanos (GROVA *et al.*, 2017; DUEDAHL-OLESEN, 2013).

Testes em laboratoriais, revelaram a presença de 8 metabólitos na forma tetra-hidroxila de HPA (tetra-OH-HPA) ligados ao DNA, e de pelo menos 23 destes em ratos de uma mesma espécie expostos a misturas de HPA. Os metabólitos identificados por cromatografia em fase gasosa estavam diretamente relacionados ao fenantreno, criseno, benz(a)antraceno e benzo(a)pireno, enquanto o tetra-OH-HAP em 3 outros (antraceno, fluoranteno e benzo(k)fluoranteno). Não foram identificados claramente metabólitos tetra-hidroxila para naftaleno, fluoreno, benzo(b)fluoranteno, benzo(g,h,i)perileno e dibenzo(a,h)antraceno, os quais podem ser potencialmente tóxicos (GROVA *et al.*, 2017; DUEDAHL-OLESEN, 2013).

Estudos realizados pelos órgãos FSAI (2015) e IARC (2010) concluíram que o benzo(a)pireno foi o causador de tumores em todas as espécies testadas em laboratório (ratos, camundogos, hamster, cobaias, coelhos, patos, cabras e macacos). Os dados foram evidenciados pela exposição em distintas vias de absorção (oral, dérmica, inalação, intratraqueal, intretecal, intrabronquial, subcutânea, intraperitoneal, intravenosa).

O benzo(a)pireno desmontou ter um efeito carcinogênico tanto local como sistêmico, indicando iniciar a carcinogênese pela exposição cutânea em ratos, e por dose única oral em estudos de acompanhamento pré-natal e transplacentário dessas espécies (IARC, 2010)

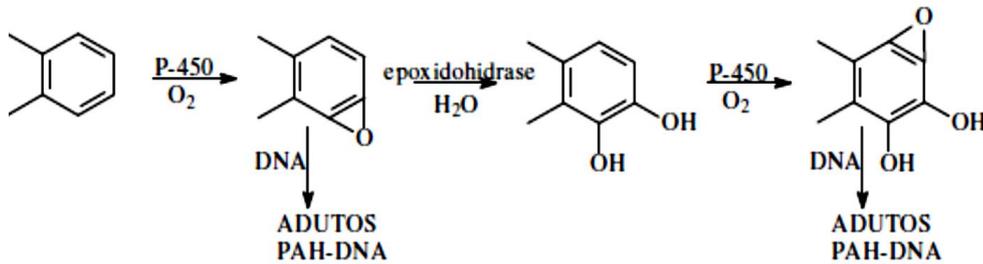
Agarcia *et al.* (2014) explicaram que a ativação enzimática dos HPA, através do processo de oxidação seguido de hidrólise. A formação de diol-epóxidos foram considerados como mecanismos e rotas metabólicas mais aceitas nas literaturas científicas.

A absorção dos HPA pelas células, é seguida por oxidação enzimática realizada pelo sistema de monoxigenases, com posterior conversão em di-hidrodióis e diol-epóxidos ao reagirem com o DNA, gerando formas genotóxicas ativas. Quatro mecanismos foram propostos na ativação enzimática dos HPA: processo de oxidação seguido de hidrólise com a formação de diol-epóxidos, produção de radicais catiônicos, hidrogenação enzimática de metabólitos di-hidrodióis produzindo quinonas, e a formação de ésteres benzílicos, por meio de uma série de reações de substituição nucleofílica e eliminação eletrofílica (AGARCIA *et al.*, 2014)

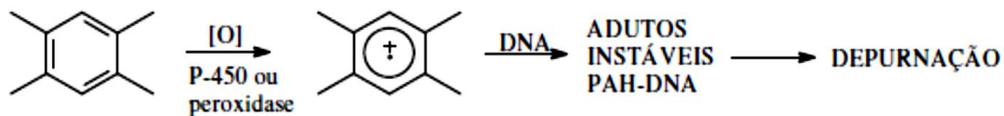
De acordo com a Figura 4 é possível perceber as interações e mecanismos relatados por Agarcia *et al.* (2014). Os HPA no organismo, e portanto, as reações que formam adutos de HPA com o DNA:

Figura 4 — Metabolismo e interação de HPA.

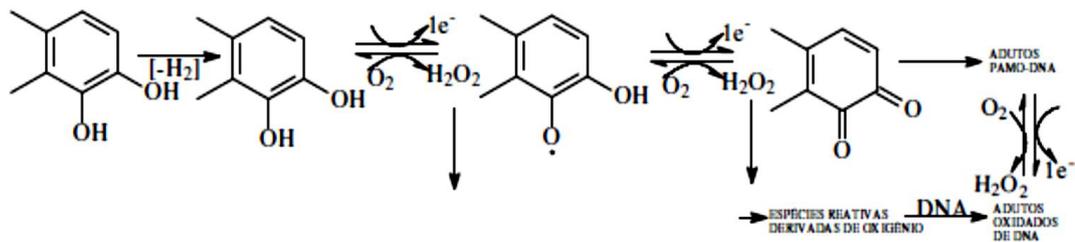
a) Mecanismo por formação de diol-epóxido:



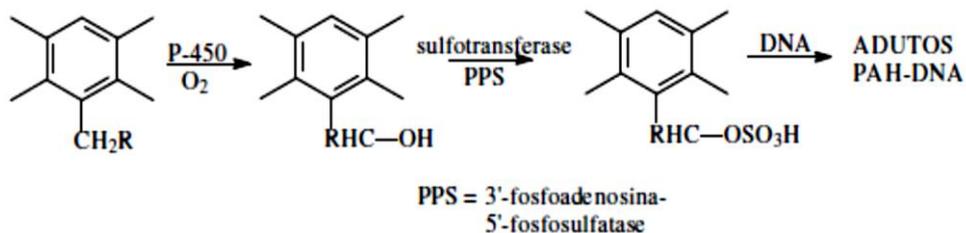
b) Mecanismo por formação de radical-cátion:



c) Mecanismo via formação de quinona:



d) Mecanismo por oxidação benzilica:



Fonte: Harvey (1996 *apud* Agarcia *et al.* 2014).

O aumento da concentração e da massa molar dos HPA (os que possuem um número maior que 4 anéis aromáticos) são mais estáveis e tóxicos, principalmente os associados as partículas no ar se devem aos maiores preocupações e estudos. Os HPA solúveis em lípideos (gorduras diversas) são essencialmente insolúveis em sistemas aquosos e quimicamente inertes. A solubilidade em sistemas aquosos diminui com o aumento da massa molar ou da condensação dos anéis aromáticos. A pressão de vapor para HPA é baixa e diminui com o aumento da molécula. O

coeficiente de partição em octanol-água possuem diferenças significativamente elevadas, indicando um potencial de adsorção parcialmente aumentado em partículas suspensas no ar, na água e de bioacumulação em organismos vivos (YEBRA-PIMENTEL *et al.*, 2013)

Conforme evidências relatadas por Duedahl-Olesen (2013) e Yebra-Pimentel *et al.* (2013), a bioacumulação dos HPA tem sido vastamente estudada, visto que, trata-se de mecanismos complexos e diversos, refletindo na forma como o homem contamina-se com essas substâncias, e conseqüentemente na evolução para os processos de toxicidade.

De acordo com Duedahl-Olesen (2013) e Agarcia *et al.* (2014), os alimentos podem ser contaminados por HPA presentes no meio ambiente, isto é, os HPA podem depositar-se sobre partículas, e dessa forma, permanecerem por exemplo em sementes de grãos e vegetais.

Segundo a pesquisa de Duedahl-Olesen (2013), substâncias como diversos HPA acumulam-se na superfície cerosa de vegetais e frutas. Para a contaminação de vegetais distintos, é possível que absorção seja do solo, modo esse, mais contraditório e pouco claro, embora estudos ambientais demonstraram que os HPA se ligaram a partículas de tamanhos variados no solo, sementes de cacau, na secagem de asfalto, em betumes expostos ao sol, ou pelo uso de processos de secagem direta em alimentos, podendo resultar na contaminação do produto final destinado ao homem após a ingestão.

Phillips *et al.* (2015) testaram a genotoxicidade pela expressão de enzimas hepáticas, e a formação de subprodutos do metabolismo. Uma mistura complexa de HPA com frações neutras de substâncias foi injetada via intravenosa em camundongos B6C3F1. Os HPA utilizados na injeção assemelham-se aos produtos de combustão incompleta de madeiras recicladas, mimetizando efeitos de sete HPA incluindo o benzo(a)pireno.

Na investigação de Phillips *et al.* (2015) foram determinados adutos de DNA que causaram o aumento da incidência de tumores diversos em camundongos machos. O estudo incluiu três diferentes doses de misturas químicas de HPA. Os valores dos picos sanguíneos de adutos de DNA (HPA-DNA) foram observados após 24 horas de intervalo. Os níveis mais altos de adutos de HPA-DNA foram exibidos em ratos administrados com BaP, assim como a maior incidência de tumor e mortalidade

observada nos grupos que receberam doses de BaP. Os níveis de aduto de DNA após três semanas foram significativamente correlacionados com mortalidade animal, e a incidência de tumores totais incluindo o de fígado e pulmão. Entretanto, apenas adutos de DNA hepático após 7 dias correlacionaram-se relevantemente as misturas de HPA como carcinógenos humanos.

Compostos carcinogênicos estruturalmente diversos ligam-se covalentemente ao DNA formando adutos, se não reparados ou destruídos pelo organismo, provocam mutações inicialmente relacionados apenas a compostos exógenos (CARVALHO, 2009).

Phillips *et al.* (2015), Agarcia *et al.* (2014) e Duedahl-Olesen (2013), em seus trabalhos relataram os mesmos HPA, (benzo(a)pireno, benzo(a)antraceno, criseno e benzo(b)fluoranteno), como principais causadores de carcinogenicidade tanto em humanos como em animais. O ponto em comum entre os autores foi a relevância abordada ao risco provável de causar tumor, não só em tecidos hepáticos, digestivos e pulmonar, mas em outros tecidos, órgãos, além da probabilidade de desregular mecanismos bioquímicos diversos, incluindo o metabolismo do DNA, como o principal.

A *United States Environmental Protection Agency* (USEPA) adicionou em seu regulamento um teste com receptor químico, que pode mediar quase todos os efeitos biológicos e tóxicos de tetraclorodibenzodioxina (TCDD) e DLCs (compostos de tipo dioxina) e diversos poluentes orgânicos persistentes. No regulamento europeu sobre os compostos semelhantes a dioxinas, o CE nº 1881/2006 da Comissão, valores do Fator de Equivalência de Toxicidade (FET) proposto foi variado em 1 a 0,00003 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ (uma faixa significativa de 33,333 entre os valores mais baixos e os mais altos). Nota-se no documento da WHO, que o conceito de FET não foi aplicado aos HPA, bem como a soma dos quatro congêneres de 4HPA (Criseno Benzo(b)fluoranteno, Benzo(k)fluoranteno, Benzo(a)pireno), e atualmente dos 8HPA (Benzo(a)antraceno, Criseno Benzo(b)fluoranteno, Benzo(k)fluoranteno, Benzo(a)pireno, DiBenzo(a,h)antraceno, Benzo(g,h)perileno, Indeno(1,2,3-c,d)pireno, sugeridos pela autoridade sanitária internacional como prioridade no monitoramento de seus níveis a serem encontrados em alimentos (WHO, 2016).

A *United States Environmental Protection Agency* subestimou a toxicidade do HPA em comparação com B (a) P. O estudo de Nisbet e Lagoy (1992), compara a toxicidade do B (a) P com outros HPA. Portanto, eles relataram que diversos HPA

possuem toxicidade muito próxima quando comparados aos efeitos do B(a)P. O que permitiu a estes pesquisadores realizar uma classificação mais fidedigna com base no valor do FET dos HAPs. A USEPA em 2010 não considerou esse parâmetro de toxicidade no documento oficial CE nº1881/2006 quanto ao valor de FET para tais compostos (USEPA, 2010)

Somente em 1992, em Massachusetts, pesquisadores atribuíram valores de FET para HPA. O estudo relacionou tanto poluentes orgânicos persistentes, incluindo os HPA, que atualmente são prioridades para o monitoramento da OMS e outros órgãos, como correlacionaram valores às possíveis misturas de HPA, classificados como carcinógenos, possíveis carcinógenos, prováveis carcinógenos e não carcinogênicos ao homem (NISBET; LAGOY, 1992).

Diante desse estudo, Nisbet e Lagoy (1992) reuniram as informações e puderam ser visualizadas nas Tabelas 8 e 9 com o intuito de demonstrar a relação do FET dos HPA individualmente com os índices percentuais de causar câncer, e os valores da dose para que tais compostos induzam a carcinogênese.

Tabela 8 — Nível da dose e o índice de tumores provocados em ratos.

Substâncias	Grupo por dose	Nível da dose (µg/ tratamento)	Incidência de Tumor
Grupo A Benzo(a)pireno	A1	3,12	9%
	A2	6,25	35%
	A3	12,5	51%
	A4	25	57%
	A5	50	77%
	A6	100	83%
Grupo B diBenzo(a,h) antraceno	B1	2,35	37%
	B2	4,7	39%
	B3	9,3	44%
	B4	18,7	56%
	B5	37,5	65%
	B6	75	69%
Grupo C Benzo(a)pireno (0,8%), Benzo(a)antraceno (1.1%), Fenatreno (46%), Antraceno(11%), Pireno(0,1%), Benzo(g,h)pireno(5%), Coroneno(1,1%).	C1	270	6%
	C2	550	8%
	C3	1100	6%
	C4	2200	4%
	C5	4400	13%
	C6	8800	5%
Grupo D	D1=A1+B1	5,5	48%
	D2=A2+B2	11	44%
	D3=A3+B3	22	61%
	D4=A4+B4	44	68%
	D5=A5+B5	88	69%
	D6=A6+B6	175	79%
Grupo E	E1=C1+D1	280	41%
	E2=C2+D2	560	55%
	E3=C3+D3	1120	61%
	E4=C4+D4	2240	72%
	E5=C5+D5	4500	68%
	E6=C6+D6	9000	82%

Fonte: Nisbet; Lagoy, 1992.

Tabela 9 — Fator de Equivalência de Toxicidade propostos individualmente por HPA e classificação carcinogênica segundo critérios da USEPA.

HPA	TEF	USEPA (1984)
Benzo(a)pireno	*5	1
Dibenzo(a,h)antraceno	1	1
Benzo(a)antraceno	0.1	1
Benzo(b)fluoranteno	0.1	1
Benzo(k)fluorantheno	0.1	1
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	0.1	1
Acenafteno	0.01	0
Acenaftileno	0.01	0
Antraceno	0.01	0
Benzo(g,h,i)perileno	0.001	0
Criseno	0.001	1
Fluoranteno	0.001	0
Flureno	0.001	0
2-metilnaftaleno	0.001	0
Naftaleno	0.001	0
Fenantreno	0.001	0
Pireno	0.001	0

*O TEF = 1 possui maior relação com altas doses de Dibenzo(a)antraceno, mas o TEF = 5 é considerado mais provável ao aplicar-se às exposições ambientais (índice de incidência de tumores relacionados as substâncias químicas menor que 25%).

Fonte: Nisbet; Lagoy, 1992.

O painel sobre Contaminantes Ambientais (CONTAM) da EFSA explorou um critério importante na determinação da toxicidade dos HPA, o fator de equivalência de toxicidade (FET) para a caracterização dos risco de misturas ou somatório dos HPA em alimentos (EFSA, 2015)

Em comparação com outros compostos, a agência ambiental americana USEPA concluiu que a inclusão das classificações e valores de FET não são cientificamente válida para HPA, devido à falta de mais dados e estudos que provem a carcinogenicidade oral dos HPA nas suas formas individuais. Além disso, com base nos valores FET atualmente proposto, a falta de novas investigações que expliquem suas distintas formas de ações e a previsão da potência cancerígena das misturas

de HPA, foi o principal motivo de não aplicar o FET como parâmetro de avaliação dos HPA na documentação técnica CE nº1881/2006 (WHO, 2016; EFSA, 2010).

Os FETs da Tabela 9 indicam a potência carcinogênica de cada composto em relação ao benzo(a)pireno. Multiplica-se portanto, a concentração verificada de HPA individualmente pelo FET indicado na concentração de produtos químicos em termos equivalentes ao B(a)P. Por exemplo, multiplica-se a concentração de Benzo(a)antraceno de $170 \mu\text{g kg}^{-1}$, quantificados em determinada amostra pelo FET (0,1), o equivalente de Benzo(a)pireno será a concentração de $17 \mu\text{g kg}^{-1}$ na amostra. Uma relação útil para identificar concentrações e classificar o potencial carcinogênico de HPA (LEE *et al.*, 2018; NISBET; LAGOY, 1992).

1.5.4 Análise química de HPA em alimentos

Muitos autores tomam como base, métodos de extração envolvendo etapas de saponificação, extração com cicloexano, por partição líquido-líquido com N, N-dimetilformamida-água (9:1, v v⁻¹) e purificação em coluna de vidro empacotada com sílica-gel, ou a extração em fase sólida para análise de HPA em alimentos (ESPOSITO *et al.*, 2015; ROSE *et al.*, 2015; GUL *et al.*, 2015; GUILLÉN *et al.*, 2011; GUL *et al.*, 2011; RATOLA; AMIGO; ALVES 2010; RATOLA *et al.*, 2006; CAMARGO; TOLEDO, 2002). Adaptações de métodos originais têm sido utilizadas para determinação dos HPA em diferentes tipos de alimentos (TFOUNI, 2005).

Segundo Purcaro *et al.* (2013) e Plaza-Bolanos *et al.* (2010), a metodologia de extração de HPA em alimentos tradicionalmente apresenta três fases, saponificação, extração líquido-líquido (ELL) e purificação através da cromatografia em coluna ou extração em fase sólida (EFS).

Purcaro *et al.* (2013) faz uma extensa revisão bibliográfica sobre as metodologias e condições de extração e purificação para a determinação de HPA em alimentos, água do mar e bebidas, permitindo obter uma visão ampla das técnicas atualmente usadas na análise química de HPA.

Plaza-Bolanos *et al.* (2010) relataram que técnicas de separação e detecção de compostos químicos por cromatografia são atualmente aplicados na determinação de HPA em alimentos e bebidas frequentemente.

Fasano *et al.* (2015) realizaram investigações sobre a presença HPA na produção de queijo mozzarella defumado. Ao separar amostras de leite e de queijo de 57 fábricas, e seguir para o acondicionamento sob refrigeração iniciou-se a hidrólise das amostras com KOH 50 % e Na₂SO₄ anidro. As alíquotas foram submetidas ao aquecimento, prosseguindo para uma extração líquido-líquido (ELL) em solventes (n-hexano, éter, e água destilada), com a separação da fase orgânica, filtrou-se com Na₂SO₄ anidro, as amostras foram purificadas em coluna de vidro empacotada com sílica, eluindo-se com éter/n-hexano 90:10 v v⁻¹, coletando 1 - 2 ml. Este volume foi evaporado com fluxo de nitrogênio à 55 °C e ressuspensão com acetonitrila (ACN) 99,9 %, e levados a análise por CLAE-DF.

O preparo de amostras de alimentos variados e a saponificação foi descrita por diversos pesquisadores, utilizando-se o KOH como agente de saponificação, seguida de filtração em Na₂SO₄ anidro (ROSE *et al.*, 2015; GUL *et al.*, 2015; PURCARO *et al.*, 2013).

A extração relatada por Wegrzyn *et al.* (2006) utilizou metanol, clorofórmio, diclorometano e acetonitrila em etapas distintas de ELL em diluições sucessivas e purificação com EFS em cartuchos de sílica de 1 g.

A etapa de purificação foi realizada por diversos pesquisadores utilizando-se coluna de vidro empacotada com sílica-gel ou alumina neutra seguida de EFS (ESPOSITO *et al.*, 2015; ROSE *et al.*, 2015; GUL *et al.*, 2015; CAMARGO *et al.*, 2011; GUILLÉN *et al.*, 2011).

Os métodos analíticos que foram propostos para o estudo na determinação de HPA em QC seguiram os princípios de pesquisas realizadas em produtos alimentícios, destacando-se as técnicas mais empregadas de preparo de amostras e extração (LI *et al.*, 2015; ROSE *et al.*, 2015; GUILLÉN *et al.*, 2011; WEGRZYN *et al.*, 2006), e a cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fluorescência (CLAE-DF) foi a técnica mais utilizada em diversos trabalhos publicados (GUL *et al.*, 2015; ESPOSITO *et al.*, 2015; YEBRA-PIMENTEL *et al.*, 2015; WEGRZYN *et al.*, 2006; ZHANG, 2010).

Segundo Fasano *et al.* (2016), a concentração de 8 HPA mais o fluoranteno e pireno em pão de páprica, queijos e linguiça mostraram que compostos inofensivos de baixa massa molar (fluoranteno e pireno) representaram a maior contribuição do total de HPA.

Os HPA mais importantes de acordo com os níveis encontrados foram os do grupo dos 4 HPA monitorados pelos órgãos regulamentadores. Os níveis dos 4 HPA mostraram porcentagens variadas, em queijo 23 à 28 % do total, já o B(a)P não excedeu os limites impostos pela União Européia (UE). Nas amostras de queijo, a contaminação por HPA foi detectada em média na casca, que representou em torno dos 100% da contaminação total (FASANO *et al.*, 2016)

Os teores médios de 4 HPA e BaP ficaram abaixo do limite estabelecido. Embora os níveis mais elevados de HPA tenham sido detectados na paprica. Em queijo e carne, segundo estimativas dos autores, a retirada da parte externa pode ser considerada uma boa prática de consumo para reduzir a ingestão de HPA em produtos defumados (FASANO *et al.*, 2016).

Diferentes matrizes foram investigadas por pesquisadores, sabe-se que para identificar HPA em alimentos são necessárias técnicas eficientes, seletivas e sensíveis para separação de compostos, assim como o uso de instrumentos analíticos apurados de acordo com a metodologia empregada (GUILLÉN *et al.*, 2011; WEGRZYN *et al.*, 2006)

A técnica de CLAE, em especial com detector de fluorescência (CLAE-DF) tem predominado no âmbito da análise, identificação e quantificação dos HPA em alimentos (LI *et al.*, 2015; ROSE *et al.*, 2015; GUILLÉN *et al.*, 2011; WEGRZYN *et al.*, 2006; GUL *et al.*, 2015; ESPOSITO *et al.*, 2015; YEBRA-PIMENTEL *et al.*, 2015; WEGRZYN *et al.*, 2006; ZHANG, 2010).

Foram constatados em estudos a importância da cromatografia líquida para o monitoramento apurado dos níveis de contaminantes persistentes em matrizes alimentícias, assim casos de estudos sobre queijo contendo HPA foram demonstrados na Tabela 10, bem como enfatizou-se um dos parâmetros analíticos essenciais, o Limite Detecção (LD) para diferentes matrizes avaliadas por distintos autores:

Tabela 10 — Limite de Detecção determinados em diferentes matrizes por diversos autores

Matriz	Fontes de HPA	Técnica de Análise	LD $\mu\text{g Kg}^{-1}$	Autores
Queijo	Defumado	CLAE-DF	0,03 – 0,90 7HPA	Pagliuca <i>et al.</i> , (2003)
Carne de porco	Processada	CLAE-DF	0,0005–0,002 7HPA	Janoszka (2011)
Café e Cha-mate	Torrefação	CLAE-DF	0,07 – 1,29 10HPA	Camargo e Toledo (2001)
Guaraná em pó	Torrefação	CLAE-DF	0,04 – 0,21 5HPA	Camargo <i>et al.</i> , (2006)
Queijo muzzarella	Processados	CLAE-DF	0,2-2,58 7HPA	Esposito <i>et al.</i> , (2015)
Pescado	Fresco	CLAE-DF	0,0048-0,0750 12HPA	Zhang <i>et al.</i> , (2010)
Queijo Defumado	Defumação	CLAE-DF	0,1-4,7 Benzo[a]pireno	Machalski e Germuska (2003)
Pão tostado	Tostagem	CLAE-DAD	0,02-5,80 11HPA	Rey-Salgueiro <i>et al.</i> , (2008)
Semente de Guarná	Torrefação	CLAE-DF	0,005-0,101 16HPA	Veiga <i>et al.</i> , (2014)

Fonte: Dados da pesquisa bibliográfica, 2018.

Em estudos com diversas matrizes alimentícias foi possível perceber as dificuldades de se encontrar métodos práticos e menos dispendiosos para extração e análise de HPA. Diversos pesquisadores relataram dificuldades analíticas para identificação de HPA em alimentos, devido tais compostos serem altamente lipofílicos, reagirem com substâncias apolares variadas, bem como adsorverem em superfícies de diversos materiais, vidrarias de laboratório e no ambiente (ESPOSITO *et al.*, 2015; NUDI *et al.*, 2007; BARRANCO *et al.*, 2003).

A bioacumulação desses compostos em matéria orgânica, um processo complexo de ser determinado, foi um dos problemas enfrentado, exigindo gastos de

solventes orgânicos demasiados para segregá-los dos interferentes químicos. Isso foi relatado como uma das enormes barreiras para se desenvolver e validar métodos eficientes de análise química na identificação e quantificação de HPA (ESPOSITO *et al.*, 2015; NUDI *et al.*, 2007; BARRANCO *et al.*, 2003).

De acordo com Vavrous *et al.* (2016), materiais em contato com alimentos tem sido alvo de investigação como fonte de vários xenobióticos para o homem. O estudo dos autores possibilitou a análise simultânea de 68 contaminantes potenciais, especificamente ftalatos, HPA, fotoiniciadores, bisfenóis e compostos polifluorados.

Compostos alvos foram isolados usando uma técnica baseada na extração ultrassônica pela mistura de acetonitrila e água, seguida por partição líquido-líquido do tipo Quechers na presença de sais inorgânicos. Os extratos resultantes foram analisados usando cromatografia gasosa e líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massa (CG-EM-EM, CLAE-EM-EM). As recuperações constatadas foram 70 -120 % alcançadas para a maioria dos analitos com níveis de 0,05, 0,2 e 1 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Os limites de quantificação (LQs) variaram de 0,0013 a 0,22 $\mu\text{g kg}^{-1}$. As misturas complexas de contaminantes atingiram os níveis de até 48 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (VAVROUS *et al.*, 2016).

As técnicas de CG-EM e CLAE-EM têm sido amplamente utilizada na análise de alguns compostos relevantes, como aminas aromáticas primárias, HPA, bisfenol A, diglicidil éter, fotoiniciadores de tinta, compostos perfluorados e ftalatos. Devido à tendência de minimização do consumo de solvente, automatização do preparo de amostras, integração da extração e a etapa de purificação tem sido observada em estudos (SANCHIS; YUSÀ; COSCOLLÀ, 2017; VAVROUS *et al.*, 2016)

A extração e tratamento de amostras pelos métodos de Extração Líquida Pressurizada, Microextração em Fase Sólida, Extração Sólido-Líquido em Ultrassom e Quechers têm sido utilizados principalmente em contaminantes de materiais em contato com alimentos. Recentes avanços nas metodologias analíticas permitiram a identificação inequívoca e a confirmação desses contaminantes usando Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massa de Alta Resolução (CLAE-EMAR) através de precisão de massa e aplicação de padrões isotópicos (SANCHIS; YUSÀ; COSCOLLÀ, 2017).

Apesar da técnica de CLAE-DF ser empregada em diversas investigações envolvendo a contaminação de HPA em matrizes distintas, e obter resultados

expressivos relativos a recuperação e separação desses composto em produtos lácteos, vegetais, carnes bovinas, peixes, alimentos embutidos, enlatados e em água potável, segundo Santonicola *et al.* (2017), Zachara, Gałkowska e Juszcak (2017), a técnica de CG-EM tem demonstrado uma técnica alternativa com melhor resultado na separação, identificação, quantificação e na investigação de complexas misturas de compostos voláteis presentes em queijos Cheddar (GAN *et al.*, 2016).

Conforme a Tabela 11 a seguir é possível perceber a aplicação da CG-EM na análise química de HPA e outros compostos aromáticos em algumas matrizes:

Tabela 11 — As recentes utilizações da técnica de CG-EM na análise de alimentos para o monitoramento de HPA.

Matriz	Analitos	Técnica de Análise	LD ng ou $\mu\text{g Kg}^{-1}$	Autores
Carne cozida	*16 HPA, aromatizantes, Benzo(a)pireno	CG-CG-EM	5 – 65 ng Kg^{-1}	Gir <i>et al.</i> (2015)
Fórmulas de alimentos infantis	*16 HPA	CG-CG-EM	50 – 75 ng kg^{-1}	Nyiri <i>et al.</i> (2017)
Carne vermelha grelhada	*16 HPA + **4HPA	CG-EM	0,01 – 0,18 $\mu\text{g Kg}^{-1}$	Rose <i>et al.</i> (2015)
Café	*16 HPA	CG-EM	3,5 – 16,4 $\mu\text{g Kg}^{-1}$	Guatemala-Morales <i>et al.</i> (2016)
Carne bovina e de frango grelhada e defumada	Benzo [k] fluoranteno (BkP), Benzo [a] pireno (BaP), Indeno [123-cd] pireno (IP) e Benzo [ghi] perileno (BghiP)	CG-DIC***	0,07 – 46,67 $\mu\text{g Kg}^{-1}$	Olatunji <i>et al.</i> (2014)
Carnes grelhada	*16 HPA	CG-EMAR***	0,15 – 0,3 ng g^{-1}	Kamankesh <i>et al.</i> (2015)
Peixe (Robalo)	Compostos voláteis, diversos derivados fenólicos, hidrocarbonetos	***MEFS-CG-EM	0,06 – 0,10 $\mu\text{g Kg}^{-1}$	Nieva-Echevarría; Goicoechea; Guillén (2017)
Queijos defumados	57 HPA	CG-EM-SIM	****29,21–739,55 $\mu\text{g Kg}^{-1}$	Guillén <i>et al.</i> (2011; 2007)

*16HPA - dibenzo (a, e) pireno; dibenzo (a, i) pireno; dibenzo (a, h) pireno; benzo (c) fluoreno; benzo (a) antraceno; ciclopenta (cd) pireno; criseno; 5-metilchryseno; benzo (b) fluoranteno; benzo (k) fluoranteno; benzo (j) fluoranteno; benzo (a) pireno; indeno (1,2,3-cd) pireno; dibenzo (a, h) antraceno; benzo (g, h, i) perileno; dibenzo (a, l) pireno.

**4HPA-USEPA—Benzo (a) Antraceno, Criseno, Benzo (b) Flureno e Benzo (a) Pireno (HPA monitorados pela USEPA, devido aos prováveis efeitos carcinogênicos).

***Detector por Ionização de Chama (DIC); Espectrometria de Massas de Alta Resolução (EMAR); Micro extração em Fase Sólida (MEFS). Modo Seletivo de Íons (SIM).

****Neste estudo apenas foram dispostos a faixa de concentração encontrada nas amostras, e não o LD.

Fonte: Dados da pesquisa bibliográfica, 2018.

2 JUSTIFICATIVA

Originalmente no Brasil, tanto a produção como o consumo do queijo de coalho (QC) predominam da região nordeste do país. Sua fabricação tem alcançado valores promissores para a economia e difundido o produto ao mercado consumidor em números expressivos, bem como em outros estados, como é observado no Rio de Janeiro a produção industrial vem crescendo.

A complexidade da tecnologia de produção do QC reside no envolvimento de diversas etapas de transformações químicas, físicas e bioquímicas interligadas. O consumo do QC tem sido observado como um produto para degustação, tanto cru como preparado de diversas formas em churrasqueiras, podendo ser assado, grelhado, tostado ou defumado.

O preparo do QC para consumo, em muitos casos, utiliza-se combustível para aquecimento o carvão vegetal. Agências reguladoras de fiscalização ambiental e de alimentos, tem apontado indício de formação e exposição humana a Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPA) em produtos alimentícios, visto que tais substâncias possuem a capacidade de provocar processos mutagênicos, carcinogênico e genotóxicos.

A contaminação por HPA gera riscos relevantes à saúde humana, pelo fato de tais substâncias serem ingeridas em alimentos processados, ou que sofreram algum tipo de preparo à alta temperatura ou através da combustão de matéria orgânica serem preparados, como é caso de defumados, tostados e grelhados.

Grande parte da contaminação humana por HPA ocorre por ingestão ou exposição cutânea frequente, fim pelo qual, estes compostos são absorvidos e distribuídos pelo organismo, reagindo facilmente, por exemplo, com a guanina presente na constituição do DNA ou formando peróxidos e epóxidos altamente reativos em diversos tecidos do corpo humano.

A prioridade na busca por métodos de identificação mais eficientes, e de quantificação química de HPA, para estabelecer limites em produtos alimentícios na Europa, tem sido de grande importância para a cadeia de fabricação, processamento, manipulação e consumo.

Assim, esta pesquisa torna-se relevante pelo fato de se buscar métodos e técnicas de química analítica, que possam identificar e quantificar os HPA que possam

ser formados pelo processamento de QC em churrasqueira, e demonstrar os possíveis níveis que possam ser prejudiciais à saúde humana baseados, nos parâmetros de regulamentação internacional e nacional .

Este estudo tem por finalidade identificar e quantificar os HPA formados após o preparo e cozimento de queijos de coalho em churrasqueira utilizando como combustível o carvão vegetal. E para tal pesquisa, utilizou-se a técnica de cromatografia gasosa com detector de espectrometria de massas (CG-MS).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAL

Identificar e quantificar HPA em amostras de QC assadas em churrasqueira por Cromatografia em Fase Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Buscar informações sobre o perfil do consumidores e vendedores de QC na cidade do Rio de Janeiro;
- Analisar diversos tempo e forma de cozimento do QC nas distâncias específica da fonte de calor;
- Avaliar e determinar a concentração de HPA e identificar estes compostos por CG-EM, formados em QC assados em churrasqueiras utilizando como combustível carvão vegetal convencional.
- Avaliar e estimar a toxicidade HPA pelas concentrações específicas encontradas nas amostras processados em churrasqueira e pelo consumo estimado de QC.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 PERFIL DE CONSUMO E COZIMENTO DO QC

Para inferir a forma, tempo e materiais utilizados no preparo do queijo coalho por vendedores ambulantes, bem como de consumidores típicos residenciais, e urbano, foi confeccionado e aplicado aleatoriamente uma pesquisa de opinião na Região Metropolitana do Rio de Janeiro, conforme a Figura 5, com a finalidade de conhecer o perfil do consumidor de QC na cidade. Os questionamentos foram relacionados no estudo como fatores. Cada fator foi questionado aos participantes.

As respostas dos participantes foram quantificadas gerando valores inferidos pela soma total. Na soma total das respostas estimou-se o percentual para cada fator pelo total de participantes. Os participantes foram escolhidos aleatoriamente e de diversas regiões da cidade do Rio de Janeiro, dos quais os vendedores foram abordados na região urbana da mesma cidade, onde existiam a maior quantidade destes. Alguns questionamentos foram inferidos em conjunto, exceto, o fator que diferencia consumidores e vendedores (campo classificado como entrevistado). A seguir a figura representa o modelo de questionário.

Figura 5 — Formulário de pesquisa de opinião sobre o consumo e preparo de QC

Questionário de Avaliação de Consumo de Queijo de Coalho	
Nome: _____	
Sexo:	<input type="checkbox"/> F <input type="checkbox"/> M
Origem/Estado: _____	
Escolaridade:	
<input type="checkbox"/> 1º grau incompleto	<input type="checkbox"/> 1º grau
<input type="checkbox"/> 2º grau incompleto	<input type="checkbox"/> 2º grau
<input type="checkbox"/> 3º grau incompleto	<input type="checkbox"/> 3º grau
	<input type="checkbox"/> pós graduação
Entrevistado:	
Vendedor <input type="checkbox"/>	Consumidor típico que assa o produto em sua residência <input type="checkbox"/>
Você consome queijos de coalho?	
<input type="checkbox"/> sim	<input type="checkbox"/> não
Como você o consome?	
<input type="checkbox"/> cru	<input type="checkbox"/> assado
	<input type="checkbox"/> outros _____
Se assado, você faz na churrasqueira com carvão ou churrasqueira a gás?	
<input type="checkbox"/> carvão	<input type="checkbox"/> gás
Quanto tempo você deixa o queijo de coalho assando? _____	

Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

4.2 ANÁLISES ESTATÍSTICA DA PESQUISA DE OPINIÃO

As informações obtidas no formulário apresentado na Figura 6 foram analisadas estatisticamente obtendo-se o valor de média e do percentual com base no total dos participantes da pesquisa. Os valores analisados foram tabulados conforme Apêndice A. Através de *software* específico foram demonstradas diferenças estatísticas entre os grupos de consumidores e vendedores pesquisados (FREITAS *et al.*, 2013; SILVA *et al.*, 2012). Com adaptações foram utilizados para as análises o *Software do Pacote Microsoft Office - Excel versão 15.0.4569/2013* integrado a *Action Stat Pro 3.4.124.1308-3*.

4.3 AMOSTRAGEM

Amostras de QC foram adquiridas em distintos comércios da Região Metropolitana do Rio de Janeiro. Os queijos foram escolhidos de uma mesma marca devidamente armazenados e transportados para o Laboratório de Análise de Alimentos e posteriormente para Laboratório de Análise Instrumental do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia, *Campus* Rio de Janeiro.

Em seguida foram executados o processo de pesagem, análise de suas dimensões e armazenadas sob refrigeração, conforme vendidos no mercado em forma de espeto, e dessa forma separados segundo o peso médio destes. As amostras também foram selecionadas em apenas um lote, não permitindo a variação do percentual de gordura total presente nos queijos, já que estes foram fatores limitantes para a análise principalmente na extração dos HPA na matriz.

Os dados sobre o percentual de gordura total, saturada, insaturada e *trans* das marcas de QC encontrados foram relacionados e estão apresentados no Apêndice B, para a escolha da marca a ser analisada como menor teor de gordura possível.

4.4 MATERIAIS

Para o preparo das amostras foram necessários inicialmente adquirir uma churrasqueira para uso no laboratório em condições controladas, carvão vegetal de apenas um lote e marca, e queijos de coalho em espeto, caixa para transporte,

recipientes para armazenamento sob refrigeração das amostras a serem preparadas, e um triturador de alimentos convencional (Mini Processador EPV - 86 Vicini).

A fim de avaliar o método mais adequado para extração dos HPA foram realizados estudos de recuperação, visando o menor gasto de solvente e maior eficiência, inicialmente seguiram-se como descrito no método de Wegrzyn *et al.* (2006). Outros métodos de extração e preparo das amostras foram aplicados nos experimentos como o de Veiga *et al.* (2015), o método de Barranco *et al.* (2003), de Nudi *et al.* (2007), Luz *et al.* (2013) e Esposito *et al.* (2015). Esse último foi o de melhor aplicabilidade, consumo de solvente e adaptação aos recursos disponíveis no IFRJ.

4.4.1 Reagentes

Etanol (EtOH) absoluto (J.T.BAKER® - México), Metanol (MeOH) (J.T.BAKER® - México), Cicloexano (C₆H₁₂) (Sigma Aldrich®), Acetonitrila (ACN) (J.T.BAKER® - México), Diclorometano (CH₂Cl₂) (J.T.BAKER® - México), todos em grau de pureza para cromatografia, Água Tipo 1 obtida de um sistema MilliQ®, Sulfato de sódio (Na₂SO₄) anidro e Hidróxido de potássio (KOH) sólido (Vetec), Padrão do Mix de 16HPA da Supelco 100 - 2000 µg mL⁻¹.

4.4.2 Utensílios e vidrarias

Tubos de Falcon de 50 ml de polipropileno, pipetas de Pasteur de tamanhos variados, papel de filtro quantitativo faixa preta, termômetro, Tubos de ensaio de 3 ml de vidro, seringas de 3 ml, filtro em cartucho de 0,22 micrômetros, funis de vidro, provetas, balões volumétricos, balões de fundo chato, pipetas micrométricas com calibração certificada e conhecida.

4.4.3 Equipamentos

Balanças analíticas e semi-analítica (OHAUS Adventurer AR:2140), Equipamento de produção de água Tipo 1 com operação em sistema MilliQ, Vórtex (Biomixer QL-901), Centrífuga (Hermle Z 446K) com rotação mínima à 10.000 rpm, Banho maria de aquecimento 120°C cuba redonda (550 Fisatom), Rota evaporador

analógico (801 *Fisatom*) acoplado ao Banho Ultratermostático (SL151 *Solab*), com vácuo e aquecedor de recipientes integrados, Concentrado de amostras tipo Evaporador com fluxo Nitrogênio (*Zymark Calipur TurboVap LV rack for 16 x 100mm*), Cromatógrafo à Gás (*VARIAN-450*) acoplado ao Espectrômetro de Massas (*VARIAN - 220 IT*) (CG-EM).

4.5 PREPARO DA AMOSTRA

Os experimentos nas churrasqueiras foram conduzidos inicialmente em laboratório, baseando-se em análises realizadas com carnes e pães, com modificações, a fim de controlar as condições e evitar interferências do ambiente (ROSE *et al.*, 2015). Entretanto, foi verificado que o efeito do exaustor da capela retirava as fuligens e fumaça onde provavelmente poderiam conter HPA, reduzindo a probabilidade de identificação e quantificação. Portanto, a maior parte das amostras preparadas em churrasqueira foram em ambiente externo. Cabe ressaltar que foi a única forma que melhor viabilizou o preparo das amostras.

As variáveis controladas foram: tipo de combustível (carvão vegetal - 1 kg); tempo de cozimento (normal, o recomendado nas instruções dos rótulos dos fabricantes; atribuiu-se valores de normalidade percentual como normal, normal mais 50% e normal mais 100%) e a distância da fonte de calor (5, 15 e 20 cm). O controle da temperatura não foi estimado, sendo esta variável dispensada nas medidas do experimento.

Os experimentos foram realizados coletando-se amostras de QC em duplicata, utilizando-se para este fim, quantidades idênticas de combustível, pastilha de álcool próprio para churrasqueira e copo descartável de polipropileno para direcionar as chamas no interior da churrasqueira, segundo hábitos observados de como vendedores ambulantes acendem e produzem a ignição para combustão do carvão. Na Figura 6 é apresentado um esquema de execução dos experimentos no preparo das amostras, onde para cada tempo foram coletadas duas amostras (2A), conforme exposto:

Figura 6 — Esquema dos experimentos em churrasqueira segundo Rose *et al.* (2015) modificado.

QUANTIDADE	TIPO DE COMBUSTIVEL	DISTÂNCIA	TEMPO DE COZIMENTO
1KG	CARVÃO VEGETAL+ ÁLCOOL LIQ. OU PASTILHA DE ÁLCOOL	5 cm	NORMAL (T) = 2A
			T + 50% = 2A
			T+100% = 2A
		15 cm	NORMAL (T) = 2A
			T + 50% = 2A
			T+100% = 2A
		20 cm	NORMAL (T) = 2A
			T + 50% = 2A
			T+100% = 2A

Fonte: Adaptado de Rose *et. al.* (2015).

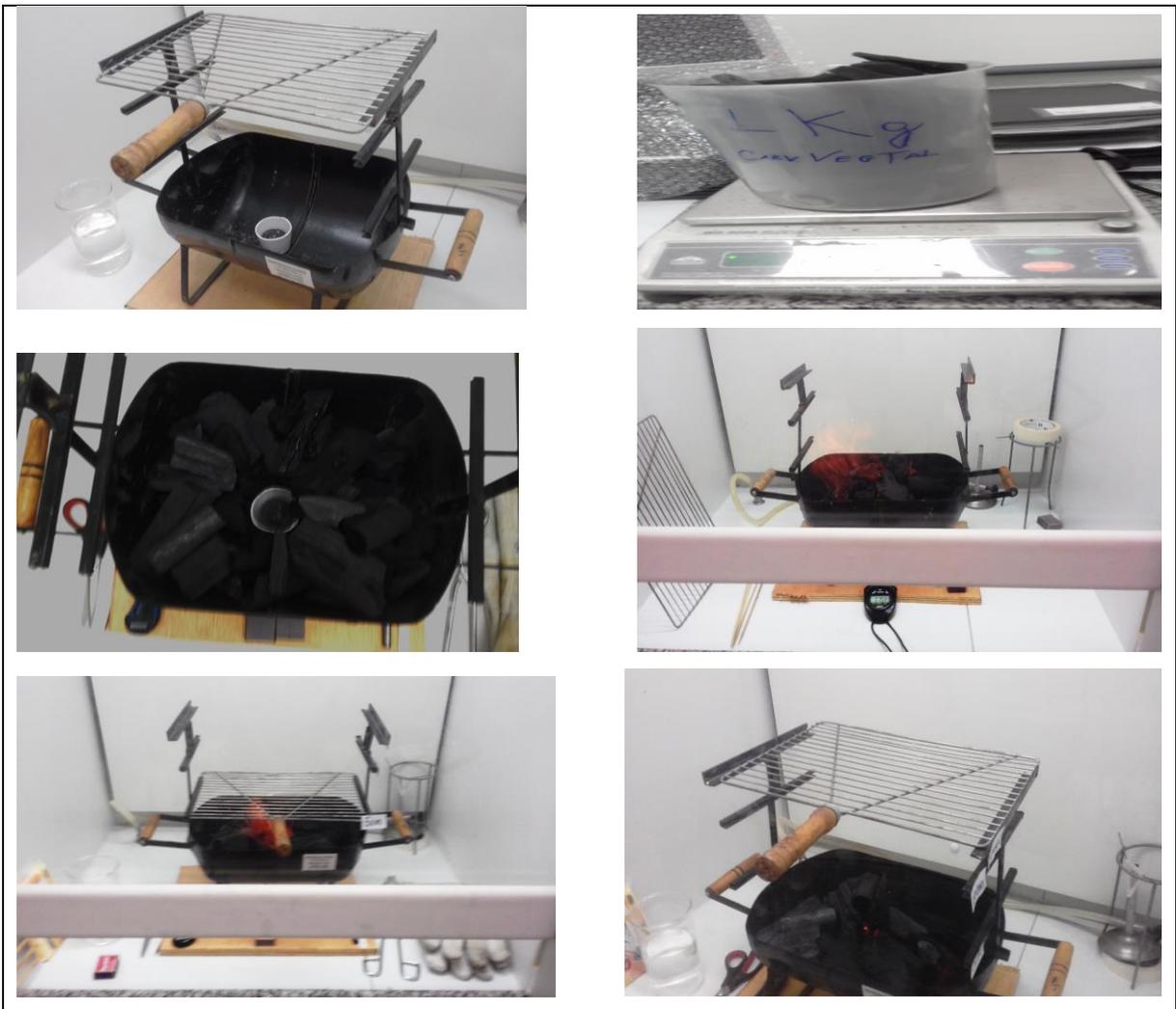
Para cada altura e tempo retiraram-se duas amostras, as quais foram trituradas em seguida. Apenas foi possível realizar os experimentos nas alturas citadas por tempo, portanto não sendo possível controlar todos os tempos. Por exemplo, realizou-se em um experimento o preparo com 2 espetos de QC nas alturas 5, 15, 20 cm sob influência do calor das chamas durante tempo normal (T), e assim sucessivamente.

Cabe ressaltar que as alturas foram estimadas de modo observacional. Diversas churrasqueiras de vendedores ambulantes apresentavam tais alturas. Ao ser adquirida a churrasqueira para o experimento com QC, também foram verificadas tais distâncias. Porém, grande parte destas apenas apresentavam uma altura. Nesse caso, foram necessárias adaptações de uma churrasqueira convencional, adquirida do comércio do comércio da região metropolitana do Rio de Janeiro, e modificada para as três alturas propostas neste estudo. Todo o processo de cozimento em grelha foi realizado segundo observado o preparo que os vendedores ambulantes efetuaram,

além disso, as informações da pesquisa de opinião também permitiram inferir tais dados para a execução do processo de preparo dos QC.

Foram elaboradas como exemplo, sequências de imagens obtidas dos testes de combustão do carvão em laboratório, bem como o preparo das amostras. Esses testes possibilitaram verificar o tempo de combustão, padrão da pirólise do carvão na temperatura alcançada, forma de preparo e comportamento das amostras submetidas ao calor das chamas emitidas do carvão, conforme demonstrado a seguir na Figura 7.

Figura 7 — Sequência de imagens do procedimento de testes de combustão com carvão vegetal e preparo final da amostra.





Fonte: Elaborado pelo autor - Laboratório de Análise de Alimentos - IFRJ, 2018.

Todos os experimentos de cozimento foram realizados conforme o seguinte protocolo:

Após acender, deixou-se aquecer por 30 minutos a churrasqueira com carvão já com o peso mensurado (1 kg de carvão vegetal), a fim de assegurar que todo o combustível mais leve seja consumido e a fonte de calor se torne uniformemente distribuída. Foi usada churrasqueira para o uso nos experimentos em alturas distintas, evitando-se qualquer contaminação cruzada. Todos os experimentos foram realizados com a churrasqueira aberta não se aplicando a forma de abafamento do queijo. Os tempos de cozimento do QC observados e adotados em todos os experimentos foram, normal (aproximadamente 10 a 15 minutos), normal mais 50 % (20 a 25 minutos) e normal mais 100 % (aproximadamente 30 a 40 minutos). Após

serem assados os queijos de coalho foram devidamente preparados para análise de HPA segundo o método de extração relatado por Esposito *et al.* (2015) com modificações. O Apêndice C confere os parâmetros das amostras, registrando quais amostras foram fortificadas com solução padrão de concentração conhecida e a técnica de cromatografia utilizada, a fim de se avaliar a recuperação do processo de extração.

4.6 PREPARO DA SOLUÇÃO PADRÃO

4.6.1 Padrão utilizado

Foi adquirida da Supelco Inc. (EUA) uma mistura de padrões de HPA, composta de 16 HPA, a saber: Naftaleno, Acenaftileno, Acenafteno, Fluoreno, Fenantreno, Antraceno, Fluoranteno, Pireno, Benzo (a) antraceno, Criseno, Benzo (b) fluoranteno, Benzo (k) fluoranteno, Benzo (a) pireno, Dibenzo (a, h) antraceno, Benzo (g, h, i) pireno, Indeno (1,2,3-c, d) pireno.

A solução de mistura de padrões possui diferentes concentrações para cada HPA, conforme Tabela 12.

Tabela 12 — Concentração de HPA na mistura do padrão da *Supelco Analytical*.

HPA	Nome	Concentração $\mu\text{g mL}^{-1}$
Nap	Naftaleno	1010
AcI	Acenaftileno	2017
Act	Acenafteno	1012
Flu	Fluoreno	200,6
Fen	Fenantreno	100,5
Ant	Antraceno	101
Fluo	Fluoranteno	199,8
Pir	Pireno	101,5
B (a) A	Benzo (a) antraceno	103
Cry	Criseno	100,6
B (b) F	Benzo (b) fluoranteno	193,4
B (k) F	Benzo (k) florentino	98,9
B (a) P	Benzo (a) pireno	105,4
D (ah) A	Dibenzo (a, h) antraceno	199,8
B (ghi) P	Benzo (g, h, i) pireno	199,7
Ind	Indeno (1,2,3-c,d) pireno	97,4

Fonte: *Supelco Analytical*, 2017.

4.6.2 Diluição do padrão

A solução padrão (Mix de 16HPA da *Supelco Analytical* 100 - 2000 $\mu\text{g mL}^{-1}$) foi adicionada em amostras trituradas a uma concentração conhecida, diluídas 1:10 em uma solução contendo os solventes ACN:H₂O (60:40). A diluição foi efetuada de acordo com a Tabela 13.

Tabela 13 — Diluição do padrão de dopagem das amostras.

Solução 16 HPA	Diluição ACN:H ₂ O (60:40)	Concentração obtida $\mu\text{g mL}^{-1}$
100 - 2000 $\mu\text{g mL}^{-1}$	*1:10	10 - 200
10 - 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$	1:10	**1 - 20

*Diluição com 100 μL do padrão de 16HPA, em 540 μL de ACN e 360 μL H₂O (1:10).

**Concentração obtida da solução de uma solução estoque e utilizada para dopagem de amostras.

Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

4.7 EXTRAÇÃO

As amostras foram coletadas em lotes iguais, e de mesma marca, transportadas em condições controladas em caixa de acondicionamento térmico, preparadas conforme descrito anteriormente. Logo após foram trituradas em micro processador convencional utilizando a parte superficial do QC assado (a casca formada), conforme método Esposito *et al.* (2015).

Pesou-se 2g das amostras em duplicata obtidas nas diferentes alturas (5, 15 e 20 cm), transferindo-se essa massa para tubos de Falcon de 50mL. Adicionou-se 100 μL da solução padrão de concentração conhecida (1-20 $\mu\text{g mL}^{-1}$) as amostras assadas, dopando-as para cada altura utilizada a fim de verificar a recuperação no processo de extração e identificação na análise cromatográfica. Destaca-se que outras amostras não foram dopadas, a fim de avaliar a concentração real de HPA gerada e adsorvida pela matriz no cozimento das mesmas.

Adicionou-se 10 mL da solução preparada de etanol hidróxido de potássio/etanol (KOH.C₂H₅OH 2M) seguida por agitação em vórtex por 1 minuto. As amostras foram aquecidas em “banho maria” a 80 °C, por 2 horas (com separação

dos constituintes da matriz). Decorrido 2 horas retirou-se do aquecimento, e foi adicionado aos tubos, 10 ml de H₂O Tipo I aguardando 5 minutos até o resfriamento das amostras.

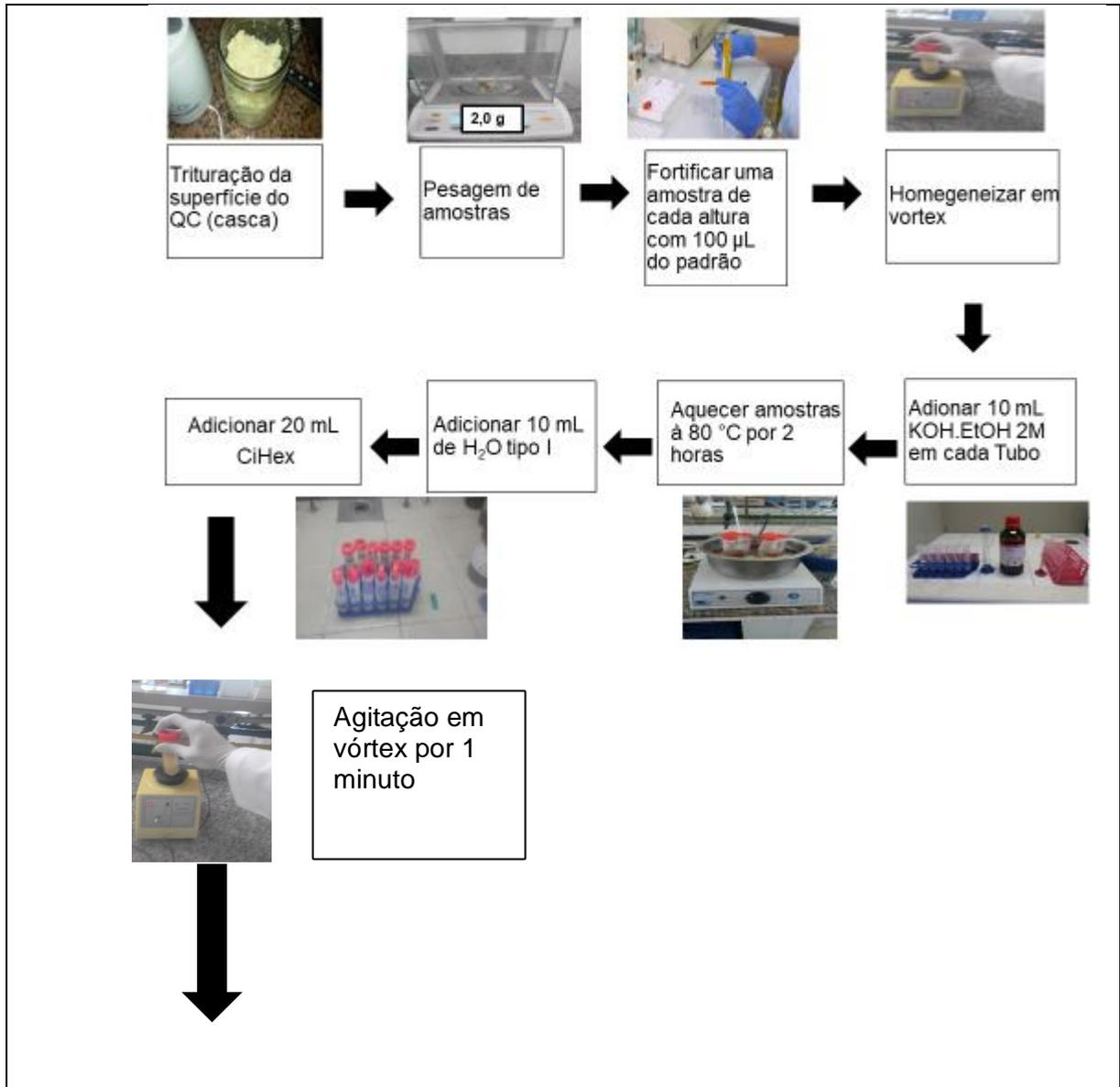
Transferiu-se para cada tubo, 20 mL de ciclohexano iniciando-se, portanto, a extração líquido – líquido (ELL) com agitação em vórtex por 1 minuto. Observou-se a separação de fases da mistura, levou-se em seguida as amostras para a centrifugação a frio (4 °C) em 10.000 rpm, por 5 minutos, repetindo-se este procedimento para cada tubo contendo a amostra 3 vezes (isto é, adição de ciclohexano, agitação em vórtex por 1 minuto e centrifugação a frio). Desta forma, a ELL foi executada 3 vezes para cada amostra. Após cada extração foi recolhido cerca de 20 mL de fase orgânica. O volume total recolhido com as três ELL, foi cerca de 60 mL, transferidas para novos tubos de Falcon.

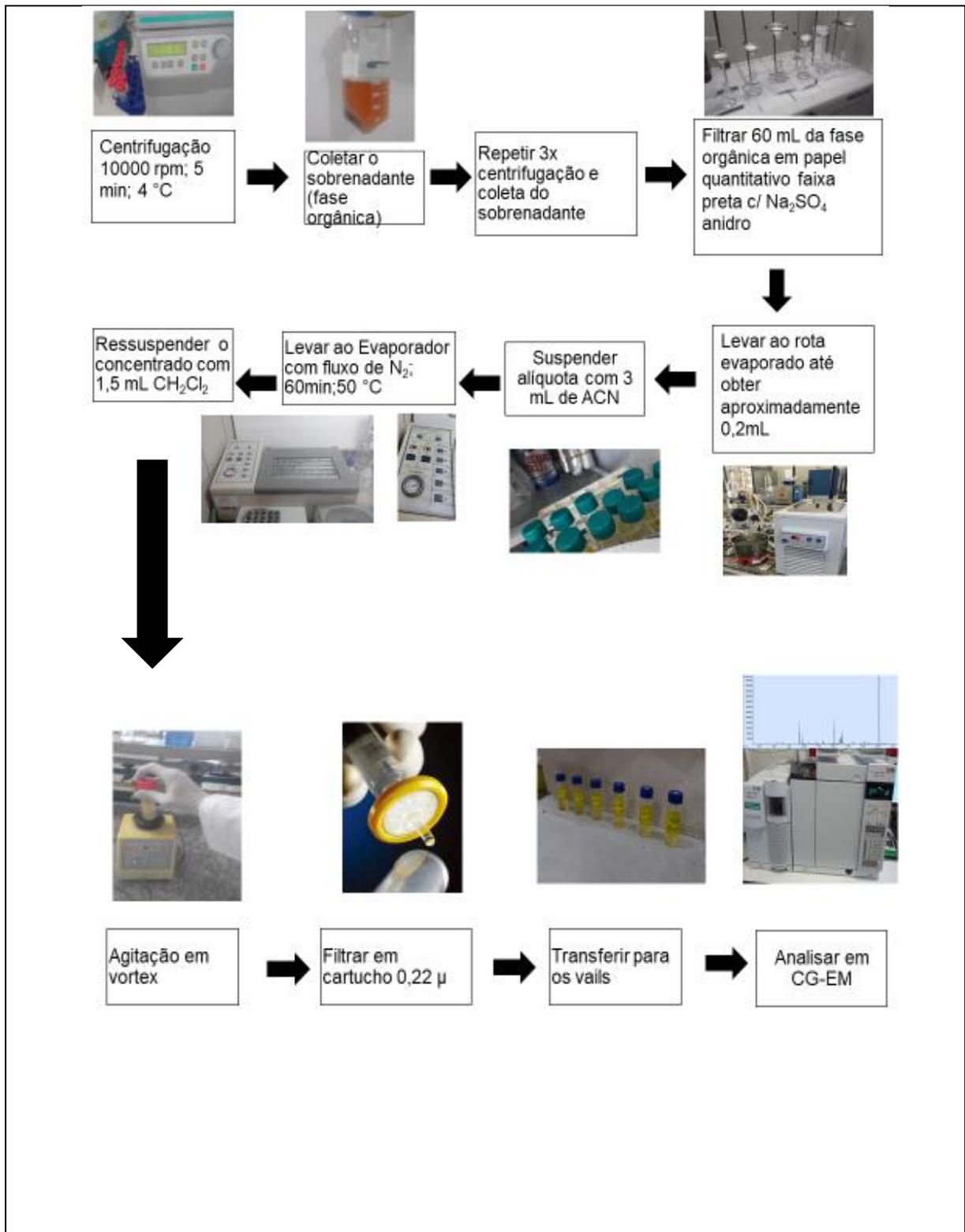
Seguiu-se o procedimento de filtração de todos os sobrenadantes em papel de filtro quantitativo, contendo 2 g de Na₂SO₄ anidro. Após a filtração de cada porção dos sobrenadantes, reduziu-se o volume do filtrado em rotaevaporador a aproximadamente 0,2 ml (120 rpm, sistema a vácuo, condensador à 4 °C e aquecimento em banho maria a 50°C em balões de fundo chato). Após rotaevaporação, os balões foram rinsados com 3 mL de ACN. O volume recolhido foi evaporado em fluxo de nitrogênio a 40 °C até a secura.

Após a evaporação, o resíduo foi ressuspenso em 1,5 mL de CH₂Cl₂, filtrado com membrana de 0,22 µm, e transferidos para vials de 1,5 mL para posteriormente serem analisados por CG-EM.

Para melhor visualização das etapas sequenciais do procedimentos de extração utilizado na investigação, a seguir demonstra-se um fluxo das atividades (Figura 8) com 3 etapas subdivididos em 20 procedimentos realizados segundo o Método Esposito *et al.* (2015):

Figura 8 — Fluxo do procedimento de extração de HPA em QC





Nota: Cabe frisar que a terceira etapa onde ocorre a suspensão com ACN, ressuspensão co Dicloro metano e utilização da técnica de CG-EM para análise, foram realizados testes e experimentos de recuperação do padrão de 16HPA nas soluções obtidas.

Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

4.8 MÉTODO CROMATOGRÁFICO

As soluções obtidas no item 5.7 foram analisadas em coluna capilar HP-5MS (5% fenil, 95% metilpolisiloxano, 30m x 250 μ m x 0,25 μ m) por cromatografia gasosa (*Agilent Technologies 7890*) acoplada a espectrômetro de massas (*Agilent Technologies 5975C*) de acordo com o método descrito na Tabela 14.

A quantificação foi realizada por padronização externa com curva de calibração em seis níveis de concentração (125, 250, 375, 500, 1000, 1250 ng mL⁻¹). Porém percebeu-se que não foi possível identificar os analitos no primeiro nível da curva, a concentração 125 ng mL⁻¹. Portanto, permanecendo apenas 5 níveis de concentração para o monitoramento. As análises foram realizadas em duplicatas.

No modo SCAN a identificação dos sinais obtidos nos cromatograma foram confirmadas através do tempo de retenção do analito, comparação dos espectros com a biblioteca (NIST Ano 2001) e por deconvolução espectral (programa *MassHunter* versão B05.00, 2008). No modo SIM, além do tempo de retenção foram utilizados três íons característicos para cada analito, de acordo com a Tabela 15.

Tabela 14 - Condições operacionais por CG-EM.

Parâmetros	Condições
Volume de Injeção	1,0 μ L
Modo de Injeção (divisão)	Split (1:100)
Gás de arraste	Hélio 4.6
Fluxo do gás de arraste	1,0 mL min ⁻¹
Temperatura da linha de transferência	300 °C
Programação do forno	70 °C por 1 min 12 °C min ⁻¹ até 210 °C 20 °C min ⁻¹ até 300 °C 300 °C por 8 min
Tempo de análise	25,167 min

Fonte: Dados da análise - IFRJ, 2018.

Tabela 15 — Monitoramento dos íons característicos de acordo com o tempo de retenção dos analitos

Tempo inicial de monitoramento (min)	Íon (s) monitorados (s)	HPA
6,33	102; 126 — 128	Naftaleno
9,35	76; 151 — 152	Acenaftileno
9,72	76; 154 — 153	Acenafteno
10,72	82.3; 165 — 166	Fluoreno
12,58	174; 176; 178	Fenantreno
12,67	152; 178.1 — 179	Antraceno
14,67	101; 200 — 202	Fluoranteno
14,99	101; 200 — 202	Pireno
16,69	226; 228; 229	Benzo (a) antraceno
16,75	226; 228; 229	Criseno
18,13	126; 250 — 252	Benzo (b) florentino
18,16	126; 250 — 252	Benzo (k) flureno
18,61	126; 250 — 252	Benzo (a) pireno
20,72	138; 274 — 276	Dibenzo (a, h) antraceno
20,78	139; 276 — 278	Benzo (g, h, i) pirileno
21,30	137.9;276 — 277	Indeno - 1,2,3(c, d) pireno

Fonte: Dados do estudo - IFRJ, 2018.

4.9 PROTOCOLO DE AVALIAÇÃO DO MÉTODO

Foi efetuada uma avaliação do método, para tal tomou-se como base alguns parâmetros necessários aos procedimentos de análises quantitativas segundo a Resolução RDC nº. 166 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde (BRASIL, 2017).

A quantificação de HPA em queijo de coalho assado foi acompanhada pelos testes de linearidade, seletividade/especificidade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão e exatidão (recuperação).

A seletividade e a especificidade se relacionam com a capacidade que o método possui de determinar um analito na presença de outros componentes da matriz, impurezas e/ou produtos de degradação. O método específico não apresenta

equivocos quanto à identificação das substâncias de interesse. A aceitação é atribuída à ausência de interferentes no tempo de retenção do analito de interesse.

A linearidade é uma avaliação da proporcionalidade entre a concentração do analito e a resposta analítica, com determinação de um modelo que se ajuste ao intervalo de concentração. Normalmente, utiliza-se uma equação linear do tipo $y=ax+b$, obtida por método dos mínimos quadrados e se faz a avaliação da homocedasticidade dos dados, isto é, homogeneidade da variância dos resíduos da curva de calibração. A aceitação é obtida quando o coeficiente de correlação é superior a 0,99 e os resíduos não apresentam valores aberrantes (*out liers*).

O limite de detecção (LD) e quantificação (LQ) teóricos foram estimados com a extrapolação das curvas de calibração em cinco níveis de concentração. Os valores foram determinados de acordo com as equações 1 e 2:

$$LD = \frac{3,3 X \sigma}{IC} \quad (1)$$

$$LQ = \frac{10 X \sigma}{IC} \quad (2)$$

onde,

σ = desvio padrão dos três valores de área em que cada reta intercepta o eixo y;

IC = média dos três valores de inclinação da curva de calibração.

A precisão (repetitividade ou precisão intra-ensaio) apresenta a variação (coeficiente de variação, CV) em torno da média de uma série de amostras com a mesma concentração, preparadas pelo mesmo analista, no menor espaço de tempo possível. A precisão interensaio ou intermediária é uma avaliação que admite maior variação do que a repetitividade por ser determinada em condições variáveis, geralmente entre dias e/ou analistas diferentes. A precisão foi determinada em duplicata para amostras preparadas nas alturas de 5, 15 e 20 cm.

A exatidão expressa o percentual de concordância entre a concentração obtida experimentalmente e o valor nominal. A exatidão, assim como a precisão, pode ser avaliada intra-ensaio e interensaio. A exatidão apresentada foi avaliada interensaio como recuperação de acordo com a fórmula calculada conforme descrito na mesma

RDC 166/17, descrita anteriormente. A equação (3) expressa o modelo matemático utilizado:

$$\% Rec = \frac{CA}{CTA} \times 100 \quad (3)$$

Onde:

%Rec.: Recuperação percentual;

CA: concentração média experimental;

CTA: concentração teórica dos analitos adicionados do padrão conhecido.

A recuperação foi calculada para cada um dos 16 HPA presentes no padrão.

4.10 CÁLCULO DE TOXICIDADE E INGESTÃO

A toxicidade dos HPA presentes no QC foi avaliada com base nos cálculos propostos por Lee *et al.* (2018) e nas recomendações da OMS e USEPA. Foi proposto por Lee *et al.* (2018) modelos matemáticos para expressar os valores que possam ser comparados com a Equivalência Tóxica estudada por Nisbert e Lagoy (1992), os quais avaliaram a Ingestão Diária Crônica (CDI) comparadas a exposição ao B (a) P, em concentrações de alto nível expressas em $\mu\text{g kg}^{-1}$ e de forma aguda em ratos de laboratório. Os estudos deles avaliaram, também, a Margem de Exposição (MOE) ao longo da vida adulta de um indivíduo, e por fim calculou-se o risco de exposição aos HPA conjunto a capacidade destes compostos em causar câncer de acordo com a expectativa de vida de uma população, dados pelo (ILCR).

Para os cálculos de CDI, MOE e ILCR foram tomados como parâmetros os dados e pesquisas do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística¹ (IBGE). A informação coletada no IBGE serviu como exemplo para avaliar o perfil populacional relativo ao nível de exposição aos HPA pela população do Rio de Janeiro e no Brasil. O estudo de Lee *et al.* (2018) ressaltou em seus cálculos informações referentes aos

¹<https://ww2.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pof/2008_2009_analise_consumo/defaulttab_zip_alimentos.shtm

coreanos, portanto para ser aplicado ao QC necessitou ser adaptado ao perfil de consumo e de utilização para os brasileiros.

O cálculo de TEQ foi realizado conforme descrito por Lee *et al.* (2018). Segundo o autor cada HPA possui um nível de toxicidade particular. Desse modo, as concentrações de cada HPA foram calculadas como equivalentes ao B(a)P, para expressar a potência tóxica relativa em comparação a esta substância, já que a mesma é conhecida e comprovada como tóxica e carcinogênica para o organismo humano.

O equivalente tóxico da concentração de B(a)P (TEQBaP – Equação 4) foi obtida através da multiplicação entre a concentração de cada HPA encontrada na análise química e o seu FET, conforme recomendado pela (FAO / WHO, 2005). A seguir representa-se o modelo matemático utilizado, já os valores obtidos foram expressos no Apêndice E:

$$TEQ_{BaP} = \sum_{i=1}^n C_i \times TEF_i \quad (4)$$

Onde [Ci], refere-se a concentração individual de cada HPA encontrada por alimento; FET é o Fator de Equivalência Tóxica Individual de cada HPA conforme descrito na Tabela 9 deste estudo.

Conforme Lee *et al.* (2018) o número de amostras por item alimentar ingerido não foram idênticos, não sendo possível afirmar o valor exato de cada item, portanto, foram determinadas as concentrações médias dos 8 HPA por item alimentar. O mesmo modelo foi adotado na avaliação da concentração de HPA em QC, calculando-se a média das concentrações obtidas entre as duplicatas das amostras para o cálculo de TEQ em $\mu\text{g kg}^{-1}$.

Para avaliar a exposição pela ingestão de HPA na dieta humana Lee *et al.* (2018) adotou o modelo de cálculo medindo a CDI. O nível diário de exposição humana aos 8 HPA foi calculado obtendo-se a soma total do nível de ingestão cumulativa ao longo da vida. Nesse sentido, para carcinogênicos conhecidos, baseou-se no pressuposto de que uma dose elevada recebida ao longo de um período curto de exposição é equivalente a uma dose baixa distribuída ao longo da vida. Portanto, para comparar adequadamente esta exposição às condições de

ingestão em nível crônico, os cálculos de CDI dos 8 HPA em QC foram necessárias as verificações de dados referentes ao peso médio dos brasileiros, anos de vida adulta e a expectativa de vida tanto da população brasileira, como a do Estado do Rio de Janeiro, verificado no censo do IBGE de 2008 à 2009, publicados em 2010. O CDI segundo Lee *et al.* (2018) pode ser calculado pela seguinte Equação 5:

$$CDI = \sum_{i=1}^n \frac{CF_i \times IR_i \times ED}{BW \times AD} \quad (5)$$

Onde:

CDI= Ingestão Diária Crônica

CF_i= Nível de TEQ total de 8HPA em alimento, em µg kg⁻¹

IR_i= Ingestão média diária de alimento, em g dia⁻¹

BW= Peso médio corporal, em kg

ED= Tempo de exposição em vida adulta, corresponde a 44,5 anos para brasileiros, que é tempo médio em vida adulta de um brasileiro de acordo com o IBGE

AD: Tempo de vida médio ou expectativa de vida média, considerados pelo IBGE, 75,9 anos de vida.

Ressalta-se que os valores adotados por Lee *et al.* (2018) estão relacionados aos perfis de vida, de biótipo e de alimentação dos coreanos, sendo, portanto, necessários modificá-los para os brasileiros. Os dados e valores referentes ao CDI apresentam-se no Apêndice E.

A MOE é a caracterização do risco em causar danos, está relacionada a Margem de Exposição proposta pela OMS (OMS, 1998), e o ILCR é tempo de vida acrescido do risco em causar câncer recomendado pela USEPA (USEPA, 1991). Esses índices foram utilizados por Lee *et al.* (2018) para avaliação do risco em causar câncer com base no nível de exposição ao longo da vida. As Equações de MOE (eq. 6) e ILCR (eq. 7) são as seguintes:

$$MOE = \frac{BMDL}{CDI} \quad (6)$$

$$ILCR = CDI \times \text{Risco do } B(a)P \text{ de causar câncer} \quad (7)$$

Onde,

BMDL= limite de confiança da menor dose, estimado experimentalmente pelo Σ 8HPA dos 0,49 mg kg⁻¹ BW dia⁻¹ (EFSA, 2008)

Risco do B (a) P de causar câncer = Determinado pela capacidade de causar câncer com base nos testes em animais, o valor fixo é 7,3 mg kg⁻¹ BW dia⁻¹

Os valores obtidos dos cálculos estão representados no Apêndice E. A EFSA USEPA propõe uma classificação quanto aos valores de MOE e ILCR conforme demonstrado nas Tabelas 16 e 17:

Tabela 16 — Faixa dos MOE segundo EFSA (2008).

MOE	
<10.000 possivelmente preocupante	
10.000 e 100.000 denota baixa preocupação	
> 100.000 implica insignificante preocupação	
> 1.000.000 significa preocupação desprezível	

Fonte: Lee *et al.* (2018).

Tabela 17 — Faixa dos valores de ILCR segundo USEPA (2005).

ILCR	
< 10 ⁻⁶	Risco aceitável ou sem consequência
10 ⁻⁶ ~ 10 ⁻⁴	Risco potencial
> 10 ⁻⁴	Sério ou grave risco

Fonte: Lee *et al.* (2018).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 PESQUISA DE OPINIÃO DE CONSUMIDORES E VENDEDORES

Os resultados a seguir foram obtidos a partir de uma pesquisa de opinião realizada de forma aleatória a grupos de consumidores e vendedores ambulantes de churrasco e de QC na região metropolitana da cidade do Rio de Janeiro. Calcularam-se as médias, desvios padrões relativos e percentuais, intervalo de confiança, baseadas nas respostas das pessoas participantes, de acordo com: a forma de consumo, local de cozimento, combustível utilizado na churrasqueira para o aquecimento, tempo de cozimento, preferências do assado, e se existe a possibilidade de misturar ou não de marcas de QC. Com base nas resposta foi possível observar fatores mensuráveis na pesquisa de opinião em duas categorias, os fatores relacionados aos participantes, bem como suas características frente aos questionamentos presentes na Figura 9, e os fatores ligados as formas de consumo e preparo do queijo de coalho representados na Figura 9.

Foi possível perceber que dos 58 participantes que responderam a pesquisa de opinião, 77,6 % são do Rio de Janeiro, 10,3 % são da Região Nordeste e 12,1 % de outras regiões do Brasil. Com isso, foi possível perceber que as origens dos indivíduos não interfere nos resultados. Dessa forma, a Figura 9 demonstra que o maior percentual de pessoas tem sua origem no Rio de Janeiro, sendo relevante, pois não foram geradas tendências de maiores consumos de QC pela presença de nordestinos na região metropolitana.

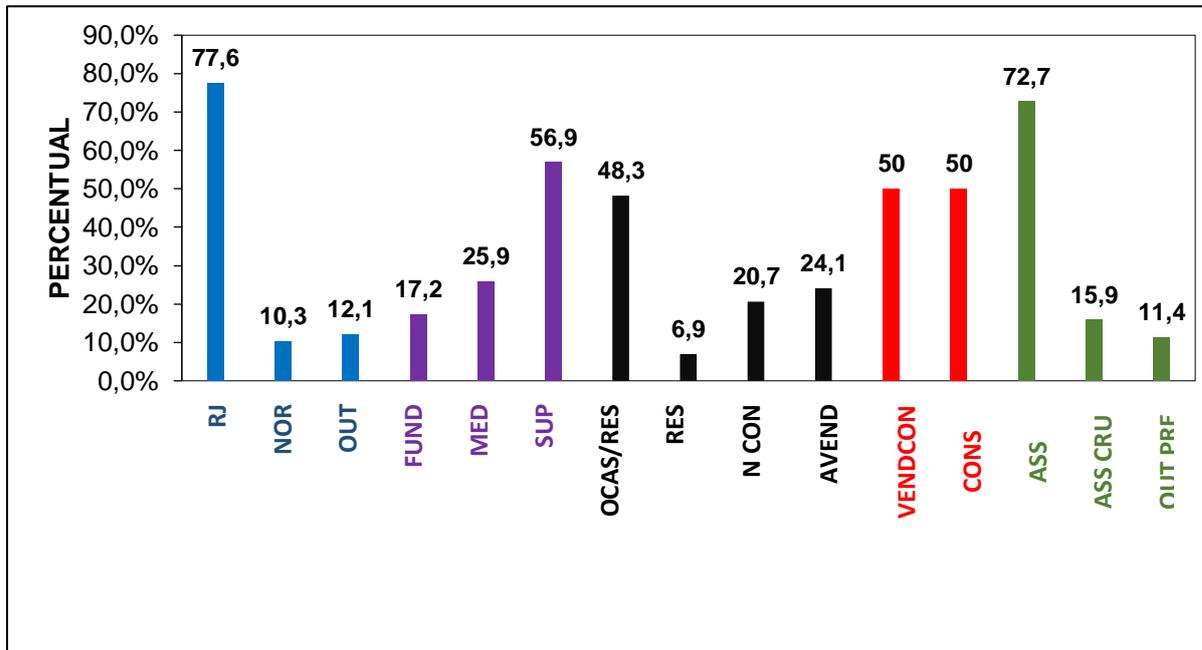
Na Figura 9, foram apresentados, ainda, os dados sobre o nível de instrução dos participantes, os quais não foram levados em consideração aos experimentos em laboratório. Apesar de demonstrarem que a maior parte dos participantes 56,90 % possuía nível superior, esse valor pode seguir uma tendência maior ligada a categoria aplicada, já que a pesquisa realizada foi de modo convencional e aleatória, não levando em consideração apenas um grupo de indivíduos. Ainda assim, os valores observados mostraram que a classe e instrução de pessoas não interfere no consumo de QC, logo, esse alimento pode estar acessível a distintos tipos de pessoas na região metropolitana do Rio de Janeiro. Contudo, os dados sobre o nível de instrução

conforme a Figura 9 não foram relevantes ao objetivo experimental proposto, servindo apenas para conhecimento aos interessados sobre o assunto.

Com o percentual de consumidores, foram possíveis inferir o perfil de consumo de QC na cidade do Rio de Janeiro. Dentre os 58 participantes da pesquisa de opinião, tanto consumidores e vendedores, 48,3 % se consideravam consumidores ocasionais. Apenas 20,7 % consomem tanto ocasionalmente (fora do convívio residencial), como preparam e consomem em sua própria residência. Somente 6,9 % consomem onde residem e 24,1 % não consomem. Já que dos 58 entrevistados, um percentual expressivo de 76 % são consumidores ainda que 48 % sejam ocasionais, o valor percentual pode ser relevante, pois existe a possibilidade do risco de maior exposição aos HPA e contaminantes que possam ocorrer em determinada população ou grupo de pessoas, se for levado em consideração o preparo do QC em churrasqueira.

Segundo a forma de consumo verifica-se através da Figura 9, que 72,7 % dos participantes da pesquisa de opinião preferem consumir o QC assado. Enquanto 15,9 % apenas não possuem preferências quanto a forma de consumo do alimento, portanto ingerem o produto tanto cru como assado. Apesar disso, um número muito próximo dos que não possuem preferências pode ser observado, 11,4 % participantes da pesquisa de opinião, que consomem de outras formas, o que não permitiu inferir se pode ou não, nesta parcela de indivíduos, ser significativa para exposição aos HPA.

Figura 9 — Dados obtidos da pesquisa de opinião sobre o perfil dos participantes.



Nota: RJ - Rio de Janeiro ; NOR - Nordeste(generalizado para todos os Estados desta região; OUT - Outros; FUND - Nível de instrução fundamental ou primeiros anos; MED - Nível médio de instrução; SUP - Nível de instrução superior; OCAS - Consumo ocasional; RES - Consumo residencial; NCON - Não consome; AVEND - Apenas vendem; VEND - Vendedores entrevistados; VEND CON - Vendedores e consumidores; ASS - preparo do QC assado; ASS CRU - preparo do QC assado e cru; OUT PRE - outras formas de preparo.

Fonte: Dados da pesquisa de opinião, 2016.

A Figura 10 representa além de outras mensurações, os dados dos questionados sobre o local de cozimento de maior preferência. A maioria dos participantes que responderam a pesquisa de opinião, 59,0 % preferem o QC preparado na churrasqueira, assim como 30,8 % tanto em churrasqueira como na chapa seja elétrica ou a gás, em alta temperatura para cozimentos e tosta, e 10,3 % responderam que somente preparam o queijo na chapa com aquecimento por resistência elétrica, bem como pelo aquecimento da chapa pela combustão do butano ou propano (gás natural para uso domiciliar). O local de preparo permite inferir que o uso da churrasqueira entre a população tanto consumidora residente, na região metropolitana do Rio de Janeiro, como consumidores ocasionais podem produzir e expor-se aos HPA, e liberá-los ao meio ambiente, sendo esta prática uma potencial fonte de contaminação de forma silenciosa. E nesse sentido, os riscos pode estar

associado a capacidade e a oportunidade de determinado grupo populacional em possuir ou adquirir uma churrasqueira, assim como a forma de acesso e conhecimento do preparo nesta modalidade.

Observa-se que um percentual relevante de 34,69 %, disseram utilizar como fonte de calor para o cozimento do QC, tanto o carvão como o aquecimento elétrico. Já 10,2% utilizam fontes elétricas, carvão e a combustão do gás natural e 2,0% apenas responderam usar apenas o gás como fonte de combustível para o aquecimento. Na Figura 10 é possível observar, também, que o combustível mais utilizado para preparar o QC é o carvão vegetal, pois 53,1% dos participantes da pesquisa de opinião utilizam essa fonte de aquecimento para o seu cozimento do QC.

Pôde-se avaliar a importância dessa análise, pois possibilita base para a prática experimental na pesquisa sobre a formação de HPA através da combustão do carvão vegetal, bem como o desprendimento destes ao ambiente seja no meio externo ou livre de confinamento, assim como a origem da contaminação por HPA nesse tipo de matriz. Ainda assim, não foi possível estimar a parcela separadamente dos 34,7 % que utilizam tanto carvão como eletricidade no aquecimento ou fonte de calor para o cozimento, pois estes indivíduos assinalaram a duas opções, mas se quantificar tal valor quanto ao uso do carvão, pode-se inferir que 88 % dos 58 entrevistados utilizam o carvão vegetal, e portanto estimar como a maior parcela dos participantes usam a combustão do carvão como fonte de calor para o preparo do QC.

Quando questionados quanto ao melhor tempo de cozimento, a maioria dos participantes da pesquisa de opinião, 56,8 % preparam o QC entre 10 e 15 min (uma estimativa pessoal). A preocupação maior se concentra não apenas para os 11,4 % que relataram preferir “bem passado”, mas sim, para os participantes que não determinaram o tempo. Nesses casos, em que não foram estimados qual melhor tempo de preparo do QC, se mais próximo ou quanto tempo exposto a fonte de calor, fica a possibilidade de melhor apurar e mensurar experimentalmente qual tempo necessário para que o QC atinja o ponto ideal para consumo, avaliando pela aparência, sabor, textura e adequação à ingestão. Apesar das respostas terem sido quantificadas, o tempo é um fator que depende da aceitabilidade no preparo e consumo, bem como está principalmente ligada as características do produto.

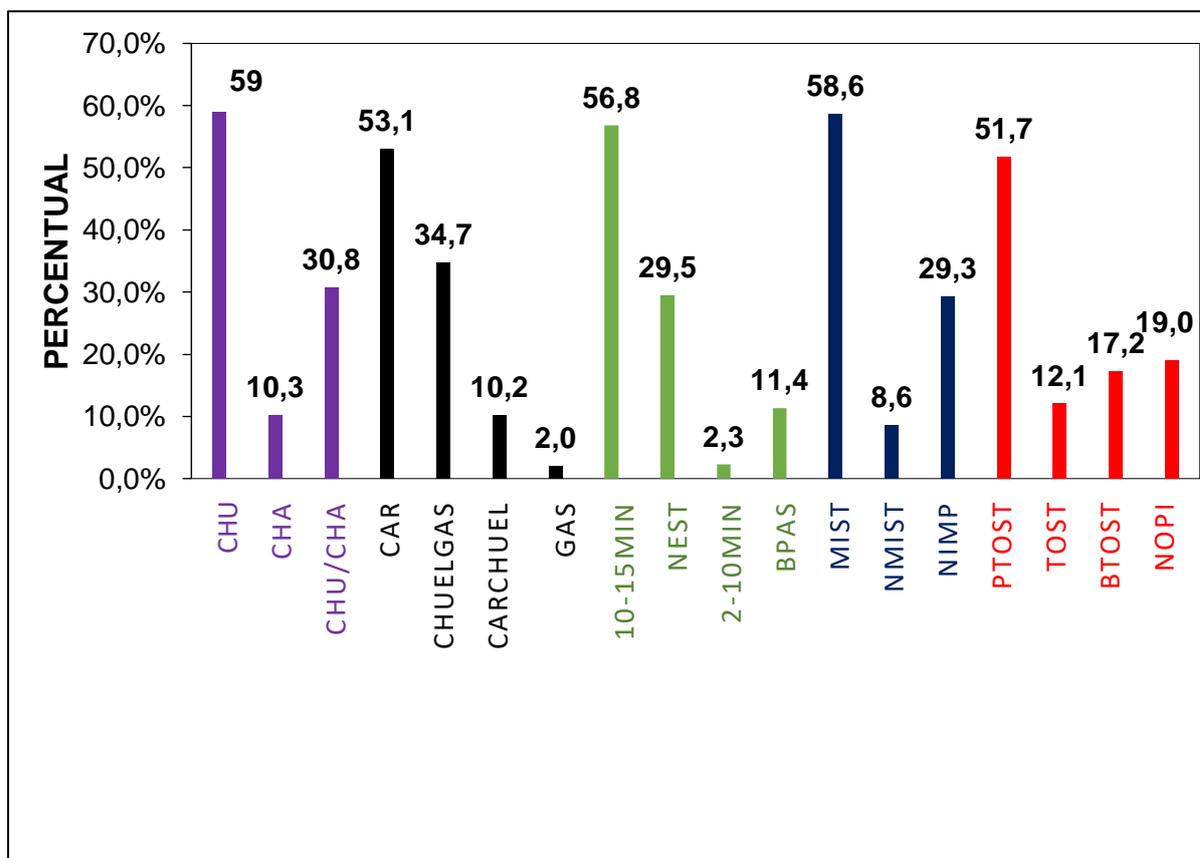
As respostas dos participantes quando questionados sobre o perfil do queijo assado para consumo, permite uma comparação com a figura anterior, pois o tempo

estimado para cozimento do queijo reflete na aparência final em que será consumido. Grande parte das respostas, 51,7 % das opiniões, representaram o que era esperado como as pessoas consomem o QC. Apesar de nenhuma recomendação ser explicada no rótulo dos fabricantes, ainda assim, os participantes mantiveram suas respostas sobre o padrão em que preferem consumir o queijo. Surpreende e preocupa, os que não souberam opinar, cerca de 19 %, dos quais as respostas sobre o perfil do queijo assado não foram definidas. Uma parte expressiva de pessoas preferem o queijo com perfil de “tostado” a “bem tostado”. O somatório conferem aproximadamente 29,3 % dos participantes, porém, esse valor aferido contrapõe o valor de 11,4 % que opinaram preferir “bem passado”, observado na mesma figura.

Dos participantes que responderam a pesquisa de opinião, 58,62 % tanto os que consumiam como os que vendiam QC misturam marcas de fabricantes industriais, sendo que 8,6 % não misturam, e 29,3 % não se importam com a marca do QC para preparo, venda ou consumo. A mistura nesse caso, significa que se outras marcas de produtores de QC fazem diferença para consumo ou não. Portanto, observa-se que tanto para consumidores, como para vendedores ambulantes de churrasco na região metropolitana do Rio de Janeiro, um valor expressivo de pessoas usam marcas distintas no uso do QC.

Apesar desse fato, quanto aos experimentos de preparo das amostras foram considerada apenas em duplicatas amostras de QC de mesma marca e lote de fabricantes, para o melhor controle experimental, analítico e evitar erros aleatórios indesejáveis, como desvio de qualidade, da uniformidade das amostras e comprometimento das análises químicas.

Figura 10 — Perfil de preparo do QC segundo pesquisa de opinião dos participantes.



Nota: CHU - Preparo na Churrasqueira; CHA - Preparo na Chapa Elétrica; CHU/CHA - preparo na Churrasqueira e Chapa Elétrica; CAR - Carvão vegetal; CHU EL GAS - Churrasqueira elétrica e fogo agás; CAR CHU ELE - Carvão e churrasqueira elétrica; GAS - Fogo à gás; 10 - 15MIN - tempo para assar de dez à quinze minutos; N EST - Não estimado; 2 - 10MIN - tempo para assar de dois à dez minutos; BPAS - Bem passado; MIST - Mistura marcas; NMIST - Não mistura marcas; NIMP - Não se importam com a marca; PTOST - Preferem o QC parcialmente tostado; TOST - preferem tostado; BTOST - Preferem bem tostado; NOPI - Não opinaram como preferem.

Fonte: Dados da pesquisa de opinião, 2016.

Destaca-se que os resultados da pesquisa de opinião representados nas Figuras 10 e 11 foram importantes para verificar o perfil de consumo, o tipo de cozimento, o combustível utilizado e o tempo de cozimento do QC. Dessa forma, foram aplicados aos experimentos envolvendo a combustão do carvão e o processamento das amostras de QC conduzidos inicialmente em laboratório.

Essa análise proporcionou condições mensuráveis ao serem reproduzidas experimentalmente, inferindo-se, portanto, os efeitos relacionados ao comportamento dos indivíduos no consumo e processamento do QC.

5.2 RESULTADOS DAS ANÁLISES QUÍMICAS

5.2.1 Procedimentos de Extração

O método Wegrzyn *et al.* (2006) foi executado inicialmente nos experimentos, assim como outros métodos, como de: Veiga *et al.* (2014), Barranco *et al.* (2003), de Nudi *et al.* (2007), Luz *et al.* (2013). O efeito de matriz predominou na execução desses métodos, ocasionando inconsistências nas extrações e produzindo interferentes que dificultaram a separação e identificação dos HPA. Esses métodos não foram adequados para a extração de HPA em QC.

O método Wegrzyn *et al.* (2006) foi bem executado nos laboratórios e pelos técnicos do IFRJ, a quantidade de amostra de 1 g, a utilização das mesmas vidrarias e materiais citados no estudo, a alíquota de 20 $\mu\text{L L}^{-1}$ de padrão de HPA usado para dopar foi fundamental para aprimoramento das técnicas e procedimentos pré-analíticos.

Destaca-se que a fortificação das amostras com padrão de 16 HPA, teve como objetivo inicial determinar a recuperação, isto é, avaliar se o processo de extração era efetivo. Buscou-se nesse sentido, relacionar o método de análise empregado ao material disponível na instituição. Reagente como MeOH 99,97 %, ciclohexano, diclorometano, acetonitrila, clorofórmio e equipamentos para o tratamento das amostras foram utilizados em diversos métodos.

Fora observado que ao aplicar o método Wegrzyn *et al.* (2006) na etapa de centrifugação a separação de três fases nas amostras de QC não ocorreram. E nesse caso, não foi possível coletar a última fase formada no fundo dos tubos que possivelmente continha os HPA. O procedimento de filtração e purificação em cartuchos de sílica 0,45 μm , e ressuspensão do filtrado com clorofórmio não foi efetivo mesmo após centrifugar as amostras a 10.000 rpm por 10 minutos (rotação e força centrífuga máxima para equipamento utilizado).

Procedeu-se também a Extração em Fase Sólida (EFSA), esta cita a purificação de amostras contendo HPA, segundo Wegrzyn *et al.* (2006), com cartuchos contendo Florisil em suporte sólido próprio para HPA, em sistema a vácuo. Os eluentes foram coletados, evaporados até a secura, concentradas as amostras e

resuspensas em ACN, para serem injetadas em CLAE-DF, a fim de identificar os HPA propostos por Wegrzyn *et al.* (2016).

Para o QC o método de Wegrzyn *et al.* (2006) não foi efetivo e gerou muitos interferentes. Em alguns casos as amostras mesmo filtradas turvaram, não houve a separação das três fases, onde parte da LLE foi interrompida e não concretizada. Buscou-se, portanto, outros métodos para desenvolver a extração em uma matriz tão complexa comparadas a de QC.

Portanto, na busca de um método mais eficiente, com menor gasto de solvente e adequado aos equipamentos e reagentes dos laboratórios do IFRJ, o método Esposito *et al.* (2015) permitiu obter extratos adaptados para serem analisados em CG-EM. Apesar do método Esposito *et al.* (2015) utilizar a técnica CLAE-DF para identificar HPA em mozzarella defumada, foram possíveis adaptações do método de extração de HPA em queijos de coalho assados em churrasqueira, levando em consideração a semelhança das matrizes e de suas estruturas químicas.

5.2.2 Análises em CG-EM

5.2.2.1 Dados analíticos

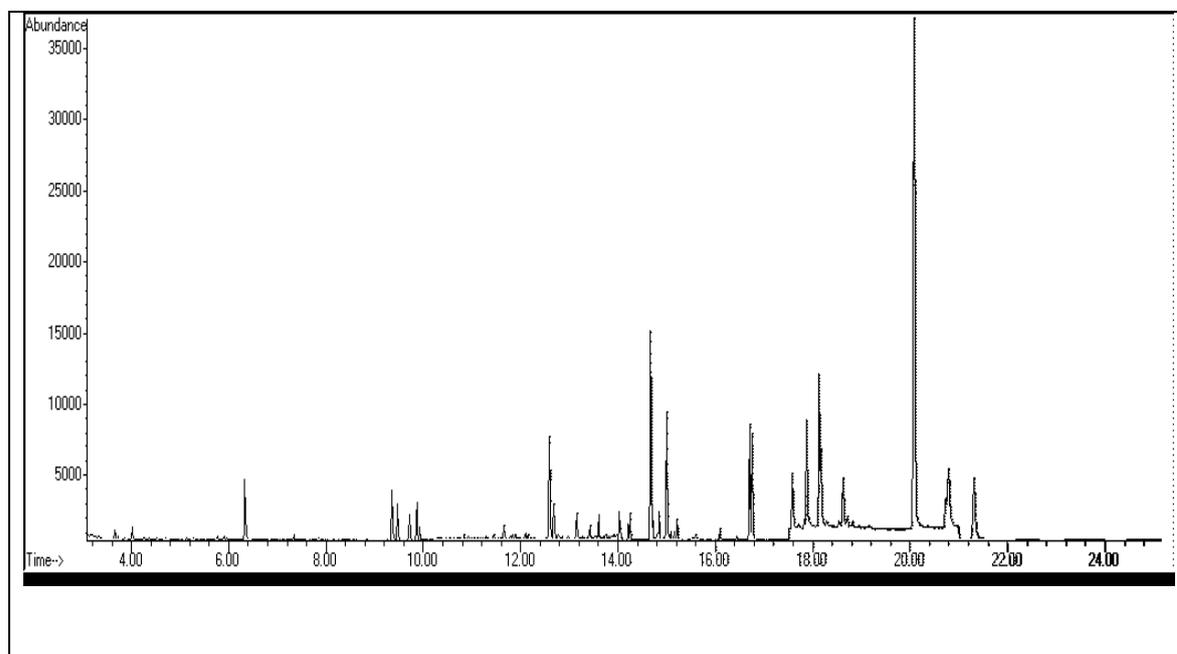
Diante das dificuldades apresentadas para a determinação dos 16 HPA por CLAE, optou-se, após revisão bibliográfica, testar a separação e identificação por CG-EM. Para tal, contou-se com o apoio do Laboratório de Análise Química e Ambiental da Universidade do Estado do Rio de Janeiro – *Campus* Resende, tanto no uso do cromatógrafo, visto que o equipamento do Laboratório de Instrumental do IFRJ estava sendo consertado, a priori, bem como no desenvolvimento do método analítico. Os dados obtidos em colaboração com a UERJ-Resende, foram essenciais para servir de base para uma investigação analítica das amostras pela técnica CG-EM empregada no IFRJ, bem como para identificação, detecção e monitoramento dos analitos.

As análises foram realizadas segundo as condições do método cromatográfico descritas no item 4.8, com as condições operacionais e monitoramento dos íons descritos nas Tabelas 14 e 15.

As curvas analíticas foram construídas utilizando soluções padrão. A curva utilizada tinha cinco níveis de concentração (125, 250, 375, 500, 1000, 1250 ng ml⁻¹), em cinco concentrações de 1 a 200 ng mL⁻¹. A linearidade foi avaliada através do coeficiente de determinação r^2 . O limite de detecção e quantificação foram determinados utilizando os parâmetros da curva analítica.

Alguns cromatogramas foram selecionados para representar as análises em CG-EM realizadas no IFRJ, após as amostras de QC serem preparadas de acordo com o método de extração com modificações de Esposito *et al.* (2015). Estas foram injetadas no equipamento de CG-EM. As Figuras 16, 17 e 18 representam os cromatogramas de amostras fortificadas com padrão da mistura de 16 HPA em concentração conhecida, 1-20 µg mL⁻¹ de HPA, após o preparo da amostra (QC triturado nas alturas 5, 15 e 20 cm de distância das brasas da churrasqueira, respectivamente). Outros cromatogramas dos analitos podem ser visualizados nos Apêndice D.

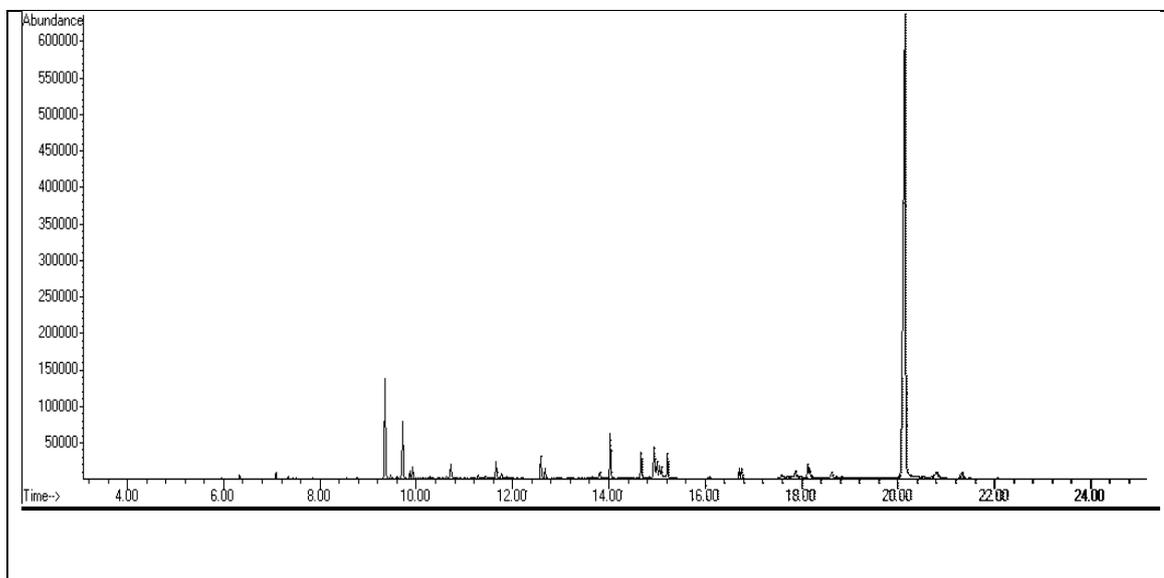
Figura 11— Cromatograma obtido do CG-EM, pela injeção de amostra do extrato de QC assado a 5 cm e triturado.



Nota: O cromatograma exposto foi obtido no Modo SCAN.

Fonte: Laboratório de Análise Instrumental - IFRJ, 2018.

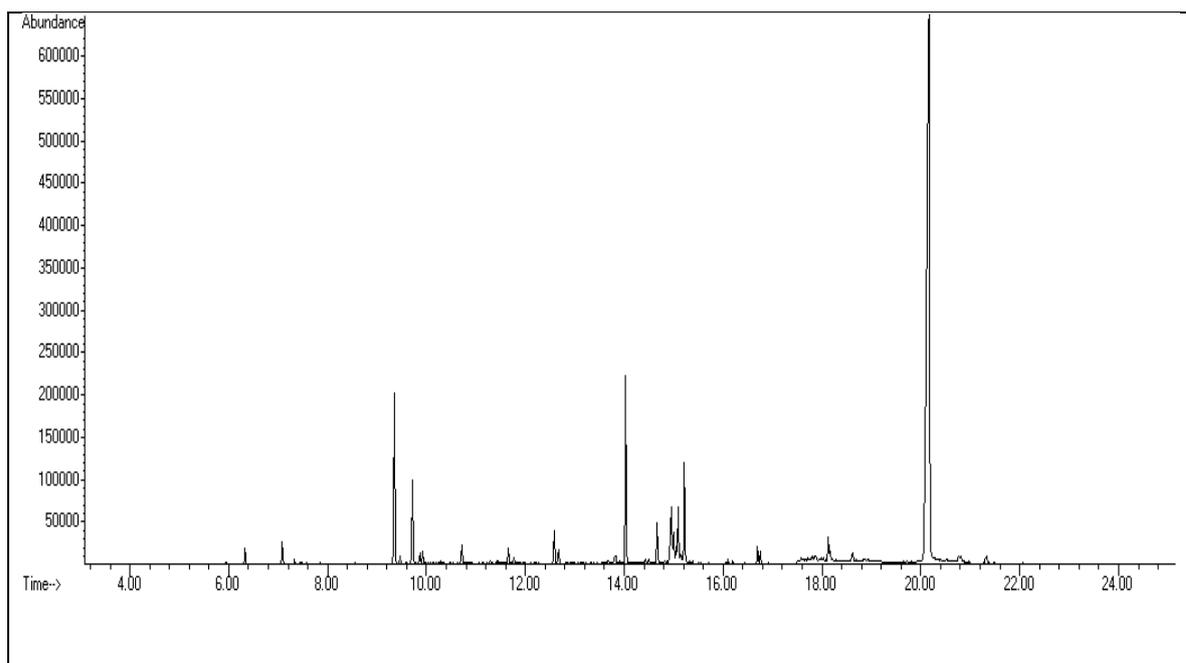
Figura 12 — Cromatograma obtido do CG-EM pela a injeção de amostra do extrato de QC assado a 15 cm e triturado.



Nota: O cromatograma exposto foi obtido no Modo SCAN.

Fonte: Laboratório de Análise Instrumental - IFRJ, 2018.

Figura 13— Cromatograma obtido do CG-EM pela a injeção da amostra 32 do extrato de QC assado a 20 cm e triturado.



Nota: O cromatograma exposto foi obtido no Modo SCAN.

Fonte: Laboratório de Análise Instrumental - IFRJ, 2018.

5.2.2.2 Avaliação do método analítico

Sendo o método analisado por CG-EM no modo SIM e os analitos identificados também por deconvolução no programa *Mass Hunter*, não foi obtido sinal de interferentes no tempo de retenção dos analitos alvo, demonstrando a especificidade do método. Amostras de branco de solvente (hexano) e branco de amostra (matriz isenta de analito) foram injetadas após o nível de maior concentração da curva analítica, não apresentando sinais no tempo de retenção dos HPA avaliados.

A linearidade foi obtida por regressão linear com o método dos mínimos quadrados a partir da relação entre a concentração e área do analito, com padronização externa. A curva analítica foi injetadas em cada dia de análise e utilizada para quantificação de amostras. Foi utilizada apenas uma curva de calibração, em que foi possível perceber a melhor curva adotada de um dia de análise, já que outras análises foram realizadas em dias próximos.

A precisão intermediária foi determinada com as amostras de queijo assadas a 5, 15 e 20 cm entre dias diferentes. Estes resultados englobam os valores obtidos pela precisão intra-ensaio. Os resultados estão apresentados nas Tabela 18 e 19.

Tabela 18 – Precisão intermediária de amostras fortificadas com padrão

HPA	Precisão intermediária		
	DPR %5cm	DPR %15 cm	DPR%20 cm
Naf	13,45	32,53	29,70
Acl	5,01	2,73	9,63
Act	8,26	0,11	9,61
Flu	4,77	1,46	3,80
Fen	5,22	4,75	9,40
Antr	0,47	0,86	3,82
Fluo	2,76	3,91	4,86
Pir	7,90	4,03	5,89
B (a) A	2,76	3,45	8,48
Cry	2,49	2,23	5,39
B (b) F	0,20	4,50	14,40
B (k) F	2,77	1,51	7,24
B (a) P	8,01	6,83	11,49
D (a) A	3,35	4,54	8,23
B (g, h, i) P	13,77	13,76	4,36
Ind	7,95	8,58	4,04

Fonte: Dados do estudo - IFRJ, 2018.

Tabela 19 — Recuperação (%) das amostras fortificadas com padrão de 16 HPA na concentração 1 - 20 µg mL⁻¹.

HPA	5 cm	15 cm	20 cm
Nap	69,2±0,1	12,7* ±0,3	21,5* ±0,3
Acl	78,0±0,05	66,6±0,03	83,5±0,1
Act	72,3±0,08	65,5±0,01	76,7±0,1
Flu	70,6±0,05	63,9±0,01	78,2±0,04
Fen	77,6±0,05	68,7±0,05	163,1* ±0,09
Antr	75,2±0,01	75,5±0,01	98,1±0,04
Fluo	91,5±0,03	87,8±0,04	117,0±0,05
Pir	79,6±0,08	72,3±0,04	120,9±0,06
B (a) A	90,9±0,03	89,9±0,03	110,6±0,08
Cry	80,9±0,02	78,5±0,02	99,1±0,05
B (b) F	87,7±0,01	87,9±0,05	102,0±0,1
B (k) F	82,0±0,03	73,8±0,02	92,3±0,07
B (a) P	76,5±0,08	64,7±0,07	95,8±0,1
D (a) A	37,9* ±0,03	40,0* ±0,05	44,7* ±0,08
B (g, h, i) P	98,5±0,1	109,0±0,1	97,0±0,04
Ind	55,4±0,08	58,7±0,09	69,8±0,04

Nota: *Valores fora da faixa de 50 – 120% de recuperação utilizada como critério.

Fonte: Dados do estudo - IFRJ, 2018.

A variação da repetitividade das amostras se deve a dificuldade em obter uma amostra homogênea, já que a trituração da superfície do QC assado não permite uma proporção exata de HPA presentes no campo de coleta dessa matriz. A análise entre dias, também pode ser citada como relevante fator para a variação dos dados obtidos, já que os experimentos adotando o método de extração duraram por um dia aproximadamente, sendo portanto, um processo muito longo.

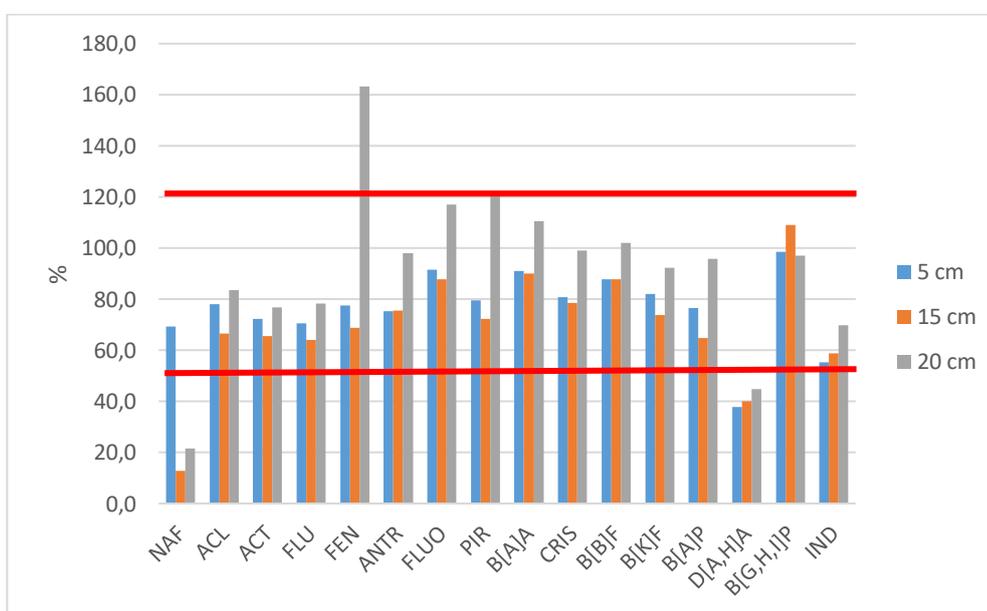
Sendo por vezes, iniciado e finalizado no mesmo dia ou ficando as amostras armazenadas sob congelamento até serem analisadas outro dia, logo, a duração de 24 horas após extração pode justificar a variação dos resultados de recuperação e de concentração para o mesmo analito em amostras oriundas do mesmo processo de preparo e extração química.

Estudos de recuperação para a avaliação do procedimento empregado no tratamento da amostra foram realizados comparando-se diferentes metodologias. De acordo com Esposito *et al.* (2015), a CE 836/2011 utiliza como critério para análise de HPA em alimentos, a faixa de 50 – 120 % de recuperação.

Os estudos de recuperação de HPA foram conduzidos e obtidos a partir de valores quantificados da área dos picos referentes aos 16 HPA, permitindo em seguida obter por análise estatística da média percentual, recuperação percentual e o desvio padrão e desvio padrão relativo das concentrações dos HPA em $\mu\text{g kg}^{-1}$ investigados nas amostras fortificadas com padrão de concentração conhecida (Mix de 16 HPA de *Supelco Analytical*, 1 - 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$), de acordo com amostras submetidas a alturas determinadas e sob o tempo de processamento a 100 % do normal. Ressalta-se que essas alturas e tempo, foram tomadas por base, porém com modificações, aos experimentos de *Rose et al.* (2015), *Esposito et al.* (2015) e *Pagliuca et al.* (2003).

Na Figura 14 pode ser visualizado diferentes percentuais de recuperações obtidos das análises realizadas. Os resultados nesse gráfico permitem melhor compreensão e comparação da recuperação de HPA na matriz referente a cada altura.

Figura 14— Gráfico do percentual de recuperação HPA em $\mu\text{g kg}^{-1}$, das amostras fortificadas e analisadas por CG-EM.



Nota: As linhas vermelhas demonstram que faixa percentual de recuperação ficou dentro do esperado, conforme o documento CE 836/2011 citado por *Esposito et al.* (2015).

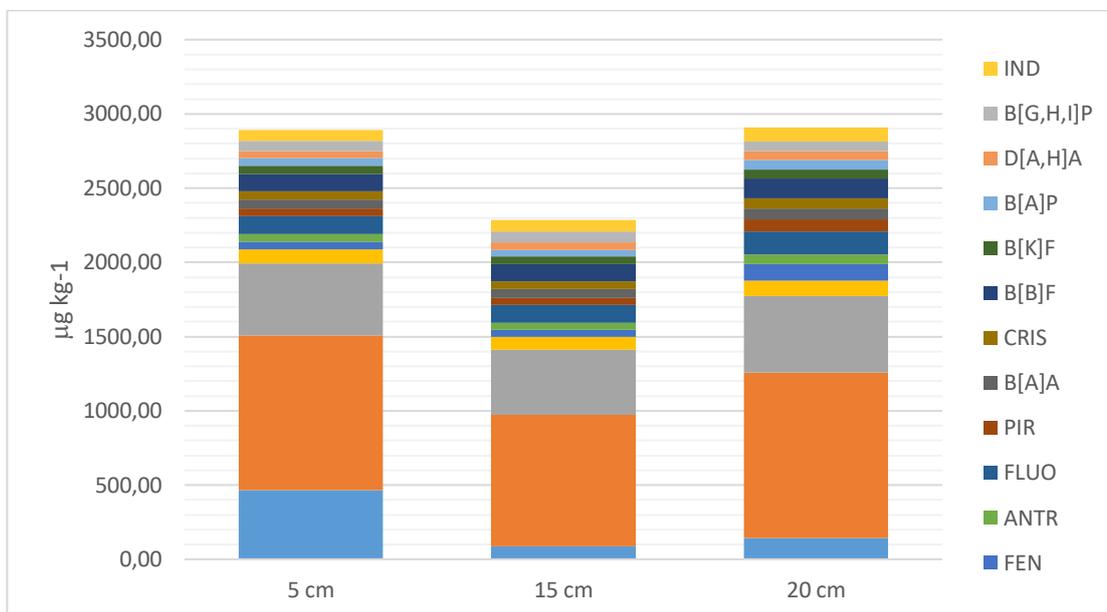
Fonte: Dados obtidos do estudo experimental, 2018.

Ficou evidente que o método de extração empregado, possibilitou uma expressiva recuperação dos HPA na concentração de 1 - 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ do padrão. Foi adotado para a fortificação das amostras o volume de 100 μL para cada preparo (QC em duplicata das diferentes alturas, 5, 15, 20 cm). A concentração dos analitos presentes no padrão segue o demonstrado na diluição por Veiga *et al.* (2014), a qual foi utilizada a padronização externa, pois nesta concentração, os HPA são identificados com melhores picos na curva de calibração. As concentrações dos HPA presentes na mistura do padrão permitiram obter a solução na diluição necessária para a fortificação das amostras, bem como comparar esses valores com a curva analítica. Destaca-se que: NAF para a altura de 15 e 20 cm, FEN para altura de 20 cm, não obtiveram resultados satisfatórios, assim como D(a,h)A, em todas as alturas, não atendendo ao preconizado para HPA em alimentos pela CE 836/2011.

Comparando-se as recuperações obtidas nas diferentes alturas verifica-se a recuperação média foi de 76,5 %, 69,7 % e 91,9 %, respectivamente para 5, 15 e 20 cm. Logo, tanto o método de extração, como o cromatográfico, foi efetivo na determinação de HPA, principalmente nas amostras tratadas a 20 cm de distância da brasa emitida do carvão.

A média das concentrações recuperadas nas amostras fortificadas (Figura 17) demonstraram que a extração pelo método Esposito *et al.* (2015) foi eficiente, seletiva e sensível para 13 HPA (exceto para NAF, FEN e D (a,h) A). Apesar de variar em concentrações distintas nas respectivas alturas, das quais as amostras de QC foram submetidas, as maiores concentrações observadas a partir da média foram encontradas em amostras expostas as brasas de carvão na altura de 20 cm. Além disso, verificou-se as melhores recuperações em amostras submetidas à altura de 20 cm, em se tratando dos 8 HPA. Sugere-se, portanto, que a matriz coletada e tratada em diferentes alturas interfere na interação por cada analito de modo distinto em termos quantitativos e qualitativos. Desta forma, foi observado a efetividade da fortificação, a estabilidade do padrão frente a interação com a matriz e o método de extração química empregado.

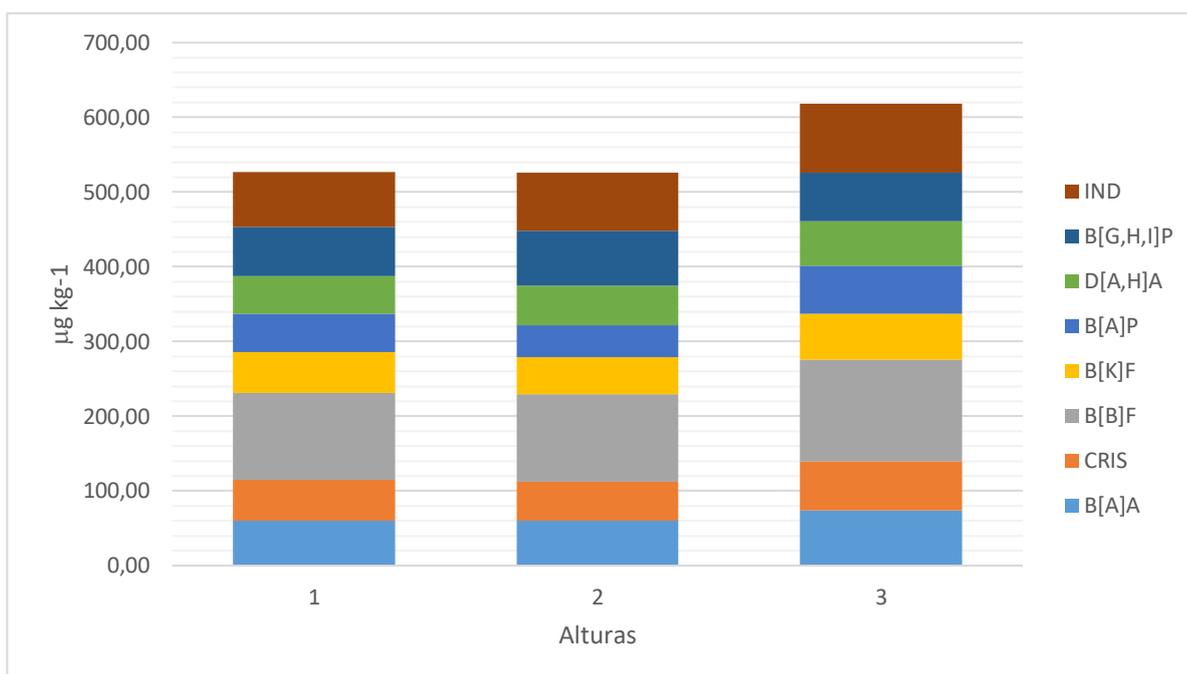
Figura 15— Concentração média em $\mu\text{g kg}^{-1}$ das amostras fortificadas com 100 μL , na concentração 1 - 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de padrão dos 16 HPA.



Fonte: Dados obtidos do estudo - IFRJ, 2018.

A concentração encontrada nas amostras fortificadas corroborou com o resultado demonstrando que o método de extração executado permitiu a recuperação dos 8 HPA (em $\mu\text{g kg}^{-1}$), que são de prioridade para monitoramento de seus níveis de contaminação em alimentos segundo USEPA, CE e WHO. Os resultados foram em somatório à 5 cm (Σ 8 HPA = $527,06 \mu\text{g kg}^{-1}$); à 15 cm (Σ 8 HPA = $525,94 \mu\text{g kg}^{-1}$) e à 20 cm (Σ 8 HPA = $618,63 \mu\text{g kg}^{-1}$). Apesar da recuperação apresentar-se mais efetiva a 20 cm na Figura 18, cabe destacar a variação entre Σ 8 HPA foi de 14,8 % e 15 % para 5 cm e 15 cm, respectivamente.

Figura 16– Média das concentrações recuperadas nas amostras fortificadas dos 8 HPA (em $\mu\text{g mL}^{-1}$).



Nota: 1 = 5cm, 2 = 15cm e 3 = 20 cm.

Fonte: Dados dados obtidos do estudo, 2018.

Tabela 20 - Figuras de mérito estimadas nas análises das amostras de QC.

HPA	Curva analítica	r^2	LD($\mu\text{g Kg}^{-1}$)	LQ($\mu\text{g Kg}^{-1}$)
NAP	$y=185,55x-37971,34$	0,997	0,002	0,006
ACE	$y=188,892x-8506,36$	0,998	0,002	0,007
ACY	$y=120,99x-24089,16$	0,997	0,003	0,008
FLU	$y=257,21x-53460,59$	0,998	0,001	0,003
FEN	$y=185,24x-37535,82$	0,988	0,001	0,004
ANT	$y=227,97x-49703,68$	0,997	0,001	0,003
FLU	$y=188,62x-52485,65$	0,997	0,002	0,007
PYR	$y=211,35x-32744,01$	0,997	0,002	0,006
BaA	$y=198,69x-34332,02$	0,994	0,003	0,008
CRY	$y=188,77x-27589,42$	0,994	0,002	0,006
BbF	$y=152,62x-25279,43$	0,997	0,003	0,008
BkF	$y=195,50x-30634,80$	0,997	0,002	0,007
BaP	$y=154,60-24585,80$	0,998	0,003	0,008
DahA	$y=182,95-31152,24$	0,995	0,002	0,007
BghiP	$y=156,14-27538,54$	0,963	0,003	0,008
IND	$y=40,51-6625,90$	0,996	0,010	0,030

Fonte: Dados obtidos do estudo - IFRJ, 2018.

O intervalo do limite de detecção (LD) foi estabelecido experimentalmente entre 0,001 – 0,010 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Foram considerados para estimar o LD dos analitos a partir do FLU, pois os valores de concentrações de NAF, ACE e ACY apresentaram algumas discrepâncias e *outliers*.

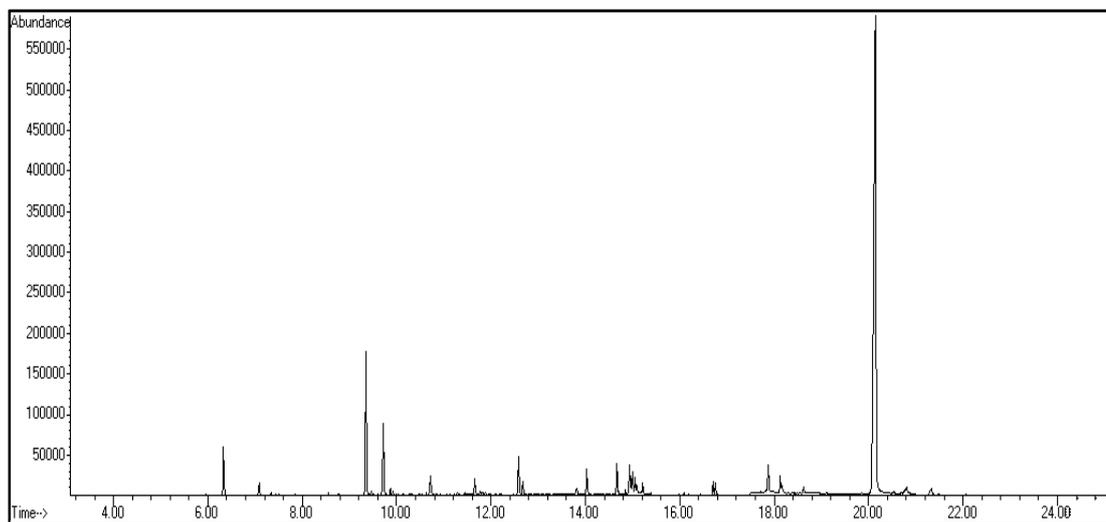
Para o limite de quantificação (LQ) foi considerado o intervalo de um intervalo de 0,003 – 0,030 $\mu\text{g Kg}^{-1}$, sendo o menor valor determinado na curva de calibração, precisão < 5% e exatidão no intervalo de 95 %.

O limite inferior e superior de recuperação percentual foram respectivamente, 12,7 % e 163,1 %. A média das concentrações em $\mu\text{g Kg}^{-1}$, obtidas na análise dos 8 HPA de interesse para monitoramento em alimentos, $\Sigma = 557,2 \mu\text{g Kg}^{-1}$ em amostras fortificadas, e $\Sigma = 1084,6 \mu\text{g Kg}^{-1}$ para não fortificadas, sendo relevante em relação ao nível de contaminação gerado no processamento do QC em churrasqueira, pois Nisbert e Lagoy (1992) comprovaram a toxicidade dos HPA com experimentos em ratos, tanto isoladamente, como a ação destes compostos associados, gerando percentuais elevados para o risco em causar câncer na espécie investigada, conforme pode ser visualizado na Tabela 8 deste trabalho.

5.2.2.3 Concentrações das amostras de queijo de coalho

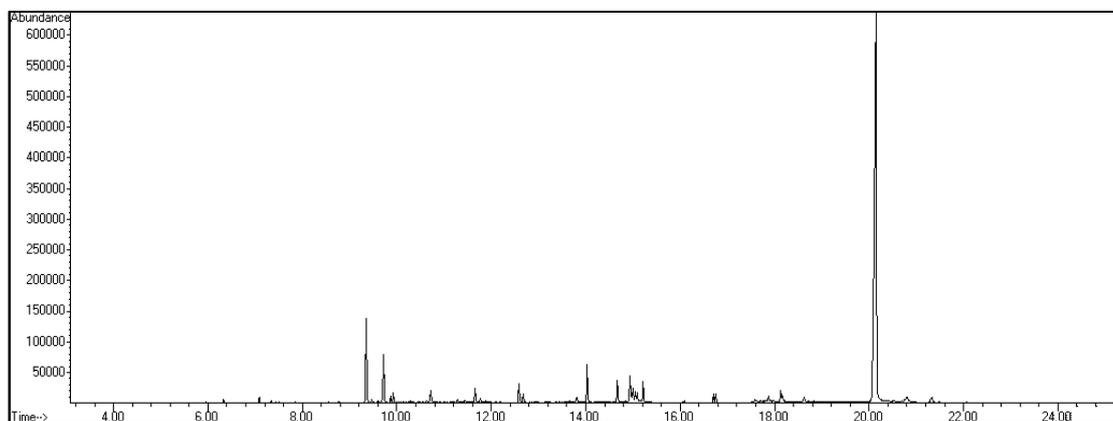
As Figuras 17, 18 e 19 representam os cromatogramas de amostras de queijo de coalho, após o preparo da amostra (QC nas alturas 5, 15 e 20 cm de distância das brasas da churrasqueira e trituradas, respectivamente). Outros cromatogramas podem ser visualizados no Apêndice D.

Figura 17— Cromatograma obtido do CG-EM, pela injeção da amostra 29 do do extrato de QC assado a 5 cm, sob influência do calor a 100% do tempo normal e triturada.



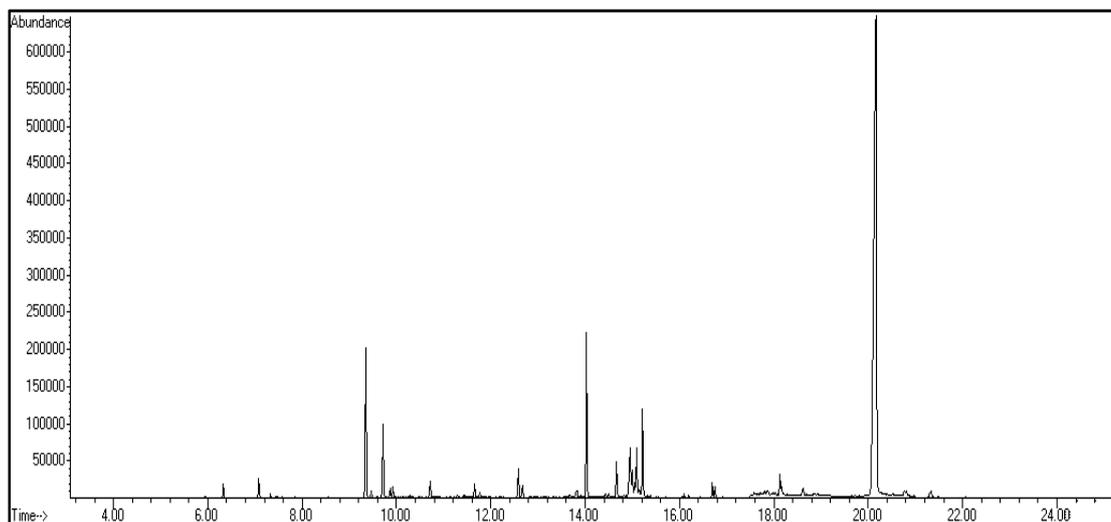
Fonte: Laboratório de Análise Instrumental - IFRJ, 2018.

Figura 18— Cromatograma obtido do CG-EM pela a injeção da amostra 31 do extrato de QC assado a 15 cm, sob influência do calor a 100 % do tempo normal e triturada.



Fonte: Laboratório de Análise Instrumental - IFRJ, 2018.

Figura 19— Cromatograma obtido do CG-EM pela a injeção da amostra 57, do extrato de QC assado a 20 cm, sob influência do calor a 100 % do tempo normal e triturada.



Fonte: Laboratório de Análise Instrumental - IFRJ, 2018.

A análise de HPA por CLAE proposta por Lee e Shim (2007) demonstraram que as amostras investigadas foram contaminadas com níveis significativamente expressivos de B (a) P. Em geral, os produtos de origem animal apresentaram altos níveis de detecção B (a) P variando de 2,21 a 5,55 $\mu\text{g kg}^{-1}$. A variação dos níveis ocorreram nas matrizes estudadas, porém processadas de modos distintos, sendo alimentos fritos, assados, grelhados e defumados. Os níveis mais altos de B(a)P estudados foram encontrados no estudo de Lee e Shim (2007) em frango e carnes defumadas.

Os resultados da análise de Lee e Shim (2007) demonstraram que o Ba(a)P foi detectado em níveis que variaram nos diferentes tipos de alimentos estudados (19 itens alimentícios estudados).

O estudo com QC mostrou que os níveis de concentração de B(a)A e D(a,h)A estiveram elevados e variaram de 140,73 à 149,46 $\mu\text{g kg}^{-1}$, e 135,00 a 139,53 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente. Lembra-se que estes são os compostos com maior índice de possivelmente causar tumores, de acordo com estudos de Lee *et al.*(2018) e Nisbet e Lagoy (1992).

Os valores obtidos de HPA das amostras não fortificadas apresentaram variações entre os HPA investigados. Na Tabela 20 podem ser observadas as

concentrações de HPA encontradas nas amostras de QC assadas nas diferentes alturas.

Tabela 21 — Concentrações em $\mu\text{g kg}^{-1}$ de HPA encontradas nas amostras queijo de coalho assadas nas diferentes alturas

HPA	5 cm	15 cm	20 cm
NAP	139,8±6,6	63,9±4,9	108,6±4,4
ACE	149,2±2,2	664,8±1,0	833,6±6,9
ACY	141,1±6,3	149,4±7,7	146,4±5,8
FLU	153,9±3,3	143,7±7,2	78,1±1,2
FEN	298,2±2,2	228,4±4,3	244,8±1,8
ANT	158,6±4,5	147,3±5,5	149,9±2,9
FLU	179,7±1,2	156,1±1,1	156,7±4,7
PYR	179,5±1,3	156,0±1,5	152,2±3,1
BaA	149,4±1,4	144,6±1,1	140,7±4,2
CRY	140,2±1,5	135,0±01,1	130,2±5,6
BbF	143,3±1,1	146,9±1,1	140,7±7,8
BkF	133,1±1,1	134,7±1,1	129,1±5,9
BaP	112,9±1,2	110,0±1,2	130,4±8,1
DahA	139,5±1,4	137,2±1,3	135,0±5,8
BghiP	137,7±0,4	136,6±4,4	141,1±2,2
IND	138,9±1,2	134,06±6,9	131,6±4,4

Fonte: Dados do estudo - IFRJ, 2018.

Segundo Esposito *et al.* (2015), 6 HPA foram determinados em Mussarela defumada de Bufalo da Campana. Técnicas diferentes de defumações estudadas pelos autores foram comparadas para avaliar o risco associado ao consumo desses queijos. Esposito *et al.* (2015) ressaltaram que embora nenhum limite máximo seja estabelecido para os HPA em queijo, os níveis encontrados em algumas amostras constituíram um risco para a saúde.

O fato do estudo de Esposito *et al.* (2015) chamou a atenção devido o uso de materiais tradicionais que envolve o acúmulo de HPA na parte externa. E, que no total das concentrações no produto, estas foram significativamente menores em relação as concentrações encontradas em QC. Ainda assim, a técnica de defumação (envolver papel em queijos) revelaram alto nível de contaminação, com faixas de concentrações de B(a)P que foram de 110 à 417,8 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Apesar desse fato, níveis de D (a,h) A não foram encontrados em queijos submetidos a defumação líquida industrial.

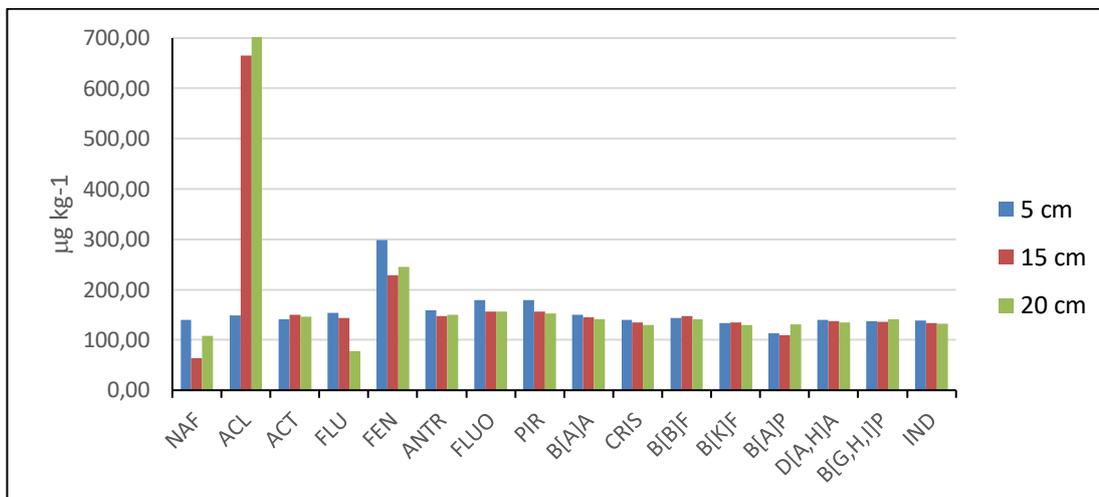
Esposito *et al.* (2015) enfatizaram a idéia de que fabricantes de produtos utilizam a defumação líquida em alimentos como no caso de queijo mussarela, mas não recomendam que a casca de tais produtos seja ingerida. A mussarela defumada com palha de trigo apresentou níveis de contaminação por HPA que foram muito variáveis, mesmo na parte exterior, onde valores aceitáveis de B(a)P e B(a)A foram detectados, mesmo que limites de HPA nesse tipo de matriz não sejam definidos por agências reguladoras sanitárias.

Neste estudo, ao preparar as amostras para a análise, a principal parte triturada e submetida ao processo de extração (seguindo o método Esposito *et al.* (2015) foi a casca da matriz de QC processada em churrasqueira. Cabe destacar que não foram testados os níveis de penetração dos 16 HPA na matriz processada em churrasqueira, nem mesmo dos 8 HPA prioritários para o monitoramento em alimentos, sugerindo, portanto, apenas constatar um alto teor de contaminação por HPA na superfície do QC assado.

Os níveis do somatório dos 4 HPA encontrados em queijos defumados no estudo de Esposito *et al.* (2015), que para OMS podem causar câncer, foram preocupantes. Mesmo quando estes compostos foram observados individualmente, o somatório de 4 HPA encontrados foram 957,2 à 1892,5 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

Em QC assado foram encontrados níveis de 4 HPA e 8 HPA variáveis, apesar dos valores próximos no processamento realizado nas alturas 5, 15, 20 cm de distância das brasas, as concentração respectivamente foram Σ 4 HPA (679,22; 671,42 e 671,30) em $\mu\text{g kg}^{-1}$ e para Σ 8 HPA (1095,37; 1079,34 e 1079,08) em $\mu\text{g kg}^{-1}$. Na Figura 20 podem ser verificadas as concentrações de HPA obtidas nas diferentes alturas após processamento:

Figura 20 — Concentrações reais das amostras não forficadas em $\mu\text{g kg}^{-1}$



Fonte: Dados do estudo - IFRJ, 2018.

Foi possível verificar que não houve uma diferença significativa das concentrações de HPA nas diferentes alturas, segundo este estudo para os compostos com carcinogenicidade comprovada.

Esposito *et al.* (2015) destacaram que em amostras de mussarela, foi possível derivar os perfis de contaminação por HPA. Eles caracterizaram as várias técnicas de defumação, contudo, não foi possível identificar HPA em todas as amostras submetidas a esses processos ou detectar em qualquer uma das três partes (casca, interior e produto inteiro) das amostras. Embora o pequeno número de amostras analisadas não permitiram afirmar que seja possível identificar padrões característicos de contaminação, algumas diferenças foram detectáveis, como, em amostras defumadas com papel corrugado, onde concentrações HPA foram maiores, e uma prevalência de B(a)A e B(b)F.

Nas amostras de QC, não ocorreram a ausência de algum dos 16 HPA neste estudo. Pelo contrário, a variabilidade entre amostras não excluiu a possibilidade de contaminação por um ou outro composto dessa classe de substâncias tóxicas. O que reforça os risco de exposição por ingestão desse tipo de alimento ou do preparo deste.

Nos estudos de Rose *et al.* (2015) foram destacados pontos importantes na análise de HPA em diversos alimentos processados na forma de grelhar, fritar, tostar e assar, em aquecimento por tempo prolongado ou curto e em distâncias variadas. De acordo com as pesquisas dos autores, em alguns alimentos os níveis de HPA não

aumentaram ao grelhar, fritar ou assar o alimento, independente da intensidade, tempo ou período de exposição ao calor, como a carne bovina e de porco. Embora, em outros alimentos foram constatados níveis elevados de HPA, como em salmão e hambúrgueres assados em churrasqueira com carvão vegetal.

Os experimentos com churrasco de alimentos preparados com carvão mostraram que hambúrgueres possuíam as maiores concentrações totais dos 8 HPA.

A pesquisa com QC não revelou diferenças na concentração de HPA em amostras assadas nas alturas 15 e 20 cm para alguns HPA, nesse caso, aqueles de maior número de anéis aromáticos como os 8 HPA prioritários para o monitoramento em alimentos.

Concentrações elevadas foram observadas de Acenaftileno em QC assados a 15 e 20 cm, bem como de Fenantreno em amostras assadas a 5 cm. Em geral, os níveis de HPA variaram com as distâncias. O distanciamento das amostras da fonte de calor não aumentaram a concentração de HPA, o que também foram constatados nos estudos de Rose *et al.* (2015) com carnes assadas em churrasqueira, com exceção da carne de hambúrguer bovino.

Apesar de poucas diferenças entre amostras de 5, 15 e 20 cm, concentrações consideráveis como de alto nível de contaminação, tanto para os padrões internacionais, com para os limites nacionais de produtos contendo aromas de fumaça.

Sendo assim, todos os 16 HPA nas diferentes alturas foram identificados e extraídos das amostras de QC. A concentração de benzo (a) pireno variou de 0,006 – 0,030 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (LQ). A legislação brasileira referente aos aromatizantes/aromas de fumaça, destaca o valor limite de 0,03 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para benzo (a) pireno (BRASIL, 2007).

A soma de 4 HPA também alcançou valores muito superiores (541,63 $\mu\text{g kg}^{-1}$) ao nível máximo fixado para vários produtos alimentícios, conforme disposto em regulamento europeu, onde o maior valor encontrado se refere a moluscos bivalves (35 $\mu\text{g kg}^{-1}$).

Naccari *et al.* (2008) realizaram um estudo com queijo provolone defumado, onde as concentrações de HPA no queijo defumado por meio de métodos naturais foi superior (B (a) P: 0,46-1,13 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e B (a) A: 1,38-9,29 $\mu\text{g kg}^{-1}$) aos encontrados em amostras aromatizadas pela técnica de defumação líquida (B (a) P: 0,085-0,32 $\mu\text{g kg}^{-1}$; B (a) A: 1,20-2,98 $\mu\text{g kg}^{-1}$). Entretanto, destaca-se que os valores obtidos para o

queijo de coalho foram 115 a 406 vezes superiores para B (a) P e de 16 a 50 vezes superiores para B (a) A.

Esposito *et al.* (2015) obtiveram concentrações de benzo (a) pireno na casca da mozzarella que foi diretamente exposta a fumaça (queima de madeira) variando de $<0,8 \mu\text{g kg}^{-1}$ a $28,2 \mu\text{g kg}^{-1}$. E, a soma de 4HPA de $26,2 \mu\text{g kg}^{-1}$. Avaliaram também a defumação utilizando para tal papel liso e corrugado. Observaram que usando o papel liso os resultados foram semelhantes ao do uso da madeira. Entretanto, altas concentrações foram obtidas com o uso de papel corrugado. A concentração mediana na casca da mozzarella de B (a) P foi de $247,9 \mu\text{g kg}^{-1}$, B (a) A, $498,7 \mu\text{g kg}^{-1}$, B (b) F, $410,7 \mu\text{g kg}^{-1}$ e Cry $177,8 \mu\text{g kg}^{-1}$. No caso do uso de papel corrugado para queima, as concentrações obtidas foram 1,9; 3,3; 2,8 e 1,3 vezes superiores aos valores de concentração dos HPA acima relacionados obtidos para QC, respectivamente.

Segundo Purcaro *et al.* (2013), Esposito *et al.* (2015), e CE (2011), o benzo (a) pireno não pode ser o único marcador para a ocorrência de HPA em alimentos. Assim, um novo sistema de substâncias específicas de 4 HPA ou de 8 HPA devem representar os indicadores mais adequados desses compostos nos alimentos, visto que o somatório dos 8HPA são de prioridade para o monitoramento, devido ao alto índice carcinogênico, mutagênico e genotóxico.

Concluiu-se no relatório da CE, que um sistema de oito substâncias (8HPA) representaria significativamente o valor de toxicidade comparado com um sistema de quatro substâncias (4 HPA) mais o B (a) P, havendo, portanto, pouca harmonização em relação aos HPA prioritários para serem monitorados pelas agências e órgãos internacionais reguladores, caso haja a contaminação em alimentos.

Com base nas conclusões da *European Food Safety Authority* (EFSA), não é possível manter o sistema atual utilizando o benzo (a) pireno como único marcador da classe dos compostos HPA para determinar a toxicidade em humanos. Por conseguinte, foram necessárias alterações no Regulamento (CE) nº1881/2006, no qual introduziu-se novos teores e limites máximos para a soma de quatro substâncias 4 HPA (benzo (a) pireno, benzo (a) antraceno, benzo (b) fluoranteno e criseno) na atualização deste regulamento na CE nº 1125/2015, mantendo, entretanto, um teor máximo distinto para os outros HPA em relação ao benzo (a) pireno. A Tabela 22 representa as alterações e os limites de HPA como alerta de monitoramento para

limites máximo permitidos em alguns alimentos, a qual não inclui queijos de quaisquer espécies.

Tabela 22 — Teores máximos de HPA presentes em gêneros alimentícios.

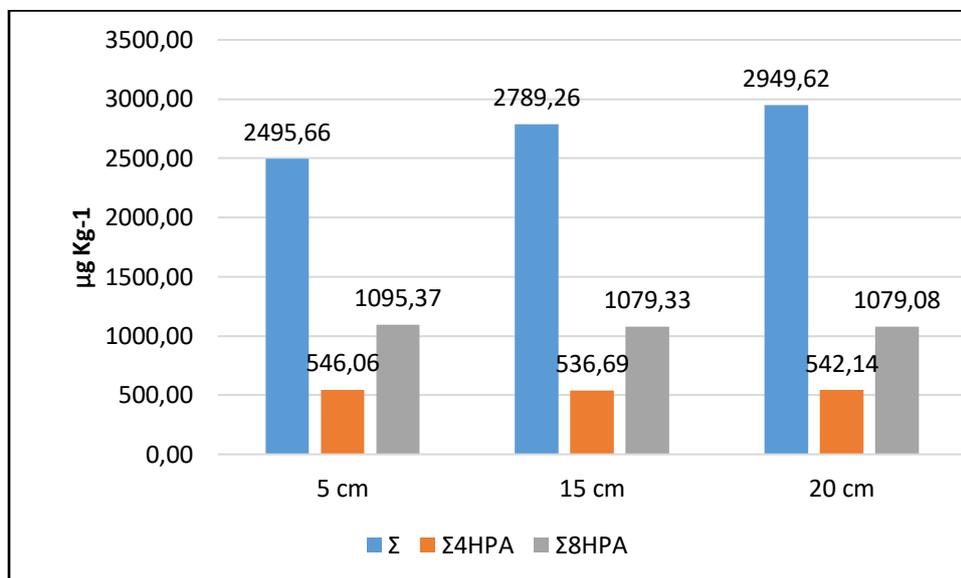
Gênero alimentício	B (a) P µg kg⁻¹	*Σ 4 HPA µg kg⁻¹
Óleos e gorduras (com exceção da manteiga de cacau e do óleo de coco)	2,0	10,0
Grãos de cacau e produtos derivados	5,0	30,0
Óleo de coco	2,0	20,0
Carne fumada e produtos à base de carne fumada	2,0	12,0
Peixe defumado e produtos de pesca defumados, crustáceos, caranguejos e crustáceos similares (<i>Brachyura</i> e <i>Anomura</i>) defumados.	2,0	12,0
Espadilhas defumadas e espadilhas defumadas em lata (<i>sprattus sprattus</i>); moluscos bivalves (frescos refrigerados ou congelados), e <i>Katsuobushi</i> (bonito seco, <i>Katsuwonus pelamis</i>). Carne tratada termicamente e produtos à base de carne tratada termicamente	5,0	30,0
Moluscos bivalves	6,0	35,0
Alimentos transformados à base de cereais e alimentos para bebês destinados a lactentes e crianças jovens	1,0	1,0
Fórmulas para lactentes e fórmulas de transição,	1,0	1,0
Alimentos dietéticos destinados para fins medicinais específicos, especificamente destinados a lactentes	1,0	1,0

*benzo (a) antraceno, benzo (b) fluoranteno, criseno e benzo (a) pireno. Entra em vigor a partir de 2014.

Fonte: Comissão Europeia, 2015.

Os 8 HPA, B (a) P, B (a) A, Cris, B (b) F, B (k) F, D (a, h) A, B (g, h, i) P, IND de prioridade para o monitoramento pela OMS e CE, foram possíveis quantificar nas amostras processadas em churrasqueira artesanal, em amostras de QC dispostas em distintas alturas, com 100% do tempo normal e expostas a fonte de calor. O total do Σ 8 HPA em µg kg⁻¹ representados na Figura 21 foram a 5 cm (Σ=1095,37 µg kg⁻¹), 15 cm (Σ=1079,33 µg kg⁻¹), 20 cm (Σ=1079,08 µg kg⁻¹).

Figura 21 – Somatório das concentrações dos 8 HPA prioritários no monitoramento pela OMS e CE para alimentos.



Fonte: Dados obtidos do estudo - IFRJ, 2018.

Comparando-se os valores de concentração obtidas do queijo de coalho com os teores máximos dos gêneros alimentícios que sofrem processo de defumação (carne e peixe) preconizados pela CE (2015), observa-se que em relação ao B (a) P, os valores obtidos são cerca de 65 vezes superiores e o somatório de 4 HPA aproximadamente 45 vezes superiores.

Embora atualmente não sejam limites máximos estabelecidos na legislação brasileira, mas sim, na legislação europeia estes valores de B (a) P, 4 HPA e para 8 HPA são muito elevados e constituem um risco grave para a saúde dos consumidores. Mesmo que o consumo seja esporádico ou ocasional, pois já foi comprovado em estudos com ratos que as exposições às concentrações elevadas em curto período de tempo equivalem àquelas que ocorrem por um longo período ou anos, quando o efeito se trata de compostos tóxicos e bioacumuladores como os HPA (NISBERT e LAGOY, 1992).

Segundo Guillén *et al.* (2011), HPA com maior massa molar, nesse caso incluem a maioria dos agentes cancerígenos, são encontrados em concentrações baixas em amostras de queijos defumados. De fato, benzo(a)antraceno, juntamente

com o criseno + trifenileno, foram os HPA com maior massa molar detectada em todas as amostras defumadas estudadas por Guillén *et al.* (2011).

A concentração de benzo(a)pireno detectada foi somente em uma das amostras e possuía níveis abaixo do limite estabelecido na Espanha, em se tratando da casca de queijo defumado. Entretanto, altas concentrações de HPA foram encontradas, especialmente do naftaleno e seus derivados alquílicos, cujo efeito sobre a saúde humana e seu metabolismo no organismo ainda não estão bem elucidados (GUILLÉN *et al.*, 2011).

Os resultados a partir da análise do perfil de HPA sugerido por Guillén *et al.* (2011) apontam para uma potencial relação entre alguns pares de HPA (Naftaleno / Acenaftileno / Fenantreno / Antraceno) para fornecer informações sobre a fonte de contaminação. Além disso, diferenças foram encontradas, dependendo da posição dos queijos no defumador e na direção em que queijo estiveram expostos a fumaça. Aqueles colocados diretamente no caminho da fumaça foram as amostras com maior nível de contaminação.

Somente com 100 % do tempo normal, para as alturas 5, 15, 20 cm em 45 minutos de queima do carvão foram possíveis identificar os HPA em QC assados. Esses resultados contrastam com os estudos de Rose *et al.* (2015) em experimentos com carne grelhada, exceto para carne de hambúrguer, mas não com o estudo de Guillén *et al.* (2011).

Apesar de resultados opostos entre os estudos de Guillén *et al.* (2011) e o de Rose *et al.* (2015), e de serem pesquisas com matrizes diferentes, ao relatarem que a posição das amostras no defumador influenciaram na concentração de HPA conforme afirma Guillén *et al.* (2011), na investigação com QC observou-se pouca diferença nas concentrações de HPA, exceto para o Naftaleno, Acenaftaleno, Acenafteno, Fenantreno e Fluoreno em amostra preparadas nas distintas alturas.

5.3 RESULTADOS DOS CÁLCULOS DE TOXICIDADE COM BASE EM FET (FATOR DE EQUIVALÊNCIA TÓXICA) AO B (a) P

O nível de toxicidade continua sendo explorado em diversos estudos como o de Lee *et al.* (2018), Grova *et al.* (2017), Rose *et al.* (2015) e Nisbet e Lagoy (1992).

Atrelado a tais pesquisa, sugere-se na comunidade científica avaliações quanto: a quantidade, o nível de exposição, toxicidade do HPA para o ser humano e qual a margem máxima de ingestão de alimentos contaminados por compostos podem ser prejudiciais aos humanos.

Veiga *et al.* (2014), Rose *et al.* (2015) e Esposito *et al.* (2015) destacaram a importância do monitoramento de HPA, como o do B(a)P mais os 4 HPA de relevância toxicológicas comprovadas, quando estes são ingeridos através dos alimentos. Para Esposito *et al.* (2015) alimentos como queijos defumados trazem riscos para seres humanos devido a elevada concentração dos 4 HPA encontradas em amostras de mozzarella de Bufala, já Rose *et al.* (2015) destaca que o processamento de alimentos a altas temperaturas na forma de, grelhar, fritar, assar e tostar, por tempo prolongado pode ser um risco potencial de contaminação por HPA em seres humanos.

Esta investigação constatou que o QC possui um potencial risco de contaminação por HPA, pois podem adsorver em elevados níveis dos mesmos. Pesquisas de Lee *et al.* (2018) e Grova *et al.* (2017) relataram que B (a) P e D (a,h) P são compostos de alto grau de carcinogenicidade. Segundo Nisbet e Lagoy (1992), experimentos com ratos revelaram que estes dois compostos possuem maior índice de causar câncer.

Conforme dito anteriormente, o limite máximo estabelecido de B (a) P em produtos contendo aromatizantes originados de fumaça em alimentos brasileiros é de $0,03 \mu\text{g kg}^{-1}$ (BRASIL, 2007). Na Tabela 23, o CDI calculado foi baseado na Equivalência Tóxica de cada HPA em relação aos efeitos tóxicos do B (a) P.

Tabela 23 — Valores de CDI calculados para as concentrações obtidas de 8 HPA nas diferentes alturas de processamento do QC na churrasqueira

Altura	N	TEQ Σ 8 HPA (mg)	IRi (mg)	ED anos de vida adulto (30-59)	AD anos de vida total - RJ	BW (69,6 kg)	CDI
5cm	2	0,737	50000	44,5	75,9	69,6	$3,11 \times 10^{-02}$
15cm	2	0,742	50000	44,5	75,9	69,6	$3,13 \times 10^{-02}$
20cm	2	0,747	50000	44,5	75,9	69,6	$3,15 \times 10^{-02}$

Fonte: Dados obtidos do estudo, 2018.

Cálculos baseados nas concentrações dos 8 HPA prioritários no monitoramento pela OMS e USEPA foram realizados segundo Lee *et al.* (2018). Foram calculados a exposição a longo prazo através da Equivalência Tóxica entre o B (a) P e os 8 HPA. A ingestão diária dos HPA em QC seguiu como base os dados de ingestão média diária da população do estado do Rio de Janeiro, utilizando também o peso médio corpóreo desta população, conforme descrito pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística censo dos anos 2008 a 2009, sendo este o mais recente para essa característica.

As concentrações obtidas das amostras de QC processadas em alturas diferentes sugerem um alto nível de concentração em $\mu\text{g kg}^{-1}$ de 8 HPA estabelecidos pelas agências internacionais, que monitoram tais níveis em alimentos. Apesar do documento atual CE 2015/1125 não relatar em seu conteúdo limites para queijos de qualquer espécie, as pesquisas de Lee *et al.* (2018), com diversas matrizes alimentícias permitiram a utilização de modelos matemáticos para estimar a toxicidade dos HPA na quantidade de QC ingerido pela população do Rio de Janeiro nesta investigação.

De acordo com Lee *et al.* (2018), os maiores níveis de concentração dos 8 HPA foram observados em alimentos de maior consumo na Coréia, logo, o café e o arroz destacaram-se onde maiores concentrações principalmente de D (a, h) A. Estimou-se que o CDI de 5×10^{-6} e o $\text{TEQ}_{\text{B (a) P}}$ foi cerca de $0,18 \mu\text{g kg}^{-1}$. Ressalta-se que no estudo Lee *et al.* (2018) o nível de exposição aos compostos carcinogênicos aumenta quanto maior for o consumo destes, logo $\text{TEQ}_{\text{B (a) P}}$, servem como parâmetros de monitoramento da exposição humana aos HPA presentes em alimentos.

Conforme descrito anteriormente as concentrações encontradas em QC foram maiores do que as apresentadas nos 7 grupos de alimentos estudados por Lee *et al.* (2018). Em QC, o CDI de B (a) P comparadas as alturas, não houve diferenças significativas (3,11, 3,13, 3,15 $\mu\text{g kg}^{-1} \text{ dia}^{-1}$), para a $\text{TEQ}_{\text{B (a) P}}$ os valores foram (737,47, 741,98 e 747,40 $\mu\text{g kg}^{-1}$). Estes valores foram estimados para a população brasileira, com base no consumo de QC estimados pelo IBGE em 2010. O referido instituto destaca, 2 espetos (totalizados 46 g) de consumo por pessoa, e em g dia^{-1} .

A seguir, na Tabela 24, são comparados os valores máximo e mínimo de CDI e $\text{TEQ}_{\text{B (a) P}}$ para Σ 8 HPA calculados por Lee *et al.* (2018) com os valores calculados neste estudo:

Tabela 24 — Valores máximo e mínimos de CDI e TEQ_{B(a)P} de Lee *et al.* (2018) comparados aos de QC.

Lee <i>et al.</i> (2018)		Pesquisa com QC	
CDI mg kg ⁻¹ dia ⁻¹	TEQ BaP µg kg ⁻¹	CDI mg kg ⁻¹ dia ⁻¹	TEQ BaP µg kg ⁻¹
1,23 X 10 ⁻⁴	2,91	3,15 X 10 ⁻²	747,4
9,88 X 10 ⁻⁶	0,01	3,11 X 10 ⁻²	737,4

Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

5.4 INGESTÃO DE HPA POR QC

A OMS e a EFSA estabeleceram limites para o nível de exposição humana aos 8HPA relativos ao risco de causar câncer ao longo da vida adulta. Segundo Lee *et al.* (2018), a Margem de Exposição (MOE) baseia-se na razão entre a média de peso corpóreo de determinado grupo de pessoas ou população sobre a Ingestão Diária Crônica (CDI).

Os cálculos da Margem de Exposição recomendados pela OMS (MOE) ao longo da vida foram realizados com base neste dado disposto pelo IBGE. Para o Rio de Janeiro, não existe dados referentes ao consumo diário de QC ou de sua proporção por pessoa. Logo, considerou-se os valores estimados de CDI e MOE baseados por item alimentar, em 25 g que é o peso médio de um espeto de um QC, conforme descrito por Lee *et al.* (2018), que em seus estudos não conseguiram mensurar o consumo diário de certos alimentos por pessoa, estudados nos 7 grupos principais. O estudo com QC demonstra que a exposição humana aos 8 HPA é significativamente preocupante, se comparadas aos estudos de Lee *et al.* (2018) em diversos alimentos que possuíam valores de CDI e TEQ_{B(a)P} menores.

Diante dos cálculos obtidos de exposição crônica em anos de vida adulta, pela ingestão de alimentos contaminados com 8 HPA segundo Lee *et al.* (2018), e baseados na expectativa de vida dos brasileiros, a Tabela 25, a seguir, representa os cálculos MOE e o Índice do risco de causar câncer acrescido aos anos de vida ou expectativa de vida. Foram dispostos no Apêndice E todos os dados tabulados para os cálculos de toxicidade estimada

Tabela 25: Cálculo de MOE e ILCR, baseados nas concentrações indicadas em QC assado em churrasqueira.

Altura	MOE (mg kg ⁻¹ BW dia ⁻¹)	CDI (mg kg ⁻¹ dia ⁻¹)	Risco do BaP em causar câncer (mg kg ⁻¹ BW dia ⁻¹)	ILCR
5cm	1097,94	3,11 x 10 ⁻²	7,3	2,27 x 10 ⁻¹
15cm	1091,28	3,13 x 10 ⁻²	7,3	2,28 x 10 ⁻¹
20cm	1083,36	3,15 x 10 ⁻²	7,3	2,30 x 10 ⁻¹

Fonte: Dados obtidos do estudo, 2018.

Verificou-se que os valores de MOE e ILCR foram calculados no estudo de Lee *et al.* (2018) com base na contaminação pelos Σ 8 HPA em cada alimento. Ou seja, os cálculos da Margem de Exposição ao longo da vida adulta e do Índice em causar câncer foram calculados para cada altura 5, 15 e 20 cm, as quais representaram o item alimentar processado.

Os valores das concentrações de HPA encontrados no estudo com QC foram mensurados em $\mu\text{g kg}^{-1}$. Os valores de MOE e ILCR foram dispostos nos estudos de Lee *et al.* (2018) em mg Kg^{-1} , necessitando nesse caso, a conversão de unidades de medidas.

A interpretação do estudo e dos cálculos de Lee *et al.* (2018) foram realizadas com correções de unidades medidas na investigação em QC assados. Estas interpretações estão representadas nas tabelas os valores calculados no Apêndice E.

A Tabela 26 demonstra os valores de referência com base no MOE e ILCR descrito em pesquisas com diversos alimentos, sendo 7 grupos principais que não inclui o queijo de coalho ou queijos de qualquer origem. Porém serviram como perfil de comparação para relatar a insegurança no preparo de queijo de coalho e o nível de exposição tóxica aos 8 HPA prioritários e monitorados em alimentos, pela OMS.

Os valores de MOE e ILCR estimados baseados nas concentrações encontradas neste estudo com QC nas diferentes alturas foram preocupantes. Nesse caso, a faixa para os compostos com maior índice de causar câncer descritos por Nise e Lagoy (1992) e Lee *et al.* (2018) foram de $1,07 \times 10^{-2}$ a $1,4710^{-2}$. Para a MOE dos QC assados a 5 cm foram de $1097,94 \text{ mg kg}^{-1}\text{BW dia}^{-1}$; a 15 cm $1091,28 \text{ mg kg}^{-1}\text{BW dia}^{-1}$ e a 20 cm $1083,36 \text{ mg kg}^{-1}\text{BW dia}^{-1}$.

Diante dos resultados obtidos na Tabela 25 e comparando com a Tabela 26, pode-se inferir que o risco de causar câncer ao longo da vida adulta tanto para a população do Rio de Janeiro, como para a do Brasil, em relação ao consumo de QC e de acordo com o recomendado para monitoramento dos 8 HPA em alimentos pela OMS (1998), citado por Lee *et al.* (2018), porém com resultados diferentes deste último, o risco estimado pode ser potencial.

No Apêndice E os resultados completos dos cálculos de CDI, TEQ_{B(a)P}, MOE, e ILCR foram apresentados. O índice do risco de causar câncer pela estimativa de consumo de QC ao longo da vida adulta foram constatados em maiores que 83 % para B (a) P e maiores que 69 % para D (a,h) A, os compostos com maior índice de carcinogenicidade listadas pelo estudo Nisbet e Lagoy (1992) com ratos. Os resultados dos cálculos do índice percentual do risco de causar câncer pela ingestão de QC estão dispostos no Apêndice E. Uma Tabela extraída do IBGE sobre consumo médio diário de QC também está disponível no Apêndice E.

Tabela 26: Valores de referência de MOE e ILCR, segundo a agência internacional

MOE segundo EFSA, (2008)	ILCR segundo USEPA, (2005)	
<10,000 possivelmente preocupante	< 10 ⁻⁶	RISCO ACEITÁVEL OU SEM CONSEQUÊNCIA
10.000e100.000 denota baixa preocupação	10 ⁻⁶ ~ 10 ⁻⁴	RISCO POTENCIAL
> 100.000 implica insignificante preocupação	>10 ⁻⁴	SÉRIO OU GRAVE RISCO
> 1.000.000 significa preocupação desprezível		

Fonte: Extraído de Lee *et al.*, 2018.

CONCLUSÃO

O queijo de coalho destaca-se na culinária brasileira devido a textura, sabor e praticidade de preparo. Compostos tóxicos, como hidrocarbonetos policíclicos aromáticos são formados, liberados ou adsorvidos na superfície de diversas matrizes, podendo com isso, contaminar vários alimentos ingeridos pelo homem. A forma de preparo de alimentos em churrasqueiras tem sido questionada nas comunidades científicas e nas agências reguladoras internacionais para monitoramento ambiental e de alimentos. Foi possível observar neste estudo um nível elevado de contaminação de HPA em QC, o qual não havia sido percebido em outras pesquisas com matrizes semelhantes. A estimativa sobre a toxicidade que podem causar pelas concentrações de B (a) P e D (a,h) A, apresentada nesta investigação, corroboram para novas pesquisas e análises de HPA envolvendo produtos alimentícios industriais ou artesanais nacionais, bem como o modo de preparo destes de forma segura para a alimentação humana.

Sugere-se ainda, a partir desta investigação, mais estudos em relação a quantidade de HPA que são liberados e adsorvidos em uma matriz alimentícia, com caráter altamente lipofílico como o QC. Nesse contexto, faz-se necessário mais pesquisas sobre quanto de ingestão diária de queijo de coalho contaminados com tais níveis encontrado neste estudo podem ser capazes de causar efeito tóxico ao organismo humano. Visto que, a ação destes compostos é silenciosa, por meio de metabólitos acumulativos e prejudiciais à saúde, manifestando-se ao longo prazo ou ao em vida adulta, ou até mesmo em gerações futuras.

Portanto, conclui-se com esta investigação, que o QC assado em churrasqueira com carvão vegetal, pode causar algum dano à saúde humana em alguma fase da vida adulta. Fato este, que se verifica comparando as recomendações de limites máximo de composto aromáticos, incluindo HPA, em alimentos estabelecidos por agências internacionais e pela ANVISA.

Altas concentrações de HPA foram encontradas neste estudo, em amostras assadas nas distintas alturas 5, 15 e 20 cm. Isso se deve, ao preparo do QC em churrasqueira, por longo período exposto a chama e fumaça do carvão vegetal, bem como a exposição deste produto as brasas queimadas por período estendido. Essas

concentrações encontradas acima do limite estabelecido por autoridades sanitárias, pode ser interpretada e classificada como potencial risco à saúde humana. Mesmo assim, estudos experimentais com mais queijos de diversas origens e com QC cru precisam ser desenvolvidos. Cabe ressaltar que o uso da Técnica de CG-EM colaborou para a identificação e quantificação dos 16 HPA incluindo os mais tóxicos presentes nas amostras assadas em churrasqueira. Necessitando ainda que tais experimentos sejam otimizados em seu método de extração química dos HPA propostos da matriz. Assim como, mais pesquisas no campo da bioquímica conjunto a química analítica deve ser projetada para nortear com mais certeza as rotas metabólicas, em que, os HPA de menor ou maior número de anéis aromáticos perfazem o organismo, bem como os valores de dose e resposta aos efeitos carcinogênicos, genotóxicos e mutagênicos ocasionados pela contaminação durante ou após a ingestão de queijo de coalho.

REFERÊNCIAS

AGARCIA, L. P. *et al.* **Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em alimentos: uma revisão.** Publicação Eletrônica Revista de Medicina Veterinaria v. 8, p. 2292-2450, 2014.

ALSHAARAWY, O. *et al.* **Polycyclic aromatic hydrocarbon biomarkers and serum markers of inflammation: a positive association that is more evident in men.** Environmental Research, v. 126, p. 98-104, 2013.

ALSHAARAWY, O. *et al.* **Urinary polycyclic aromatic hydrocarbon biomarkers and diabetes mellitus.** Occup Environ Med, p. 2013-101987, 2014.

BARRANCO, A. *et al.* **Solid-phase clean-up in the liquid chromatographic determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in edible oils.** Journal of Chromatography A, v. 988, n. 1, p. 33-40, 2003.

BEMFEITO, R. M. *et al.* **Temporal dominance of sensations sensory profile and drivers of liking of artisanal Minas cheese produced in the region of Serra da Canastra, Brazil.** Journal of dairy science, v. 99, n. 10, p. 7886-7897, 2016.

BERGAMINI, C. V. *et al.* **Characterisation of biochemical changes during ripening in Argentinean sheep cheeses.** Small ruminant research, v. 94, n. 1, p. 79-89, 2010.

BERTINETTI, I. A. *et al.* **Accumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in rice subjected to drying with different fuels plus temperature, industrial processes and cooking.** Journal of Food Composition and Analysis, v. 66, p. 109-115, 2018.

BEZERRA, T. K. A. *et al.* **Effect of supplementation with probiotic lactic acid bacteria, separately or combined, on acid and sugar production in goat 'coalho' cheese.** LWT-Food Science and Technology, v. 75, p. 710-718, 2017.

BEZERRA, T. K. A. *et al.* **Proteolysis in goat "coalho" cheese supplemented with probiotic lactic acid bacteria.** Food chemistry, v. 196, p. 359-366, 2016.

BORGES, B. A. G. **Aplicação da Técnica de Microextração Dispersiva Líquido-Líquido na Avaliação da Contaminação da Água por PAHs e Nitro-PAHs.** 2015.

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução RDC nº 360: Regulamento Técnico sobre Rotulagem Nutricional de Alimentos Embalados, tornando obrigatória a rotulagem nutricional.** Brasília, DF. 23 dez. 2003. p. 1-9.

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução RDC nº 24: Dispõe sobre a oferta, propaganda, publicidade, informação e outras práticas correlatas cujo objetivo seja a divulgação e a promoção comercial de alimentos considerados com quantidades elevadas de açúcar, de gordura saturada, de gordura trans, de sódio, e de bebidas com baixo teor nutricional, nos termos desta Resolução, e dá outras providências.** Brasília, DF, 15 jun. 2010. p. 1-7.

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Teor de sódio nos alimentos processados.** Brasília, DF, Informe técnico nº69 de 13 dez de 2011, p. 28-38, pub. 2015.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **PORTARIA Nº 146 Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade dos Produtos Lácteos.** GABINETE DO MINISTRO. Brasília, DF, 7 mar. 1996. p. 4-7.

BRASIL. **Guia para validação de métodos analíticos.** Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC Nº 166. 24 de Julho, 2017.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Instrução Normativa nº 30. Departamento de Inspeção de produtos de origem animal.** Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 26 de jun. de 2001. p.13-5.

BRITO, C. *et al.* **Viabilidad y efectos del probiótico *Lactobacillus paracasei* ssp *paracasei* en queso gauda semidescremado chileno.** Archivos Latinoamericanos de Nutrición, v. 61, n. 4, p. 414, 2011.

BRODY, J. G. *et al.* **Environmental pollutants and breast cancer.** Cancer. v. 109, n. S12, p. 2667-2711, 2007.

BURITI, F. C. A.; CARDARELLI, H. R.; SAAD, S. M. I. **Textura instrumental e avaliação sensorial de queijo fresco cremoso simbiótico: implicações da adição de *Lactobacillus paracasei* e inulina**. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, v. 44, n. 1, p. 75-84, 2008.

CAGGIANO, R. *et al.* **Metal levels in fodder, milk, dairy products, and tissues sampled in ovine farms of Southern Italy**. Environmental research, v. 99, n. 1, p. 48-57, 2005.

CALEJA, C. *et al.* **Foeniculum vulgare Mill. as natural conservation enhancer and health promoter by incorporation in cottage cheese**. Journal of functional foods, v. 12, p. 428-438, 2015.

CALEJA, C. *et al.* **Foeniculum vulgare Mill. as natural conservation enhancer and health promoter by incorporation in cottage cheese**. Journal of functional foods, v. 12, p. 428-438, 2015

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

CARVALHO, F.; PRAZERES, A. R.; RIVAS, J. **Cheese whey wastewater: characterization and treatment**. Science of the total environment, v. 445, p. 385-396, 2013.

CAVALCANTE, J. F. M. *et al.* **Processamento do queijo coalho regional empregando leite pasteurizado e cultura láctica endógena**. Ciência e Tecnologia de Alimentos. Campinas, São Paulo, v. 27, n. 1, p. 205-214, mar. 2007.

CICHELO, S. A. **Oxygen absorbers in food preservation: a review**. Journal of food science and technology, v. 52, n. 4, p. 1889-1895, 2015.

CIECIERSKA, M.; OBIEDZINSKI, M. W. **Polycyclic aromatic hydrocarbons in infant formulae, follow-on formulae and baby foods available in the Polish market**. Food Control 21, 1166–1172. 2010.

CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. **Code of practice for the reduction of contamination of food with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) from smoking and direct drying processes**. CAC/RCP, v. 68, 2009.

COPPA, G. V. *et al.* **Structural characterisation of chondroitin sulphate from Italian cheese Parmigiano-Reggiano.** Food chemistry, v. 134, n. 1, p. 195-199, 2012.

COSTA, A. F. **Avaliação da contaminação humana por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAHs): 1-hidroxipireno urinário.** Centro de Estudos de Saúde do Trabalhador e Ecologia humana, Fundação Oswaldo Cruz, 2001.

D'AMATO, C.; TORRES, J. P. M.; MALM, O. **DDT (dicloro difenil tricloroetano): toxicidade e contaminação ambiental-uma revisão.** Química Nova, v. 25, n. 6/A, p. 995-1002, 2002.

DA CÂMARA, C. L. **História da alimentação no Brasil.** Global Editora e Distribuidora Ltda, 2017.

DA SILVA, D. F. *et al.* **Effect of commercial konjac glucomannan and konjac flours on textural, rheological and microstructural properties of low fat processed cheese.** Food Hydrocolloids, v. 60, p. 308-316, 2016.

DAVID, W. E.; MARK A, E. A. **Cheese structure and current methods of analysis.** International Dairy Journal, Volume 18, Issue 7, July, p. 759-773, 2008.

DE FREITAS FILHO, J. R. *et al.* **Avaliação da qualidade do queijo “coalho” artesanal fabricado em Jucati-PE.** Extensio: Revista Eletrônica de Extensão, v. 6, n. 8, p. 35-49, 2009.

DE LIMA, R. F. *et al.* **PAHs in corn grains submitted to drying with firewood.** Food chemistry, v. 215, p. 165-170, 2017.

DIAS, B. F. *et al.* **Qualidade microbiológica e físico-química de queijo minas frescal artesanal e industrial.** Revista de Agricultura Neotropical, v. 3, n. 3, p. 57-64, 2016.

DO EGYPTO, R. C. R. de *et al.* **Nutritional, textural and sensory properties of Coalho cheese made of goats', cows' milk and their mixture.** LWT-Food Science and Technology, v. 50, n. 2, p. 538-544, 2013.

DOMINGO, J. L.; NADAL, M. **Human dietary exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: A review of the scientific literature.** Food and Chemical Toxicology, v. 86, p. 144-153, 2015.

DOS SANTOS, K. M. O. *et al.* **Probiotic caprine Coalho cheese naturally enriched in conjugated linoleic acid as a vehicle for *Lactobacillus acidophilus* and beneficial fatty acids.** International Dairy Journal, v. 24, n. 2, p. 107-112, 2012.

DUEDAHL-OLESEN, L. **Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in foods.** In: Persistent Organic Pollutants and Toxic Metals in Foods, p. 308-333, 2013.

EFSA, European Food Safety Authority. **Scientific opinion of the panel on contaminants in the food chain on a request from the European commission on polycyclic aromatic hydrocarbons in food.** The Journal European Food Safety Authority, n. 724, 1 - 114, 2008.

EL-SHAHAWIA, M. S. *et al.* **An overview on the accumulation, distribution, transformations, toxicity and analytical methods for the monitoring of persistent organic pollutants.** Talanta, 80(5):1587–1597. 2010.

EPA U.S., Unit Stat Environmental Protection Agency. **Doseeresponse analysis of ingested benzo[a]pyrene.** Washington, Human Health Assessment Group, Office of Health and Environmental Assessment, n.. 50-32-8,. 1991.

EPA, U. S. **Guidelines for carcinogen risk assessment.** Washington, DC, 2005.

ESPOSITO, M. *et al.* **Influence of different smoking techniques on contamination by polycyclic aromatic hydrocarbons in traditional smoked Mozzarella di Bufala Campana.** International Journal of Dairy Technology, v. 68, n. 1, p. 97-104, 2015.

ESSER, N. *et al.* **Inflammation as a link between obesity, metabolic syndrome and type 2 diabetes.** Diabetes research and clinical practice, v. 105, n. 2, p. 141-150, 2014.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY, EFSA. **Amendment of Regulation (EC) No 1881/2006 as regards maximum levels for polycyclic aromatic hydrocarbons in foodstuffs.** Commission Regulation, n° 835 of 19 August 2011 p. 215.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY, EFSA. **Amending Regulation (EC) No 1881/2006 as regards the maximum levels of polycyclic aromatic hydrocarbons present in Katsuobushi and smoked foods.** Commission Regulation, n^o1125 of 10 July 2015. p. 184.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY, EFSA. **Journal published by John Wiley and Sons Ltd on behalf of European Food Safety Authority.** Commission Regulation, 28 June 2016. p. 1-13.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY, EFSA. **Maximum levels for certain contaminants in foodstuffs.** Commission Regulation, n^o 1881 of 19 December 2006. p. 11-12.

EVERETT, D. W.; AUTY, M. A. E. **Cheese structure and current methods of analysis.** International Dairy Journal, v. 18, n. 7, p. 759-773, 2008.

FABRE, B.; ROTH, E.; KERGARAVAT, O. **Analysis of the insecticide hexachlorocyclohexane isomers in biological media: a review.** Environmental Chemistry Letters, v. 3, n. 3, p. 122-126, 2005.

FAO/WHO, World Health Organization. **Joint FAO/WHO expert committee on food additives. Sixty-fourth meeting.** Roma, pág. 8 - 17 Fevereiro, 2005.

FASANO, E. *et al.* **Detection of polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked buffalo mozzarella cheese produced in Campania Region, Italy.** Journal of the Science of Food and Agriculture, v. 96, n. 5, p. 1704-1708, 2016.

FASANO, E. *et al.* **Profiling, distribution and levels of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in traditional smoked plant and animal foods.** Food Control, v. 59, p. 581-590, 2016.

FLORES, A. V. *et al.* **Organoclorados: um problema de saúde pública.** Ambiente & Sociedade, 2004.

FOOD SAFETY AUTHORITY IRELAND, FSAI. **Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in food.** Toxicology Factsheet Series, v. 2, p. 1-10, 2015.

FREITAS, L.P. E; *et al.* **Macronutrients consumption by gym users.** Revista Brasileira de Nutrição e Esportiva. 7, 37, 43-50, Jan. 2013.

GAN, H. H. *et al.* **Development and validation of an APCI-MS/GC–MS approach for the classification and prediction of Cheddar cheese maturity.** Food chemistry, v. 190, p. 442-447, 2016.

GARCIA, E. F. *et al.* **Development and quality of a Brazilian semi-hard goat cheese (coalho) with added probiotic lactic acid bacteria.** International journal of food sciences and nutrition, v. 63, n. 8, p. 947-956, 2012.

GASULL, M. *et al.* **Empirical analyses of the influence of diet on human concentrations of persistent organic pollutants: a systematic review of all studies conducted in Spain.** Environment international, v. 37, n. 7, p. 1226-1235, 2011.

GIRI, A. *et al.* **Relevance of two-dimensional gas chromatography and high resolution olfactometry for the parallel determination of heat-induced toxicants and odorants in cooked food.** Journal of Chromatography A, v. 1388, p. 217-226, 2015.

GONZÁLEZ-CÓRDOVA, A. F. *et al.* **Invited review: Artisanal Mexican cheeses.** Journal of dairy science, v. 99, n. 5, p. 3250-3262, 2016.

GROVA, N. *et al.* **Identification of new tetrahydroxylated metabolites of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in hair as biomarkers of exposure and signature of DNA adduct levels.** Analytica chimica acta, v. 995, p. 65-76, 2017.

GUATEMALA-MORALES, G. M. *et al.* **Validation of analytical conditions for determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in roasted coffee by gas chromatography–mass spectrometry.** Food Chemistry, v. 197, p. 747-753, 2016.

GUILLÉN, M. D. *et al.* **Contamination of cheese by polycyclic aromatic hydrocarbons in traditional smoking. Influence of the position in the smokehouse on the contamination level of smoked cheese.** Journal of dairy science, v. 94, n. 4, p. 1679-1690, 2011.

GUL, O. *et al.* **Evaluation of polycyclic aromatic hydrocarbons in Circassian cheese by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection.** Journal of Food Composition and Analysis, v. 37, p. 82-86, 2015.

HAN, J. *et al.* **Polyphenolic compounds as functional ingredients in cheese.** Food Chemistry, v. 124, n. 4, p. 1589-1594, 2011.

HOU, J. *et al.* **Combined effect of urinary monohydroxylated polycyclic aromatic hydrocarbons and impaired lung function on diabetes.** Environmental Research, v. 148, p. 467-474, 2016.

HOU, J. *et al.* **Exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons and central obesity enhanced risk for diabetes among individuals with poor lung function.** Chemosphere, v. 185, p. 1136-1143, 2017.

HUANG, M.; PENNING, T. M. **Processing contaminants: polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs).** 2014.

HUERTAS-PÉREZ, J. F. *et al.* **PAHs in baby food: assessment of three different processing techniques for the preparation of reference materials.** Analytical and bioanalytical chemistry, v. 407, n. 11, p. 3069-3081, 2015.

IAMMARINO, M. *et al.* **Survey of benzoic acid in cheeses: contribution to the estimation of an admissible maximum limit.** Food Additives and Contaminants: Part B, v. 4, n. 4, p. 231-237, 2011.

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <https://ww2.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pof/2008_2009_encaa/defaulttabpdf_GR.shtm> Dados de 2008-2009 . Acessado em : 13 de jun de 2018.

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <https://ww2.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pof/2008_2009_analise_consumo/default.shtm> . Dados de 2008-2009 . Acessado em: 13 de jun de 2018.

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <https://ww2.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pof/2008_2009_analise_consumo/defaulttab_zip_alimentos.shtm> Dados de 2008-2009. Acessado em : 11 de jun de 2018.

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <https://ww2.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pof/2008_2009>

[_encaa/default.shtm](#) > Dados publicados em 2010. Acessado em : 13 de jun de 2018.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, IARC. **Agents Classified by the International Agency for Research on Cancer**. Monographs. v. 1-103. Last updated 22 February, 2012.

ISHIZAKI, A. *et al.* **Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in food samples by automated on-line in-tube solid-phase microextraction coupled with high-performance liquid chromatography-fluorescence detection**. Journal of Chromatography A. 1217, 5555–5563. 2010.

JANOSZKA, B. **HPLC-fluorescence analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in pork meat and its gravy fried without additives and in the presence of onion and garlic**. Food Chemistry, v. 126, n. 3, p. 1344-1353, 2011.

KAMANKESH, M. *et al.* **Rapid determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in grilled meat using microwave-assisted extraction and dispersive liquid–liquid microextraction coupled to gas chromatography–mass spectrometry**. Meat Science, v. 103, p. 61-67, 2015.

KHALIL, A. *et al.* **Polycyclic aromatic hydrocarbons potentiate high-fat diet effects on intestinal inflammation**. Toxicology Letters, v. 196, n. 3, p. 161-167, 2010.

KIM, K.-H. *et al.* **A review of airborne polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and their human health effects**. Environment International, v. 60, p. 71-80, 2013

KIRA, C. S.; AKIKO-MAIHARA, V. **Determinação de elementos essenciais maiores e traço em queijos por espectrometria de emissão atômica com plasma de argônio induzido após digestão parcial**. Ciência e Tecnologia de Alimentos, v. 27, n. 3, 2007.

KMITA, A. *et al.* **Pyrolysis of organic ester cured alkaline phenolic resin: identification of products**. Journal of Analytical and Applied Pyrolysis, 2017.

KMITA, A. *et al.* **Thermal decomposition of foundry resins: A determination of organic products by thermogravimetry–gas chromatography–mass spectrometry (TG–GC–MS)**. Arabian Journal of Chemistry, 2016.

LANDAUD, S.; HELINCK, S.; BONNARME, P. **Formation of volatile sulfur compounds and metabolism of methionine and other sulfur compounds in fermented food**. *Applied microbiology and biotechnology*, v. 77, n. 6, p. 1191-1205, 2008.

LE QUÉRÉ, J.-L.; MOLIMARD, P. **Cheese Flavour**. *Cheese* v. 1, p. 330–340, 2002.

LEDESMA, E.; RENDUELES, M.; DÍAZ, M. **Contamination of meat products during smoking by polycyclic aromatic hydrocarbons: Processes and prevention**. *Food Control*, v. 60, p. 64-87, 2016.

LEDESMA, E.; RENDUELES, M.; DÍAZ, M. **Spanish smoked meat products: benzo (a) pyrene (BaP) contamination and moisture**. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 37, p. 87-94, 2015.

LEE, B. M.; SHIM, G. A. **Dietary exposure estimation of benzo [a] pyrene and cancer risk assessment**. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, v. 70, n. 15-16, p. 1391-1394, 2007.

LEE, J.-G. *et al.* **Effects of grilling procedures on levels of polycyclic aromatic hydrocarbons in grilled meats**. *Food chemistry*, v. 199, p. 632-638, 2016.

LEE, Jaewook *et al.* **Monitoring and risk assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in processed foods and their raw materials**. *Food Control*, v. 92, p. 286-292, 2018.

LUZ, R. L. F. de *et al.* **Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPA) em leite e derivados: contaminação e influência na saúde dos consumidores**. *Revista Eletrônica Acervo Saúde/Electronic Journal Collection Health ISSN*, v. 2178, p. 2091. 2016.

LUZ, R. L. F. de *et al.* **Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPA) queijos defumados e em queijos assados em churrasqueira**. *Acervo Eletrônico, Universidade Federal de Lavras*. 2013.

LUZARDO, O. P. *et al.* **Assessment of the exposure to organochlorine pesticides, PCBs and PAHs in six species of predatory birds of the Canary Islands, Spain**. *Science of The Total Environment*, v. 472, p. 146-153, 2014.

MACHADO G. M. de *et al.* **Physico-chemical aspects of “Coalho” type cheese using lactic acid.** Brazilian Journal of Food and Nutrition. Vol.22(3), 421-428. 2011.

MALARUT, J.-A.; VANGNAI, K. **Influence of wood types on quality and carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) of smoked sausages.** Food Control, v. 85, p. 98-106, 2018.

MAMEDE, M. E. O. de *et al.* **Sensorial characteristics and chemical composition of manufactured coalho cheese.** Revista Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, v. 69, n. 3, 2010.

MARTORELL, I. *et al.* **Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in foods and estimated PAH intake by the population of Catalonia, Spain: temporal trend.** Environment International, v. 36, n. 5, p. 424-432, 2010.

MATSUDA, M.; SHIMOMURA, I. **Increased oxidative stress in obesity: implications for metabolic syndrome, diabetes, hypertension, dyslipidemia, atherosclerosis, and cancer.** Obesity Research & Clinical Practice, v. 7, n. 5, p. e330-e341, 2013.

MEDEIROS, B. G. S. de *et al.* **Physical characterisation of an alginate/lysozyme nano-laminate coating and its evaluation on ‘Coalho’cheese shelf life.** Food and Bioprocess Technology, v. 7, n. 4, p. 1088-1098, 2014.

MICHALSKI, R. *et al.* **The content of benzo (a) pyrene in Slovakian smoked cheese.** Polish journal of food and nutrition sciences, v. 12, n. 4, p. 33-38, 2003.

MISTRY, V. V. **Low fat cheese technology.** International dairy journal, v. 11, n. 4, p. 413-422, 2001.

MOLLE, D. R.D. *et al.* **Polycyclic aromatic hydrocarbons in canola, sunflower and corn oils and estimated daily intake.** Food Control, v. 81, p. 96-100, 2017

MORET, S.; CONTE, L. S. **Polycyclic aromatic hydrocarbons in edible fats and oils: occurrence and analytical methods.** Journal of Chromatography A, v. 882, n. 1-2, p. 245-253, 2000.

NAILA, A. *et al.* **Control of biogenic amines in food—existing and emerging approaches.** Journal of Food Science, v. 75, n. 7, 2010.

NARDOCCI, A. C. **Avaliação probabilística de riscos da exposição aos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) para a população da cidade de São Paulo.** Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

NASSU, R. T.; MACEDO, B. A.; LIMA, M. H. P. **Queijo de Coalho.** Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica. 2006.

NATIONAL GEOGRAPHIC, HISTORY OF CHEESE. **National Historic Cheesemaking Center.** Disponível em: <http://www.nationalhistoriccheesemakingcenter.org/history-of-cheese>. Acessado em: 05 abr. 2017.

NIEVA-ECHEVARRÍA, B.; GOICOECHEA, E.; GUILLÉN, M. D. **Effect of liquid smoking on lipid hydrolysis and oxidation reactions during in vitro gastrointestinal digestion of European sea bass.** Food Research International, v. 97, p. 51-61, 2017.

NISBET, I. C.T.; LAGOY, P. K. **Toxic equivalency factors (TEFs) for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs).** Regulatory toxicology and pharmacology, v. 16, n. 3, p. 290-300, 1992.

NUDI, A. H. *et al.* **Validation of *Ucides cordatus* as a bioindicator of oil contamination and bioavailability in mangroves by evaluating sediment and crab PAH records.** Environment international, v. 33, n. 3, p. 315-327, 2007

NYIRI, Z. *et al.* **Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in infant formula using solid state urea clathrate formation with gas chromatography–tandem mass spectrometry.** Talanta, v. 174, p. 214-220, 2017.

OLATUNJI, O. S. *et al.* **Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons [PAHs] in processed meat products using gas chromatography–Flame ionization detector.** Food Chemistry, v. 156, p. 296-300, 2014.

ORDIALES, E. *et al.* **Influence of the technological properties of vegetable rennet (*Cynara cardunculus*) on the physicochemical, sensory and rheological**

characteristics of 'Torta del Casar' cheese. International journal of dairy technology, v. 67, n. 3, p. 402-409, 2014.

OZCAN, T. *et al.* **The formation of polycyclic hydrocarbons during smoking process of cheese.** Mljekarstvo, v. 61, n. 3, p. 193-198, 2011.

PAGLIUCA, G. *et al.* **Determination of high molecular mass polycyclic aromatic hydrocarbons in a typical Italian smoked cheese by HPLC-FL.** Journal of agricultural and food chemistry, v. 51, n. 17, p. 5111-5115, 2003.

PARRISH, Z. D. *et al.* **Accumulation of weathered polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by plant and earthworm species.** Chemosphere, v. 64, n. 4, p. 609-618, 2006.

PAUMGARTTEN, F. J. R. *et al.* **Evaluation of the developmental toxicity of annatto in the rat.** Food and Chemical Toxicology, v. 40, n. 11, p. 1595-1601, 2002.

PENASA, M. *et al.* **Influence of composite casein genotypes on additive genetic variation of milk production traits and coagulation properties in Holstein-Friesian cows.** Journal of dairy science, v. 93, n. 7, p. 3346-3349, 2010.

PÉRÈS, C.; VIALON, C.; BERDAGUÉ, J.-L. **Curie point pyrolysis–mass spectrometry applied to rapid characterisation of cheeses.** Journal of analytical and applied pyrolysis, v. 65, n. 2, p. 161-171, 2002.

PERRY, K. S. P. **Queijos: aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos.** Química Nova, São Paulo, v. 27, n. 2, p. 293-300, Apr. 2004.

PERUGINI, M. *et al.* **Polycyclic aromatic hydrocarbons in marine organisms from the Adriatic Sea, Italy.** Chemosphere, v. 66, n. 10, p. 1904-1910, 2007

PHILLIPS, T. D. *et al.* **Mechanistic relationships between hepatic genotoxicity and carcinogenicity in male B6C3F1 mice treated with polycyclic aromatic hydrocarbon mixtures.** Archives of Toxicology, v. 89, n. 6, p. 967-977, 2015.

PLAZA-BOLAÑOS, P.; FRENICH, A. G.; VIDAL, J. L. M. **Polycyclic aromatic hydrocarbons in food and beverages.** Analytical methods and trends. Journal of chromatography A, v. 1217, n. 41, p. 6303-6326, 2010.

POLAKIEWICZ, L. C. **Estudo de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos nos estuários de Santos e São Vicente/SP utilizando diatomito como material adsorvente.** Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, SP, 2008.

PURCARO, G. *et al.* **Overview on polycyclic aromatic hydrocarbons: occurrence, legislation and innovative determination in foods.** Talanta. Vol.105, 292-305. 2013.

RADOVIC, B. S.; GOODACRE, R.; ANKLAM, E. **Contribution of pyrolysis-mass spectrometry (Py-MS) to authenticity testing of honey.** Journal of Analytical and Applied Pyrolysis, v. 60, n. 1, p. 79-87, 2001.

RATOLA, N. *et al.* **Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in pine needles by gas chromatography–mass spectrometry: comparison of different extraction and clean-up procedures.** Journal of Chromatography A, v. 1114, n. 2, p. 198-204, 2006.

RATOLA, N.; AMIGO, J. M.; ALVES, A. **Comprehensive assessment of pine needles as bioindicators of PAHs using multivariate analysis.** The importance of temporal trends. Chemosphere, v. 81, n. 11, p. 1517-1525, 2010

REIS, P. M. *et al.* **Applicability of extracts from Centaurea calcitrapa in ripening of bovine cheese.** International dairy journal, v. 10, n. 11, p. 775-780, 2000.

REY-SALGUEIRO, L. *et al.* **Effects of toasting procedures on the levels of polycyclic aromatic hydrocarbons in toasted bread.** Food Chemistry, 108, 607–615.2008.

RIBEIRO, L. C. *et al.* **Produção, composição e rendimento em queijo do leite de ovelhas Santa Inês tratadas com ocitocina.** Revista Brasileira de Zootecnia, v. 36, n. 2, p. 438-444, 2007.

ROCHA, A. A. **Mercado de queijos cresce no país e atrai estrangeiros.** Jornal Valor Econômico, São Paulo, p.8, 28 out. 2014. Disponível em: <<http://www.valor.com.br/sites/default/files/gn/14/10/arte20agr-102-queijo-b12.jpg>>. Acesso em: 15 Julho 2017.

ROSE, M. *et al.* **Investigation into the formation of PAHs in foods prepared in the home to determine the effects of frying, grilling, barbecuing, toasting and roasting.** Food and Chemical Toxicology, v. 78, p. 1-9, 2015.

SALOTTI, B. M. *et al.* **Qualidade microbiológica do queijo minas frescal comercializado no município de Jaboticabal, São Paulo.** Arquivos do Instituto Biológico, v. 73, n. 2, p. 171-5, 2006.

SANCHIS, Y.; YUSÀ, V.; COSCOLLÀ, C. **Analytical strategies for organic food packaging contaminants.** Journal of Chromatography A, v. 1490, p. 22-46, 2017.

SANTANA, R. F. *et al.* **Qualidade microbiológica de queijo-coalho comercializado em Aracaju.** Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia. Belo Horizonte, v. 60, n. 6, p. 1517-1522, dez. 2008.

SANTONICOLA, S. *et al.* **Study on the occurrence of polycyclic aromatic hydrocarbons in milk and meat/fish based baby food available in Italy.** Chemosphere, v. 184, p. 467-472, 2017.

SANTONICOLA, S. *et al.* **Study on the occurrence of polycyclic aromatic hydrocarbons in milk and meat/fish based baby food available in Italy.** Chemosphere, v. 184, p. 467-472, 2017.

SCHECTER, A. *et al.* **Perfluorinated compounds, polychlorinated biphenyls, and organochlorine pesticide contamination in composite food samples from Dallas.** Texas, USA. Environmental health perspectives, v. 118, n. 6, p. 796, 2010.

SILVA, M. C. D. *et al.* **Influência dos procedimentos de fabricação nas características físico-químicas, sensoriais e microbiológicas de QC.** Revista do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, v. 69, n. 2, 2010.

SILVA, R. A. *et al.* **Can artisanal “Coalho” cheese from Northeastern Brazil be used as a functional food?** Food Chemistry, v. 135, n. 3, p. 1533-1538, 2012.

SILVÉRIO, F. O.; BARBOSA, L. C. A.; PILÓ-VELOSO, D. **A pirólise como técnica analítica Pyrolysis as an analytical technique.** Quimica Nova, v. 31, n. 6, p. 1543-1552, 2008.

SINGH, L.; VARSHNEY, J. G.; AGARWAL, T. **Polycyclic aromatic hydrocarbons' formation and occurrence in processed food**. Food chemistry, v. 199, p. 768-781, 2016.

SOUSA, A. Z. B. de *et al.* **Aspectos físico-químicos e microbiológicos do queijo tipo coalho comercializado em estados do nordeste do Brasil**. Arquivo do Instituto de Biologia. São Paulo, v. 81, n. 1, 30-35. 2014.

SOUZA, E. L. *et al.* **Qualidade do queijo de leite de cabra tipo Coalho condimentado com cumaru (Amburana cearensis A.C. Smith)**. Brazilian Journal Food Technology, Campinas, v. 14, n. 3, p. 220-225, Setembro. 2011.

TFOUNI, S. A. V. **Estudo do efeito do processamento na contaminação de cana-de-açúcar e derivados por hidrocarbonetos policíclicos aromaticos**. Journal Toxicology. 2005.

VAN HOLDERBEKE, M. *et al.* **Determination of contamination pathways of phthalates in food products sold on the Belgian market**. Environmental research, v. 134, p. 345-352, 2014.

VASEK, O. M.; MAZZA, S. M.; GIORI, G. S. de. **Physicochemical and microbiological evaluation of corrientes artisanal cheese during ripening**. Food Science and Technology. Campinas, v. 33, n. 1, p. 151-160, 2013.

VAVROUS, A. *et al.* **Method for analysis of 68 organic contaminants in food contact paper using gas and liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry**. Food Control, v. 60, p. 221-229, 2016.

VEIGA, L. L. A. *et al.* **Quantification of polycyclic aromatic hydrocarbons in toasted guaraná (Paullinia cupana) by high-performance liquid chromatography with a fluorescence detector**. Food chemistry, v. 152, p. 612-618, 2014.

VIANA, A. C. *et al.* **Evaluation of quality of Coalho cheese produced with endogenous Lactococcus spp**. British Food Journal, v. 113, n. 5, p. 680-692, 2011.

VIEGAS, R. P. *et al.* **Qualidade de leites fermentados funcionais elaborados a partir de bactérias ácido-lácticas isoladas de QC**. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, 2010.

WANG, L. *et al.* **Halogenated and parent polycyclic aromatic hydrocarbons in vegetables: Levels, dietary intakes, and health risk assessments.** Science of The Total Environment, v. 616, p. 288-295, 2018.

WEGRZYN, E. *et al.* **Modified analytical method for polycyclic aromatic hydrocarbons, using sec for sample preparation and RP-HPLC with fluorescence detection:** Application to different food samples. Acta Chromatographica, v. 17, p. 233, 2006.

WHO, World Health Organization. **Selected non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons. . Environment Health Criteria.** n. 202. In W. H. Organization, Edição Genova, 1998.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, WHO. **Toxicity equivalence factors for marine biotoxins associated with bivalve molluscs. In: Toxicity equivalence factors for marine biotoxins associated with bivalve molluscs.** 2016.

WORLD HEATH ORGANIZATION, WHO. **Selected non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons. Environmental Health Criteria.** Geneva, n.202, 1998.

YEBRA-PIMENTEL, I. *et al.* **A critical review about the health risk assessment of PAHs and their metabolites in foods.** Critical Reviews in Food Science and Nutrition, v. 55, n. 10, p. 1383-1405, 2015.

YEGIN, S. *et al.* **Aspartic proteinases from *Mucor* spp. in cheese manufacturing.** Applied microbiology and biotechnology, v. 89, n. 4, p. 949-960, 2011.

YOON, E. *et al.* **Estimation of excess cancer risk on time-weighted lifetime average daily intake of PAHs from food ingestion.** Human and Ecological Risk Assessment, v. 13, n. 3, p. 669-680, 2007.

ZACHARA, A.; GAŁKOWSKA, D.; JUSZCZAK, L. **Contamination of smoked meat and fish products from Polish market with polycyclic aromatic hydrocarbons.** Food Control, v. 80, p. 45-51, 2017.

ZACHARA, A.; GAŁKOWSKA, D.; JUSZCZAK, L. **Contamination of smoked meat and fish products from Polish market with polycyclic aromatic hydrocarbons.** Food Control, v. 80, p. 45-51, 2017

ZALAZAR, C. A. *et al.* **Effect of moisture level and fat replacer on physicochemical, rheological and sensory properties of low fat soft cheeses.** International Dairy Journal, v. 12, n. 1, p. 45-50, 2002.

ZHANG, B. *et al.* **Production of aromatic hydrocarbons from catalytic co-pyrolysis of biomass and high density polyethylene: analytical Py-GC/MS study.** Fuel, v. 139, p. 622-628, 2015.

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

APÊNDICE A — Tabulação dos dados obtidos da pesquisa de opinião aplicada aos consumidores e vendedores de QC

LEVANTAMENTO DE DADOS												
PESQUISA DE OPINIÃO DE CONSUMIDORES E VENDEDORES DE QUELHO DE COLHO												
FATOR	RIO DE JANEIRO	NORDESTE	OUTRO ESTADO	TOTAL ENTREVISTADO	MEDIA	% RJ	%NORDESTE	%OUTROS	DESVIO PAD			
1	45	6	7	58	19,33	78	10	12	18,1536507			
	FUNDAMENTAL	MEDIO	SUPERIOR	TOTAL ENTREVISTADO	MEDIA	%FUND	%MEDIO	%SUPERIOR	DESVIO PAD			
2	10	15	33	58	19,33	17	26	57	9,877021593			
	CONSUMIDOR OCASIONAL RESIDENCIAL	CONSUMIDOR RESIDENCIAL	CONSUMIDOR OCASIONAL/RESIDENCIAL	NÃO CONSUMIDOR ENTREVISTADO	TOTAL ENTREVISTADO	MEDIA	%CO	%CR	%CRO	%NC		
3	28	4	12	14	58,00	14,50	48	7	21	24		8,645808233
	VENDEDORES	VENDEDOR CONSUME	TOTAL ENTREVISTADO	MEDIA	%VEND	%VEN CONS	DESVIO PAD					
4	4	4	8	4	50	50	0					
	ASSADO	ASSADO/CRU	OUTRA FORMA	TOTAL ENTREVISTADO	MEDIA	%ASSADO	%ASS CRU	%OF	DESVIO PAD			
5	32	7	5	44	14,67	73	16	11	12,283684			
	CHURRASQUEIRA	CHAPA	CHU/CHAPA	TOTAL ENTREVISTADO	MEDIA	%CHU	%CHA	%CHUR CHA	DESVIO PAD			
6	23	4	12	39	13	59	10	31	7,788880964			
	CARVÃO	GAS	CHUR. ELÉTRICA/CHAPA	CARV./ELET.	TOTAL ENTREVISTADO	MEDIA	%CARVÃO	%CAR./ELET	%CHU. ELÉTRICA/CHA	%GAS		
7	26	1	5	17	49	12,25	53	35	10	2		9,8836987

APÊNDICE A (continuação)

	ATE FICAR BEM PASSADO	ATE 2 MIN	10-15 MINUTOS	NÃO ESTIMADO	TOTAL ENTREVISTADO	MEDIA	10-15 MIN ESTIMADO	NÃO ESTIMADO	2-10 MIN	%BEM PASS	DESVIO PAD
8	5	1	25	13	44	11	57	30	2	11	9,165161
	MISTURA MARCAS	NÃO MISTURA	NÃO IMPORTA	TOTAL ENTREVISTADO	MEDIA	MISTURA	NÃO MISTURA	NÃO IMPORTA	DESVIO PAD		
9	34	5	17	56	19	59	9	29	11,897712		
	PARCIALMENTE TOST	TOSTADO	BEM TOSTADO	NÃO SABE	TOTAL ENTREVISTADO	MEDIA	%PARC TOST	%TOSTADO	%BEM TOSTADO	%NÃO SABE	DESVIO PAD
10	30	7	10	11	58	14,5	52	12	17	19	9,06978674

APÊNDICE A (continuação)

FATORES		Médias	Percentual da Média	DE\$VP	Variância	DE\$PAD. MÉDIO
1- ORIGEM		19,33	33,33333333	18,15366507	494,3333333	17,11111111
2- NIVEL DE INSTRUÇÃO		19,33333333	33,33333333	9,877021593	146,3333333	9,11111111
3- CONSUMIDOR		14,5	25	8,645808233	99,66666667	6,75
4- VENDEDOR		4	50	1,732050808	5,333333333	0
5- FORMAS DE CONSUMO		14,66666667	28,66666667	12,28368385	226,3333333	11,55555556
6- LOCAL DE COZIMENTO		13	33,33333333	7,788880964	91	6,66666667
7- COMBUSTÍVEL		12,25	25	9,8836987	130,25	9,25
8- TEMPO DE ATÉ 20 MINUTOS		11	25	7,788881	165,3333333	8
9- USO DE MARCAS		18,66666667	32	11,8977122	212,3333333	10,22222222
10- PADRÃO DO QUEJO ASSADO		14,5	25	9,069178574	109,6666667	7,75
	MÉDIA TOTAL	14,13	31,09			

APÊNDICE B — Percentuais de gordura observado como critério de escolha da melhor amostra para análise química.

Marca	Peso líquido	Gordura Total	Gordura Saturada	Gordura Insaturada	Gordura Trans.	Peso médio das fatias
**A	380g	6,8g	5g	0	0*	45,1g
B	380g	8g	5g	0	0*	44,9g
C	350g	8g	4g	0	0*	43,7g
D	410g	8,3	5g	0	0*	35,8g
E	400g	7,8	4g	0	0*	51,3g
F	420g	9,6	6,3g	0	0*	52,5g
G	400g	8,6	5,3g	0	0*	50g
H	410g	8g	5g	0	0*	35,9g
I	380g	7,5	6,9g	0	0*	45g
J	380g	7,0	4g	0	0*	44,8
L	380g	9,0	5g	0	0*	44,9g
* Valores diários de referência, não estabelecido ou não informado.						
** Marca escolhida para as análises com base no valor de gordura total informado pelo fabricante						

APÊNDICE C — Parâmetros registrados na dopagem das amostras e os métodos utilizados

Dia	Amostra/Preparo	Matriz	Dopagem	Massa da amostra	Método de extração
30.03.2017 TESTE	DuplicataQC triturado manualmente	QC, 5 cm ; tempo normal	20 µL mix 16HPA 10-200 µg mL ⁻¹ Supelco	*5,172g e 5,049g	Veiga <i>et al.</i> 2015
30.03.2017 TESTE	DuplicataQC triturado manualmente	QC, 15 cm ; tempo normal	20 µL mix 16HPA 10-200 µg mL ⁻¹ Supelco	*5,031g e 20,051g	Veiga <i>et al.</i> 2015
30.03.2017 TESTE	DuplicataQC triturado manualmente	QC, 20 cm ; tempo normal	20 µL mix 16HPA 10-200 µg mL ⁻¹ Supelco	*20,056g e 20,052g	Veiga <i>et al.</i> 2015
18.04.2017 TESTE	DuplicataQC triturador convencional	QC, 5 cm ; tempo normal	20 µL mix 16HPA 10-200 µg mL ⁻¹ Supelco	*1,0787g; 1,0137	Wegrzyn <i>et al.</i> 2006
05.10.2017 TESTE	QC triturador convencional	QC, 5 cm ; tempo normal	20 µL mix 16HPA 10-200 µg mL ⁻¹ Supelco	1,004g; 1,036g e 1,063	Wegrzyn <i>et al.</i> 2006
05.10.2017 TESTE	QC triturador convencional	QC, 5 cm ; tempo normal	Não dopadas	1,003g; 1,007g e 1,009g	Wegrzyn <i>et al.</i> 2006
05.10.2017 TESTE	QC triturador convencional	QC	Não dopadas	1,001g; 1,023g e 1,013g	Wegrzyn <i>et al.</i> 2006
10.10.2017 TESTE	QC triturador convencional	QC, 5 cm ; tempo normal	100 µL mix 16HPA 10-200 µg mL ⁻¹ Supelco	2,002g; 2,005g; 2,002g	Nudi <i>et al.</i> 2007; Luz <i>et al.</i> 2013
10.10.2017 TESTE	QC triturador convencional	QC, 5 cm ; tempo normal	Não dopada	2,001g; 2,002g; 2,004	Nudi <i>et al.</i> 2007; Luz <i>et al.</i> 2013
09.11.2017 TESTE	QC triturador convencional	QC	100 µL mix 16HPA 1-20 µg mL ⁻¹ Supelco	2,036g; 2,020g; 2,040g	Nudi <i>et al.</i> 2007; Luz <i>et al.</i> 2013
10.11.2017 TESTE	QC triturador convencional 5min	QC, 5 cm ; tempo normal	100 µL mix 16HPA 1-20 µg mL ⁻¹ Supelco	5,0421g; 5,1808g	Luz <i>et al.</i> 2013
10.11.2017 TESTE	QC, triturador convencional por 5 min	QC, 5 cm ; tempo normal	Não dopada	5,0240g; 5,0231g	Luz <i>et al.</i> 2013
21.11.2017 TESTE	QC, triturador convencional por 5 min	QC, 5 cm ; tempo normal	100 µL mix 16HPA 1-20 µg mL ⁻¹ Supelco	2,0218 g; 2,0111g; 2,0083g	Esposito <i>et al.</i> 2015
21.11.2017 TESTE	QC, triturador convencional por 5 min	QC, 5 cm ; tempo normal	Não dopada	2,0053g; 2,0065g; 2,0006g	Esposito <i>et al.</i> 2015
21.11.2017 TESTE	QC, triturador convencional por 5 min	QC	100 µL mix 16HPA 1-20 µg mL ⁻¹ Supelco	2,0041g; 2,0035g; 2,0028g	Esposito <i>et al.</i> 2015

APÊNDICE C (continuação)

N	Dia	Amostra/Preparo	Matriz	Dopagem	Massa da amostra	Método de extração
0	21.11.2017	QC, triturador convencional por 5 min	QC	Não dopada	2,0051g; 2,0067g; 2,0049g	Esposito <i>et al.</i> 2015
1;2;3	29.11.2017	QC, triturador convencional por 5 min	QC, 5 cm/ normal +50%	100 µL mix 16HPA 1-20 µg mL ⁻¹ Supelco	2,1290g; 2,1076g; 2,0844g	Esposito <i>et al.</i> 2015 (modificado) sem SPE
4;5;6	29.11.2017	QC, triturador convencional por 5 min	QC, 5 cm/ normal +50%	Não dopada	2,0924g; 2,0678g; 2,0163g	Esposito <i>et al.</i> 2015 (modificado) sem SPE
7;8;9	05.12.2017	QC, triturador convencional por 5 min	QC, 5 cm/ normal +100%	100 µL mix 16HPA 1-20 µg mL ⁻¹ Supelco	2,0039g; 2,0096g; 2,0045g	Esposito <i>et al.</i> 2015 (modificado) ACN:H ₂ O/60:40
10;11;12	05.12.2017	QC, triturador convencional por 5 min	QC, 5 cm/ normal +100%	Não dopada	2,0023g; 2,0010g; 2,0002g	Esposito <i>et al.</i> 2015 (modificado)
13;14;15	05.12.2017	QC, triturador convencional por 5 min	QC	Não dopada	2,0068g; 2,0006g; 2,0005g	Esposito <i>et al.</i> 2015 (modificado)
16	13.12.2017	QC, triturador convencional por 5 min	QC, 5 cm/ normal +50%	100 µL mix 16HPA 1-20 µg mL ⁻¹ Supelco	2,0554g;	Esposito <i>et al.</i> 2015 (modificado) BDI
17	13.12.2017	QC, triturador convencional por 5 min	QC, 5 cm/ normal +50%	Não dopada	2,0198g	Esposito <i>et al.</i> 2015 (modificado)B BDI
18	13.12.2017	QC, triturador convencional por 5 min	QC,15 cm/ normal +50%	100 µL mix 16HPA 1-20 µg mL ⁻¹ Supelco	2,0941g	Esposito <i>et al.</i> 2015 (BDI)
19	13.12.2017	QC, triturador convencional por 5 min	QC,15 cm/ normal +50%	Não dopada	2,0094G	Esposito <i>et al.</i> 2015 (modificado) BDI
20	13.12.2017	QC, triturador convencional por 5 min	QC,20 cm/ normal +50%	100 µL mix 16HPA 1-20 µg mL ⁻¹ Supelco	2,0208g	Esposito <i>et al.</i> 2015 (modificado) BDI
21	13.12.2017	QC, triturador convencional por 5 min	QC,20 cm/ normal +100%	Não dopada	2,0203g	Esposito <i>et al.</i> 2015 (modificado) BDI
22	13.12.2017	QC, triturador convencional por 5 min	QC,20 cm/ normal +50%	100 µL mix 16HPA 1-20 µg mL ⁻¹ Supelco	2,0443g	Esposito <i>et al.</i> 2015 (modificado) BDI
23	13.12.2017	QC, triturador convencional por 5 min	QC,20 cm/ normal +50%	Não dopada	2,0734g	Esposito <i>et al.</i> 2015 (modificado) BDI

APÊNDICE C (continuação)

N	Dia	Amostra/Preparo	Matriz	Dopagem	Massa da amostra	Método de extração
24	13.12.2017	QC, triturador convencional por 5 min	QC	100 µL mix 16HPA 1-20 µg mL ⁻¹ Supelco	2,0481	Esposito <i>et al.</i> 2015 (modificado) BDI
25	13.12.2017	QC, triturador convencional por 5 min	QC	Não dopada	2,0748g	Esposito <i>et al.</i> 2015 (modificado) BDI
26	13.12.2017	QC, triturador convencional por 5 min	QC, 20 cm/normal +100%	100 µL mix 16HPA 1-20 µg mL ⁻¹ Supelco	2,1072g	Esposito <i>et al.</i> 2015 (modificado) BDI 15 min
27	13.12.2017	QC, triturador convencional por 5 min	QC, 20 cm/normal +100%	100 µL mix 16HPA 1-20 µg mL ⁻¹ Supelco	2,1023g	Esposito <i>et al.</i> 2015 (modificado) KOH EtOH 15 min
28	20.02.2018 CG-EM	QC, triturador convencional por 5 min	QC, 5 cm/normal +100%	100 µL mix 16HPA 1-20 µg mL ⁻¹ Supelco	2,0017g	Esposito <i>et al.</i> 2015 (modificado) CH ₂ Cl ₂ resusp.
29	20.02.2018 CG-EM	QC, triturador convencional por 5 min	QC, 5 cm/normal +100%	Não dopada	2,0023g	Esposito <i>et al.</i> 2015 (modificado) CH ₂ Cl ₂ resusp
30	20.02.2018 CG-EM	QC, triturador convencional por 5 min	QC, 15 cm/normal +100%	100 µL mix 16HPA 1-20 µg mL ⁻¹ Supelco	2,0011g	Esposito <i>et al.</i> 2015 (modificado) CH ₂ Cl ₂ resusp
31	20.02.2018 CG-EM	QC, triturador convencional por 5 min	QC, 15 cm/normal +100%	Não dopada	2,0012g	Esposito <i>et al.</i> 2015 (modificado) CH ₂ Cl ₂ resusp
32	20.02.2018 CG-EM	QC, triturador convencional por 5 min	QC, 20cm/normal +100%	100 µL mix 16HPA 1-20 µg mL ⁻¹ Supelco	2,0012g	Esposito <i>et al.</i> 2015 (modificado) CH ₂ Cl ₂ resusp
33	20.02.2018 CG-EM	QC, triturador convencional por 5 min	QC, 20 cm/normal +100%	Não dopada	2,0011g	Esposito <i>et al.</i> 2015 (modificado) CH ₂ Cl ₂ resusp
34	PROBLEMAS ANALÍTICOS NA AMOSTRA: TEMPO FORA REFREGRAÇÃO, TURVAÇÃO					
35	PROBLEMAS ANALÍTICOS NA AMOSTRA: TEMPO FORA REFREGRAÇÃO, TURVAÇÃO					
36	20.02.2018 CG-EM	QC, triturador convencional por 5 min	QC, 5 cm/normal +100%	100 µL mix 16HPA 1-20 µg mL ⁻¹ Supelco	2,0239g	Esposito <i>et al.</i> 2015 (modificado) CH ₂ Cl ₂ resusp.
37	20.02.2018 CG-EM	QC, triturador convencional por 5 min	QC, 5 cm/normal +100%	Não dopada	2,0336g	Esposito <i>et al.</i> 2015 (modificado) CH ₂ Cl ₂ resusp
38	20.02.2018 CG-EM	QC, triturador convencional por 5 min	QC, 15 cm/normal +100%	100 µL mix 16HPA 1-20 µg mL ⁻¹ Supelco	2,0033g	Esposito <i>et al.</i> 2015 (modificado) CH ₂ Cl ₂ resusp

APÊNDICE C (continuação)

39	20.02.2018 CG-EM	QC, triturador convencional por 5 min	QC, 15 cm/normal +100%	Não dopada	2,0023g	Esposito <i>et al.</i> 2015 (modificado) CH ₂ Cl ₂ ressusp
40	20.02.2018 CG-EM	QC, triturador convencional por 5 min	QC, 20cm/normal +100%	100 µL mix 16HPA 1-20 µg mL ⁻¹ Supelco	2,0064g	Esposito <i>et al.</i> 2015 (modificado) CH ₂ Cl ₂ ressusp
41	20.02.2018 CG-EM	QC, triturador convencional por 5 min	QC, 20 cm/normal +100%	Não dopada	2,0027g	Esposito <i>et al.</i> 2015 (modificado) CH ₂ Cl ₂ ressusp
42	20.02.2018 CG-EM	QC, triturador convencional por 5 min	QC	100 µL mix 16HPA 1-20 µg mL ⁻¹ Supelco	2,0239g	Esposito <i>et al.</i> 2015 (modificado) CH ₂ Cl ₂ ressusp
43	20.02.2018 CG-EM	QC, triturador convencional por 5 min	QC,	Não dopada	2,033g	Esposito <i>et al.</i> 2015 (modificado) CH ₂ Cl ₂ ressusp
44	20.02.2018 CG-EM	QC, triturador convencional por 5 min	QC, 5 cm/normal +100%	100 µL mix 16HPA 1-20 µg mL ⁻¹ Supelco	2,0018g	Esposito <i>et al.</i> 2015 (modificado) CH ₂ Cl ₂ ressusp.
45	20.02.2018 CG-EM	QC, triturador convencional por 5 min	QC, 5 cm/normal +100%	Não dopada	2,0029g	Esposito <i>et al.</i> 2015 (modificado) CH ₂ Cl ₂ ressusp
46	20.02.2018 CG-EM	QC, triturador convencional por 5 min	QC, 15 cm/normal +100%	100 µL mix 16HPA 1-20 µg mL ⁻¹ Supelco	2,0020g	Esposito <i>et al.</i> 2015 (modificado) CH ₂ Cl ₂ ressusp
47	20.02.2018 CG-EM	QC, triturador convencional por 5 min	QC, 15 cm/normal +100%	Não dopada	2,0013g	Esposito <i>et al.</i> 2015 (modificado) CH ₂ Cl ₂ ressusp
48	20.02.2018 CG-EM	QC, triturador convencional por 5 min	QC, 20cm/normal +100%	100 µL mix 16HPA 1-20 µg mL ⁻¹ Supelco	2,0027g	Esposito <i>et al.</i> 2015 (modificado) CH ₂ Cl ₂ ressusp
49	20.02.2018 CG-EM	QC, triturador convencional por 5 min	QC, 20 cm/normal +100%	Não dopada	2,0026g	Esposito <i>et al.</i> 2015 (modificado) CH ₂ Cl ₂ ressusp
50	20.02.2018 CG-EM	QC, triturador convencional por 5 min	QC	100 µL mix 16HPA 1-20 µg mL ⁻¹ Supelco	2,0029g	Esposito <i>et al.</i> 2015 (modificado) CH ₂ Cl ₂ ressusp
51	20.02.2018 CG-EM	QC, triturador convencional por 5 min	QC	Não dopada	2,0025g	Esposito <i>et al.</i> 2015 (modificado) CH ₂ Cl ₂ ressusp
52	20.02.2018 CG-EM	QC, triturador convencional por 5 min	QC, 5 cm/normal +100%	100 µL mix 16HPA 1-20 µg mL ⁻¹ Supelco	2,0029g	Esposito <i>et al.</i> 2015 (modificado) CH ₂ Cl ₂ ressusp.

APÊNDICE C (continuação)

53	20.02.2018 CG-EM	QC, triturador convencional por 5 min	QC, 5 cm/ normal +100%	Não dopada	2,0028g	Esposito <i>et al.</i> 2015 (modificado) CH ₂ Cl ₂ ressup
54	20.02.2018 CG-EM	QC, triturador convencional por 5 min	QC, 15 cm/ normal +100%	100 µL mix 16HPA 1-20 µg mL ⁻¹ Supelco	2,0019g	Esposito <i>et al.</i> 2015 (modificado) CH ₂ Cl ₂ ressup
55	20.02.2018 CG-EM	QC, triturador convencional por 5 min	QC, 15 cm/ normal +100%	Não dopada	2,0020g	Esposito <i>et al.</i> 2015 (modificado) CH ₂ Cl ₂ ressup
56	20.02.2018 CG-EM	QC, triturador convencional por 5 min	QC, 20cm/ normal +100%	100 µL mix 16HPA 1-20 µg mL ⁻¹ Supelco	2,0029g	Esposito <i>et al.</i> 2015 (modificado) CH ₂ Cl ₂ ressup
57	20.02.2018 CG-EM	QC, triturador convencional por 5 min	QC, 20 cm/ normal +100%	Não dopada	2,0047g	Esposito <i>et al.</i> 2015 (modificado) CH ₂ Cl ₂ ressup
58	20.02.2018 CG-EM	QC, triturador convencional por 5 min	QC	100 µL mix 16HPA 1-20 µg mL ⁻¹ Supelco	2,0030g	Esposito <i>et al.</i> 2015 (modificado) CH ₂ Cl ₂ ressup
59	20.02.2018 CG-EM	QC, triturador convencional por 5 min	QC	Não dopada	2,0040g	Esposito <i>et al.</i> 2015 (modificado) CH ₂ Cl ₂ ressup

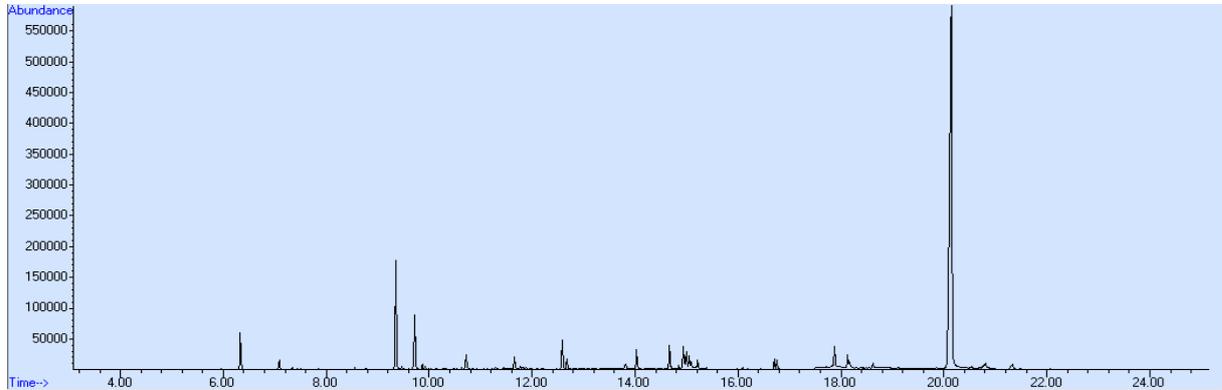
***BDI**: Detergente de alto rendimentos para limpeza de vidrarias;

***ressup**: Ressupensão de amostras concentradas em solvente modificado;

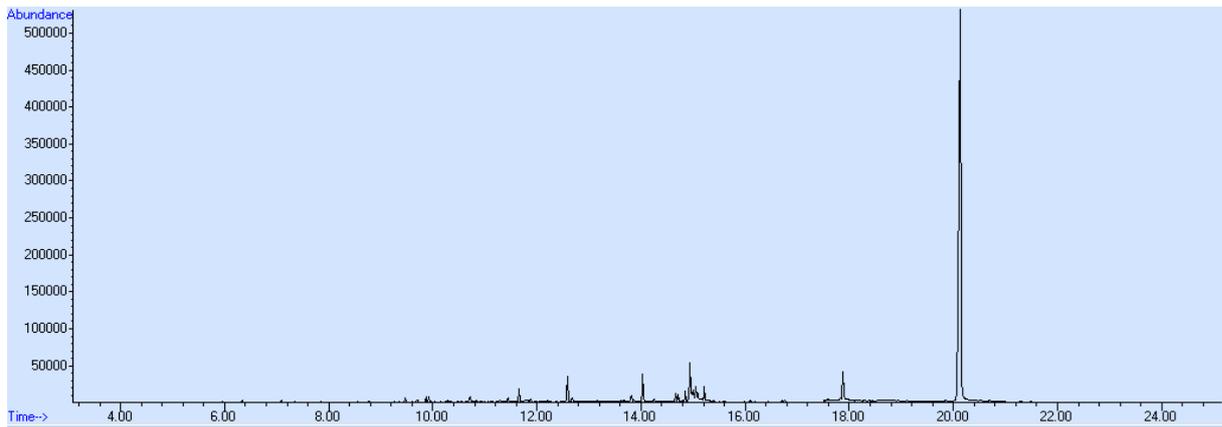
*****(modificado)**: O método de extração foi adaptado ou modificado em alguma etapa, alterações realizadas no N28 permaneceram até N52, pois foram observados os HPA nestes experimentos.

APÊNDICE D — Cromatogramas obtidos nas análises realizadas por CG-EM

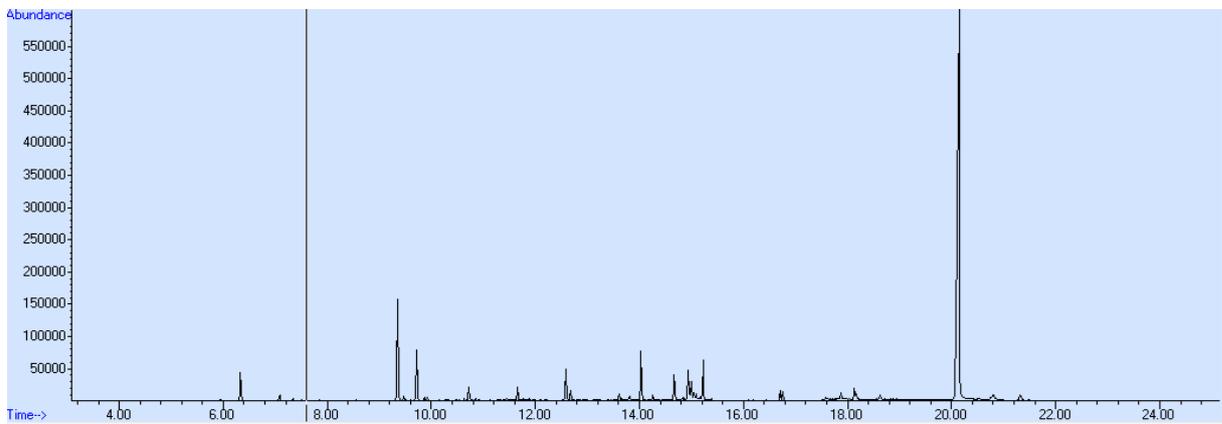
Análises do dia 16.04.2018



Análise de uma amostra extraída do QC assado a 5 cm, com 100% do tempo (aproximadamente 15 minutos).



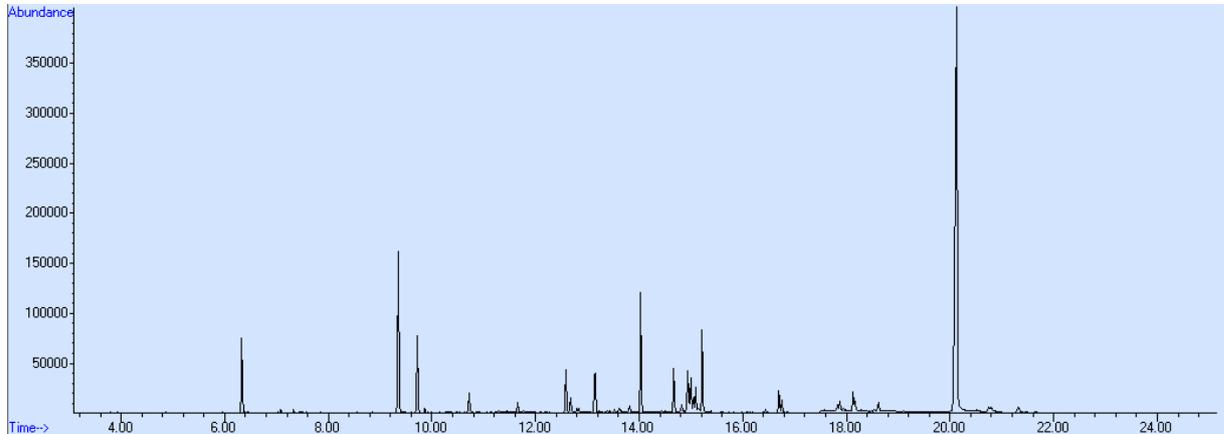
Análise de uma amostra extraída do QC assado a 15 cm, com 100% do tempo (aproximadamente 25 minutos).



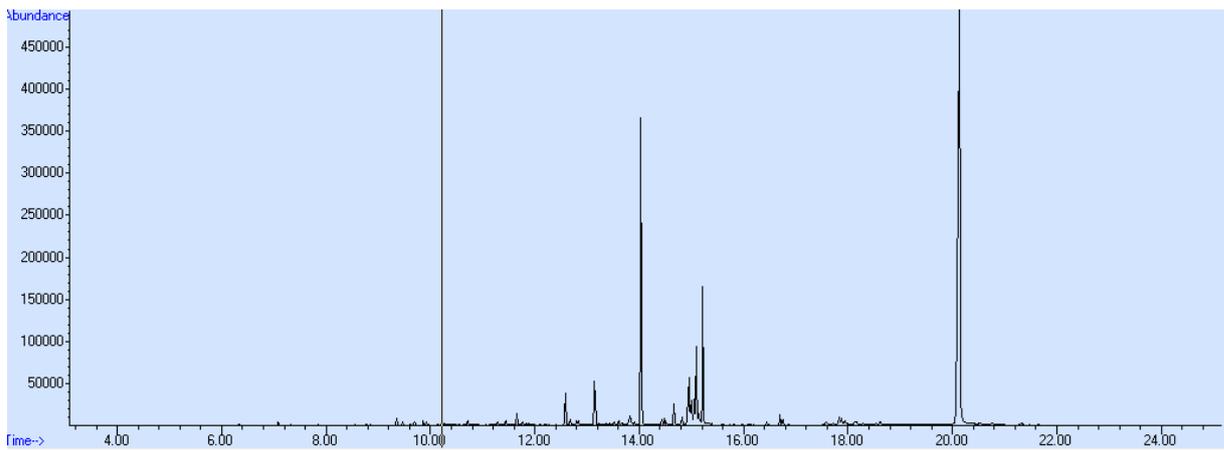
Análise de uma amostra extraída do QC assado a 20 cm, com 100% do tempo (aproximadamente 45 minutos).

Apêndice D- (Continuação)

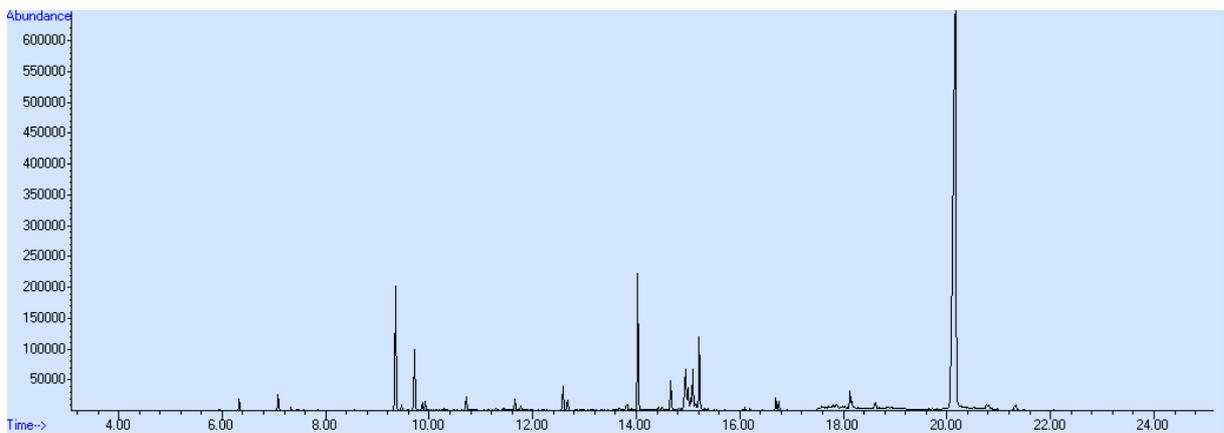
Análises do dia 18.04.2018



Análise de uma amostra extraída do QC assado a 5 cm, com 100% do tempo (aproximadamente 15 minutos).



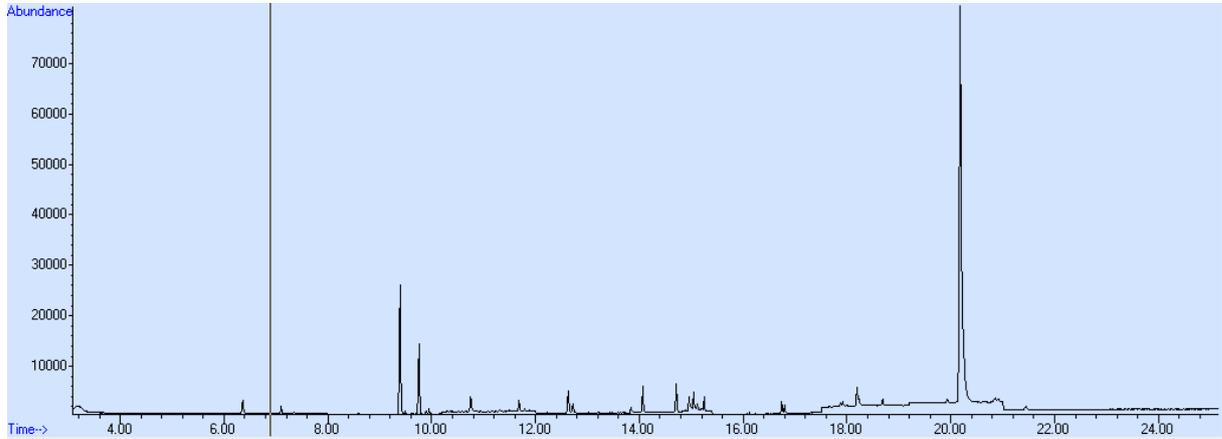
Análise de uma amostra extraída do QC assado a 15 cm, com 100% do tempo (aproximadamente 25 minutos).



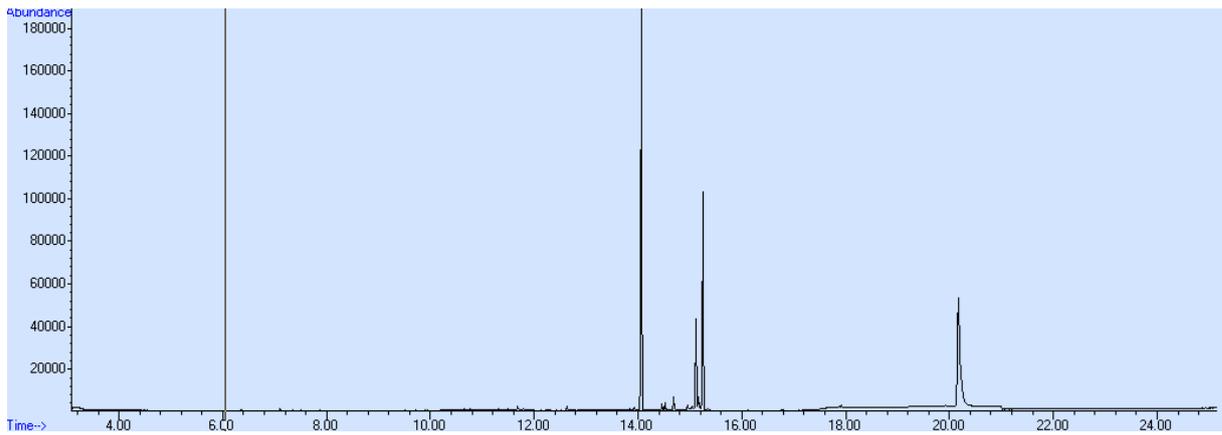
Análise de uma amostra extraída do QC assado a 20 cm, com 100% do tempo (aproximadamente 45 minutos).

Apêndice D - (Continuação)

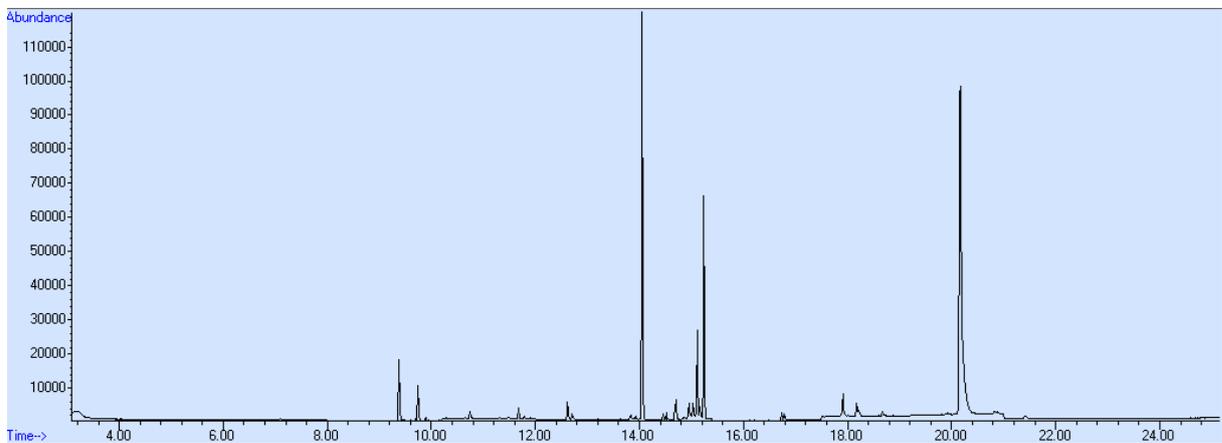
Análises do dia 23.05.2018



Análise de uma amostra extraída do QC assado a 5 cm, com 100% do tempo (aproximadamente 15 minutos).



Análise de uma amostra extraída do QC assado a 15 cm, com 100% do tempo (aproximadamente 25 minutos).



Análise de uma amostra extraída do QC assado a 20 cm, com 100% do tempo (aproximadamente 45 minutos).

APÊNDICE E — Resultados completos da avaliação da toxicidade de 8HPA em QC baseado nos cálculos de CDI, TEQ_{B(a)P}, MOE e ILCR.

Cálculo de TEQ BaP referenes aos HPA em queijo de coalho - refere-se a população (Rio de Janeiro)									
HPA	PADRÃO	n (item alimentar)	TEFi	5 cm	TEQ BaP	15 cm	TEQ BaP	20 cm	TEQ BaP
NAF	673	1	0,001	139,87	0,14	63,97	0,06	108,60	0,11
ACL	1,333	1	0,001	149,26	0,15	664,82	0,66	833,63	0,83
ACT	667	1	0,001	141,18	0,14	149,43	0,15	146,44	0,15
FLU	133,33	1	0,001	153,90	0,15	143,73	0,14	78,11	0,08
FEN	667	1	0,001	298,22	0,30	228,44	0,23	244,85	0,24
ANTR	66,67	1	0,01	158,60	1,59	147,32	1,47	149,93	1,50
FLUO	133,33	1	0,001	179,70	0,18	156,18	0,16	156,76	0,16
PIR	66,67	1	0,001	179,57	0,18	156,03	0,16	152,23	0,15
B[A]A	66,67	1	0,1	149,5	14,95	144,68	14,47	140,73	14,07
CRIS	66,67	1	0,01	140,2	1,40	135,02	1,35	130,22	1,30
B[B]F	133,33	1	0,1	143,4	14,34	146,99	14,70	140,77	14,08
B[K]F	66,67	1	0,1	133,2	13,32	134,73	13,47	129,16	12,92
B[A]P	66,67	1	1	113,0	112,99	110,00	110,00	130,43	130,43
D[A,H]A	66,67	1	5,0	139,5	697,67	137,23	686,16	135,01	675,07
B[G,H,I]P	133,33	1	0,01	137,7	1,38	136,63	1,37	141,13	1,41
IND	66,67	1	0,1	138,9	13,89	134,06	13,41	131,63	13,16
	ΣHPA	1	0,4023125	133,6	53,75	128,12	51,54	167,50	67,39
	Σ8HPA	1	0,8025	919,0	737,47	924,58	741,98	931,34	747,40

Apêndice E - (Continuação)

O CDI foi calculado tomando-se os dados de anos de vida adulta, expectativa de vida e peso médio dos brasileiros, conforme informado pelo IBGE (2008 - 2009).

HPA	n (ingestões estimadas -IBGE)	5cm TEQ Σ8HPA em mg	IRi (2 X25) - em mg	ED anos de vida adulto(30- 59)	AD anos de vida total - RJ	BW (69,6 Kg)	CDI	MOE(mg/KG.BW/dia) <10.000
Σ8HPA	2	0,737	50000,0	44,5	75,9	69,6	$3,11 \times 10^{-02}$	1097,94

HPA	n (ingestões estimadas -IBGE)	15cm TEQ Σ8HPA em mg	IRi (2 X25) - em mg	ED anos de vida adulto(30- 59)	AD anos de vida total - RJ	BW (69,6 Kg)	CDI	MOE(mg/KG.BW/dia) <10.000
Σ8HPA	2	0,742	50000,0	44,5	75,9	69,6	$3,13 \times 10^{-02}$	1091,28

HPA	n (ingestões estimadas -IBGE)	20cm TEQ Σ8HPA em mg	IRi (2 X25) - em mg	ED anos de vida adulto(30- 59)	AD anos de vida total - RJ	BW (69,6 Kg)	CDI	MOE(mg/KG.BW/dia) <10.000
Σ8HPA	2	0,747	50000,0	44,5	75,9	69,6	$3,15 \times 10^{-02}$	1083,36

Valores de referências	
MOE segundo EFSA, (2008)	
<10.000 - possivelmente preocupante	
10.000 e 100.000 - baixa preocupação	
> 100.000 implica insignificante preocupação	
> 1.000.000 significa preocupação desprezível	

Cálculos baseados na proposta da OMS (OMS, 1998) para estimar o risco em causar câncer ao longo da vida (ILCR) foram corrigidos conforme tabela a seguir:

HPA	CDI 5 cm	CDI 15cm	CDI 20cm	Risco de Câncer BaP(mg/kgBW/dia)	ILCR 5cm	ILCR 15cm	ILCR 20cm
Σ8HPA	$3,11 \times 10^{-02}$	$3,13 \times 10^{-02}$	$3,15 \times 10^{-02}$	7,3	$2,27 \times 10^{-1}$	$2,28 \times 10^{-1}$	$2,30 \times 10^{-1}$

Apêndice E - (Continuação)

ILCR	
< 10 ⁻⁶	RISCO ACEITÁVEL OU SEM CONSEQUÊNCIA
10 ⁻⁶ ~ 10 ⁻⁴	RISCO POTENCIAL
> 10 ⁻⁴	SÉRIO OU GRAVE RISCO

Apêndice E - (Continuação)

Os valores informados nos cálculos anteriores e descritos na primeira versão da dissertação, não mudaram quanto a referência do IBGE.

O MOE e ILCR para o Brasil em relação ao consumo estimado de queijo de coalho, foi inferido e representado conforme a seguir nas tabelas:

Valores encontrados e corrigidos considerando o consumo de queijo de coalho pelos brasileiros, de acordo com dados do POF do IBGE

HPA	n (ingestões estimadas)	5cm TEQ Σ8HPA em mg	IRi (1mcg X 2g X46g)	ED anos de vida adulto(30-59)	AD anos de vida total - RJ	BW (69,6 Kg)	CDI	MOE(mg/KG.BW/dia) <10.000
B[A]A	2	0,7375	92000,0	44,5	75,9	69,6	5,72x10 ⁻²	596,71

HPA	n (ingestões estimadas)	15cm TEQ Σ8HPA em mg	IRi (1mcg X 2g X46g)	ED anos de vida adulto(30-59)	AD anos de vida total - RJ	BW (69,6 Kg)	CDI	MOE(mg/KG.BW/dia) <10.000
B[A]A	2	0,7420	92000,0	44,5	75,9	69,6	5,75 x10 ⁻²	593,09

HPA	n (ingestões estimadas)	20cm TEQ Σ8HPA em mg	IRi (1mcg X 2g X46g)	ED anos de vida adulto(30-59)	AD anos de vida total - RJ	BW (69,6 Kg)	CDI	MOE(mg/KG.BW/dia) <10.000
B[A]A	2	0,75	92000,0	44,5	75,9	69,6	5,79 x10 ⁻²	588,78

Cálculo do ILCR

HPA	CDI 5 cm	CDI 15cm	CDI 20cm	Risco de Câncer BaP(mg/kgBW/dia)	ILCR 5cm	ILCR 15cm	ILCR 20cm
B[A]A	5,72x10 ⁻²	5,75 x10 ⁻²	5,79 x10 ⁻²	7,3	4,171x10 ⁻¹	4,20 x10 ⁻¹	4,23 x10 ⁻¹

Apêndice E - (Continuação)

Dose de HPA em $\mu\text{g kg}^{-1}$, verificados em QC e o % incidência em causar câncer segundo WHO							
HPA Faixa $\mu\text{g kg}^{-1}$	*ITm; Ci ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	IT 5 cm	15 cm; Ci ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	IT 15 cm	20 cm; Ci ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	IT 20 cm	
NAF **ND	ND	ND	63,97	ND	108,60	ND	
ACLND	ND	ND	664,82	ND	833,63	ND	
ACTND	ND	ND	149,43	ND	146,44	ND	
FLU ND	ND	ND	143,73	ND	78,11	ND	
FEN 270 - 8800	4 - 13 %	11%	228,44	6%	244,85	11%	
ANTR 270 - 8800 (<11%)	4 - 13 %	11%	147,32	11%	149,93	11%	
FLUO 270 - 8800 (<10%)	4 - 13 %	10%	156,18	10%	156,76	10%	
PIR 270 - 8800 (<24%)	4 - 13 %	24%	156,03	24%	152,23	24%	
B A A 270 - 8800 (<1,1%)	4 - 13 %	1,10%	144,68	1,10%	140,73	1,10%	
CRIS 270 - 8800 (<1,1%)	4 - 13 %	1,10%	135,02	1,10%	130,22	1,10%	
B B F ND	ND	ND	146,99	ND	140,77	ND	
B K F ND	ND	ND	134,16	ND	129,16	ND	
B A P 3,15 - 100	9 - 83%	>83%	112,99	>83%	110,00	>83%	
D A, H A 2,35 - 75	37 - 69%	>69%	139,53	>69%	137,23	>69%	
B G, H P 270 - 8800 (<5%)	4 - 13 %	5%	137,70	5%	136,63	5%	
IND ND	ND	ND	138,91	ND	134,06	ND	
*IT	ÍNDICE PERCENTUAL PARA CAUSAR TUMOR E CâNCER EM RATOS						
**ND	NÃO DETERMINADO PELO AUTORES						

Apêndice E - (Continuação)

Tabela de Consumo de QC pelos brasileiros disponibilizada pelo IBGE, 2010.

Código e descrição do alimento	Código e descrição do tipo de medida	Código e descrição do tipo de medida padrão	Quantidade (g)	Fonte e descrição do alimento na referência
Queijo de coalho	29 Espetinho	32 Fatia	46	2 Espetinho de carne - unidade
Queijo de coalho	32 Fatia	32 Fatia	45	1 Queijo minas padrão - fatia média

Estimativa de Ingestão e toxicidade tomando-se por base o consumo de QC estimados e informados pelo IBGE

Ingestão diária crônica (CDI) com base na concentração 8 HPA monitorados pela CE

HPA	n (ingestões estimadas)	5cm TEQ Σ 8 HPA	IRi (1mcg X 2g X46g)	ED anos de vida adulto (30-59)	AD anos de vida total - RJ	BW (69,6 kg)	CDI	MOE
B[A]A	2	0,73	92000,0	44,5	75,9	69,6	5,72E-02	596,71

HPA	n (ingestões estimadas)	15cm TEQ Σ 8HPA	IRi (1mcg X 2g X46 g)	ED anos de vida adulto(30-59)	AD anos de vida total - RJ	BW (69,6 kg)	CDI	MOE
B[A]A	2	0,74	92000,0	44,5	75,9	69,6	5,75E-02	593,09

HPA	n (ingestões estimadas)	20cm TEQ Σ 8HPA	IRi (1mcg X 2g X46 g)	ED anos de vida adulto (30-59)	AD anos de vida total - RJ	BW (69,6 kg)	CDI	MOE
B[A]A	2	0,75	92000,0	44,5	75,9	69,6	5,79E-02	588,78

HPA	CDI 5 cm	CDI 15cm	CDI 20cm	Cancer risk de BaP(mg/kgBW/dia)	ILCR 5cm	ILCR 15cm	ILCR 20cm
B[A]A	5,72E-02	5,75E-02	5,79E-02	7,3	4,17E-01	4,20E-01	4,23E-01