



**Ana Helena de Almeida Leitão Alegre**

Licenciatura em Engenharia Agronómica

**Quantificação por HPLC de hidrocarbonetos  
aromáticos policíclicos em azeites presentes  
no mercado Português**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Tecnologia e  
Segurança Alimentar

Orientador: Professora Doutora Ana Lúcia Monteiro Durão  
Leitão, Professora Auxiliar, FCT/UNL

Co-orientador: Professora Doutora Maria Suzana Leitão  
Ferreira Dias Vicente, Professora Associada, ISA/UL

Júri:

Presidente: Professora Doutora Ana Luísa Almaça da Cruz  
Fernando

Arguente: Professora Doutora Maria de Fátima Pratas Peres

Vogal: Professora Doutora Ana Lúcia Monteiro Durão Leitão

Março 2017



Quantificação por HPLC de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos em azeites presentes no mercado Português  
Ana Helena Alegre

2017



**Ana Helena de Almeida Leitão Alegre**  
Licenciatura em Engenharia Agronómica

## Quantificação por HPLC de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos em azeites presentes no mercado Português

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Tecnologia e Segurança Alimentar

Orientador: Professora Doutora Ana Lúcia Monteiro Durão Leitão, Professora Auxiliar, FCT/UNL  
Co-orientador: Professora Doutora Maria Suzana Leitão Ferreira Dias Vicente, Professora Associada, ISA/UL

Júri:

Presidente: Professora Doutora Ana Luísa Almaça da Cruz Fernando  
Arguente: Professora Doutora Maria de Fátima Pratas Peres  
Vogal: Professora Doutora Ana Lúcia Monteiro Durão Leitão



FACULDADE DE  
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Março 2017

**Quantificação por HPLC de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos em azeites presentes no mercado Português**

Copyright © 2017 de Ana Helena Alegre, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

*Para as minhas princesas que são o amor maior da minha vida*

## Agradecimentos

É nesta página que tenho a oportunidade de expressar toda a minha gratidão para com todos aqueles que de alguma forma contribuíram para conseguir chegar a bom porto e concluir este trabalho.

Agradeço em primeiro lugar à minha orientadora Professora Doutora Ana Lúcia Leitão por toda a disponibilidade e apoio que sempre demonstrou. Obrigada também pelas sugestões e dicas que me deu para tornar o trabalho melhor. Não podia deixar de agradecer também por ter acreditado, tal como eu acredito, no tema desta tese.

Obrigada à Professora Doutora Suzana Ferreira Dias, em primeiro lugar por ter aceite ser minha co-orientadora. Muito obrigada também pela sua pronta disponibilidade e apoio que sempre demonstrou.

Agradeço ao Vasco e os meus sogros pelo apoio que era necessário prestar em casa enquanto eu me dedicava a este trabalho.

Agradeço em especial aos meus pais por me incentivarem a querer ser sempre mais e melhor e a não desistir nunca. Obrigada também pela ajuda que deram cá em casa.

Agradeço também aos colegas do LET que completaram as injeções das amostras no HPLC sempre que eu não o conseguia fazer.

Agradeço também ao Laboratório de Estudos Técnicos na pessoa da Engenheira Paula Vasconcelos por me ter proporcionado todas as condições em termos de reagentes, materiais e logística para poder executar este trabalho. Sem isso não o conseguiria ter feito.

Agradeço também e de forma simbólica “ao azeite”. Foi o amor especial que tenho por este superalimento que me fez avançar para este tema e querer sempre trabalhar mais e mais “pelo azeite”.

A todos Muito Obrigada!

## Resumo

---

Os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (“Polycyclic Aromatic Hydrocarbons”- PAHs) são um grupo de mais de 100 compostos orgânicos considerados contaminantes ambientais. Atualmente, existem quatro PAHs classificados de contaminantes prioritários pela Agencia de Proteção de Ambiente (EPA) devido ao seu carácter carcinogénico. Formam-se essencialmente através de combustões incompletas de matéria orgânica. Devido à sua distribuição pelo meio ambiente e ao seu carácter lipofílico, podem facilmente contaminar os azeites virgens. Este trabalho visa a implementação e validação de uma norma internacional a ISO 15753:2016, validada para a determinação dos PAHs em óleos e gorduras e a posterior quantificação dos PAHs em azeites virgens extra de 15 marcas diferentes de azeites recolhidos no mercado português. Foi também analisada uma amostra de azeite proveniente de azeitonas que cresceram num ambiente fortemente poluído.

Das 15 marcas de azeites recolhidas no mercado, nenhuma apresentou valores de PAHs superiores aos valores legislados. Verificou-se também que a zona do Baixo-Alentejo foi a que apresentou para o ano de 2017 os valores mais elevados de PAHs.

**Palavras-chave:** azeite virgem, validação, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, PAHs, contaminação

---

## Abstract

---

Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) are a group of more than 100 organic compounds considered to be environmental contaminants. There are currently four PAHs classified as priority contaminants by the Environmental Protection Agency (EPA) because of their carcinogenic character. They are generated through incomplete combustion of organic matter. Due to their environmental distribution and their lipophilic character, they can easily contaminate virgin olive oils. This work aims to implement and validate an international standard ISO 15753: 2016 for the determination of PAHs in oils and fats and the subsequent quantification of PAHs in virgin olive oils from 15 different brands collected in the Portuguese market. A sample of non-commercialized olive oil extracted from olives grown in a heavily polluted environment was also analyzed.

From the 15 brands of olive oils collected on the market, no one had PAH levels exceeding the EU legal limits. It was also verified that the region of the Baixo-Alentejo was for the year of 2017 the one that presented higher values of PAHs.

**Key-words:** virgin olive oil, validation, polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs, contamination

---



## Índice de Matérias

<b>Enquadramento do tema e objetivos.....</b>	<b>1</b>
<b>1. Introdução.....</b>	<b>3</b>
<b>1.1 O Azeite Virgem.....</b>	<b>4</b>
1.1.1 A oliveira e o azeite na história de Portugal e do Mundo.....	4
1.1.2 Importância económica do azeite em Portugal e no Mundo.....	4
1.1.3 Principais Processos Tecnológicos de Extração de Azeite Virgem.....	7
1.1.4 Principais Categorias de Azeite.....	10
1.1.5 Azeites com Denominações de Origem Protegida em Portugal.....	10
1.1.6 Importância nutricional do azeite virgem.....	12
<b>1.2. Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos.....</b>	<b>13</b>
1.2.1 Constituição.....	13
1.2.2 Toxicidade.....	14
1.2.3 Enquadramento legal.....	16
1.2.4. Principais fontes de PAHs.....	17
1.2.5. Principais fontes de contaminação por PAHs em azeites virgens.....	19
<b>1.3. Validação de um método analítico.....</b>	<b>20</b>
1.3.1 Limiares Analíticos.....	21
1.3.2 Exatidão do método.....	23
1.3.3. Precisão/ Fidelidade.....	24
<b>2. Parte Experimental.....</b>	<b>27</b>
<b>2.1 Materiais e métodos.....</b>	<b>29</b>
2.1.1 A ISO15753:2016.....	29
2.1.2 Validação do método.....	33

2.1.2.1 Veracidade.....	33
2.1.2.2 Limiares Analíticos.....	34
2.1.2.3 Repetibilidade.....	34
2.1.2.4 Precisão Intermédia .....	35
2.1.2.5 Recuperações .....	35
<b>2.1.3 Recolha das amostras no mercado.....</b>	<b>35</b>
<b>2.1.4 Determinação de PAHs em azeite de uma região muito poluída.....</b>	<b>37</b>
<b>2.2 Apresentação de resultados e discussão.....</b>	<b>38</b>
<b>2.2.1. Validação do método.....</b>	<b>38</b>
2.2.1.1 Veracidade.....	38
2.2.1.2 Brancos.....	40
2.2.1.3 Limiares Analíticos.....	40
2.2.1.4 Repetibilidade.....	41
2.2.1.5 Precisão Intermédia .....	42
2.2.1.6 Recuperações .....	43
<b>2.2.2 Resultados das amostras recolhidas no mercado.....</b>	<b>44</b>
<b>2.2.3 Resultados da determinação de PAHs em azeite de uma região muito poluída.....</b>	<b>50</b>
<b>3. Conclusões.....</b>	<b>51</b>
<b>Referências bibliográficas.....</b>	<b>55</b>
<b>Apêndice.....</b>	<b>60</b>

## Índice de Figuras

<b>Figura 1.1</b>	Evolução da produção portuguesa de azeite desde a campanha de 2006/2007 (adaptado de Zacarias, 2015a).....	6
<b>Figura 1.2</b>	Percentagem de azeite extraído em cada região na campanha de 2016-2017(adaptado de SIAZ, 2017).....	7
<b>Figura 1.3</b>	Principais etapas do processamento tecnológico do azeite virgem (adaptado de Barranco <i>et al.</i> , 2001).....	9
<b>Figura 1.4</b>	Localização geográficas das diferentes DOP: DOP Trás-os-Montes (1); DOP Beira Interior (2); DOP Ribatejo (3); DOP Norte Alentejano (4); DOP Alentejo Interior (5) e DOP Moura (6) (adaptado de Casa do Azeite, 2016).....	11
<b>Figura 1.5</b>	Efeitos a curto e longo prazo causados pela exposição a PAHs (adaptado de Kim <i>et al.</i> , 2013).....	15
<b>Figura 1.6</b>	Principais fontes de contaminação ambiental por PAHs (Kamal <i>et al.</i> , 2015).....	18
<b>Figura 2.1</b>	Principais etapas de pré-concentração e extração e purificação dos PAHs (1ªparte).....	30
<b>Figura 2.2</b>	Principais etapas de purificação e quantificação de PAHs (2ªparte).....	31
<b>Figura 2.3</b>	Eluição em fase sólida de Florisil do extrato concentrado de PAHs após uma purificação prévia em fase sólida de C18.....	31
<b>Figura 2.4</b>	Foto do HPLC constituído por desgaseificador, bomba, forno e detetor de fluorescência.....	33
<b>Figura 2.5</b>	Equipamento Abencor no qual se extraiu o azeite das azeitonas colhidas numa zona de Lisboa .....	37
<b>Figura 2.6</b>	Resultados de z-score de trozuidos numa carta de controlo de z-score.....	39
<b>Figura 2.7</b>	Resultados de z-score de BIPEA 2 introduzidos numa carta de controlo de z-score.....	39
<b>Figura 2.8</b>	Taxas de recuperação obtidas nas seis sessões de trabalho realizadas.....	44
<b>Figura 2.9</b>	Perfil cromatográfico da solução padrão com identificação de cada um dos picos e respetivo tempo de retenção (BaA 16,06 min, Cry 16,83 min, BbF 18,83 min e BaP 22,19 min).....	44
<b>Figura 2.10</b>	a) Cromatograma referente à amostra F com baixo nível de contaminação; b) Cromatograma referente à amostra C com alto nível de contaminação.....	45

<b>Figura 2.11</b>	Resultados de PAHs para cada uma das amostras em função do tipo comercial.....	47
<b>Figura 2.12</b>	Resultados dos PAHs para cada uma das amostras em função da sua origem.....	48

**Índice de Tabelas**

<b>Tabela 1.1</b>	Lista dos PAHs que se encontram mais frequentemente nos alimentos (adaptado de Bansal & Kim , 2015).....	15
<b>Tabela 2.1</b>	Gradiente de eluição.....	32
<b>Tabela 2.2</b>	Comprimentos de onda de excitação e emissão utilizados para identificar os PAHs.....	32
<b>Tabela 2.3</b>	Codificação das amostras, tipo comercial e região de produção.....	36
<b>Tabela 2.4</b>	Resultados de z-score obtidos de análise a dois MRC.....	38
<b>Tabela 2.5</b>	Resultados do teste de Grubbs aplicado aos 10 replicados realizados para a determinação do LD e LQ.....	40
<b>Tabela 2.6</b>	Resultados obtidos de LD e LQ para cada um dos quatro PAHs estudados.....	41
<b>Tabela 2.7</b>	Resumo dos parâmetros determinados para estudo da repetibilidade e parâmetros da repetibilidade dados pela ISO15753.....	42
<b>Tabela 2.8</b>	Valor médio das amplitudes relativas e LSC.....	43
<b>Tabela 2.9</b>	Resultados dos quatro PAHs em estudo para a 16 amostras recolhidas no mercado.....	46
<b>Tabela 2.10</b>	Valor médio, desvio padrão, valo máximo e mínimo para as 16 amostras e para cada um dos PAHs.....	47
<b>Tabela 2.11</b>	Resultados PAHs para dois lotes diferentes da mesma marca.....	49
<b>Tabela A.1</b>	Limiares Analíticos.....	60
<b>Tabela A.2</b>	Repetibilidade.....	61
<b>Tabela A.3</b>	Recuperações.....	62
<b>Tabela A.4</b>	Veracidade.....	62
<b>Tabela A.5</b>	Precisão Intermédia.....	63



## Lista de Abreviaturas e Siglas

**AESA** - Autoridade Europeia de Segurança Alimentar

**AV** – Azeites Virgens

**AVE** – Azeites Virgens Extra

**BaP** – Benzo-a-pireno

**BaP**- Benzo-a-antraceno

**BbF**- Benzo-b-fluranteno

**CCAH** - Comité Científico da Alimentação Humana

**Cry**- Criseno

**CV**- Coeficiente de variação

**DOP** – Denominações de Origem Protegida

**ECI** – Ensaio Circular Interlaboratorial

**EPA** - Agência de Protecção de Ambiente

**Er**- Erro relativo

**EU** – União Europeia

**ISA**- Instituto Superior de Agronomia

**JNA** – Junta Nacional de Azeites

**LD** – Limite de detecção

**LET**- Laboratório de Estudos Técnicos

**LQ**- Limite de Quantificação

**LSC** – Limite Superior de Controlo

**MRC**- Material de Referência Certificado

**MUFA** - *Monounsaturated fatty acids*

**PAHs** - *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*

**r**- limite de repetibilidade

**Σ 4PAHs** – Somatório de Benzo-a-antraceno, Criseno, Benzo-b-fluranteno e Benzo-a-pireno

**SFA** - *Saturated fatty acids*

**UV**- Ultravioleta

## ENQUADRAMENTO DO TEMA E OBJECTIVOS

Os PAHs pertencem a uma classe de compostos orgânicos caracterizados por terem dois ou mais anéis aromáticos preenchidos por átomos de carbono ou hidrogénio.

A exposição aos PAHs foi epidemiologicamente associada a um risco aumentado de cancro na pele, pulmões e sistema digestivo. Hoje em dia 16 PAHs são classificados como poluentes prioritários pela *Environmental Protection Agency* (EPA) com base na sua ocorrência e carcinogenicidade. Para a população em geral, as principais vias de exposição a estes compostos são a alimentação e o ar inalado. Os PAHs entram na atmosfera originários de uma grande variedade de processos de combustão e pirólise (por exemplo, através de motores de combustão, produção industrial e incêndios florestais) (Kim *et al.*, 2013).

Foram detetados vários alimentos contaminados com PAHs, como sejam alguns vegetais, peixes e óleos e gorduras vegetais. Na maioria destes casos a contaminação provinha da deposição atmosférica, no entanto, os PAHs nos alimentos podem também ter origem na forma utilizada para os confeccionar, como por exemplo, grelhar, tostar ou fumar. Segundo estudos realizados no Reino Unido, o grupo de alimentos com contribuição mais elevada para a ingestão de PAHs foram o dos óleos e gorduras (50%), seguidos pelos cereais (30%) (Domingos & Nadal, 2015).

Sendo o azeite virgem obtido exclusivamente através de meios mecânicos e/ou físicos, e que por isso, mantém todas as características benéficas do fruto que lhe deu origem é considerado como um alimento com boas propriedades nutricionais e com efeitos benéficos para a saúde. No entanto, tanto as azeitonas como o azeite, estão sujeitos a sofrer contaminações com PAHs através da deposição atmosférica. Seria inviável para o consumidor que ao optar por adquirir um lípido mais saudável e benéfico para a saúde como é o azeite virgem, este pudesse estar contaminado com PAHs, compostos conhecidos por serem carcinogénicos e teratogénico.

Em Portugal, a produção de azeite praticamente duplicou nos últimos oito anos devido sobretudo à modernização dos olivais. Esta modernização deve-se em grande parte à substituição do trabalho manual pela mecanização com vista à diminuição dos custos de produção. No entanto, a modernização implica uma maior utilização de motores a combustão que conseqüentemente libertam gases poluentes para os olivais nos quais se incluem os PAHs (Rodrigues-Acuña *et al.*, 2008).

Em 2011, com a entrada em vigor do regulamento (EU) nº835, de 19 de agosto de 2011, são implementados para os óleos e gorduras (nos quais se incluem os azeites virgens), limites para a soma de quatro hidrocarbonetos: benzo(a)pireno, benz(a)antraceno, benzo(b)fluoranteno e criseno. A soma destes quatro hidrocarbonetos não deverá ser superior a 10 µg/kg e o valor do benzo(a)pireno que não deverá ser superior a 2 µg/kg.

O presente trabalho tem como principal objetivo determinar e quantificar estes quatro PAHs em azeites virgens extra, comercializados no mercado português. Para se atingir este objetivo será previamente implementado e validado o método descrito na ISO 15753:2016, que foi desenvolvido especificamente para realizar a determinação dos PAHs em óleos e gorduras de origem animal e vegetal.



# 1

## **Introdução**

## **1.1 O AZEITE VIRGEM**

### **1.1.1 A oliveira e o azeite na história de Portugal e do Mundo**

A origem da oliveira perde-se no tempo, a sua existência confunde-se com a expansão das civilizações mediterrâneas que durante séculos governaram o destino da humanidade e deixaram a sua marca na cultura ocidental.

Foram encontrados fósseis de folhas de oliveira em depósitos do Plioceno em Mongardino, na Itália e restos de oliveira fossilizados em estratos do Paleolítico Superior, no norte da África. Foram também descobertos pedaços de oliveiras em escavações do período calcolítico e da Idade do Bronze em Espanha. A existência da oliveira remonta, portanto, ao décimo segundo milénio AC (International Olive Council, 2016).

Segundo alguns autores, a oliveira selvagem será originária da Ásia Menor onde é extremamente abundante e cresce em florestas espessas. Parece ter-se espalhado da Síria para a Grécia através da Anatólia. Existem outras hipóteses que apontam a sua origem para o baixo Egito, Nubia, Etiópia, as montanhas do Atlas ou certas áreas da Europa. Caruso, por essa razão, acreditava que a oliveira era indígena de toda a bacia do Mediterrâneo e considerava que a Ásia Menor teria sido o berço da oliveira cultivada há cerca de seis milénios atrás (Guimarães, 1991).

Com a descoberta da América (1492), a cultura da oliveira espalhou-se além de seus limites mediterrâneos. As primeiras oliveiras foram transportadas de Sevilha para as Índias Ocidentais e mais tarde para o continente americano. Em 1560 foram plantados os primeiros olivais no México, depois no Peru, na Califórnia, no Chile e na Argentina onde uma das árvores trazidas durante a Conquista, a velha oliveira de Arauco, sobrevive até hoje (International Olive Council, 2016).

Em Portugal, os vestígios da presença da oliveira datam da idade do bronze. Os Romanos e mais tarde os visigodos e os Árabes, que na Península Ibérica vieram encontrar a oliveira, desempenharam um papel muito importante no desenvolvimento e prosperidade da cultura (Guimarães, 1991).

Durante os tempos de guerra em que as fronteiras mudavam frequentemente, os registos da época mostraram que a cultura da oliveira não tinha ainda muita expressão. É apenas quando a paz é mais duradoura a partir do reinado de D. João I que esta cultura revela novamente a pujança que teve em outros tempos (Guimarães, 1991).

### **1.1.2 Importância económica do azeite em Portugal e no Mundo**

Sendo uma mercadoria de troca, o azeite desempenhou e continua a desempenhar um papel importante no mercado mundial dos óleos vegetais. Apesar de se constituir como uma pequena parcela dos óleos vegetais comestíveis mundiais (menos de 3,5 %), tem dominado o

mercado dos óleos vegetais durante séculos nos países da bacia mediterrânica. Estes países representam cerca de 98% da produção mundial de azeite e azeitonas de mesa. Os fatores agronómicos e climáticos característicos desta região propiciam as condições necessárias para o desenvolvimento de um sector tão importante como o do azeite (Vassilis, 2006). Ao longo dos tempos, o consumo mundial seguiu um caminho paralelo ao da produção mundial, mas com flutuações menos acentuadas (Barjol, 2013).

Na União Europeia (EU), a produção de azeite é muito importante para o sector agrícola, principalmente para Espanha, Itália, Grécia, Portugal, França, Chipre, Eslovénia e Malta (Pagliuca & Scarpato, 2014).

De acordo com os dados provisórios para a campanha de 2016/2017, a produção de azeite na União Europeia representará 73% da produção mundial. Cerca de dois terços da produção europeia é trocada entre fronteiras (dentro e fora da EU). Espanha continua a ser o maior produtor mundial (44% da produção) e também ao nível europeu (52% da produção). Itália continua a ser o maior comprador de azeite, com 57% das importações totais da UE e o segundo maior produtor europeu com 20% da produção europeia. Portugal é ao nível europeu 4<sup>a</sup> maior produtor, ficando e 8<sup>o</sup> ao nível mundial (International Olive Council, 2016).

Os maiores mercados importadores são: EUA, Brasil, Japão, Austrália, Rússia e China. Os maiores consumidores dentro da EU são também os maiores produtores, Espanha, Itália, Grécia. O perfil de consumo difere com os países. Por exemplo, na Grécia e em Itália a categoria mais consumida é o azeite virgem extra. Em Espanha apenas 50% do consumo é de azeite virgem extra. No entanto, a tendência geral é o aumento do consumo do azeite virgem extra em detrimento das outras categorias (Pagliuca & Scarpato, 2014).

Em Portugal, temos presenciado nos últimos anos à recuperação da produção após o acentuado decréscimo verificado a partir da década de 60 até finais da década de 80. Passámos de produções na ordem das 90.000 toneladas (anos 50) para valores médios de 35.000 toneladas, nos anos 80. Na Figura 1.1 pode observar-se a evolução muito positiva na produção de azeite desde a campanha de 2006/2007 até à campanha de 2014/15, que praticamente duplicou em menos de 10 anos (Zacarias, 2015a).

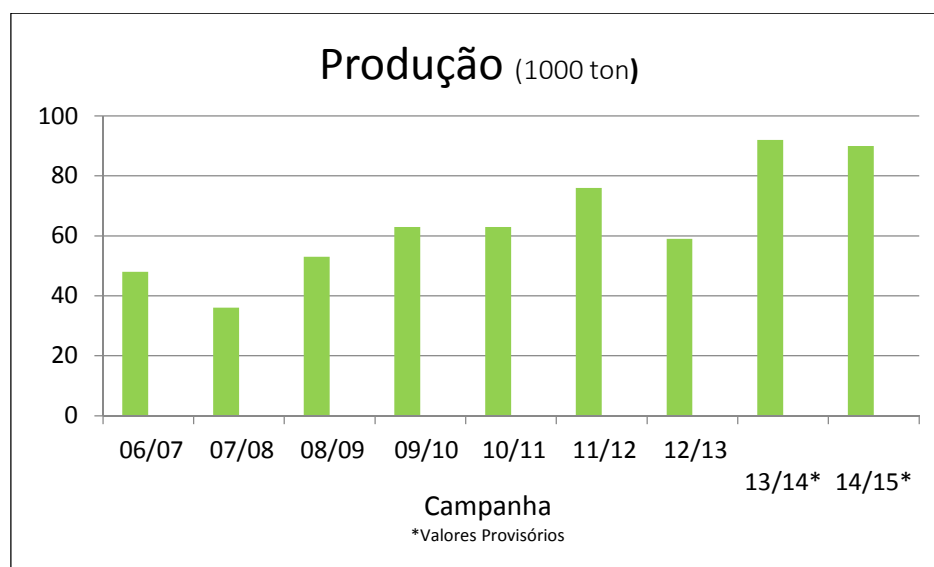


Figura 1.1- Evolução da produção portuguesa de azeite desde a campanha de 2006/2007 até aos dias de hoje (adaptado de Zacarias, 2015a).

Segundo o SIAZ (2017), estima-se que a produção nacional de azeite tenha atingido as 75,2 mil toneladas na campanha 2016-2017.

Este volume traduz um decréscimo de cerca 31% relativamente à produção da campanha de 2015-2016, que foi a mais elevada dos últimos 100 anos (109,1 mil toneladas). Este forte acréscimo na produção de 2016-2017, resultou essencialmente, da entrada em produção de novos olivais, em regime intensivo e superintensivo e com variedades de oliveiras mais produtivas. No entanto, o decréscimo da produção registado na campanha de 2016-2017 representa apenas uma quebra na ordem dos 2% relativamente à média dos últimos 6 anos (SIAZ, 2017).

O decréscimo na produção desta campanha resulta essencialmente das condições meteorológicas adversas registadas e de ser um ano de contrassafra, o que originou menos quantidade de azeitona produzida, atraso na maturação e quebra do rendimento obtido (SIAZ, 2017).

A região Alentejo passou a representar cerca de 75% da produção nacional de azeite (Figura 1.2). A média de rendimento mais alto registou-se na região Norte (16%), sendo também a região com menor diminuição do volume de azeite produzido face à campanha anterior (SIAZ, 2017).

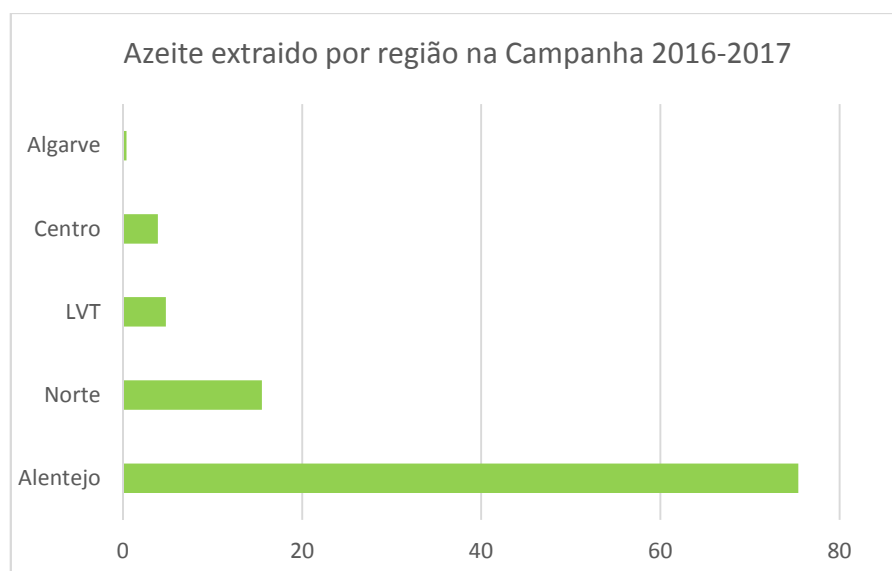


Figura 1.2- Percentagem azeite extraído em cada região na campanha de 2016-2017 (adaptado de SIAZ, 2017).

### 1.1.3 Principais Processos Tecnológicos de Extração de Azeite Virgem

Chama-se processo de extração do azeite virgem ao conjunto de operações mecânicas e/ou físicas, que tendo como matéria-prima exclusivamente as azeitonas, conduzem à separação da fração oleosa do resto dos seus constituintes. Esta fração devido à sua precedência e forma de obtenção constitui-se como um sumo extraído de azeitona, o qual conserva as características próprias do fruto (Alba *et al.*, 2008).

A primeira operação para realizar a extração do azeite é a colheita da azeitona. A colheita pode ser feita de forma manual ou mecânica, no entanto, devido à modernização dos olivais é cada vez menos frequente a colheita manual. A azeitona deverá ser colhida diretamente da árvore em perfeito estado fitossanitário e no estado de maturação adequado. Após a receção da azeitona no lagar esta deve ser de imediato limpa de folhas, ramos e pedras e posteriormente lavada (Hernández & Gámez, 2004).

O processo que ocorre de seguida é a moenda. Este processo visa triturar as azeitonas para destruir a estrutura de todos os tecidos vegetais que a formam. Este processo destrói as membranas celulares deixando livre as gotículas de azeite que se vão agrupando entre si formando gotas de tamanho variável. Em seguida, a pasta de azeitona obtida vai ser batida num equipamento designado de termobatedeira, com a finalidade de promover a coalescência das gotículas de azeite em gotas de maiores dimensões facilitando posteriormente a separação entre a fase oleosa e a fase aquosa. Tendo em conta que a viscosidade do azeite varia com a temperatura, é normal efetuar esta operação a temperaturas superiores à temperatura ambiente, no entanto, o aquecimento da massa não deve ultrapassar os 25 °C, visto que a elevação excessiva da temperatura provoca alterações prejudiciais na qualidade do azeite (Barranco *et al.*, 2001).

Após a massa estar convenientemente batida vai proceder-se à extração propriamente dita, ou seja, à separação entre a fase sólida (bagaço) e a fase líquida (azeite e águas de vegetação). Esta operação pode ser feita de três formas diferentes: prensagem, centrifugação e percolação ou filtração selectiva. A grande maioria dos lagares faz a separação por centrifugação, sendo a prensagem e a percolação técnicas menos usadas.

A centrifugação é feita num decantador centrifugo horizontal (“decanter”) que é constituído essencialmente por um rotor cilíndrico giratório. A centrifugação visa a separação das três fases da pasta de azeitona por acção da força centrífuga, em que os sólidos aderem à parte interior do cilindro e os líquidos ficam centrados na zona interior do cilindro. Existem dois tipos de sistemas de centrifugação: três fases (em que se separa o bagaço, a água de vegetação e o azeite) e duas fases (em que se separa apenas o azeite dos outros dois componentes água de vegetação e bagaço, que saem em conjunto da centrifuga) (Barranco *et al.*, 2001). Nesta fase o azeite que se obtém contém ainda uma quantidade considerável de humidade e impurezas.

A última operação a realizar consiste na separação líquido/líquido que visa separar por completo duas fases líquidas, ou seja, visa limpar o azeite de uma quantidade residual de águas de vegetação que ficam emulsionadas no azeite durante a operação de centrifugação no decante (Hernández, 2004). A figura 1.3 apresenta de uma forma esquematizada as principais etapas a realizar no processamento tecnológico dos azeites virgens com extração a duas fases.

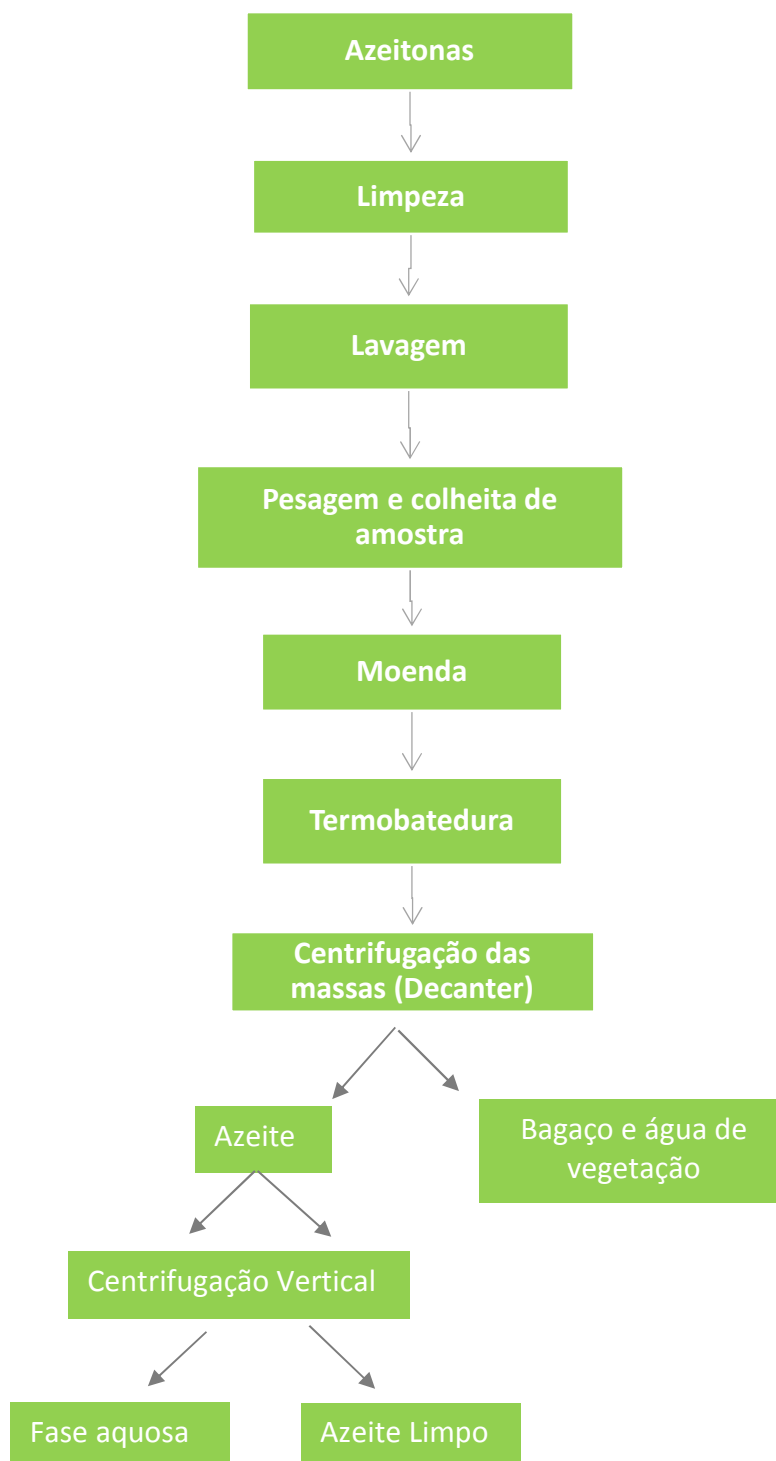


Figura 1.3 – Principais etapas do processamento tecnológico do azeite virgem extraído em duas fases (adaptado de Barranco *et al.*, 2001).

### 1.1.4 Principais Categorias de Azeite

De acordo com o regulamento (CE) nº1234/2007 de 22 de outubro de 2007, as categorias existentes no mercado e disponíveis ao consumidor final são as seguintes:

**Azeites Virgens** – *Azeites obtidos a partir do fruto da oliveira unicamente por processos mecânicos ou outros processos físicos, em condições que não alterem o azeite e que não tenham sofrido outros tratamentos além da lavagem, da decantação, da centrifugação e da filtração, com exclusão dos azeites obtidos com solventes, com adjuvantes de acção química ou bioquímica ou por processos de reesterificação e qualquer mistura com óleos de outra natureza.*

Os Azeites virgens são classificados e denominados do seguinte modo:

a) *Azeite virgem extra – Azeite virgem com uma acidez livre, expressa em ácido oleico, não superior a 0,8 g por 100 g e com as outras características conformes com as previstas para esta categoria.*

b) *Azeite virgem – Azeite virgem com uma acidez livre, expressa em ácido oleico, não superior a 2 g por 100 g e com as outras características conformes com as previstas para esta categoria.*

Existe ainda uma outra categoria disponível no mercado para o consumidor final:

**Azeite** – *composto por azeite refinado e azeite virgem - Azeite obtido por loteamento de azeite refinado e de azeite virgem, com exclusão do azeite lampante, com uma acidez livre, expressa em ácido oleico, não superior a 1 g por 100 g e com as outras características conformes com as previstas para esta categoria.”*

Existem depois outras categorias de azeite e óleos de bagaço que não estão disponíveis para o consumidor final. Destinam-se apenas a serem comercializadas e transformadas por empresas do sector. Estas categorias dizem respeito aos azeites virgens lampantes, aos azeites refinados e aos óleos extraídos dos resíduos produzidos nos lagares, ou seja, extraído quimicamente a partir de bagaço de azeitona. Como estes tipos de azeite e óleos de bagaço não estão incluídos no âmbito deste trabalho, não será desenvolvida esta temática.

### 1.1.5 Azeites com Denominações de Origem Protegida em Portugal (DOP)

De forma a fazer sobressair a qualidade e tradição nos produtos agrícolas, a União Europeia criou um esquema de certificações associadas a alguns produtos alimentares no qual inclui o azeite e que permitem garantir ao consumidor de que determinados produtos são originários de determinada região e/ou produzidos de forma tradicional. A certificação destes produtos dá a garantia ao consumidor de que um determinado alimento foi mesmo produzido de forma genuína e de que não se trata de uma imitação de um produto que goza de uma boa reputação de qualidade (Comissão Europeia, 2017).

De acordo com o regulamento da Comissão nº1151/2012, entende-se por “Denominação de Origem” uma denominação que identifique um produto como originário de um local ou região, cuja qualidade ou característica se devam essencialmente a um meio geográfico, incluído os seus fatores naturais e humanos e cujas fases de produção tenham todas lugar na área geográfica delimitada.

Em Portugal existem seis denominações de origem protegida para os azeites virgens (Figura 1.4):

- DOP -Azeites de Trás-os-Montes;
- DOP - Azeites da Beira Interior (Azeites da Beira Alta e da Beira Baixa)
- DOP – Azeites do Ribatejo
- DOP – Azeites do Norte Alentejano
- DOP – Azeites do Alentejo Interior
- DOP – Azeites de Moura

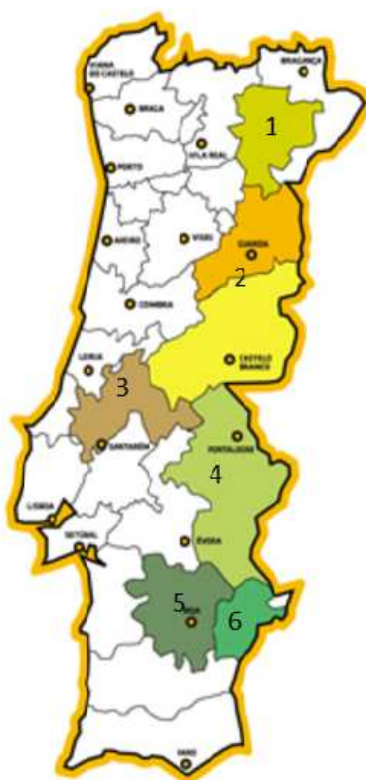


Figura 1.4- Localização geográficas das diferentes DOP: DOP Trás-os-Montes (1); DOP Beira Interior (2); DOP Ribatejo (3); DOP Norte Alentejano (4); DOP Alentejo Interior (5) e DOP Moura (6) (adaptado de Casa do Azeite, 2016)

### 1.1.6 Importância nutricional do azeite virgem

O azeite é a principal fonte de gordura na dieta mediterrânica. A dieta do sul da Europa caracteriza-se por ser mais rica em ácidos gordos monoinsaturados (MUFA) e mais pobre em ácidos gordos saturados (SFA), em comparação com a dieta do norte da Europa (Roche, 2000). Além disso o azeite contém importantes antioxidantes que constituem uma defesa contra as ações nocivas de compostos químicos que estão envolvidos no envelhecimento e no desenvolvimento de doenças neurodegenerativas (Ferreira *et al.*, 2015).

Sendo a dieta mediterrânica rica em azeite, demonstrou-se que este alimento ajuda a diminuir os riscos de doenças cardiovasculares, nomeadamente através, da melhoria do perfil lipídico, melhoria da pressão arterial, da diminuição disfunção do endotélio, da diminuição do stress oxidativo e da melhoria do perfil antitrombótico. Alguns destes benefícios podem ser atribuídos aos compostos menores existentes no azeite. Tem sido demonstrado que os compostos fenólicos lipofílicos (tocoferóis) presentes no azeite têm propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes, o que previne a oxidação lipídica e melhora o perfil sanguíneo dos lípidos (Huang & Bauer, 2008).

Outros estudos demonstraram que uma dieta rica em ácidos gordos monoinsaturados pode ser protetora contra os agentes de envelhecimento e da doença de Alzheimer. Demonstrou-se que uma dieta tendo como principal fonte de gordura o azeite, conduz a um envelhecimento mais saudável e a um aumento de longevidade. Em países em que ao nível nutricional o azeite é a principal fonte de gordura (tais como Espanha, Itália ou Grécia), as taxas de doenças oncológicas são menores quando comparadas com as dos países Nórdicos. Os resultados ao nível celular demonstraram a potencialidade do azeite como agente protetor contra o cancro (López-Miranda, 2010). Por exemplo, Di Francesco e colaboradores (2015), demonstram que o azeite virgem ou os seus compostos fenólicos, têm um efeito modelador da expressão do gene CB1 através de mecanismos epigenético, tanto *in vitro* como *in vivo* e podem fornecer uma nova terapêutica para o tratamento e/ou prevenção do cancro do cólon.

O estudo desenvolvido por Ferreira e colaboradores (2015), demonstrou também que o azeite tem um efeito benéfico na doença degenerativa de Huntington, nomeadamente, através da redução do stress oxidativo das células e da estimulação dos mecanismos neuroprotetores da doença.

Segundo um estudo realizado em 2016 por Banks e seus colaboradores, o azeite diminui a indução da formação de tumores no cólon causados por benzo-a-pirenos (BaP), promovendo a rápida desintoxicação do organismo do benzo-a-pireno, através da diminuição dos seus metabolitos orgânicos e também diminui a extensão de danos do DNA nos tecidos do cólon e do fígado.

## 1.2. Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos

### 1.2.1 Constituição

Os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos são uma família com mais de 100 compostos orgânicos, conhecidos por serem mutagénicos e carcinogénicos. São contaminantes orgânicos de carácter lipofílico constituídos por dois ou mais anéis aromáticos. Os PAHs que contêm até quatro anéis aromáticos ligados são conhecidos por serem os PAHs leves e os que contêm mais de quatro anéis são conhecidos por serem os PAHs pesados. Os PAHs pesados são conhecidos por serem mais estáveis e por isso mais tóxicos (Wenzl *et al.*, 2006).

Devido ao seu carácter altamente lipofílico, os PAHs tendem a acumular-se na cadeia alimentar. São miscíveis em solventes orgânicos sendo que a sua solubilidade em água diminui por cada anel adicionado à sua estrutura (Kim *et al.*, 2013). Em geral, os PAHs leves são mais voláteis e existem principalmente na fase gasosa da atmosfera. Os PAHs com quatro ou mais anéis aromáticos são pouco voláteis e, como tal, ocorrem maioritariamente adsorvidos às partículas de pó (Kameda, 2011).

Os PAHs possuem espectros de absorção de UV muito característicos visto que cada anel tem um espectro de UV único, cada isómero exibe um espectro de absorção único. A maioria dos PAHs também são fluorescentes emitindo em comprimentos de onda muito característicos quando são excitados. Isto é particularmente útil na identificação de PAHs com detetores de fluorescência (Kim *et al.*, 2013). A tabela 1.1 apresenta os PAHs que são mais comuns aparecerem nos alimentos e que são considerados também os mais prejudiciais. Junto ao nome de cada PAHs está também indicada a sua fórmula e estrutura química. Atualmente, existem 16 PAHs classificados de contaminantes prioritários pela Agência de Proteção de Ambiente (EPA) com base na sua ocorrência e carcinogenicidade (Teixeira, 2007).

## 1.2.2 Toxicidade

Os metabolitos reativos de alguns PAHs constituem-se como o principal problema para a saúde devido ao seu potencial para se ligarem a proteínas celulares e ao DNA, com efeitos tóxicos, resultando em quebra de moléculas e lesões ao nível celular que podem conduzir a malformações no desenvolvimento fetal e à origem de tumores e cancro (Kim *et al.*, 2013). Os fatores de equivalência tóxicas para cada um dos PAHs encontram-se na tabela 1.1.

Segundo os mesmos autores, os estudos realizados pelo Centro para a Saúde Infantil dos EUA demonstraram que a exposição à poluição por PAHs durante a gravidez está relacionada com problemas ao nascimento, nomeadamente, ao baixo peso à nascença, ao nascimento prematuro e a atrasos no desenvolvimento fetal. A exposição pré-natal a PAHs está também associada a crianças com baixo QI, com o aumento de problemas comportamentais e asma (Kim *et al.*, 2013).

Numerosos estudos epidemiológicos e toxicológicos indicam existir uma forte relação entre a exposição a PAHs e o aumento da incidência de cancro (Ewa & Danuta, 2017). Por exemplo, um estudo epidemiológico realizado por White *et al.* em 2016, demonstrou que a exposição aos PAHs, especialmente aos que são produzidos no interior das casas, pode aumentar entre 30% a 50% a incidência de cancro da mama.





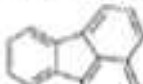
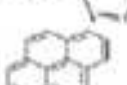
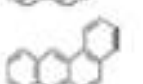
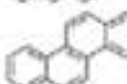
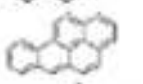

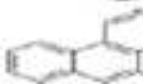
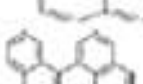
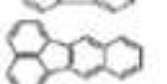
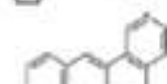
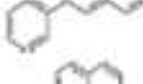
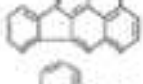
Outros estudos atribuem ainda o aumento das doenças sanguíneas com a exposição aos PAHs, como por exemplo, o aumento da anemia em crianças (Kamal, 2015).

Alguns dos efeitos adversos causados pela exposição aos PAHs a curto e longo prazo estão descritos na Figura 1.5.



Figura 1.5 – Efeitos a curto e longo prazo causados pela exposição a PAHs (adaptado de Kim *et al.*, 2013).

Tabela 1.1 - Lista dos PAHs que se encontram mais frequentemente nos alimentos (adaptado de Bansal & Kim, 2015).

Ordem	PAH	Fator de equivalência tóxica	Fórmula	Estrutura
1	Naftaleno	0,001	C <sub>10</sub> H <sub>8</sub>	
2	Fluoreno	0,001	C <sub>13</sub> H <sub>10</sub>	
3	Antraceno	0,01	C <sub>14</sub> H <sub>10</sub>	
4	Fenantreno	0,001	C <sub>14</sub> H <sub>10</sub>	
5	Fluoranteno	0,001	C <sub>16</sub> H <sub>10</sub>	
6	Pireno	0,001	C <sub>16</sub> H <sub>10</sub>	
7	Benzo(a)antraceno	0,1	C <sub>18</sub> H <sub>12</sub>	
8	Criseno	0,001	C <sub>18</sub> H <sub>12</sub>	
9	Benzo(a)pireno	1	C <sub>20</sub> H <sub>12</sub>	
10	Benzo(b)fluoranteno	0,1	C <sub>20</sub> H <sub>12</sub>	
11	Benzo(e)pireno	-	C <sub>20</sub> H <sub>12</sub>	
12	Benzo(j)fluoranthene	-	C <sub>20</sub> H <sub>12</sub>	
13	Benzo(k)fluoranteno	0,01	C <sub>20</sub> H <sub>12</sub>	
14	Dibenzo(a,h)antraceno	1	C <sub>22</sub> H <sub>14</sub>	
15	Indo(123-cd)pireno	0,1	C <sub>22</sub> H <sub>12</sub>	
16	Dibenzo(aL)pireno	-	C <sub>24</sub> H <sub>14</sub>	

### 1.2.3 Enquadramento legal

Devido à sua distribuição pelo ambiente e devido também ao carácter lipofílico dos PAHs, os azeites podem facilmente ser contaminados com estes compostos. Durante a refinação dos azeites, estes compostos podem ser facilmente eliminados, no entanto, como a refinação não é permitida nos azeites virgens, quando existe uma contaminação por PAHs de um azeite virgem, este já não poderá ser consumido diretamente e tem de ser previamente refinado perdendo-se assim a grande maioria dos benefícios para a saúde relacionados com o consumo de azeite virgem (Rodrigues-Acuña *et al.*, 2008).

Na União Europeia até ao ano de 2005 não existia nenhum limite legal nem nenhuma legislação referente aos limites os PAHs em óleos vegetais e existiam apenas recomendações. Em 2005, a Directiva 2005/10/CE da Comissão de 4 de fevereiro, estabelece os métodos de amostragem e de análise para o controlo oficial do teor de benzo(a)pireno (BaP) nos géneros alimentícios. Em 2006, o Regulamento (CE) nº1881/2006 de 19 de dezembro, fixa os teores máximos de certos contaminantes presentes nos géneros alimentícios, entre os quais o do benzo-a-pireno (BaP) com um valor máximo de 2 µg/kg para óleos e gorduras vegetais. O limite estabelecido foi unicamente para o BaP porque segundo um parecer científico do antigo Comité Científico da Alimentação Humana (CCAH), o BaP poderia ser utilizado como marcador relativamente à ocorrência e aos efeitos cancerígenos dos PAHs nos alimentos. No entanto, de acordo com o regulamento (EU) nº 835 de 19 de agosto de 2011, o mesmo Comité recomenda em 2002, à Comissão Europeia que se continue a estudar a proporção relativa dos outros PAHs em relação ao benzo(a)pireno no sentido de se rever a sua adequabilidade como marcador.

Na sequência dessa recomendação a Comissão Europeia solicitou aos seus estados membros que investigassem os limites seguros para os outros PAHs que eram claramente carcinogénicos e que aportassem dados para poderem ser estudados (Recomendação 2005/108/CE da Comissão). A Comissão solicitou então à Autoridade Europeia de Segurança Alimentar (AESA) um parecer tendo em conta as novas informações adquiridas sobre os PAHs. Nesse parecer em junho de 2008, a AESA concluiu que o benzo(a)pireno não era um marcador adequado para a ocorrência dos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos nos alimentos e que um sistema de quatro substâncias específicas (PAHs4) ou de oito substâncias específicas (PAHs8) representariam os indicadores mais adequados dos PAHs nos alimentos. A AESA também concluiu que um sistema de oito substâncias (PAHs8) não representaria um grande valor acrescentado em comparação com um sistema de quatro substâncias (PAHs4)(EFSA, 2008).

Assim, em 2011, com a implementação do regulamento (EU) nº835/2011 de 19 de agosto, são estabelecidos também limites para a soma do benzo(a)pireno, benzo(a)antraceno, benzo(b)fluoranteno e criseno, a qual não deverá ser superior a 10 µg/kg, para além do limite que já tinha sido estabelecido para o BaP (Bansal & Kim 2015).

O primeiro método a ser implementado para a determinação de BAP em alimentos era baseado na absorção na região do ultravioleta de um extrato que seria previamente purificado por cromatografia em camada fina e que foi publicado nos anos 70 (Wenzel, 2006).

Em 2006, surge o método normalizado ISO 15753:2006 que permite a determinação de 15 PAHs considerados prioritários por serem cancerígenos em óleos e gorduras.

Em 2016, a norma ISO 15753:2006 foi revista e substituída pela norma ISO 15753:2016. As alterações introduzidas foram essencialmente na redação do texto, não tendo sido introduzidas quaisquer alterações técnicas.

#### **1.2.4. Principais fontes de PAHs**

A ocorrência destes compostos no ambiente é devida tanto a origem antropogénica (por exemplo, gases de motores de combustão, refinarias petrolíferas, combustão de lixos, incêndios de origem humana, fumo de tabaco, etc) como também de origem natural (erupções vulcânicas e incêndios florestais de origem não humana). Os PAHs podem também ter origem no processamento industrial dos alimentos (torrefação de grãos, fumagem, etc) ou através da sua confecção (grelhar, torrar, etc) (Bansal & Kim, 2015).

##### Contaminação ambiental

As fontes naturais e antropogénicas de PAHs no ambiente são inúmeras. Os PAHs são formados e libertados durante combustões incompletas ou através da pirólise de matéria orgânica durante os processamentos industriais e outras atividades humanas. Os PAHs também são formados em processos naturais, tais como a carbonização (Comissão Europeia, 2002).

A grande maioria dos PAHs forma-se quando a matéria orgânica arde a temperaturas na ordem dos 500-700 °C. Os PAHs provenientes das combustões podem depositar-se nas cinzas e moverem-se ao longos de largas distâncias através das cinzas (Wenzl *et al.*, 2006).

Estes compostos são emitidos a partir de diversas fontes de contaminação ambiental, tais como, o processamento de carvão, extração de petróleo bruto e gás natural, a produção de alumínio, ferro e aço, aquecimento em cozinhas termoelétricas e residências (petróleo, gás, carvão-fired fogões, fogões a lenha), combustão de lixo, incêndios, incluindo fogueiras, escape dos veículos automóveis (Darain *et al.*, 2013).

Os PAHs, especialmente os de maior massa molecular, entram no ambiente através da atmosfera e são adsorvidos em partículas de poeira. A hidrosfera e litosfera são afetadas secundariamente pela deposição húmida e seca. Os solos, águas superficiais, precipitações e sedimentos podem ser contaminados por PAHs, devido à precipitação atmosférica, ao esgoto urbano e à deposição de esgotos e certos resíduos, como óleo ou por derrames de combustíveis (EFSA, 2008).

Os PAHs por serem compostos lipofílicos tem fraca solubilidade em água e, como tal, não se vão acumular nos tecidos vegetais com alto teor de água. Assim sendo, a transferência de PAHs para os vegetais através do solo contaminado via sistema radicular será limitado. Como a adsorção de PAHs para a fração orgânica do solo é forte, estes não penetram profundamente no solo e, portanto, a lixiviação para águas subterrâneas e absorção pelas plantas é baixa (Comissão Europeia, 2002).

A contaminação de alimentos como frutos e vegetais via ambiental faz-se essencialmente através da deposição e acumulação de partículas de pó atmosférico (figura 1.6) nas quais se encontram ligados os PAHs pesados (EFSA, 2008).

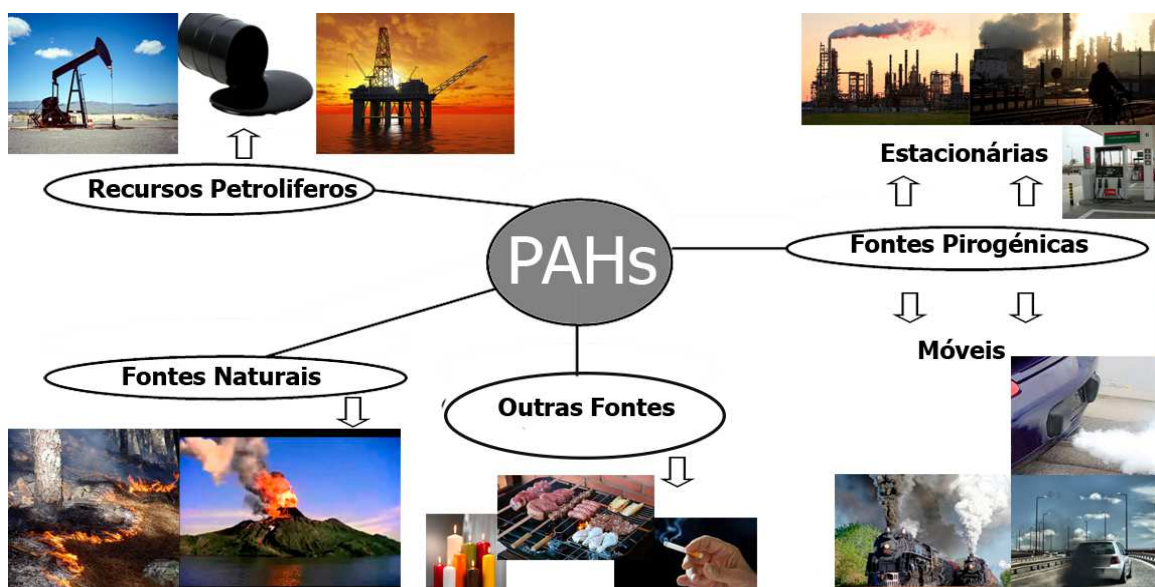


Figura 1.6- Principais fontes de contaminação ambiental por PAHs (adaptado de Kamal *et al.*, 2015).

#### Contaminação dos alimentos através da confeção e processamento tecnológico

O processamento tecnológico dos alimentos é outras das fontes de PAHs na alimentação.

Segundo Jahncke e Herman (2001), o processo de fumagem tradicional de alimentos como carnes, peixes e queijos, pode originar níveis elevados de contaminação por PAHs. Posteriormente, Houesson *et al.* (2007), estudaram também o processo de torrefação de grão de café e concluíram que os níveis altos de PAHs encontrados nos grãos parecem resultar da transformação dos PAHs leves em PAHs pesados.

Outro processo industrial conhecido por originar valores elevados de contaminação do produto final é a secagem do bagaço de azeitona. Para se poder efetuar a extração do óleo de bagaço, primeiro tem que se efetuar uma secagem para reduzir drasticamente a humidade do bagaço. Essa secagem é realizada através da utilização de fumos de combustão, o que

consequentemente contamina o bagaço seco, e posteriormente o óleo que se vai extrair (Rodrigues-Acuña *et al.*, 2008).

Outro grande contributo para a acumulação dos PAHs no organismo também é da responsabilidade do homem e advém da forma de como se cozinham os alimentos (grelhar, tostar e fritar). A eficácia desta via para a acumulação de PAHs por estas formas depende de muitos fatores, como sejam, o tipo de fonte de calor, a distância ao aquecimento ou tipo de combustível utilizado para produzir o calor. Pode mesmo dizer-se que o processo de confeção desempenha um papel fundamental na formação dos PAHs, os quais tendem a aumentar ainda mais com a alteração dos nutrientes originais (como por exemplo as proteínas e os hidratos de carbono) (Bansal & Kim, 2015).

### **1.2.5. Principais fontes de contaminação por PAHs em azeites virgens**

Devido ao carácter lipofílico dos PAHs, os óleos e gorduras são uma das principais fontes destes contaminantes através da alimentação.

Na natureza, os azeites virgens são livres de PAHs e a sua contaminação geralmente faz-se pela via atmosférica nos olivais que lhe deram origem, logo, o nível de contaminação do azeite irá refletir o nível da contaminação atmosférica do olival (Garbi *et al.*, 2017). Deste modo, no azeite virgem a principal via de contacto será a poluição da atmosfera circundante visto que a matéria-prima não é sujeita a qualquer processo de combustão (Rodríguez-Acuña *et al.*, 2008).

Em 2008, Rodríguez-Acuña *et al.* realizaram um estudo com o objetivo de identificar as fontes de contaminação durante a extração dos azeites virgens. Foram estudados fatores como a poluição ambiental durante o crescimento das azeitonas (no terreno), a contaminação durante a colheita, durante o processamento tecnológico e a contaminação ambiental dentro do lagar. Foi demonstrado que azeites virgens extraídos em lagares com elevados níveis de gases de combustão apresentavam valores de PAHs elevados. Estudaram-se em particular azeites de dois lagares em que, um estava junto a uma fábrica de extração de óleos de bagaço de azeitona, e o outro usava caroço de azeitona como material de combustão para produzir vapor de água (que entrava no funcionamento da caldeira para aquecer o lagar). Em ambos os casos, o ambiente fortemente poluído teve origem na combustão de bagaço seco e de caroço seco, respetivamente. Também os azeites virgens provenientes de azeitonas que tinham sido processadas nesses lagares e tinham sido contaminadas com gases de combustão apresentavam níveis elevados de PAHs (Rodríguez-Acuña *et al.*, 2008).

Os mesmos autores compararam ainda azeites provenientes de azeitonas colhidas mecanicamente com azeites provenientes de azeitonas colhidas manualmente, e concluíram que, a exposição aos gases provenientes dos motores é a mais importante fonte de contaminação da película da azeitona. É fundamental fazer um bom planeamento da colheita mecânica para evitar ao máximo a exposição das azeitonas aos gases de combustão (Rodríguez-Acuña *et al.*, 2008).

### 1.3 VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO ANALÍTICO

A validação de um método analítico é uma etapa fundamental para a garantia da qualidade analítica de um resultado. Através da validação possibilita-se a confirmação através de exame e demonstração de evidências objetivas, de que os requisitos específicos para um determinado uso pretendido são atendidos. Devem sempre ser utilizados de preferência métodos publicados em normas internacionais ou nacionais e que estejam atualizados (NP EN ISO/IEC 17025, 2007).

A validação do método que se pretende utilizar é fundamental, visto que, sendo o objetivo da validação verificar que o método é apropriado ao seu uso, é também a forma de verificar se os resultados são ou não confiáveis. Quando é solicitado a um laboratório uma determinada análise presume-se que este tem um grau de conhecimento adequado do resultado e que os clientes podem confiar nesse resultado. O cliente espera ser capaz de confiar nos resultados emitidos e geralmente só os questiona quando surge uma divergência entre as partes envolvidas (Morillas *et al.*, 2016).

No presente trabalho pretende-se realizar a implementação e validação de um método normalizado, como tal, não é necessária a determinação de alguns parâmetros que seriam obrigatórios efetuar para a validação se o método não fosse normalizado. Esses parâmetros são os seguintes (DOQ-CGCRE-008, 2010):

- Seletividade;
- Gama de trabalho;
- Linearidade;
- Comparação de métodos;
- Robustez;
- Comparação da precisão entre métodos;

No entanto, é fundamental demonstrar que o laboratório tem condições para realizar a determinação que pretende, dentro das condições especificadas no método antes de o implantar, sendo assim há alguns parâmetros de validação que são obrigatórios sempre que se valida um método mesmo que este seja normalizado (DOQ-CGCRE-008, 2010).

Apresentam-se de seguida e de uma forma muito reduzida, um resumo sobre os parâmetros que se vão determinar para validar a implementação da 15753:2016 e a forma como estes devem ser calculados.

### 1.3.1 Limiares Analíticos

Quando se pretende realizar ensaios a analitos presentes em quantidades muito pequenas nas amostras, ou seja, em quantidades vestigiais, é importante saber qual é a concentração mais baixa do analito que pode ser detetada com um determinado grau de confiança pelo método e também a concentração mais baixa que pode ser quantificada, com um certo grau de confiança (Morillas *et al.*, 2016).

#### Limite de deteção

O limite de deteção (LD) é segundo a ISO 13530:2009, o teor mínimo ou concentração de um analito na amostra que pode ser distinguido do zero ou do branco com um determinado grau de confiança.

Segundo a Relacre (2000), é o teor mínimo medido, a partir do qual é possível detetar a presença do analito com uma certeza estatística razoável. Este limiar não é um valor de quantificação, visto que apenas corresponde à mais pequena quantidade do analito a analisar que pode ser detetado numa amostra. Um valor inferior ao limite de deteção não significa a ausência deste mesmo analito, apenas se afirma que, com uma probabilidade definida a concentração ou valor do analito é inferior a determinado valor.

Segundo o OGC002 (2011), há várias formas de estimar o limite de deteção de um método analítico:

1) a partir de uma série de ensaios com um branco representativo (ou um padrão de baixa concentração, caso o branco não tenha flutuação significativa) e calculando a respetiva média e desvio-padrão; recomenda-se que sejam usados brancos independentes.

Em termos quantitativos o limite de deteção ( $LD$ ) é dado por:

$$LD = \bar{x}_{bi} + 3,3s_0$$

sendo,

$s_0$  o desvio padrão dos brancos, calculado sem os respetivos *outliers*

$\bar{x}_{bi}$  a média dos valores dos brancos.

2) experimentalmente, a partir da razão sinal/ruído instrumental:

$$LD = (y_0 + 3,3 s_{y0})/\text{declive}$$

sendo,

$y_0$  é o valor médio do sinal/ruído

$s_{y0}$  é o desvio padrão do sinal/ruído

3) teoricamente, a partir da estatística de mínimos quadráticos da recta de calibração, admitindo-se que o desvio-padrão da estimativa ( $S_{y/x}$ ) representa o desvio-padrão do branco (OGC002, 2001):

$$LD = 3,3 S_0/\text{declive}$$

Sendo,

$$s_0 = S_{y/x} = \sqrt{(y_{\text{teórico}} - y_{\text{experimental}})^2 / (n - 2)}$$

### **Limite de Quantificação**

O limite de quantificação (LQ) representa a concentração/valor de analito mais pequena que pode ser quantificada com uma determinada exatidão (ISO13530, 2009).

Deste modo, na prática deve usar-se o LQ como início da zona em que se reportam valores numéricos (OGC002, 2011).

Quantitativamente, o LQ pode ser estimado por:

$$LQ = \bar{X}_{bi} + 10S_0$$

Sendo,

$S_0$  o desvio padrão de 10 determinações;

$\bar{X}_{bi}$  a média de 10 determinações;

Teoricamente a partir da estatística de mínimos quadráticos da recta de calibração.

$$LQ = 10S_0/\text{declive}$$

A atualização dos limiares analíticos (limite de deteção e limite de quantificação) deverá ser efetuada sempre que ocorram alterações de fatores com influência, como por exemplo, mudança de analista, alteração de reagentes ou equipamento, entre outros, ou sempre que se elabora uma nova curva de calibração e se utiliza os dados da mesma para o cálculo dos limiares (Relacre, 2000).

### **1.3.2 Exatidão do método**

Qualquer análise química está sujeita a erro, pelo que, é essencial por um lado minimizá-lo e por outro, controlar a sua ocorrência. Torna-se, então, necessário avaliar a sua exatidão através da veracidade/justeza dos resultados.

### **Veracidade/ Justeza**

A veracidade de um ensaio é uma medida da proximidade de um número infinito de resultados (produzidos com um determinado método) a um valor de referência. Como não é possível realizar determinações infinitas, não se determina realmente a veracidade, mas sim uma avaliação prática da veracidade que diz respeito ao erro (Morillas et al, 2016). Para a avaliação da veracidade podem ser utilizados Materiais de Referência Certificados (MRC) ou amostras de Ensaio de Comparação Interlaboratorial (ECI) ou caso estes não estejam disponíveis pode ainda realizar-se a comparação de resultados usando diferentes métodos. A veracidade pode ser determinada através do erro relativo ou através da avaliação do desempenho.

### **Avaliação do erro relativo (Er)**

A avaliação do erro relativo (Er) destina-se a avaliar a veracidade/justeza de um resultado e pode ser calculada da seguinte forma:

$$Er = \left( \frac{X_{lab} - X_v}{X_v} \right) \times 100$$

em que:

$X_{lab}$  - valor obtido pelo laboratório

$X_v$  - valor aceite como verdadeiro, quer seja o valor do MRC, ou o estabelecido no ECI, como valor médio.

O erro relativo exprime a componente de erros sistemáticos. Normalmente é aceitável o erro sistemático ser inferior ou igual a 5%, no entanto, cabe ao laboratório decidir o seu critério de aceitação do erro relativo, que normalmente deve ser estabelecido de acordo com dados bibliográficos (Relacre, 2000).

### **Avaliação do desempenho**

Outra forma de avaliar a veracidade é através da avaliação do desempenho obtido pelo laboratório quer na participação em ensaios interlaboratoriais quer na análise de MRC e é realizada pelo cálculo do Z-score, através da seguinte fórmula:

$$Z = \frac{X_{lab} - X_v}{s}$$

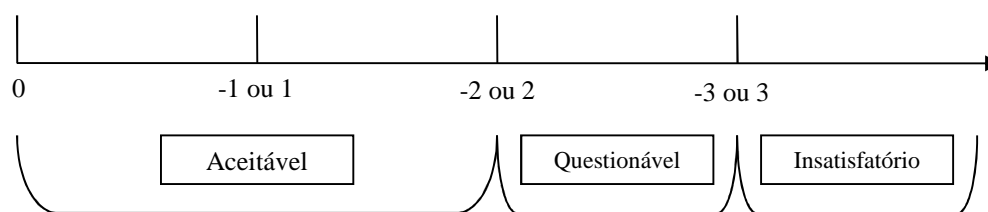
em que:

$X_{lab}$  - valor obtido pelo laboratório

$X_v$  - valor aceite como verdadeiro, quer seja o valor do MRC, ou o estabelecido no ECI, como valor médio.

$s$  - unidade de desvio, que pode ser o desvio-padrão do MRC, ou o desvio-padrão da média dos laboratórios no ECI, ou ainda a incerteza de  $X_v$ .

A avaliação de  $z$  é feita segundo a seguinte escala de pontuação:



### 1.3.3. Precisão/ Fidelidade

A precisão é o termo geral que pretende avaliar a dispersão dos resultados entre ensaios independentes, repetidos sobre a mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas. A precisão visa determinar a existência de erro aleatórios.

A dispersão dos resultados é normalmente avaliada por duas medidas extremas: repetibilidade e a reprodutibilidade. Entre estas duas medidas existe uma situação intermédia que se designa por precisão intermédia (Relacre, 2000).

#### Repetibilidade

A repetibilidade exprime a precisão do método nas seguintes condições:

- Mesmo procedimento de ensaio;
- Mesmo analista;

- Mesmo equipamento e reagentes e usados sob mesmas condições;
- Mesmo local (laboratório)
- Repetições no menor espaço de tempo possível, sempre que possível no mesmo dia.

A repetibilidade é avaliada através do limite de repetibilidade (r) e do coeficiente de variação da repetibilidade (CV%)

#### Limite de repetibilidade (r)

A partir do desvio-padrão dos resultados dos ensaios sob condição de repetibilidade é aconselhável calcular o limite de repetibilidade (r). Este parâmetro capacita o analista a decidir se a diferença entre análises realizadas em duplicado é significativa. O limite de repetibilidade (r) é dado por:

$$r = 2,8 \times \sqrt{S_n^2}$$

em que: r é o limite de repetibilidade e  $S_n$  é o desvio padrão da repetibilidade associados a resultados obtidos.

Na prática aceitam-se os resultados de duas determinações efetuadas em condições de repetibilidade se

$$|X_i - X_{i-1}| \leq r$$

sendo:  $X_i$  e  $X_{i-1}$  são os resultados do duplicados obtidos.

#### **Coefficiente de Variação da Repetibilidade**

O Coeficiente de Variação da Repetibilidade (CVr) para cada gama de trabalho é dado por:

$$CV_R = \left( \frac{S_{Ri}}{\bar{x}} \right) \times 100$$

Sendo:  $s_{Ri}$  desvio padrão da repetibilidade

$\bar{x}$  é a média das repetições efetuadas

#### **Precisão intermédia**

A precisão intermédia é, de acordo com a ISO 5725-3(1993), a precisão determinada sobre a mesma amostra ou padrão, utilizando o mesmo método, no mesmo laboratório, mas com algumas condições a variar, tais como:

- diferentes analistas;
- diferentes equipamentos e reagentes;
- diferentes tempos, diferentes dias.

Esta medida de precisão representa a variabilidade dos resultados em condições reais num laboratório. Na maioria dos casos, o valor de precisão intermédia é função do nível de concentração do ensaio e obtida a partir dos resultados obtidos, após eliminação dos resultados *outliers*. A visualização gráfica dos valores é muito útil para os identificar. A forma mais útil de usar esta ferramenta no laboratório é através do controlo dos duplicados com cartas de controlo de amplitudes relativas de duplicados. Estas cartas são preparadas com base nos resultados da análise de 25-30 amostras em condições de precisão intermédia. Depois com estes resultados vamos determinar a média das amplitudes relativas entre duplicados e definir uma carta de controlo com limites inferiores e superiores de aviso e de controlo (Relacre, 1998).



# 2

## PARTE EXPERIMENTAL

A parte experimental deste trabalho foi realizada no Laboratório de Estudos Técnicos (LET), do Instituto Superior de Agronomia (ISA). O LET foi constituído em 1968, através do estabelecimento de um protocolo entre Instituto Superior de Agronomia (ISA) e o Gabinete de Estudos da Junta Nacional do Azeite (JNA), constituindo-se nessa altura como um núcleo especializado para o estudo analítico e tecnológico das gorduras e óleos comestíveis a funcionar nas instalações do ISA. Hoje em dia é um laboratório que pertence exclusivamente ao ISA sendo os seus principais objetivos a prestação de serviços à comunidade e o apoio ao nível académico através da formação e da participação na atividade científica. O LET por ser um laboratório que sempre trabalhou na área das gorduras e óleos comestíveis, possui todos os reagentes e equipamentos necessários à validação do método e à análise das amostras que são recolhidas no mercado.

O desenvolvimento do presente trabalho adveio da necessidade de se implementar e validar a norma ISO15753 no LET para se poder responder à solicitação de diversos clientes dada a necessidade dos mesmos de poderem cumprir as exigências estabelecidas pelo regulamento (EU) nº835/2011 de 19 de agosto, que veio implementar limites legais para mais três PAHs, o Benzo-a-antraceno (BaA), o Benzo-b-fluoranteno (BbF) e Criseno (Cry) para além do que já se encontrava legislado para o Benzo-a-Pireno (BaP). Antes de implementar a ISO 15753, o LET já tinha implementado uma norma para a determinação do BaP, a norma ISO15302:2007. Na altura, foram determinadas em rotina mais de 50 análises ao BaP. Dentro destas foram encontradas pelo menos três amostras de azeites virgens com resultados de B(a)P com limites superiores ao legislado. Em pelo menos uma das amostras, foi possível prever a possível origem dessa contaminação: o olival que deu origem ao azeite contaminado estaria bastante próximo de uma fábrica de extração de bagaço de azeitona. Como já foi referido, estas indústrias utilizam o bagaço de azeitona seco como matéria-prima para a extração de óleo de bagaço de azeitona. Durante a secagem do bagaço de azeitona libertam-se gases poluentes ricos em PAHs, que se podem depositar na película da azeitona e, deste modo, se acumularem posteriormente no azeite.

Tendo em conta o enquadramento que os azeites virgens extra devem cumprir face aos contaminantes ambientais, nomeadamente em relação aos PAHs, e todas as informações anteriormente descritas sobre as possíveis fontes de contaminação dos azeites virgens extra (AVE) seria bastante importante fazer um estudo sobre a possível existência de AVE contaminados à venda no mercado Português.

Para se atingirem os objetivos estabelecidos no presente trabalho foi dividida a parte experimental em duas fases diferentes: a primeira parte consiste na implementação e validação do método analítico a utilizar e a segunda consiste na determinação dos PAHs nas amostras de azeite recolhidas no mercado.

## **2.1 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1.1 A ISO15753:2016**

Para a determinação dos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos será utilizada uma norma internacional a ISO15753:2016, que é um método normalizado baseado no isolamento da fração dos PAHs por extração com uma mistura de solventes, seguida de purificação com cartuchos de C18 de fase reversa e de Florisil. De seguida o extrato é analisado através de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), utilizando um detetor de fluorescência.

Tendo em consideração que esta norma foi produzida pela Organização Internacional de Normalização (ISO), obedece a direitos de autor, e como tal, a sua reprodução no âmbito deste trabalho não pode ser efetuada.

No entanto, e porque é importante conhecer as principais etapas do método as figuras 2.1 e 2.2 descrevem-nas de uma forma muito resumida.

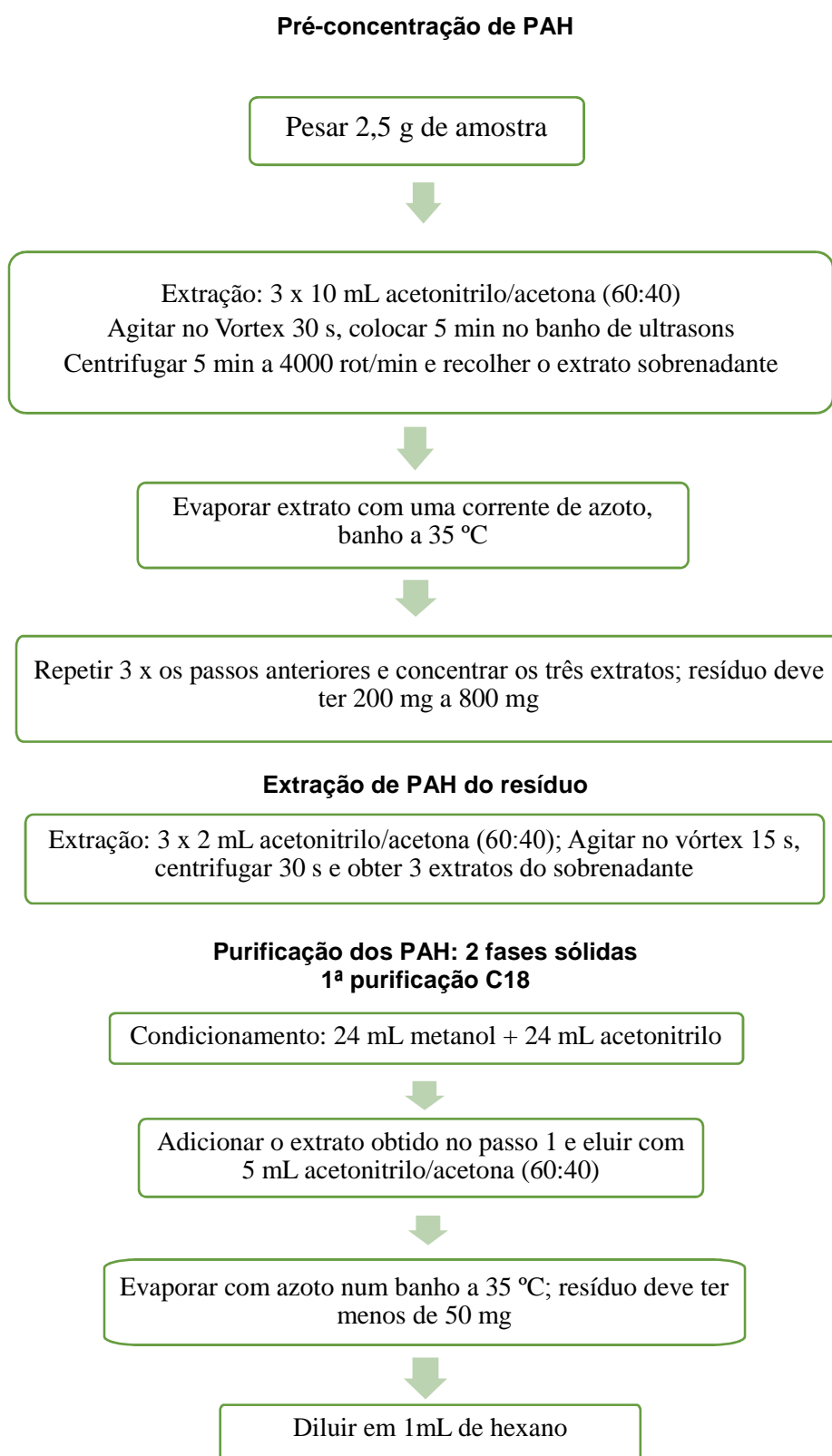


Figura 2.1 – Principais etapas de pré-concentração e extração e purificação dos PAHs (1ª parte).

## 2ª purificação: Florisil

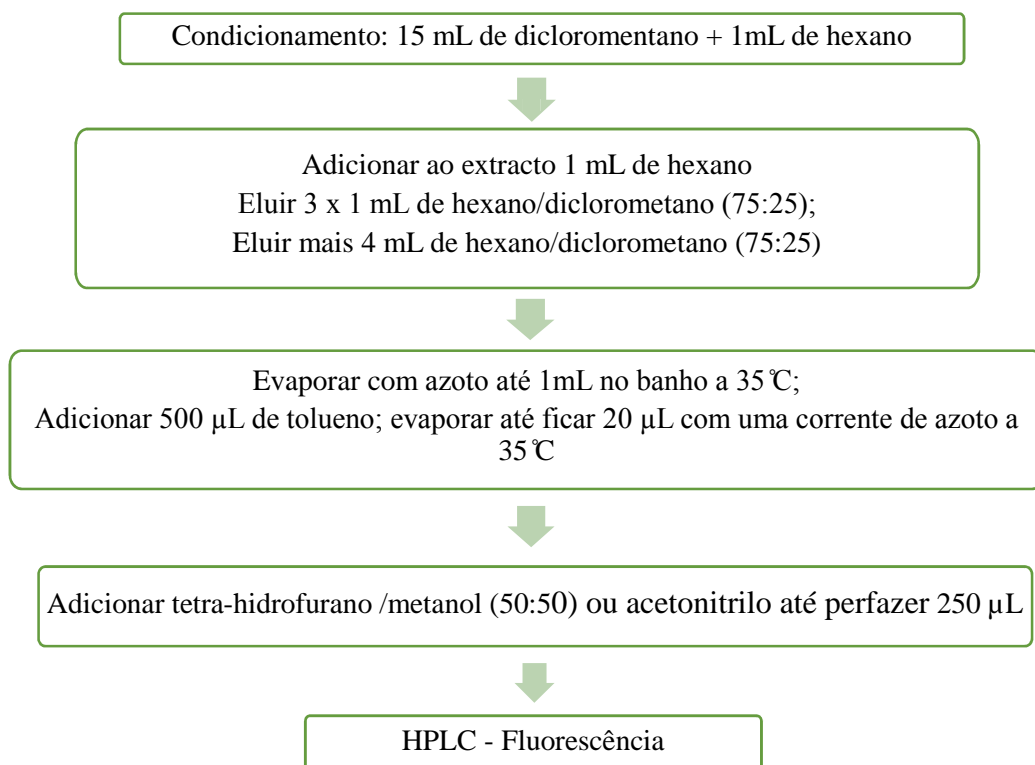


Figura 2.2 – Principais etapas de purificação e quantificação de PAHs (2ªparte).

Após a realização das etapas de préconcentração e purificação dos PAHs nas duas fases sólidas de cartuchos SPE (C18 e Florisil) (figura 2.3), é necessário proceder ao seu isolamento e quantificação através de um sistema de HPLC com detetor de fluorescência.

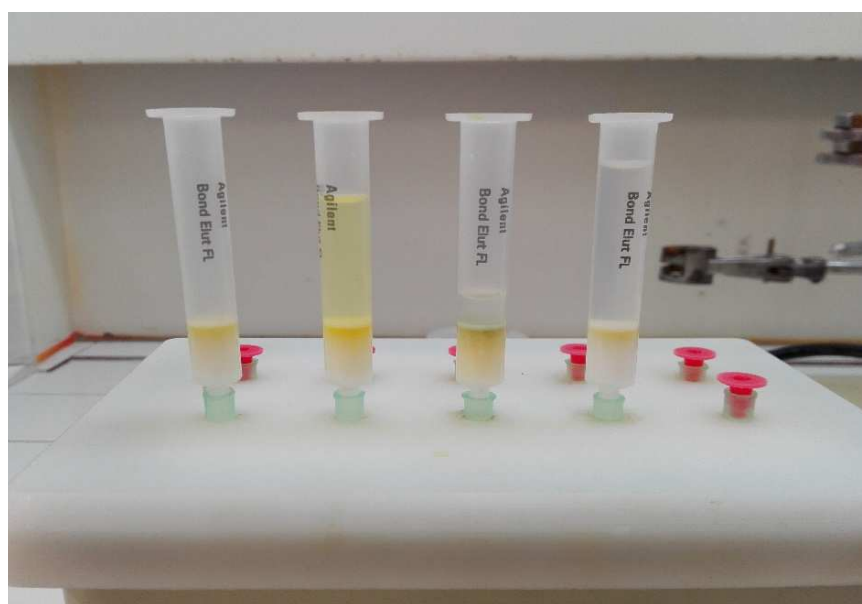


Figura 2.3 – Eluição em fase sólida de Florisil do extracto concentrado de PAHs após uma purificação prévia em fase sólida de C18.

A fase estacionária utilizada no sistema de HPLC é constituída por uma coluna de sílica gel RP18 com alta seletividade para os PAHs, com 250 mm de comprimento e partícula de 5 µm. Esta coluna foi montada num forno da Perkin-Elmer Serie 200 programado para 20 °C. A fase móvel utilizada, bem como o gradiente aplicado durante a corrida foram os indicados na tabela 2.1. A volume de amostra injetada foi de 20 µL, num loop de 10 µL e aplicado um fluxo de 1 mL/min. A bomba utilizada foi uma bomba quaternária com desgaseificador acoplado da marca Younglin.

Tabela 2.1 Gradiente de eluição

Tempo (min)	Acetonitrilo (%)	Acetonitrilo/Água 1:1 (%)
0	0	100
5	0	100
27	60	40
36	100	0
41	100	0
43	0	100
43	0	100

Os comprimentos de excitação e emissão programados no detetor e usados para identificar e quantificar cada um dos PAHs encontram-se indicados na tabela 2.2. O detetor utilizado foi um detetor de fluorescência da marca Perkin-Elmer Serie 200. O conjunto de equipamentos utilizados encontra-se na figura 2.4.

Tabela 2.2 Comprimentos de onda de excitação e emissão utilizados para identificar os PAHs

PAHs	Comprimento de onda de excitação (nm)	Comprimento de onda de emissão (nm)
Benzo-a-antraceno	270	385
Cryseno	256	446
Benzo-b-fluoranteno	292	410

A solução padrão utilizada foi uma solução que resultou da dissolução de um padrão certificado da marca LGC STANDARDS, constituído por 16 PAHs. Entre os 16 PAHs estão incluídos os quatro PAHs que vão ser estudados no âmbito deste trabalho. O padrão certificado foi adquirido com uma concentração de 100 µg/mL e diluído por duas vezes até se obter uma solução padrão trabalho de concentração 50 ng/mL.

Esta solução padrão de trabalho foi a solução utilizada para a determinação da taxa de recuperação, e é também esta solução que irá também funcionar como padrão externo para a identificação e quantificação dos PAHs. Esta solução de trabalho foi injetada várias vezes, de forma independente por cada sessão de trabalho.

A solução de trabalho permite através dos tempos de retenção de cada um dos quatro PAHs, identificar os picos correspondentes a esse PAHs na amostra. Sendo uma solução padrão de concentração conhecida, permite também quantificar os quatro PAHs através da relação entre a área de cada um dos PAHs no padrão e na amostra.



Figura 2.4 – HPLC constituído por desgaseificador, bomba, forno e detector de fluorescência.

## 2.1.2 Validação do método

Como já foi referido anteriormente, a validação do método é um passo fundamental para demonstrar que o mesmo está apto para ser usado para a finalidade a que se destina (quantificar com precisão e exatidão os PAHs), e que cumpre as condições de precisão indicadas na norma. De seguida, descrevem-se os principais parâmetros de validação do método que foram determinados. Os parâmetros de validação foram determinados pela seguinte ordem: veracidade, limiares analíticos, repetibilidade e recuperações.

### 2.1.2.1 Veracidade

A avaliação da veracidade foi feita com recurso a dois Materiais de Referência Certificados (MRC). Os dois MRC foram adquiridos ao Bureau Interprofessionnel des Etudes Analytiques (BIPEA), um organismo Acreditado para realizar Ensaio de Comparação Interlaboratorial (ECI) e para produzir MRC com base nos resultados desses ensaios. A avaliação da veracidade foi feita

com recurso à avaliação do factor de desempenho Z (Z-Score). Foram realizadas cinco determinações em cada um dos MRC e determinado o valor médio. Foi então calculado o factor de desempenho Z-score.

### 2.1.2.2 Limiares Analíticos

Não foi possível determinar o limite de quantificação (LQ) e o limite de deteção (LD) através da leitura direta dos brancos porque a flutuação do sinal produzido pelo equipamento é tão reduzido que não permite a sua quantificação pelo software. Como tal, teve que se preparar um padrão vestigial, ou seja, um padrão de muito baixa concentração. Esse padrão vestigial foi preparado através da execução de uma série de diluições tendo como base um padrão com concentração conhecida.

Foram então produzidas e injetadas dez réplicas desse padrão em dias diferentes e de forma independente. Através do teste de Grubs foi confirmada a inexistência de *outliers* nos resultados.

De acordo com a ISO 5725-2:1994, para se efetuar o teste de Grubs tem que se calcular o GP e o G1, e depois comparar estes valores com o G crítico tabelado na tabela de Grubs. Se GP e G1 forem inferiores ao G crítico então, não existem *outliers* nessa série de valores.

$$GP = \frac{X_{máx} - \bar{x}}{s_x}$$

$$G1 = \frac{\bar{x} - x_{min}}{s_x}$$

Foi posteriormente determinada a média, o desvio padrão dos resultados e calculado o LD e o LQ.

### 2.1.2.3 Repetibilidade

Para se determinar a repetibilidade efetuaram-se 10 determinações sobre a mesma amostra em condições de repetibilidade, ou seja, efetuadas pela mesma pessoa, com os mesmos equipamentos, utilizando os mesmos reagentes e num curto intervalo de tempo. Com os resultados obtidos determinou-se: a média ( $\bar{x}$ ), o desvio-padrão ( $S_i$ ), o limite de repetibilidade ( $r$ ) e o coeficiente de variação da repetibilidade (CV%).

### 2.1.2.4 Precisão Intermédia

Tal como referido anteriormente a forma eficaz de representar a precisão intermédia de uma determinação é através da representação gráfica, ou seja, através da carta de controlo de duplicados. Para se estabelecer estas cartas foi calculado o valor médio das amplitudes relativas de 25 duplicados. Após ser calculado este valor foi traçada a carta de amplitudes relativas com o Limite Superior de Controlo (LSC). De seguida foram retirados todos os pontos que se encontravam fora do controlo estatístico e recalculado o Limite Superior de Controlo. Estas cartas servem para se fazer o controlo dos resultados dos duplicados quando estamos a trabalhar em condições de precisão intermédia.

### 2.1.2.5 Recuperações

Por forma a se testar a eficiência de extração dos cartuchos de SPE utilizados e todas as etapas envolvidas a determinação dos PAHs nas amostras foram realizados testes de recuperação por cada uma das séries de amostras testadas. Para se determinar as percentagens de recuperação submeteu-se uma solução padrão de concentração conhecida, às mesmas etapas de extração e purificação a que se submeteram as amostras e posteriormente testou-se o extrato obtido no sistema de HPLC. Foram então calculadas as percentagens de recuperação e comparadas com os critérios de aceitação indicados na norma ISO15753:2016.

### 2.1.3 Recolha das amostras no mercado

Após se terem realizado todas as fases importantes na validação de um método necessárias para demonstrar que o método era válido para cumprir os objetivos para o qual foi implementado, avançou-se para a segunda fase do presente trabalho: quantificar os PAHs presentes em azeites comercializados no mercado português.

As amostras analisadas foram adquiridas em quatro cadeias diferentes de supermercados portugueses e em uma loja Gourmet. Foram adquiridos 15 azeites virgens extra (AVE) de marcas diferentes provenientes de diferentes embaladores. De cada uma das 15 amostras foram compradas três garrafas de azeite do mesmo lote e testadas as três garrafas. Relativamente ao tipo comercial das amostras de AVE adquiridas, foram compradas 4 amostras de AVE de “Denominação de Origem Protegida” (DOP), 4 amostras de AVE de “Marca Própria” e 7 amostras de AVE de “Quinta”.

As amostras de “Marca Própria” são o que o consumidor habitualmente descreve como “Marcas Brancas”, em que a responsabilidade legal sobre o produto é das cadeias de distribuição

que as comercializa. As quatro marcas adquiridas provêm das quatro maiores cadeias de distribuição em Portugal.

Das amostras de AVE DOP recolhidas, foram analisadas tanto AVE DOP de “Marca Própria” como AVE DOP de produtores próprios.

As amostras de AVE designadas aqui como azeites de “Quinta” dizem respeito a azeites produzidos por pequenos a médios produtores de azeite em que a responsabilidade da embalagem é dos próprios.

Os AVE de “Quinta” foram escolhidos de modo a serem representativos das regiões mais importantes de Portugal no que à produção de azeite diz respeito. Por razões de confidencialidade não serão apresentadas as marcas em questão e as amostras serão sempre identificadas com um código. Na tabela 2.3 encontram-se descritas a codificação das amostras adquiridas, bem como a região que lhe deu origem e o tipo comercial a que pertencem.

Tabela 2.3- Codificação das amostras, tipo comercial e região de produção.

<b>Código da amostra</b>	<b>Tipo Comercial</b>	<b>Região de Produção</b>
<b>A</b>	Quinta	Trás-os-Montes e Alto
<b>B</b>	Quinta	Algarve
<b>C</b>	Quinta	Baixo-Alentejo
<b>D</b>	Quinta	Alto-Alentejo
<b>E</b>	DOP Trás-os-Montes	Trás-os-Montes e Alto
<b>F</b>	Quinta	Baixo-Alentejo
<b>G</b>	DOP Ribatejo	Ribatejo
<b>H</b>	DOP Moura	Baixo-Alentejo
<b>I</b>	DOP Norte Alentejano	Alto-Alentejo
<b>J</b>	Marca Própria	Desconhecido
<b>K</b>	Marca Própria	Desconhecido
<b>L</b>	Marca Própria	Desconhecido
<b>M</b>	Marca Própria	Baixo-Alentejo
<b>N</b>	Quinta	Ribatejo
<b>O</b>	Quinta	Alto-Alentejo

#### 2.1.4 Determinação de PAHs em azeite de uma região muito poluída

Tendo em conta as informações fornecidas pelos autores referidos no ponto 1.2.4 deste trabalho, e também porque normalmente os azeites são provenientes de olivais localizados em zonas rurais onde a poluição proveniente do tráfego não será significativa, foi também incluída neste trabalho os resultados de uma amostra de um azeite extraído de azeitonas de uma zona central de Lisboa.

As azeitonas foram colhidas à mão, em meados de outubro de 2016 e foram levadas para o LET. O azeite foi extraído através de um sistema Abencor (figura 2.5). Este sistema de extração foi o ideal para esta etapa pois permite simular todas as etapas que normalmente decorrem no lagar utilizando quantidade de azeitonas muito pequenas (menos de 2 kg). As azeitonas foram trituradas num moinho de martelos. A massa obtida foi posteriormente colocada nas panelas do Abencor e batida a frio, durante cerca de 40 min. De seguida, a massa obtida foi colocada numa centrífuga que permitiu separar a fração sólida das duas fases líquidas (água e azeite). Posteriormente, efetuou-se a separação das duas frações líquidas por decantação.

O azeite extraído foi posteriormente guardado em câmara frigorífica e assim que foi possível foram determinados os PAHs.



Figura 2.5 – Equipamento Abencor no qual se extraiu o azeite das azeitonas colhidas numa zona de Lisboa.

## 2.2 - APRESENTAÇÃO DE RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 2.2.1. Validação do método

Como já foi referido anteriormente os diversos parâmetros de validação foram executados com uma determinada ordem tendo como objetivo só se avançar para o passo seguinte quando se tivesse certeza de que parâmetros tão importantes como a veracidade e os limiares analíticos estivessem corretos.

#### 2.2.1.1 Veracidade

Para a determinação da veracidade foi determinado o parâmetro Z-score em dois MRC (BIPEA 1 e BIPEA 2). Os resultados obtidos encontram-se descritos de uma forma resumida na tabela 2.4.

Tabela 2.4 – Resultados de z-score obtidos de análise a dois MRC (BIPEA 1 e BIPEA 2).

VERACIDADE					
MRC	Parâmetro	Resultados Z-score ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )			
		BaA	Cry	BbF	BaP
BIPEA 1	Média Laboratório $X_{\text{lab}}$	2,65	2,58	2,94	1,74
	Média ECI $X_v$	3,49	3,99	2,95	2,51
	Desvio Padrão ECI $s_x$	1,33	1,12	0,43	0,61
	Z-Score (Z)	<b>-1,11</b>	<b>-1,58</b>	<b>0,00</b>	<b>-0,47</b>
BIPEA 2	Média Laboratório $X_{\text{lab}}$	3,05	2,63	1,50	2,07
	Média ECI $X_v$	2,61	2,3	1,46	1,67
	Desvio Padrão ECI $s_x$	0,39	0,41	0,55	0,50
	Z-Score (Z)	<b>0,17</b>	<b>0,14</b>	<b>0,02</b>	<b>0,20</b>

Como se pode observar nas figuras 2.6 e 2.7, todos os resultados obtidos para os dois MRC são inferiores a -2 ou 2, e como tal, têm um z-score aceitável. Pode verificar-se também que todos os valores de z-score obtidos na amostra BIPEA 1 foram negativos ou zero, no entanto, tal não aconteceu na amostra BIPEA 2 em que os resultados obtidos foram todos positivos. O facto de os resultados obtidos serem todos inferiores a zero, ou mesmo zero no BIPEA 1 poderia indicar a existência de erros sistemáticos, mas com a análise ao BIPEA 2 os resultados já deram positivos, contrariando assim essa hipótese.

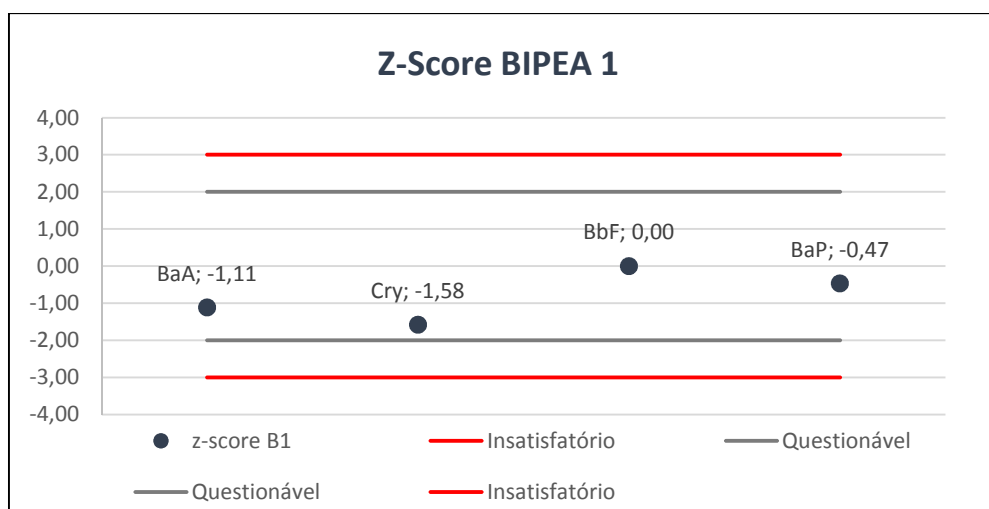


Figura 2.6 – Resultados de z-score de BIPEA 1 introduzidos numa carta de controlo de z-score.

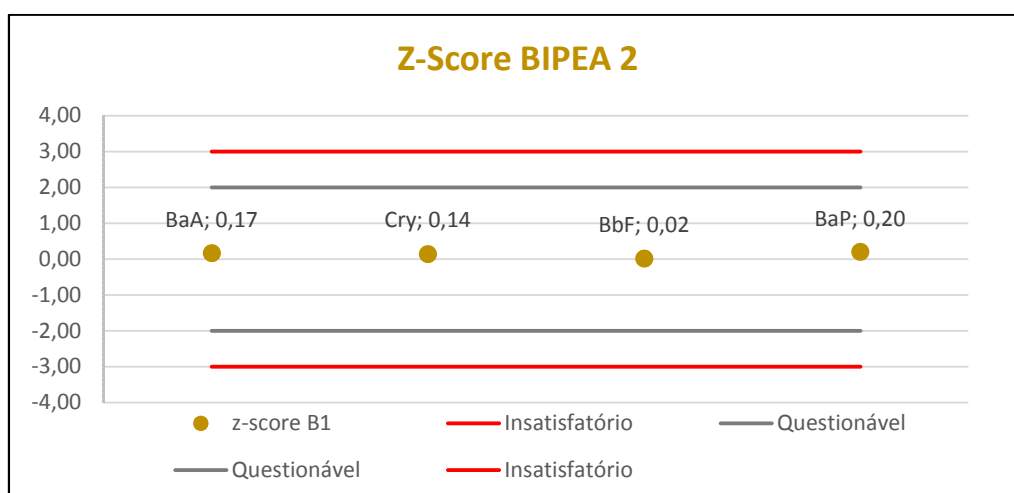


Figura 2.7 – Resultados de z-score de BIPEA 2 introduzidos numa carta de controlo de z-score.

### 2.2.1.2 Brancos

Durante a implementação do método e também durante a determinação dos PAHs nas amostras que foram recolhidas no mercado, foram também realizados brancos. A realização dos brancos consistiu em executar todas as etapas para a determinação dos PAHs utilizando apenas os reagentes, ou seja, sem utilizar amostras. A determinação dos brancos visa determinar se os materiais ou reagentes que vão ser utilizados estão contaminados. A realização dos primeiros brancos quando se implementou o método permitiu verificar que não havia contaminação nem de reagentes nem de material. Isto verificou-se porque os cromatogramas obtidos não apresentavam flutuação do sinal na zona dos PAHs. Esta foi também a razão pela qual não se determinou o LQ e LD através dos brancos. Sempre que se verificou uma mudança de lote de reagentes ou de consumíveis foram realizados brancos para confirmar que estavam isentos de contaminações.

### 2.2.1.3 Limiares analíticos

Para a determinação do limite de quantificação e de deteção, foi preparado um padrão vestigial e analisado 10 vezes. No entanto, antes de se proceder aos cálculos do LQ e LD, teve que se verificar se existiam *outliers* dentro dos resultados obtidos de acordo como teste de Grubs. Os resultados obtidos do cálculo de G1 e GP encontram-se na tabela 2.5.

Tabela 2.5 – Resultados do teste de Grubbs aplicado aos 10 replicados realizados para a determinação do LD e LQ.

TESTE DE GRUBS				
Parâmetro	Resultados ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )			
	BaA	Cry	BbF	BaP
G1	1,932	1,744	1,719	1,106
GP	1,610	1,367	1,432	1,597
G crítico	2,290			
RESULTADO	sem outliers	sem outliers	sem outliers	sem outliers

Uma vez verificada a inexistência de *outliers*, foi então calculado o LD e LQ. Os resultados encontram-se na tabela 2.6.

Tabela 2.6 – Resultados obtidos de LD e LQ para cada um dos quatro PAHs estudados.

<b>LIMIARES ANALÍTICOS</b>				
<b>Parâmetro</b>	<b>Resultados (µg/kg)</b>			
	<b>BaA</b>	<b>Cry</b>	<b>BbF</b>	<b>BaP</b>
<b>Média <math>\bar{x}</math></b>	0,035	0,031	0,042	0,030
<b>Desvio Padrão <math>s_x</math></b>	0,007	0,006	0,010	0,004
<b>Limite de Detecção (LD)</b>	<b>0,057</b>	<b>0,050</b>	<b>0,074</b>	<b>0,042</b>
<b>Limite de Quantificação (LQ)</b>	<b>0,103</b>	<b>0,089</b>	<b>0,138</b>	<b>0,067</b>

Atendendo à legislação estabelecida pelo regulamento (EU) nº835/2011 ficaram também implementados valores limites para a soma dos quatro PAHs ( $\Sigma$  4PAHs), logo, a metodologia para a apresentação dos resultados do somatório quando um ou mais PAHs estejam abaixo do LQ deverá ser a seguinte (OGC002, 2011):

$$\text{SOMA} = \text{BaA} + \text{Cry} + \text{BbF} + \text{BaP}$$

em que  $\text{LQ}(\text{BaA}) = 0,103 \mu\text{g/kg}$ ,  $\text{LQ}(\text{Cry}) = 0,089 \mu\text{g/kg}$ ,  $\text{LQ}(\text{BbF}) = 0,138 \mu\text{g/kg}$  e  $\text{LQ}(\text{BaP}) = 0,067 \mu\text{g/kg}$ , então, apresentar o resultado usando o valor de LQ na soma, ou seja, por exemplo:

$$\text{BaA} = 0,150 \mu\text{g/kg} \quad \text{Cry} < 0,089 \mu\text{g/kg (LQ)} \quad \text{BbF} = 0,150 \mu\text{g/kg} \quad \text{BaP} = 0,150 \mu\text{g/kg}$$

A soma será dada por:

$$\text{SOMA} = \text{BaA} + \text{Cry} + \text{BbF} + \text{BaP} = 0,150 + 0,089 + 0,150 + 0,150 = 0,539 \mu\text{g/kg}$$

Quando todos os valores dos PAHs são inferiores ao LQ, podemos dar como resultado da soma, o somatório dos LQ individuais, ou seja,

$$\text{LQ (Soma)} = 0,397 \mu\text{g/kg}.$$

#### 2.2.1.4 Repetibilidade

Na avaliação da precisão do método através da repetibilidade foram analisados dez replicados de uma amostra de azeite virgem extra (Tabela 2.7). Os cálculos efetuados foram baseados nas fórmulas apresentadas no ponto 1.3.1 deste trabalho. Os resultados para o limite de repetibilidade são  $0,43 \mu\text{g/kg}$  para o BaA,  $0,05 \mu\text{g/kg}$  para o Cry e de  $0,08 \mu\text{g/kg}$  para o BaP. Isto significa que a diferença absoluta entre dois resultados executados em condições de repetibilidade para cada um dos PAHs não deverá exceder este valor. Para além do limite de repetibilidade foi

também determinado o coeficiente de variação da repetibilidade. Os valores obtidos foram 14, 16 e 23%, para o BaA, Cry e BaP, respectivamente. Por comparação dos valores obtidos para cada um dos PAHs com os dados de precisão que constam na ISO17350:2016, pode verificar-se que tanto para o limite de repetibilidade como para o coeficiente de variação são inferiores aos da norma, o que indica que o método implementado apresenta bons dados de repetibilidade.

Para o BbF não foi possível determinar os parâmetros de repetibilidade uma vez que o resultado obtido na amostra era inferior ao limite de quantificação.

Tabela 2.7 – Resumo dos parâmetros determinados para estudo da repetibilidade e parâmetros da repetibilidade dados pela ISO15753.

<b>REPETIBILIDADE</b>					
<b>Parâmetro</b>	<b>Resultados (<math>\mu\text{g}/\text{kg}</math>)</b>				
	<b>BaA</b>	<b>Cry</b>	<b>BbF</b>	<b>BaP</b>	<b><math>\Sigma</math> 4PAHs</b>
<b>Média <math>\bar{x}</math></b>	<b>1,07</b>	<b>0,11</b>	<b>&lt;0,10</b>	<b>0,12</b>	<b>1,31</b>
<b>Desvio Padrão <math>s_x</math></b>	0,15	0,02	-	0,03	0,14
<b>CV (%)</b>	14,0	16,0	-	23,0	11,0
<b>Limite de Repetibilidade (r)</b>	0,43	0,05	-	0,08	0,40
<b>Dados de Precisão da ISO15753:2016</b>					
<b>Média <math>\bar{x}</math></b>	<b>2,50</b>	<b>0,22</b>	<b>0,40</b>	<b>0,36</b>	Dados não calculados pela ISO15753
<b>Desvio Padrão <math>s_x</math></b>	0,32	0,04	0,06	0,08	
<b>CV (%)</b>	12,9	17,9	16,1	21,8	
<b>Limite de Repetibilidade (r)</b>	0,90	0,11	0,18	0,22	

### 2.2.1.5 Precisão Intermédia

Foram calculados para cada um dos PAHs o valor do Limite Superior de Controlo de duplicados quando se trabalha em rotina e em condições de precisão intermédia. A tabela 2.8 apresenta o valor médio das amplitudes relativas dos duplicados e os limites superiores de controlo calculados para cada um dos PAHs.

Tabela 2.8- Valor médio das amplitudes relativas e LSC.

<b>PRECISÃO INTERMÉDIA através de carta de amplitudes relativas</b>					
<b>Parâmetro</b>	<b>Resultados (%)</b>				
	<b>BaA</b>	<b>Cry</b>	<b>BbF</b>	<b>BaP</b>	<b><math>\Sigma</math> 4PAHs</b>
<b>Média das amplitudes relativas (<math>\bar{A}</math>)</b>	7,272	6,158	10,203	6,191	4,315
<b>Limite Superior de Controlo (LSC)</b>	23,756	20,117	33,332	20,225	14,097

Como se pode observar, os LSC para os PAHs são 23,756, 20,117, 33,332, 20,225 %, para o BaA, Cry, BbF e BaP respectivamente. Para o total dos quatro PAHs é de 14,097  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Estes valores constituem o critério de aceitação da diferença de amplitudes entre dois duplicados para cada um dos PAHs, quando se trabalha em termos de precisão intermédia, ou seja, em dias diferentes, com diferentes operadores e diferentes equipamentos.

#### 2.2.1.6 Recuperações

Para se averiguar a eficiência de eluição dos dois tipos de cartuchos SPE utilizados foram determinadas as taxas de recuperação por cada sessão de trabalho. Para todas as sessões de trabalho os valores obtidos para as taxas de recuperação foram sempre bastante aceitáveis rondando valores de 80-90%. Como se pode verificar na figura 2.8, os valores mais baixos obtiveram-se para o BaA na primeira sessão de trabalho e para o BaP na última sessão de trabalho. Os valores mais elevados foram obtidos para o BaA e Cry na quinta sessão de trabalho. A ISO15753, estabelece como valores adequados, taxas de recuperação superiores a 70% e inferiores a 110% para os quatro PAHs, verificando-se assim que o método respeita os critérios estabelecidos.

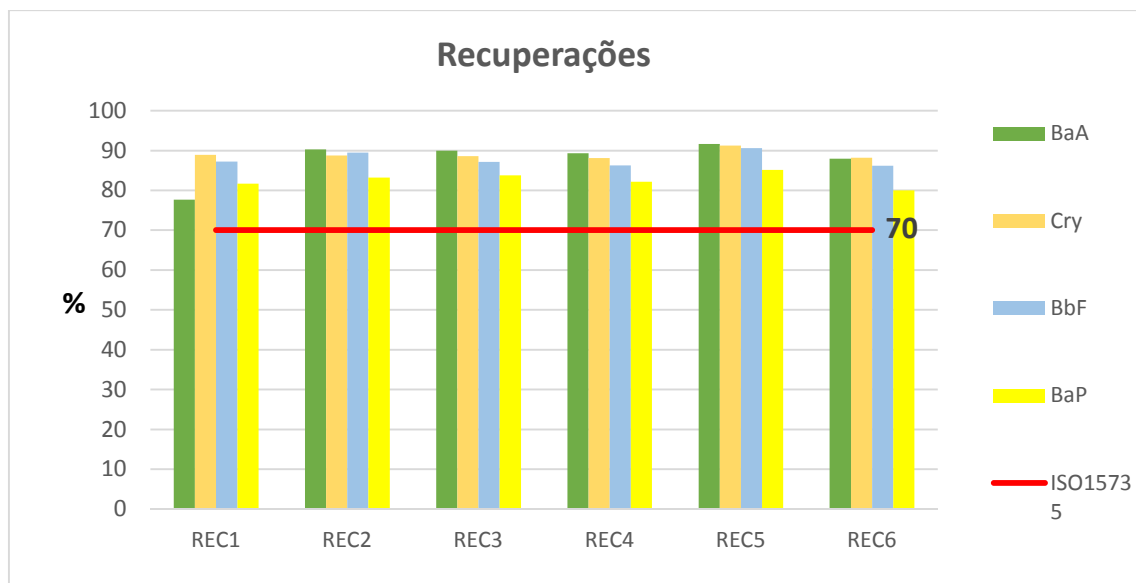


Figura 2.8 – Taxas de recuperação obtidas nas seis sessões de trabalho realizadas.

## 2.2.2 Resultados das amostras recolhidas no mercado

As amostras recolhidas no mercado foram analisadas de acordo com os procedimentos descritos na ISO15753:2016. Como foi descrito anteriormente para se realizar a identificação e quantificação de cada um dos PAHs que aparecem nos cromatogramas das amostras, injetou-se também uma solução padrão de concentração conhecida. A figura 2.9 apresenta o cromatograma dessa solução padrão, no qual se encontram identificados os picos correspondentes aos quatro PAHs em estudo. Os tempos de retenção são 16,06 min, 16,83 min, 18,83 min e 22,19 min, para o BaA, Cry, BbF e BaP, respectivamente.

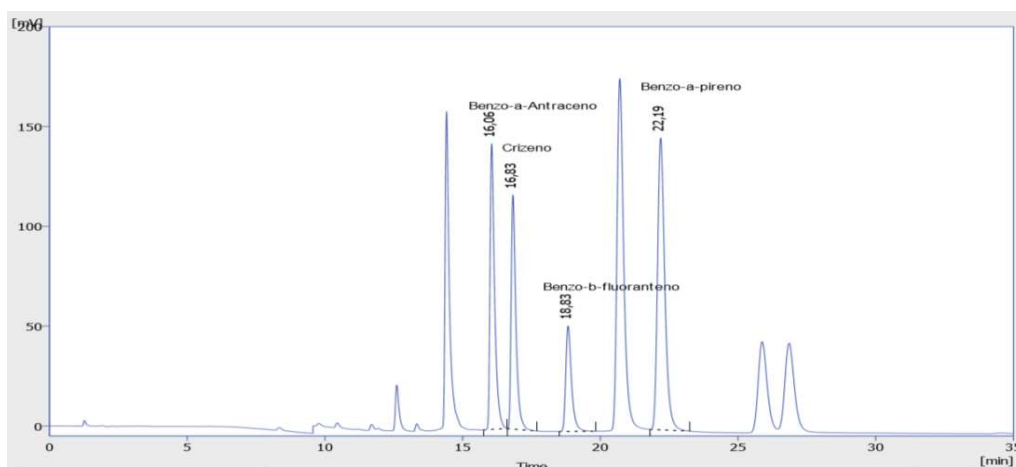


Figura 2.9 – Perfil cromatográfico da solução padrão com identificação de cada um dos picos e respetivo tempo de retenção (BaA 16,06 min, Cry 16,83 min, BbF 18,83 min e BaP 22,19 min).

De seguida apresentam-se também dois cromatogramas obtidos para uma amostra com baixo nível de contaminação e outro para uma amostra com contaminação mais elevada (figura 2.10). Falta assinalar os PAHs no gráfico

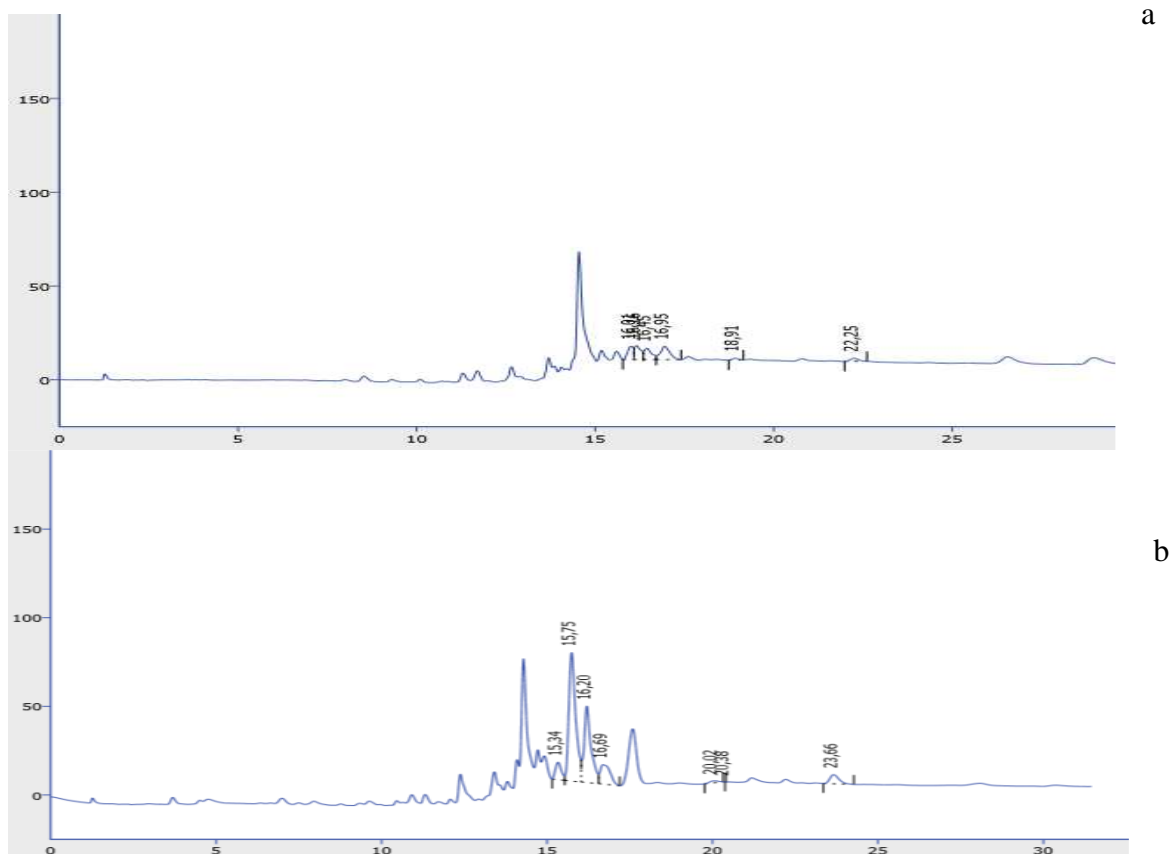


Figura 2.10- a) Cromatograma referente a uma amostra com baixo nível de contaminação; b) Cromatograma referente a uma amostra com nível de contaminação mais elevado.

A tabela 2.9 apresenta os teores médios e respetivos desvios padrão das três determinações de cada uma das 15 amostras de azeite virgem extra recolhidas no mercado português e para cada um dos PAHs.

Tabela 2.9 – Resultados dos quatro PAHs em estudo para as 15 amostras recolhidas no mercado.

RESULTADOS PAH DAS AMOSTRAS ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )					
Amostras	BaA	Cry	BbF	BaP	$\Sigma$ 4PAHs
A	1,218 $\pm$ 0,004	2,847 $\pm$ 0,041	< 0,138	0,346 $\pm$ 0,001	4,549 $\pm$ 0,044
B	0,144 $\pm$ 0,006	1,312 $\pm$ 0,041	< 0,138	0,201 $\pm$ 0,004	1,796 $\pm$ 0,049
C	2,128 $\pm$ 0,053	2,374 $\pm$ 0,165	1,410 $\pm$ 0,153	1,483 $\pm$ 0,026	7,395 $\pm$ 0,339
D	0,161 $\pm$ 0,009	0,318 $\pm$ 0,010	< 0,138	0,179 $\pm$ 0,013	0,796 $\pm$ 0,028
E	0,156 $\pm$ 0,006	0,133 $\pm$ 0,003	< 0,138	< 0,067	0,494 $\pm$ 0,008
F	< 0,103	<0,089	< 0,138	< 0,067	<0,397
G	0,854 $\pm$ 0,010	0,394 $\pm$ 0,007	< 0,138	0,307 $\pm$ 0,002	1,693 $\pm$ 0,015
H	1,085 $\pm$ 0,074	0,761 $\pm$ 0,031	0,276 $\pm$ 0,011	1,603 $\pm$ 0,108	3,725 $\pm$ 0,212
I	0,546 $\pm$ 0,003	0,240 $\pm$ 0,003	< 0,138	0,067	0,992 $\pm$ 0,002
J	0,774 $\pm$ 0,061	0,325 $\pm$ 0,025	< 0,138	0,173 $\pm$ 0,008	1,410 $\pm$ 0,064
K	0,762 $\pm$ 0,022	1,157 $\pm$ 0,055	0,1610 $\pm$ 0,026	0,221 $\pm$ 0,010	2,300 $\pm$ 0,035
L	0,623 $\pm$ 0,011	0,531 $\pm$ 0,012	0,750 $\pm$ 0,061	0,120 $\pm$ 0,001	2,023 $\pm$ 0,081
M	4,310 $\pm$ 0,199	1,520 $\pm$ 0,051	0,156 $\pm$ 0,007	0,750 $\pm$ 0,045	6,737 $\pm$ 0,299
N	1,245 $\pm$ 0,035	0,864 $\pm$ 0,025	< 0,138	0,233 $\pm$ 0,003	2,480 $\pm$ 0,024
O	0,749 $\pm$ 0,025	0,137 $\pm$ 0,007	0,222 $\pm$ 0,021	0,122 $\pm$ 0,002	1,229 $\pm$ 0,026

Através da observação dos resultados pode verificar-se que existem quatro amostras que se distinguem das restantes relativamente ao valor total dos PAHs (F, C, M e H). A amostra F que apresenta valores inferiores aos limites de quantificação para os quatro PAHs e também para o somatório. É a amostra que apresenta valores mais baixos de PAHs das 15 recolhidas.

A amostra C, seguida da amostra M, são as amostras que apresentam valores mais elevados para o somatório dos quatro PAHs, de 7,395  $\mu\text{g}/\text{kg}$  e de 6,737  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , respectivamente. A amostra H apresenta um valor de BaP de 1,603  $\mu\text{g}/\text{kg}$  que é o valor mais elevado. A amostra C apresenta um valor de 1,483  $\mu\text{g}/\text{kg}$  para o BaP que é segundo valor mais elevado.

Pode também verificar-se que, embora a amostra C que é a amostra que é a que tem um valor mais elevado para o somatório dos quatro PAHs, não é a amostra com valor de BaP mais elevado.

A tabela 2.10 apresenta o valor médio, o desvio padrão, os valores mínimos e máximos para o total das 15 amostras estudadas e para cada um dos PAHs. Podemos verificar que a média

de todas as amostras para o BaP e para o somatório dos quatro PAHs foi de 0,396 µg/kg e de 2,534 µg/kg, respectivamente.

Tabela 2.10 – Valor médio, desvio padrão, valor máximo e mínimo para as 16 amostras e para cada um dos PAHs

RESULTADOS PAH DAS AMOSTRAS (µg/kg)					
Parâmetros	BaA	Cry	BbF	BaP	Σ 4PAHs
<b>Média</b>	0,991	0,867	0,281	0,396	2,534
<b>S<sub>x</sub></b>	1,028	0,813	0,338	0,479	2,089
<b>Min</b>	0,103	0,089	0,138	0,067	0,397
<b>Máx</b>	4,310	2,847	1,410	1,603	7,395

De seguida, apresentam-se os resultados em função do tipo comercial com a finalidade de se averiguar se poderá existir alguma relação entre o tipo comercial e os valores de PAHs obtidos.

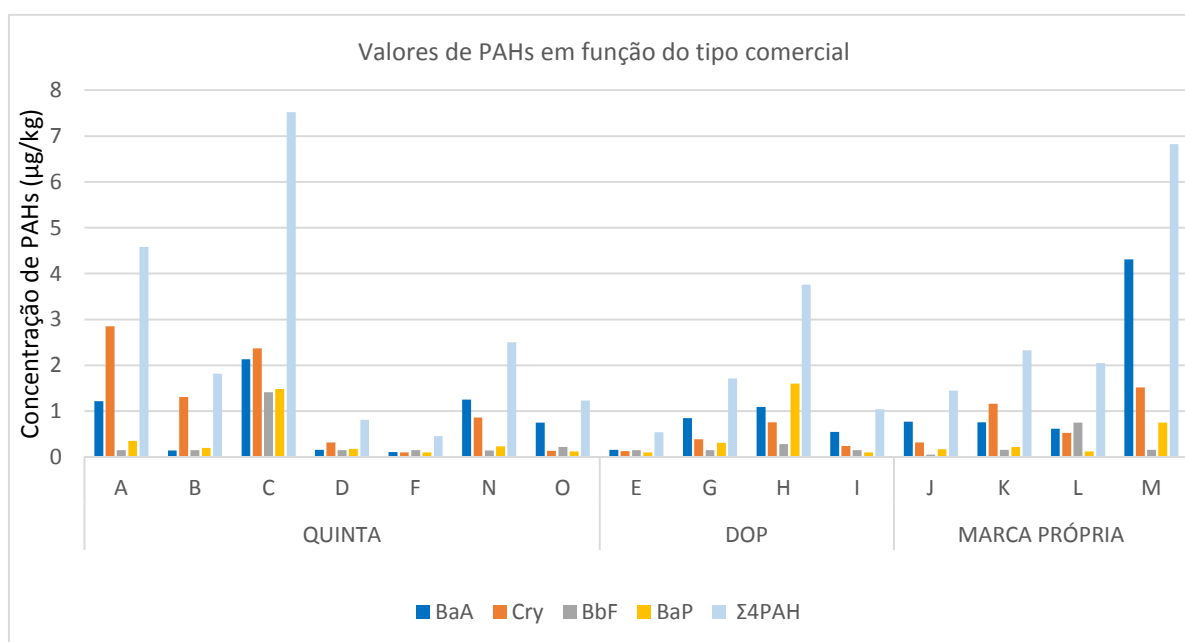


Figura 2.11 – Resultados de PAHs para cada uma das amostras em função do tipo comercial.

Como se pode observar na figura 2.11, não existe relação entre o tipo comercial e os valores de PAHs.

Para o somatório dos quatro PAHs, os quatro valores mais elevados obtidos (7,395 µg/kg, 6,737 µg/kg, 4,549 e 3,725 µg/kg) estão distribuídos pelos três tipos comerciais diferentes. Ainda para o somatório dos quatro PAHs, verifica-se que também os valores mais baixos encontrados (<0,397 (LQ), 0,494 µg/kg, 0,796 µg/kg e 0,992 µg/kg) estão distribuídos pelos diferentes tipos comerciais.

Para o BaP, tanto os valores altos (1,603 µg/kg, 1,483 µg/kg e 0,750 µg/kg) como os valores baixos (<0,067 (LQ), 0,120 µg/kg, 0,173 µg/kg) estão presentes nos resultados dos três tipos comerciais.

O próximo passo foi o de verificar se existe alguma relação entre as amostras recolhidas e a zona geográfica de proveniência. A figura 2.12 apresenta os resultados por região de origem para cada uma das amostras e para cada um dos PAHs.

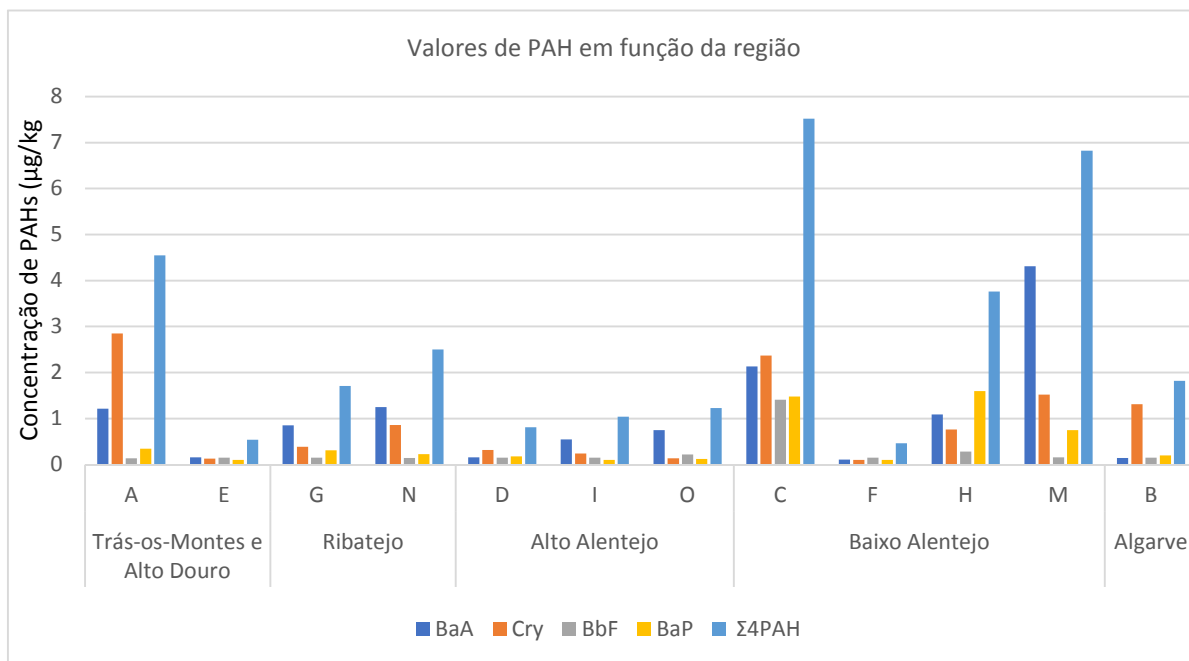


Figura 2.12- Resultados dos PAHs para cada uma das amostras em função da sua origem.

Como se pode observar na figura 2.12, parece existir uma relação entre a região e os valores de PAHs obtidos, pois pelo que se pode observar a região do Baixo Alentejo apresenta três dos quatro valores mais elevados para o somatório dos quatro PAHs. Pode também verificar-se que o Alto Alentejo é a zona onde o valor de PAHs é menor tendo em conta as três amostras analisadas.

Sendo assim, decidiu-se proceder novamente à recolha de amostras das marcas que apresentavam os valores mais elevados de PAHs (C, H e M), mas agora de lotes diferentes dos já analisados. Foram então recolhidas mais 3 garrafas de amostras da marca de H e M. Não foi possível fazer uma recolha de um outro lote da amostra C visto que não estava disponível no mercado.

Tabela 2.11 - Resultados PAHs para dois lotes diferentes da mesma marca.

Resultados ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )										
Amostras	BaA		Cry		BbF		BaP		$\Sigma$ 4PAHs	
	1 <sup>a</sup> rec	2 <sup>a</sup> rec	1 <sup>a</sup> rec	2 <sup>a</sup> rec	1 <sup>a</sup> rec	2 <sup>a</sup> rec	1 <sup>a</sup> rec	2 <sup>a</sup> rec	1 <sup>a</sup> rec	2 <sup>a</sup> rec
<b>H</b>	1,085 $\pm 0,074$	4,607 $\pm 0,535$	0,761 $\pm 0,031$	1,018 $\pm 0,045$	0,276 $\pm 0,011$	0,139 $\pm 0,030$	1,603 $\pm 0,108$	0,222 $\pm 0,008$	3,725 $\pm 0,212$	5,986 $\pm 0,454$
<b>M</b>	4,310 $\pm 0,199$	2,045 $\pm 0,157$	1,520 $\pm 0,051$	0,649 $\pm 0,024$	0,156 $\pm 0,007$	0,281 $\pm 0,026$	0,750 $\pm 0,045$	0,534 $\pm 0,031$	6,737 $\pm 0,299$	3,508 $\pm 0,201$

A tabela 2.11 apresenta os resultados dos PAHs das amostras H e M. A primeira coluna (1<sup>a</sup>rec) diz respeito aos resultados do primeiro lote recolhido e a segunda coluna (2<sup>a</sup>rec) aos resultados do segundo lote recolhido.

Pode observar-se que relativamente ao somatório dos quatro PAHs na amostra M o segundo lote recolhido deu valores bastante mais baixos. No entanto, na amostra H o valor foi quase o dobro. Verifica-se também que efectivamente o valor do somatório dos quatro PAHs nesta segunda recolha, embora sejam valores ainda dentro dos limites legais estabelecidos, continuam a ser valores mais elevados relativamente à média das 15 amostras que foi de 2,534  $\mu\text{g}/\text{kg}$ .

Sendo a região do Baixo Alentejo uma região pouco povoada e fracamente industrializada, não seria de esperar obter valores de PAHs como os que se obtiveram. No entanto, talvez o facto de ser também a região com mais área de olival plantado no país leve a que existam mais indústrias de extracção de óleo de bagaço de azeitona, que possam contaminar a atmosfera. A região do Baixo- Alentejo sendo a mais produtiva e com mais olivais novos, deverá ser também a zona onde as operações culturais no olival estão mais mecanizadas, e como tal, poderá haver contaminação das azeitonas com os fumos provenientes do escape dos motores a diesel.

Em 2017, Garbi *et al.* estudaram também 5 azeites virgens extra de origem Tunisina e de diferentes marcas comerciais e, tal como no presente estudo não encontraram azeites fora dos limites legais estabelecidos para o BaP nem para o somatório dos quatro PAH. Os valores encontrados foram muito baixos tanto para o somatório dos quatro PAHs (máximo 0,7  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) como para o BaP (<0,05  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) em todas as amostras estudadas.

Um outro estudo foi desenvolvido por Rodriguez-Acunã *et al.* (2008), em amostras de azeites espanhóis, nos quais se incluíram também azeites virgens extra de vários tipos comerciais. Este estudo permitiu demonstrar que todos os azeites encontrados no mercado tinham concentrações muito baixas de PAHs.

### 2.2.3 Resultados da amostra de azeite virgem de uma região fortemente poluída

Como já foi anteriormente referido, foi também extraído e analisado azeite de azeitonas provenientes de oliveiras situadas no centro de Lisboa. Os resultados obtidos para o BaA, Cry, BbF, BaP e somatório dos quatro PAHs foram de 0,498 µg/kg, 41,256 µg/kg, 0,138 µg/kg, 0,635 µg/kg, e 42,528 µg/kg, respetivamente. Os valores de todos os PAHs, à exceção do Cry, foram valores baixos ao contrário do que seria de esperar. Face ao resultado obtido, pode concluir-se que este azeite não poderia ser comercializado, visto que o valor obtido para o somatório dos quatro PAHs, está muito acima do limite legal que é de 10 µg/kg. Este resultado faz ressaltar a importância da monitorização dos PAHs nos azeites virgens extra, para que não seja possível a ingestão de azeite virgem extra contaminado com PAHs

Segundo Rodriguez-Acunã *et al.* (2008) e à semelhança dos resultados obtidos para esta amostra, valores de PAHs elevados também foram encontrados em amostra de azeite provenientes de zonas poluídas.

De acordo com os resultados obtidos pode também verificar-se que, tal como indicado pelo painel no relatório da AESA em 2008, o benzo(a)pireno não é um bom marcador para a ocorrência dos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, uma vez que as amostras que apresentavam o valor mais alto para o somatório dos quatro PAHs não apresentavam um valor de BaP também alto. Além disso a amostra que apresentava o valor de BaP mais elevado, não era a que apresentava o valor do somatório dos quatro PAHs mais elevado.

De acordo com os resultados apresentados relativamente aos valores dos PAHs nas amostras recolhidas, verifica-se que os valores de PAHs encontrados não são tão baixos como seria de esperar e como foi relatado nos estudos referidos anteriormente. Diversas serão as razões para isto acontecer, no entanto, o que será importante realçar é que se até há alguns anos os PAHs não seriam uma preocupação, hoje em dia a sua monitorização regular deveria ser considerada pelos produtores de azeite.

3

**CONCLUSÕES**

Tendo em conta que o presente trabalho se dividiu em duas partes, as conclusões de seguida apresentadas também estarão divididas em duas partes: primeiro a validação e em segundo as conclusões respeitantes às amostras recolhidas no mercado.

Relativamente à validação do método pode concluir-se o seguinte:

- Através da análise de z-score pode concluir-se que o método permite obter resultados bastante aceitáveis no que à veracidade diz respeito. Foram analisados dois materiais de referência certificados que se demonstrou serem suficientes para verificar que os resultados obtidos segundo o presente método são muito próximos dos verdadeiros. No entanto, para o Laboratório de Estudos Técnicos concluir que futuramente não existem tendências nos resultados, ou seja, que não se verificam erros sistemáticos, deveria implementar um sistema de controlo de qualidade dos MRC através de cartas de controlo e assim verificar que não existem pontos fora de controlo estatístico.

- O método implementado possui limites de quantificação de 0,103 µg/kg, 0,089 µg/kg, 0,138 µg/kg, 0,067 µg/kg para o BaA, Cry, BbF e BaP, respetivamente. Estes valores são satisfatórios para o método em questão, visto que, correspondem a cerca de 5% dos valores limites legais estabelecidos tanto para a BaP como para o total dos quatro PAHs que são 2,0 µg/kg e 10 µg/kg para o BaP e para total dos PAHs. Além disso o LQ para o BaP, encontra-se de acordo com a Directiva 2005/10/CE 4 de fevereiro, que aconselha a que o LQ não deva ser superior a 0,9 µg/kg.

- O método implementado reporta valores adequados para os parâmetros de repetibilidade e que respeitam os indicados na norma ISO15753:2016. No entanto, a amostra escolhida não foi a mais adequada visto que o valor de Benzo-b-Antraceno era inferior ao limite de quantificação.

- Relativamente às recuperações, verificou-se que o método cumpre os critérios estabelecidos pela ISO15753:2016, o que vem também confirmar que o método apresenta bons resultados relativamente à veracidade. Seria também importante fazer recuperações não só no padrão, mas em amostras fortificadas com padrão para se averiguar se a matriz teria efeitos nos resultados finais.

- Ao que à precisão interna diz respeito podemos afirmar que foram estabelecidos os Limites Superiores de Controlo para a execução de duplicados quando em condições de rotina e de precisão intermédia. Estes limites devem ser atualizados à medida que o LET possui mais valores de duplicados de amostra para assim se obter um valor mais real.

- Pode concluir-se que os reagentes, materiais e consumíveis utilizados durante as determinações foram adequados dado que os resultados dos brancos efetuados revelaram que não existiam contaminações visto que os cromatogramas obtidos não apresentam nem sequer flutuações da linha de base.

Pode concluir-se então que o método apresenta todas as condições necessárias para se poder dar resultados com a exatidão e precisão exigidas pela norma ISO1753:2016.

De seguida apresentam-se as conclusões referentes às 15 amostras recolhidas no mercado Português.

Os resultados do presente estudo demonstram que embora não tendo sido encontrada nenhuma amostra com valores de PAHs superiores aos limites legais estabelecidos, duas dessas amostras apresentavam um valor superior a 6 µg/kg para o somatório dos quatro PAHs. Os valores encontrados situam-se entre 0,067 µg/kg e os 1,603 µg/kg para o BaP e para o somatório dos quatro PAHs entre 0,397 µg/kg a 7,395 µg/kg.

Pode também concluir-se para o ano estudado (2017), a região que apresentou os valores mais elevados de PAHs de uma forma global foi a região do Baixo Alentejo e a região do Alto Alentejo foi a região que também numa forma global apresentou os valores mais baixos. No entanto, não se observou nenhuma relação entre o tipo comercial e os valores de PAHs.

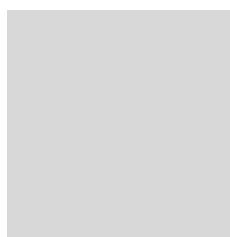
Face aos resultados obtidos importa realçar vários aspetos relativamente às perspetivas futuras para se poder consolidar os resultados obtidos no presente trabalho.

Relativamente às questões relacionadas com a validação do método já foram referidos os vários pontos a ter em atenção.

Relativamente à segunda parte do trabalho seria importante repetir as análises nas mesmas marcas de AVE recolhidas no mercado com o intuito de perceber se os resultados obtidos dizem respeito apenas a um ano ou se se repetem em anos subsequentes. Ou seja, seria importante repetir este estudo por mais dois anos.

Relativamente aos resultados da amostra recolhida na zona de Lisboa seria também importante consolidar este resultado com mais amostras para realçar a ideia de que é fundamental monitorizar os quatros PAHs em conjunto e não apenas o BaP.





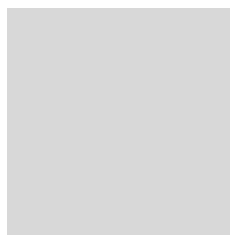
## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- Alba, J., Izquierdo, J. R., Gutiérrez, F., & Vossen, P. (2008). *Aceite de Oliva Virgen* (2ª ed.). Madrid: Editorial Agrícola Española, 41-40. ISBN:978-84-85441-92-1
- Banks, L., Amoah, P., Niaz, M., Washington, K., Adunjah, S., & Ramesh, A. (2016). Olive oil prevents benzo(a)pyrene [B(a)P]-induced colon carcinogenesis through altered B(a)P metabolism and decreased oxidative damage Apc<sup>Min</sup> mouse model. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 28, 37-50.
- Bansal, V. & Kim, K. (2015). Review of PAHS contamination in food products and their health hazards. *Environment International*, 84, 26-38.
- Barjol, J.-L. (2013). Introdução. *Handbook of Olive Oil: Analysis and Properties*. (2ª edição). New York: Ramón Aparicio and Jonh Harwood, 1-17. ISBN: 978-1-4614-7776-1
- Barranco, D., Fernández-Escobar, R., & Rallo, L. (2001). *El Cultivo del Olivo* (4ª ed.). Espanha: Mundi-Prensa, 27-40. ISBN:84-7114-983-4
- D., L. (1993). As Raízes da Oliveira. *Tempo Medicina - Suplento nutrição*, 491, 3
- Darain, K., Rahamn, A., Ahsan, A., lisam, A., & Yusuf, B. (2013). Brick manufacturing practice in Bangladesh: a review of energy efficiency and air pollution. *Journal of Hydro-environment Research*, 1, 60-90.
- Directiva 2005/10/CE da Comissão, de 4 de fevereiro de 2005, que estabelece os métodos de amostragem e de análise para o controlo oficial do teor de benzo(a)pireno nos géneros alimentícios. *Jornal Oficial da União Europeia* L34. 15-20.
- Domingos, J., & Nadal, M. (2015). Human dietary exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: A review of the scientific literature. *Food and Chemical Toxicology*, 86, 144-153.
- DOQ-CGCRE-008. Orientação sobre Validação de Métodos Analíticos. (2010). Coordenação Geral de Acreditação, Revisão 03, Fevereiro.
- Ewa, B., & Danuta, M.-Ś. (2017). Polycyclic aromatic hydrocarbons and PAHS-related DNA adducts. *Journal of Applied Genetics. DOIDE* 1-10
- European Commission. Opinion of the Scientific Committee on Food (2002). Disponível em <[http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scf/out153\\_en.pdf](http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scf/out153_en.pdf)> Acedido em 10 de setembro de 2016
- Ferreira, D., Santamaria, A., Escribano, B., Luque, E., & Túnez, I. (2015). Olive Oil and Huntington's Disease. *Diet and Nutrition in Dementia and Cognitive Decline*. Colin R. Martin and Victor Preedy. 719-731. ISBN: 978-0-12-407824-6
- Francesco, A. D., Falconi, A., Di Germanio, C., Bonaventura, M., Costa, A., Caramuta, S., Dainese, E., Del Carmo, M., Campagnone, D., Cifani, C., Maccarrone, M., D'Adario, C., (2015). Extravirgin olive oil up-regulates CB1 tumor suppressor gene in human colon cancer cells nad rat colon via epigenetic mechanisms. *The journal of Nutritional Biochemistry*, 26, 250-258.

- Gharbi, I., Moret, S., Chaari, O., Issaoui, M., Conte, L., Lucci, P., Hammami, M. (2017). Evaluation of hydrocarbon contaminants in olives and virgin olive oils from Tunisia. *Food Control*, 75, 160-166
- Guimarães, M. (1991). *À Redescoberta do Azeite*. Centro de Informação do Azeite-Azeite da Comunidade Europeia
- Hernández, J., & Gámez, M. (2004). *Gestión de la calidad en el proceso de extracción de aceite de oliva*. Jaén: Westfalia Separator Andalucía, 325-345 ISBN: 84-609-2497-1
- Houessou, J.K., Maloug, S., Leveque, A.-S., Delteil, C., Heyd, B. and Camel, V. (2007). Effect of Roasting Conditions on the Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Content in Ground Arabica Coffee and Coffee Brew. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 9719-9726
- Huang, C. L., & Bauer, S. (2008). Olive Oil, The Mediterranean Diet and Cardiovascular Health. *American College of Surgeons*, 207, 407-416
- ISO 15753: 2006. *Animal and vegetable fats and oils – Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons*. International Organization for Standardization. setembro de 2006
- ISO 15753: 2016. *Animal and vegetable fats and oils – Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons*. International Organization for Standardization. abril de 2016
- ISO 13530:2009. *Water quality - Guidance on analytical quality control for chemical and physicochemical water analysis*. International Organization for Standardization. março de 2009
- ISO 5725-3:1994. *Accuracy (trueness and Precision) of measurement methods and results- Part3: Intermediate measures of the precision of a standard measurement method*. International Organization of Standardization. outubro de 1994
- Jahncke, M.L., & Herman, D. (2001). Control of food safety hazards during cold-smoked fish processing. *Journal of Food Science*, 66(7), 1104-1112.
- Kamal, A., Cincinelli, A., Martellini, T., & Malik, R. (2015). A review of PAHS exposure from the combustion of biomass fuel and their less surveyed effect on the blood parameter. *Environmental Science and Pollution Research*, 22, 4076-4098.
- Kameda, T. (2011). Atmospheric chemistry of polycyclic aromatic hydrocarbons and related compounds. *Journal of Health Sciences*, 57, 504-511
- Kim, K.H., Jahan, S., Kabir, E., & Brown, R. (2013). A review of airborne polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and their human health effects. *Environment International*, 60, 71-80.
- López-Miranda. (2010). Olive Oil and Health: Summary of the International Conference on Olive Oil and Health Consensus Report, *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 20 (4), 284-294.
- Morillas, P., & colaboradores. (2016). Guía Eurachem. *La Adecuación al Uso de los Métodos Analíticos*, 4-6, 17. EURACHEM.
- NP EN ISO/IEC 17025:2007. *Requisitos Gerais de Competência para laboratórios de ensaio e calibração*. Instituto Português da Qualidade. maio de 2007.

- OGC002. Guia para a Acreditação de Laboratórios Químicos. IPAC – Instituto Português de Acreditação. maio de 2011.
- Pagliuca, M. M., & Scarpato, D. (2014). The olive oil sector: a comparison between consumers and “experts” choices by the sensory analysis. *Procedia Economics and Finance*, 17, 221-230.
- Regulamento (CE) nº1234/2007 de 22 de Outubro de 2007. que estabelece uma organização comum dos mercados agrícolas e disposições específicas para certos produtos agrícolas. Jornal Oficial da União Europeia. L299. 45-115
- Regulamento nº835/2011 que altera o regulamento (CE) nº 1881/2006 no que diz respeito aos teores máximos de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos presentes nos géneros alimentícios. Jornal Oficial da União Europeia. L 215. 4-8
- Regulamento (ce) n.o 1881/2006 da comissão de 19 de dezembro de 2006 que fixa os teores máximos de certos contaminantes presentes nos géneros alimentícios. L364. 5-24
- Regulamento (ue) n.o 1151/2012 do parlamento europeu e do conselho de 21 de novembro de 2012 relativo aos regimes de qualidade dos produtos agrícolas e dos géneros alimentícios. L343.1-8
- Guia relacre 13. (2000). Validação de métodos internos de ensaio em análise química, Relacre, 7-41*
- Roche, H. (2000). Beneficial properties of olive oil. *Food Additives and Contaminants*, 33, 227-231.
- Rodriguez-Acuña, R., Peres-Camino, M., Cert, A., & Moreda, W. (2008). Sources of contamination by polycyclic aromatic hydrocarbons in Spanish virgin olive oils. *Food Additives and Contaminants*, 25(1), 115–122.
- Rodriguez-Acuña, R., Peres-Camino, M., Cert, A., & Moreda, W. (2008). Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Spanish Olive Oils: Relationship between Benzo(a)pyrene and Total Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Cont. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 56, 10428–10432.
- Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the European Commission on Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Food. (2008). *The EFSA Journal*, 724, 1-114
- SIAZ (2017)- Sistema de Informação sobre o Azeite e a Azeitona de mesa. Gabinete de Planeamento, Políticas e Administração Geral. Disponível em <<http://www.gpp.pt/index.php/siaz/siaz-sistema-de-informacao-sobre-o-azeite-e-a-azeitona-de-mesa>> . Acedido em 10 de Março de 2017
- Teixeira, V., Casal, S., & Oliveira, M. (2007). PAHs content in sunflower, soybean and virgin olive oils: evaluation in commercial samples and during refining process. *Food Chemistry*, 104, 106-112.
- International Olive Council. (2106). The Olive World. The Olive Tree. (2016). Disponível em <<http://www.internationaloliveoil.org/web/aa-ingles/oliveWorld/olivo.html>>. Acedido em 09 de Março de 2017*

- Vassilis, Z. (2006). *Olive Oil. Chemistry and Technology. Olive Oil in the World Market*. (2ªedição). Academic Press and AOCS Press. 21-39. **ISBN:** 9780128043547
- White, A., Bradshaw, P., Herring, A., Teitelbaum, S., Beyea, J., Stellman, S., Steck, S., Mordukhovich, I., Eng, S., Engel, L., Conway, K., Hatch, Neugut, A., Santella, R. & Gammon, M. (2016). Exposure to multiple sources of polycyclic aromatic hydrocarbons and breast cancer incidence. *Environment International*, 89-90, 185-192.
- Wenzl, T., Simon, R., Kliener, J., & Anklam, E. (2006). Analytical methods for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in food and the environment needed for new food legislation in the European Union. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 25(7), 716–725.
- Zacarias, T. (2015a) Produção. Casa do Azeite. Disponível em <<http://www.casadoazeite.pt/Profissionais/Dados-sector/Produção>>. Acedido em 10 de Março de 2017.
- Zacarias, T. (2015b) Denominações de Origem Protegida. Casa do Azeite. Disponível em <<http://www.casadoazeite.pt/Azeite/Denominacoes-de-origem-prottegida>>. Acedido em 12 de Maio de 2017.



## **APÊNDICE**

Neste apêndice são apresentados os resultados não tratados relativamente aos parâmetros determinados para a validação do método.

Tabela A.1- Limiares Analíticos

<b>Benzo-a-Antraceno BaA</b>	Data	Leitura padrão vestigial BaA(g)	S0	Média	G1	Gp	Gcrítico		LD	LQ
	17/03/2014	0,022	0,007	0,035	1,932	1,610	2,290		0,057	0,103
	17/03/2014	0,024								
	18/03/2014	0,034								
	18/03/2014	0,035								
	18/03/2014	0,036								
	19/03/2014	0,046								
	19/03/2014	0,039								
	25/03/2014	0,037								
	25/03/2014	0,036								
	25/03/2014	0,039								
	25/03/2014	0,038								
<b>Criseno (Cry)</b>	Data	Leitura padrão vestigial BaA(g)	S0	Média	G1	Gp	Gcrítico		LD	LQ
	17/03/2014	0,024	0,006	0,031	1,744	1,367	2,290		0,050	0,089
	17/03/2014	0,021								
	18/03/2014	0,032								
	18/03/2014	0,025								
	18/03/2014	0,035								
	19/03/2014	0,030								
	19/03/2014	0,039								
	25/03/2014	0,034								
	25/03/2014	0,034								
	25/03/2014	0,038								
	25/03/2014	0,030								
<b>Benzo-b-floranteno BbF</b>	Data	Leitura padrão vestigial BaA(g)	S0	Média	G1	Gp	Gcrítico		LD	LQ
	17/03/2014	0,026	0,010	0,042	1,719	1,432	2,290		0,074	0,138
	17/03/2014	0,026								
	18/03/2014	0,049								
	18/03/2014	0,043								
	18/03/2014	0,044								
	19/03/2014	0,054								
	19/03/2014	0,056								
	25/03/2014	0,041								
	25/03/2014	0,042								
	25/03/2014	0,042								
	25/03/2014	0,043								

<b>Benzo-a-Pireno BaP</b>	Data	Leitura padrão vestigial BaA(g)	S0	Média	G1	Gp	Gcrítico		LD	LQ
	17/03/2014	0,026	0,004	0,030	1,106	1,597	2,290		0,042	0,067
	17/03/2014	0,026								
	18/03/2014	0,031								
	18/03/2014	0,034								
	18/03/2014	0,029								
	19/03/2014	0,036								
	19/03/2014	0,036								
	25/03/2014	0,028								
	25/03/2014	0,027								
	25/03/2014	0,029								
	25/03/2014	0,029								

Tabela A.2 - Repetibilidade

Data	Amostra	Resultado				
		BaA	Cry	BbF	BaP	$\Sigma$ 4PAHs
21/09/2017	REPETIBILIDADE 2	1,02	0,14	0,01	0,14	1,32
21/09/2017	REPETIBILIDADE 3	0,93	0,14	0,02	0,13	1,21
22/09/2017	REPETIBILIDADE 5	0,99	0,09	0,01	0,07	1,16
22/09/2017	REPETIBILIDADE 6	1,16	0,10	0,01	0,09	1,36
22/09/2017	REPETIBILIDADE 7	1,22	0,09	0,01	0,12	1,45
22/09/2017	REPETIBILIDADE 8	1,09	0,10	0,01	0,09	1,29
23/09/2017	REPETIBILIDADE 9	1,41	0,11	0,02	0,10	1,64
23/09/2017	REPETIBILIDADE 10	0,94	0,11	0,01	0,15	1,22
23/09/2017	REPETIBILIDADE 11	0,99	0,10	0,01	0,13	1,23
23/09/2017	REPETIBILIDADE 12	0,97	0,10	0,01	0,15	1,23
	Média	<b>1,07</b>	<b>0,11</b>	<b>0,01</b>	<b>0,12</b>	1,31
	S rep	0,15	0,02	0,003	0,027	0,14
	CV rep (%)	14	16	27	23	11
	r limite de repetibilidade	0,43	0,05	0,010	0,08	0,40

Tabela A.3 - Recuperações

Recuperação (Áreas)				Resultados (%)			
BaA	Cry	BbF	BaP	BaA	Cry	BbF	BaP
1331541,01	1259932,49	606409,79	2258710,18	77,70	88,95	87,21	81,72
1111709,20	902154,09	484665,65	1746473,72	90,30	88,73	89,48	83,18
1121932,82	921449,92	486328,34	1722793,20	89,95	88,63	87,17	83,75
1113830,34	915901,96	481152,45	1690803,31	89,30	88,10	86,24	82,20
1183796,18	971153,39	513835,29	1810010,15	91,67	91,26	90,60	85,13
1135747,28	938319,57	488688,85	1699993,51	87,95	88,18	86,17	79,96

Tabela A.4 - Veracidade

Veracidade (Cálculo do Z-SCORE)						
Data	Amostra	Resultado				
		BaA	Cry	BbF	BaP	$\Sigma$ 4PAHs
03/01/2017	Bipea 1a- Óleo de soja bruto	2,62	2,58	2,92	1,72	9,83
03/01/2017	Bipea 1b Óleo de soja bruto	2,64	2,56	2,96	1,73	9,88
03/01/2017	Bipea 1c Óleo de soja bruto	2,67	2,58	3,00	1,75	10,00
03/01/2017	Bipea 1d Óleo de soja bruto	2,69	2,58	2,91	1,73	9,91
03/01/2017	Bipea 1e Óleo de soja bruto	2,66	2,58	2,93	1,75	9,92
	Média	2,65	2,58	2,94	1,74	9,91

Tabela A.5 – Precisão Intermédia

Resultados de duplicados para cálculo da Precisão Intermédia									
BaA		Cry		BbF		BaP		Σ 4PAHs	
1º determinação	2º determinação	1º determinação	2º determinação	1º determinação	2º determinação	1º determinação	2º determinação	1º determinação	2º determinação
0,109	0,107	0,028	0,026	0,013	0,008	0,003	0,003	0,141	0,136
2,256	2,234	0,705	0,701	0,170	0,186	0,239	0,241	3,200	3,285
2,551	2,503	0,463	0,443	0,488	0,453	0,363	0,331	3,377	3,277
0,835	0,836	0,460	0,456	0,554	0,550	0,390	0,367	1,685	1,659
0,192	0,166	0,067	0,091	0,023	0,016	0,028	0,028	0,286	0,285
3,830	5,748	1,049	3,397	0,114	0,184	0,115	0,188	4,993	9,333
0,811	0,889	0,633	0,675	0,201	0,217	0,217	0,229	1,660	1,794
0,984	0,938	0,535	0,479	0,149	0,119	0,240	0,210	1,759	1,627
0,168	0,145	0,049	0,044	0,013	0,004	0,020	0,011	0,236	0,199
0,187	0,181	0,464	0,455	0,019	0,018	0,069	0,070	0,720	0,706
0,458	0,456	0,255	0,258	0,213	0,204	0,255	0,234	0,967	0,947
0,142	0,144	0,123	0,137	0,128	0,044	0,200	0,185	0,465	0,466
2,207	2,122	1,133	1,051	0,042	0,094	0,185	0,045	3,524	3,177
3,139	3,216	1,059	1,000	0,190	0,180	0,399	0,257	4,597	4,473
1,641	1,574	0,274	0,320	0,872	0,886	0,220	0,204	2,135	2,098
2,408	2,164	2,411	2,200	1,023	0,948	1,057	0,991	5,876	5,356
0,305	0,294	0,099	0,092	0,012	0,025	0,087	0,086	0,491	0,472
0,253	0,256	0,156	0,163	0,078	0,056	0,038	0,039	0,447	0,458
0,133	0,200	0,117	0,269	0,374	0,172	0,513	0,492	0,301	0,962
0,738	0,711	0,594	0,562	0,222	0,214	0,119	0,122	1,450	1,396
0,393	0,346	0,760	0,673	0,679	0,612	0,399	0,347	1,551	1,367
0,748	0,716	0,675	0,706	0,824	0,871	0,689	0,744	2,080	2,199
0,853	0,888	1,142	1,220	1,018	1,065	0,759	0,806	2,754	2,914
0,719	0,745	0,525	0,583	0,372	0,275	0,077	0,066	1,320	1,395
0,224	0,210	0,166	0,148	0,078	0,076	0,097	0,094	0,487	0,452
0,593	0,616	0,671	0,701	0,070	0,075	0,169	0,201	1,433	1,518
0,099	0,094	0,011	0,011	0,006	0,007	0,024	0,030	0,133	0,135
5,594	5,507	2,436	2,448	3,057	3,016	1,670	1,565	9,699	9,520
0,208	0,231	0,009	0,009	0,013	0,032	0,037	0,086	0,250	0,326
0,141	0,141	1,533	1,564	0,285	0,290	0,022	0,019	1,695	1,723