



UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIAS



LUCILENE DOS SANTOS ROSA

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DA ALFACE (*Lactuca sativa*, L.) APÓS SER
SUBMETIDA A IRRIGAÇÃO COM ÁGUA CONTAMINADA POR HPA,
COMPARADA COM AMOSTRAS COMERCIALIZADAS NO MUNICÍPIO DE
DOURADOS/MS**

TESE DE DOUTORADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA AMBIENTAL

Dourados/MS

Janeiro/2022



LUCILENE DOS SANTOS ROSA



**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DA ALFACE (*Lactuca sativa*, L.) APÓS SER
SUBMETIDA A IRRIGAÇÃO COM ÁGUA CONTAMINADA POR HPA,
COMPARADA COM AMOSTRAS COMERCIALIZADAS NO MUNICÍPIO DE
DOURADOS/MS**

ORIENTADOR: PROF. Dr. ERITON RODRIGO BOTERO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação stricto sensu, como requisito parcial obtenção do título de Doutor em Ciência e Tecnologia Ambiental curso de Doutorado - área de concentração de Ciência

Dourados/MS

Janeiro/2022

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo dom da vida, por iluminar todos os meus passos e me dar forças para superar os desafios de cada dia, por estar sempre me protegendo e abençoando, tenho muito que agradecer. Obrigada, por permitir minha convivência com tantas pessoas maravilhosas, às quais expresso, nesse momento, meus sinceros agradecimentos:

À minha querida família, exemplo de amor e respeito, sempre presente em todos os momentos da minha vida. Ao meu pai Marcelino Rosa (in memoriam), que sempre me apoiou e nunca perdeu a fé nos meus sonhos, à minha mãezinha, Maria Neusa dos Santos Rosa, pela formação e ensinamentos de vida, cuidado, apoio, orações, incentivo, amor e dedicação a mim. A minha irmã, Lucimara dos Santos Rosa e cunhado Diego Amaral, sobrinhos Evelyn Sayuri Santos Kushida e Pablo Dhiego Santos Servin e ao meu Esposo Fabrício Santos Silva que muito me apoia e incentiva, sempre com carinho e paciência. A amiga Dona Lídia sempre presente em minha vida. Tenho muito orgulho de todos vocês!

Ao meu orientador, Prof. Dr. Eriton Rodrigo Botero por ser paciente em todos os momentos, pela confiança em mim depositada, pelo esforço para oferecer a melhor estrutura possível e pelo aprendizado diário não apenas sobre espectroscopia, mas também sobre como ser um excelente profissional independentemente de onde você esteja.

Aos amigos do Laboratório do Grupo de Optica Aplicada (GOA), àqueles que passaram pelo laboratório e aos de convívio frequente, pela ajuda nas análises, pelo conhecimento que cada um de vocês me transmitiram durante esse tempo de convivência, pelos bons momentos de conversas, aprendizagem, amizade, pelas piadas, risadas e diversão.

Aos Professores pela atenção, colaboração e contribuição como membro da comissão avaliadora da defesa desse trabalho.

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

A todos que de alguma forma contribuíram para a concretização deste trabalho, muito obrigada.

Resumo

A alface (*Lactuca sativa*, L.) é a mais consumida no Brasil e grande parte da sua produção encontra-se próxima às áreas metropolitanas devido à facilidade de transporte e ao curto período de vida pós-colheita. A presença de poluentes nessas águas é muito comum, e dentre eles podemos destacar os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs), que apresentam média persistência no ambiente e características mutagênicas, teratogênicas e carcinogênicas. Nesse sentido, esse estudo teve como finalidade relacionar a produção de hortaliças, com a qualidade da água e a poluição ambiental devido a presença de HPAs. Escolheu-se como técnica de prova a Espectroscopia de Fluorescência Sincronizada (EFS), para identificação e quantificação dos HPAs, tanto nos meios aquáticos, quanto nas hortaliças. Foram descritas e analisadas as características da alface (*Lactuca sativa*, L.) sujeitas ao contato com o benzo(a)pireno, um dos mais comuns e tóxicos dos HPAs. Para isso foi necessário criar metodologias apropriadas para avaliação do impacto tóxico no desenvolvimento das plântulas. Foi possível observar que a fluorescência da clorofila aumenta com o aumento das concentrações de B(a)P adicionados nas soluções de irrigação. Os resultados, obtidos das análises espectroquímicas, obtidas em órgãos específicos da alface, revelaram a seguinte sequência para a concentração média de HPA absorvido e acumulado, na seguinte ordem: folhas > raízes > talos, na comparação de médias, para os todos os tratamentos. Sendo que as menores concentrações de HPA, foram encontrados na folha verde $3,59 \text{ ng.mL}^{-1}$, enquanto que, os valores mais altos foram encontrados nos talos $79,01 \text{ ng.mL}^{-1}$ e raízes com $41,13 \text{ ng.mL}^{-1}$. De maneira geral, ouve a distribuição da solução nutritiva com a presença do HPA, por toda planta e as condições de cultivo hidropônico para a execução do experimento não limitaram o desenvolvimento de mudas de alface.

PALAVRAS-CHAVE: Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, benzo(a)pireno, espectroscopia, toxidade.

Abstract

Lettuce (*Lactuca sativa*, L.) is the most consumed in Brazil and a large part of its production is located close to metropolitan areas due to the ease of transport and the short post-harvest life. The presence of pollutants in these waters is very common, and among them we can highlight Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs), which have medium persistence in the environment and mutagenic, teratogenic and carcinogenic characteristics. In this sense, this study aimed to relate the production of vegetables with water quality and environmental pollution due to the presence of PAHs. Synchronized Fluorescence Spectroscopy (SFS) was chosen as the test technique for the identification and quantification of PAHs, both in aquatic environments and in vegetables. The characteristics of lettuce (*Lactuca sativa*, L.) subjected to contact with benzo(a)pyrene, one of the most common and toxic of PAHs, were described and analyzed. For this, it was necessary to create appropriate methodologies to assess the toxic impact on the development of seedlings. It was possible to observe that chlorophyll fluorescence increases with increasing concentrations of B(a)P added to the irrigation solutions. The results, obtained from spectrochemical analyses, obtained in specific organs of lettuce, revealed the following sequence for the average concentration of absorbed and accumulated PAH, in the following order: leaves > roots > stalks, in the comparison of averages, for all treatments. The lowest concentrations of PAH were found in the green leaf with 3.59 ng.mL⁻¹, while the highest values were found in the stems with 79.01 ng.mL⁻¹ and roots with 41.13 ng.mL⁻¹. In general, there is the distribution of the nutrient solution with the presence of PAH, throughout the plant and the conditions of hydroponic cultivation for the execution of the experiment did not limit the development of lettuce seedlings.

KEY-WORDS: Lettuce, *Lactuca sativa*, L., polycyclic aromatic hydrocarbons, benzo(a)pyrene, spectroscopy.

SUMÁRIO

1. Introdução Geral.....	1
1.1. Objetivo Geral	3
1.2. Objetivos Específicos	3
2. Revisão de Literatura	4
2.1. Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPA): propriedades, fontes de missão e efeitos no ser humano.....	4
2.1.1. Fontes de Contaminação por HPAs	7
2.1.2. Distribuição dos HPAs.....	8
2.1.2.1. HPAs no Ambiente Aquático.....	9
2.2. Considerações sobre o consumo, produção de alfaces e contaminação por HPA.....	11
2.3. Efeitos toxicológicos e o metabolismo da Alface.....	13
2.3.1. Incorporação dos HPA nos vegetais folhosos	15
2.4. Fluorescência Molecular	16
2.4.1. HPAs e as Propriedades Espectroscópicas.....	19
3. Materiais e Métodos.....	20
3.1. Técnicas experimentais de caracterização para detecção e determinação de HPAs.....	20
3.2. Plantio Ambiente Controlado de Cultivo – ACC.....	22
3.3. Amostra de Ambiente Não Controlado de Cultivo – ANC.....	24

3.4. Preparação das amostras para análise.....	26
3.5. Parâmetros de Calibração Instrumental.....	27
3.5.1. Curva Analítica.....	28
3.5.2 Linearidade.....	28
3.5.3. Limite de Detecção.....	29
3.5.4. Limite de Quantificação.....	29
3.5.5. Precisão.....	29
4. Resultados e Discussão.....	31
4.1. Obtenção da curva analítica com a amostra padrão.....	31
4.2. Determinação do Teor de Clorofila.....	35
4.3. Estudo sobre o efeito direto do B(a)P sobre a clorofila.....	38
4.4. Influência do benzo(a)pireno sobre a planta cultivada em sistema hidropônico.....	40
4.5. Análises da Extração Líquido-Líquido em órgãos Específicos da Alface (<i>Lactuca sativa, L.</i>) Cultivada em Sistema Hidropônico.....	43
4.5.1. Absorção de B(a)P na parte aérea da planta – Folha Verde.....	44
4.5.2. Absorção de B(a)P na parte aérea da planta – Matéria seca de folha senescent.....	46
4.5.3. Absorção de B(a)P no Talo da Alface (<i>Lactuca sativa, L.</i>).....	48
4.5.4. Absorção de B(a)P na Raiz da Alface (<i>Lactuca sativa, L.</i>).....	49

4.5.5. Análises da Presença de Benzo(a)Pireno em Alfaces Colhidas na Horta Escolar e na Feira Livre da Cidade de Dourados/MS.....	53
5. Conclusão.....	56
6. Referências Bibliográficas.....	57

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Estrutura molecular do Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos Benzo(a)Pireno.....6
- Figura 2.** Diagrama de níveis de energia mostrando algumas alterações de energia que ocorrem durante a absorção. Relaxação não-radiativa e fluorescência por uma espécie molecular.....17
- Figura 3.** O espectrofluorímetro . Dados obtidos da Referência [57].....19
- Figura 4.** Sequência de procedimento metodológicos realizados. Fonte: Autoria própria.....21
- Figura 5.** Sistema convencional de cultivo, bancadas com as mudas em estufa, da Alface *Lactuca sativa*, L. ((Imagens: ROSA, L.S.).....23
- Figura 6.** Cisterna para captação de água da chuva., localizada na Escola Estadual Professor José Pereira Lins, Bairro Jockey Clube. (Imagens: ROSA, L.S.).....25
- Figura 7.** Canteiro de Alface *Lactuca sativa*, L., localizada na Escola Estadual Professor José Pereira Lins, Bairro Jockey Clube. (Imagens: ROSA, L.S.).....26
- Figura 8.** Intensidade de fluorescência em função da concentração de B(a)P, representando uma curva analítica do procedimento proposto.....31
- Figura 9.** Espectro de emissão de fluorescência sincronizada do B(a)P em solução metanólica para um $\Delta\lambda$ de 40nm. A concentração do B(a)P era de 0,97 ng/mL.....32
- Figura 10.** Espectro de EFS de uma solução de benzo(a)pireno acondicionada em temperatura ambiente (26°C) e na geladeira (-10°C).....33
- Figura 11.** Intensidade de fluorescência do B(a)P em função do tempo (horas) após o preparo da solução de HPA, no laboratório GOA – UFGD.....34
- Figura 12.** Espectro de emissão do efeito da adição de B(a)P sobre o extrato da clorofila extraída de plantas de alface cultivadas através do sistema de convencional.....35
- Figura 13.** Espectro de emissão do efeito da adição de B(a)P sobre o extrato da clorofila extraída de plantas de alface cultivadas através do sistema de hidropônico.....35

Figura 14. Intensidade de Fluorescência em função da concentração de B(a)P adicionado nas soluções nutritivas e absorvidos pela clorofila de plantas de alface cultivadas através do sistema convencional.....	36
Figura 15. Intensidade de Fluorescência em função da concentração de B(a)P adicionado nas soluções nutritivas e absorvidos pela clorofila de plantas de alface cultivadas através do sistema hidropônico.....	36
Figura 16. Intensidade de fluorescência sincronizada da extração líquido-líquido clorofila para o sistema de cultivo convencional.....	38
Figura 17. Intensidade de fluorescência sincronizada da extração líquido-líquido clorofila para o sistema de cultivo hidropônico.	39
Figura 18. Imagens de QY_Max durante período de análise, obtidas por meio da cinética de fluorescência da clorofila.	40
Figura 19. Valores médios de comprimento, em função do tempo, para duas concentrações de benzo(a)pireno, comparadas com as medias do comprimento da controle (solução nutritiva). Fonte: Poliane Guerino.	41
Figura 20 Raiz de plantas de <i>Lactuca sativa</i> , <i>L.</i> , de cultivo hidroônico, com diferentes concentrações de Benzo(a)pireno, da esquerda para a direita, planta controle, concentração 5,09ng/mL e concentração 50,9 ng/mL.....	42
Figura 21. Amostra da Alface (<i>Lactuca sativa</i> , <i>L.</i>) Cultivada em Sistema Hidropônico - Parte Aérea da planta – Folha Verde (Imagens: ROSA, L.S.).....	44
Figura 22. Intensidade de fluorescência em função da concentração de B(a)P na folha verde...45	
Figura 23. Massa verde e massa seca da parte aérea das plântulas. (Imagem: ROSA, L.S.).....	46
Figura 24. Intensidade de fluorescência em função da concentração de B(a)P na matéria seca de folha senescente da parte aérea.....	47
Figura 25. Amostra do Talo da Alface (<i>Lactuca sativa</i> , <i>L.</i>). (Imagem: ROSA, L.S.).....	48
Figura 26. Intensidade de fluorescência em função da concentração de B(a)P no Talo.....	49
Figura 27. Intensidade de fluorescência em função da concentração de B(a)P na Raiz.....	50
Figura 28. Espectro de emissão do benzo(a)pireno presente na Raiz da alface cultivada por meio de hidroponia.....	51

Figura 29. Distribuição do HPA em cada parte da planta.....	52
Figura 30. Espectro de emissão do B(a)P presente na alface cultivada na escola.....	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Propriedades físico-químicas do HPA Benzo(a)Pireno. Número de anéis aromáticos; PM, peso molecular ($\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$); S, solubilidade ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$); PV, pressão de vapor (Pa – Pascal); Log Kow, coeficiente de partição (octanol/água).....6

Tabela 2: Absorção média dos valores obtidos pela técnica de EFS em cada parte da planta.....53

1. Introdução Geral

Sendo a alimentação um direito fundamental e inerente à dignidade humana, e um requisito básico e essencial para o crescimento, desenvolvimento humano, qualidade de vida e cidadania, a insegurança alimentar e nutricional (IAN) configura-se, então, como uma questão de saúde pública. [1] Nesse sentido, o consumo de hortaliças vem sendo cada vez mais incentivado no mundo atual, diante de todos os seus benefícios nutricionais conhecidos. Porém, principalmente as hortaliças folhosas, constituem um importante meio de transmissão de várias doenças toxinfeciosas, tendo sido reportadas como fonte potencial de microrganismos patogênicos, e contribuindo para a elevação dos casos de doenças veiculadas por alimentos [2]. O uso de água com baixa qualidade para a irrigação é um dos principais problemas ao ser avaliado no cultivo de hortaliças.

Sabe-se que a atividade antrópica é responsável pela inserção de uma grande variedade de substâncias no ambiente, inclusive substâncias nocivas à saúde humana. Nesse sentido, por exemplo, a presença de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) em mananciais pode originar novos compostos que apresentam média persistência no ambiente e características mutagênicas, teratogênicas e carcinogênicas que entraram em contato com tais hortaliças. Identificar a presença dessas substâncias se torna, então, de grande importância para a sociedade.

Visto esta problemática, uma avaliação ecotoxicológica para identificação de HPAs nas hortaliças, de um modo geral, se torna essencial. Contudo, as pesquisas existentes em nosso meio para avaliar a qualidade sanitária de hortaliças, em sua grande maioria, só ocorrem nos locais de distribuição e comercialização das mesmas, poucas se referem ao local de cultivo ou início da cadeia produtiva, onde deveria ter seu controle e monitoramento iniciados. [3]

Dentre essas hortaliças, a alface (*Lactuca sativa*, L.) é a mais consumida no Brasil, onde grande parte da produção, encontra-se próxima às áreas metropolitanas devido ao curto período de vida pós-colheita. Nesse sentido, esse estudo se fundamenta avaliar comparativamente a qualidade da alface (*Lactuca sativa*, L.) após ser submetida a irrigação com água contaminada por Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) comparada com amostras da alface rotineiramente comercializada no município, além de amostras plantadas em uma Escola Estadual sob supervisão. Escolheu-se como técnica de prova a espectroscopia de fluorescência

sincronizada (EFS), para identificação e quantificação dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. Outras técnicas também foram usadas para a caracterização das amostras e identificar a influências dos HPAs nas plantas.

A proposta de trabalhar estas constantes acrescentará à região um maior conhecimento científico e informações relevantes quanto à possível presença desses compostos tóxicos nas hortaliças as quais tornam-se impróprias para o consumo humano. Desta forma, a necessidade de se investigar metodologias apropriadas para avaliação do impacto ambiental na alface (*Lactuca sativa*, L.), e as ações locais ligadas à agricultura familiar, no enfoque da agroecologia, podem ser entendidas como ações de promoção da saúde.

1.1. Objetivo Geral

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

1.2. Objetivos Específicos

- Avaliar amostras de alface sujeita à contaminação com diferentes concentrações de benzo(a)pireno;
- Obter dados de emissão de fluorescência de plantas na presença de HPA, utilizando a técnica de Espectroscopia de Fluorescência para a análise do teor de B(a)P e suas influências na fluorescência da clorofila;
- Utilizar a técnica de Espectroscopia e Fluorescência Sincronizada e métodos de recuperação de solventes em água para identificar e quantificar a presença de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) em órgãos específicos da alface (*Lactuca sativa*, L.);
- Correlacionar os parâmetros físicos e fisiológicos das amostras de alface com os resultados encontrados por fluorescência. Avaliar comparativamente a qualidade da alface (*Lactuca sativa*, L.), plantada na escola e comercializada na feira livre do município de Dourados/MS.

2. Revisão de Literatura

2.1 Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs): propriedades, fontes de emissão e efeitos no ser humano.

O estudo dos Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) teve sua origem em 1931, com o isolamento do benzo(a)pireno B(a)P a partir do carvão e sua síntese no mesmo ano. Contudo, os primeiros dados referentes aos riscos ocupacionais e ambientais dos HPAs foram obtidos em 1922 pela demonstração de que extratos orgânicos de fuligem eram carcinogênicos em animais. Em 1970, ele foi caracterizado como um agente cancerígeno de distribuição mundial, em ambientes respiráveis e como constituinte de aerossóis urbanos [2].

Os HPAs são compostos orgânicos de elevada persistência no ambiente, devido a sua estabilidade química e resistência à biodegradação. Esta persistência varia em função da estrutura, sendo os de menor massa molecular degradados mais facilmente [4]. A migração dos HPAs no ambiente também depende de suas características físicoquímicas, como por exemplo, capacidade de evaporação e solubilização. Os HPAs apresentam alta hidrofobicidade e tendem a se associar ao material particulado, sendo depositado em solos e sedimentos por longos períodos, causando impactos nas mais diversas formas de biodiversidades [5].

A poluição ambiental, decorrente das atividades industriais e dos derramamentos acidentais de petróleo e seus derivados, causa a liberação excessiva hidrocarbonetos apresentando um grande risco aos ecossistemas aquáticos e terrestres [6]. Da atmosfera, HPAs podem estar aderidos as folhas e aos vegetais, portando estarem presentes em culturas agrícolas [7]. Sua presença pode alterar consideravelmente a estrutura de vegetais tais como núcleos, cloroplastos e mitocôndrias, que são responsáveis para a vitalidade celular e transformação de energia [8].

Estudos epidemiológicos evidenciaram que há uma considerável correlação entre a exposição a HPAs e a incidência ou mortalidade de doenças respiratórias, incluindo o câncer de pulmão e problemas envolvendo sistema neural, além de incidência com o câncer de mama em estudo feito com mulheres. Esses estudos incluíram fumantes ativo/passivo e ingestores de alimentos grelhados, no qual contribui para a produção de HPAs não apenas pela fumaça da

queima do carvão, mas também devido a resultante da combustão incompleta de gordura que pinga sobre o fogo que torna ainda mais agravante a situação [9-12]. No entanto, a capacidade de HPAs para induzir efeitos nos seres humanos ainda não é totalmente clara. Mas é sabido que exposições elevadas de misturas desses poluentes conduziram a sintomas tais como irritação, náusea, vômitos, diarreias entre outros [13,14].

Dentre os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, o benzo(a)pireno B(a)P é um dos mais conhecidos e estudado (figura 1). É considerado um dos mais potentes agentes carcinogênicos em animais, além de embriotóxico e teratogênico. Por esta razão, ele tem sido utilizado como indicador da contaminação por HPAs em amostras ambientais, alimentos e bebidas [15]. Após ser absorvido por animais, o B(a)P é biotransformado no fígado por uma classe enzimática denominada citocromo P-450 monooxigenases. Nas células hepáticas, as reações catalisadas pelo citocromo P450-monooxigenase se processam no compartimento celular, composto por uma rede tridimensional de túbulos e cisternas interconectados, que vai desde a membrana nuclear até a membrana plasmática, isto é, no retículo endoplasmático.

Estas conexões intracelulares permitem que, após as reações de biotransformação, os HPAs hidroxilados sejam eliminados da célula [16]. A ação exercida pelos HPAs é ativada durante o seu processo metabólico, visando à formação de compostos hidrossolúveis para facilitar a sua excreção. O mecanismo de eliminação envolve a formação de epóxidos, seguidos de compostos polihidroxilados, os quais são mais solúveis em água, viabilizando a sua eliminação pela via urinária. Contudo, um destes intermediários pode reagir com a guanina do DNA e formar um aducto dando origem a processos de tumoração [17].

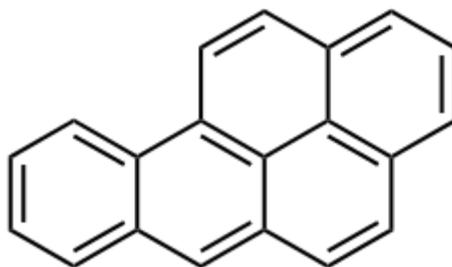


Figura 1. Estrutura molecular do Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos Benzo(a)Pireno.
 Fonte: Ashino, T.E.B(2020). Referência [18].

O B(a)P possui a aparência de cristais amarelo-pálidos em forma de agulhas, possui fórmula molecular $C_{20}H_{12}$ e peso molecular 252,3g. Apresenta baixa volatilidade, seus pontos de fusão e ebulição são 178,1 e 310-312°C (a 10mmHg), respectivamente. Sua pressão de vapor (25°C) é $2,13 \times 10^{-5}$ e a constante de Henry (20°C) $1,86 \times 10^{-5}$. Sofre foto-oxidação quando exposto à luz solar ou radiação fluorescente. Reage com NO ou NO_2 para formar nitroderivados; é oxidado pelo ozônio, produzindo benzo(a)pireno-(1,6) ou (3,6)-quinona. Como os demais HPAs, o B(a)P é lipossolúvel, apresentando coeficiente de partição octanol/água (log Kow) igual a 6,04 e solubilidade em água a 25°C de 3,8µg/L. Desta forma, em sistemas aquosos, o B(a)P tende a concentrar-se em sedimentos ou permanecer associado à matéria orgânica em suspensão [15]. O Benzo(a)Pireno tem suas características físico-químicas, resumidamente, apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1: Propriedades físico-químicas do HPA Benzo(a)Pireno. Número de anéis aromáticos; PM, peso molecular ($g.mol^{-1}$); S, solubilidade ($mg.L^{-1}$); PV, pressão de vapor (Pa – Pascal); Log Kow, coeficiente de partição (octanol/água).

HPA	Sigla	Nº de Anéis	PM($g.mol^{-1}$)	S(mg/L)	PV(Pa)	LogK _{ow}
Benzo[a]pireno	B(a)P	5	252	$3,8 \times 10^{-3}$	7×10^{-7}	6,04

Fonte: Latimer e Zheng (2003), adaptado Referência [19].

Os HPAs originários de combustão apresentam 4 a 6 anéis, como o benzo(a)pireno, e são considerados de alto peso molecular [19]. A pressão de vapor dos HPAs determina a sua distribuição ambiental entre ar-água-solo e, também, entre as fases vapor e aerossol na atmosfera. A solubilidade em água também afeta a distribuição entre ar-água-solo apesar dos baixos coeficientes de solubilidade dos HPA em água. A grande variação nas faixas de pressão de vapor (da ordem de 10^{-7} Pa) é refletida no fato de que, no ar ambiente, a 25 °C, o naftaleno existe virtualmente (~100%) na fase vapor enquanto o BaP e outros HPA de 5 ou mais anéis estão predominantemente adsorvidos em material particulado atmosférico (MPA). A solubilidade de HPA em água é geralmente muito baixa, sendo que a solubilidade dos HPA diminui com o aumento do número de anéis aromáticos e, conseqüentemente, com a massa molar. A temperatura média ambiental tem efeito sobre a distribuição dos HPAs. Em temperaturas mais baixas observa-se um aumento das concentrações de HPA na fase partícula, bem como uma redução nos processos de degradação química [20].

2.1.1 Fontes de Contaminação por HPAs

Os HPAs presentes no ambiente são resultantes de uma mistura de compostos provenientes de diversas fontes, que podem ser de origem natural, antropogênica e tecnológica [21].

- Fontes Naturais: Exemplos de fontes naturais são as atividades vulcânicas, afloramento de petróleo e sínteses biológicas.
- Fontes Antropogênicas: Podem ser citadas derramamento de petróleo, queima de combustíveis fósseis, queimadas de florestas, processos industriais e emissões automotivas. As fontes antropogênicas (ou antrópicas), são as principais responsáveis pela presença destes contaminantes no meio ambiente. Os HPAs originários de fontes antropogênicas podem ser petrogênicos e pirogênicos, onde o primeiro é caracterizado pelos HPAs de baixa massa molecular (BMM), sendo formados através de baixa temperatura de formação, podendo ser provenientes de derramamento de petróleo, combustão de matéria orgânica e lenta maturação da

mesma. Os pirogênicos são aqueles que apresentam alta massa molecular (AMM), atribuídos a esse tipo de fonte estão, em grande parte, a combustão incompleta da madeira, óleo e carvão, a combustão incompleta de matéria orgânica a altas temperaturas, além de emissões veiculares. Para identificação pode-se utilizar uma razão entre o Fluoranteno (FL) e Pireno (P), FL/(FL + P). Quando for menor que 0,5: fontes petrogênicas; valores acima de 0,5; indicação de fontes pirogênicas [22]. O críseno gerado de combustão, é classificado como de origem pirogênica podendo ter origem do diesel, madeira, carvão e produtos petrolíferos [23].

- Fontes tecnológicas: Que podem ser móveis ou estacionárias. Entre as fontes móveis, destaca-se o motor de combustão, comum em diversos veículos de transporte de cargas e passageiros. As fontes estacionárias são subdivididas entre as utilizadas na geração de energia elétrica e calor e aquelas ligadas à atividade industrial (produção de alumínio) e de incineração (principalmente de rejeitos químicos) e podem emitir uma grande variedade de produtos de combustão incompleta [24].

2.1.2. Distribuição dos HPAs

Os HPAs são compostos orgânicos de elevada persistência no ambiente, devido a sua estabilidade química e resistência à biodegradação. Esta persistência varia em função da estrutura, sendo os de menor massa molecular degradados mais facilmente [25]. A migração dos HPAs no ambiente depende de suas características físicoquímicas, como por exemplo, capacidade de evaporação e solubilização. Porém, eles podem persistir no ambiente por um longo período e migrar por longas distâncias seja por via atmosférica ou aquática, resultando em uma distribuição global [26].

Na atmosfera pode estar presente em culturas agrícolas, aderido às folhas e aos vegetais o que representa um risco potencial para a saúde humana através da cadeia alimentar [23]. Sua presença pode alterar consideravelmente a estrutura de vegetais tais como núcleos, cloroplastos e mitocôndrias, que são responsáveis para a vitalidade celular e transformação de energia [24].

A poluição ambiental causada pela liberação de hidrocarbonetos, decorrente das atividades industriais e dos derramamentos acidentais de petróleo e seus derivados apresentam grandes riscos aos ecossistemas aquáticos e terrestres [25]. Processos de combustão originam poluentes nas fases gasosa e material particulado (MP) [26]. Os HPAs apresentam alta hidrofobicidade e tendem a se associar ao material particulado, sendo depositado em solos e sedimentos por longos períodos, causando impacto na qualidade do ar, na saúde humana e no clima [27,28].

Os impactos ambientais da construção de rodovias, bem como os materiais utilizados para esse fim, podem ser destacados pelo potencial de lixiviação dos constituintes químicos desses materiais, que pode ser uma mistura de asfalto, óleo lubrificante, gasolina, diesel, partículas do pneu, que devido à precipitação podem ser transportados para a superfície adjacente e corpos d'água do subsolo [29]. Por exemplo, sabe-se que as partículas do pneu podem contribuir com certas quantidades de HPAs como o dos pireno, e do antraceno e o benzo[a]pireno entre outros [30], já o óleo diesel é um derivado do petróleo, constituído principalmente por hidrocarbonetos de cadeia longa emitindo material particulado, fumaça preta e carregam diversos compostos carcinogênicos de elevado impacto à saúde humana e aos ecossistemas[31].

As atividades industriais e dos derramamentos acidentais de petróleo e seus derivados, também apresentam grandes riscos aos ecossistemas aquáticos e terrestres [23]. Em baixas temperaturas a combustão de carvão rendem mais HPAs do que em processos de alta temperatura, como em usinas termoelétricas à carvão [32].

2.1.2.1. HPAs no Ambiente Aquático

Dentre as diversas fontes de poluição dos ecossistemas aquáticos, pode-se dar destaque à contaminação destes ambientes por HPAs. Esses elementos podem atingir os ecossistemas aquáticos de diversas formas, como por deposição atmosférica, carreamentos superficiais por

escoamento de água de chuva, descargas de esgotos domésticos, efluentes industriais e derramamentos de petróleo [33].

Estes compostos podem adsorver-se nos organismos por bioconcentração que é a absorção somente da água. Através de bioacumulação, que ocorre por meio da alimentação, respiração e adsorção dérmica [34].

- Adsorção: A adsorção consiste em se proporcionar o contato entre uma fase fluida (líquida ou gasosa) para uma fase sólida. A fase fluida é denominada de adsorbato, e a fase sólida, de adsorvente. É um fenômeno de superfície e está ligado à tensão superficial de soluções [35]. A adsorção tem características próprias, destacando-se o alto grau de recuperação que propicia a partir de soluções de extrema diluição [36]. Devido à baixa solubilidade aquosa dos HPA e seu caráter hidrofóbico, os mesmos são facilmente adsorvidos a partículas de matéria orgânica e, posteriormente, acumulam-se nos sedimentos. Animais consumidores não seletivos de depósitos sedimentares ingerem grandes quantidades de sedimentos expondo seu sistema gastrointestinal e superfície corpórea aos HPA sorvidos na matéria orgânica e/ou desorvidos na água intersticial [37].
- Bioacumulação: Experimentos conduzidos nas últimas duas décadas mostram que diversas espécies de plantas extraem quantidades elevadas de metais de solos contaminados, sendo estas denominadas de bioacumuladoras das condições naturais. Os bioacumuladores podem ser animais, vegetais, células e substâncias moleculares. Plantas bioacumuladoras naturalmente concentram elementos químicos em maior quantidade em comparação com as demais espécies ocorrentes em um mesmo habitat, sendo reflexo de sua habilidade de concentrar e das características do meio [38]. O acúmulo contínuo de HPAs em solos de campos agrícolas causados por atividades humanas dão origem a potenciais riscos negativos tanto para o ecossistema agrícola como para o ser humano através da bioacumulação da cadeia alimentar.

Globalmente, a transferência do solo para a planta é possível, mas contaminação de hortaliças pelo ar via volatilização de HPAs de o solo continua a ser também um potencial meio de contaminação, que tem de ser considerado. Além de sua bioacumulação na cadeia alimentar, outras vias, incluindo contato dérmico e inalação, contribuem à exposição humana a PAHs carcinogênicos ambientais [36,39].

Em águas subterrâneas rasas são comumente encontrados, o que representa um risco para a saúde potencialmente graves para aqueles que dependem da água [40]. Na presença de peixes esses compostos causam uma redução na taxa metabólica e a velocidade de natação, que foi associado ainda a anomalias cardíacas, que devem contribuir para a redução do transporte de oxigênio, particularmente durante o esforço intensivo [41].

2.2. Considerações sobre o consumo, produção de alfaces e contaminação por HPA

Originária da Europa e da Ásia, a alface (*Lactuca sativa*, L.) pertence à família Asteracea e é a verdura mais consumida no Brasil. A alface possui um caule diminuto ao qual se prendem as folhas, podem ser do tipo lisa ou crespa, fechando-se ou não na forma de um cone [2]. Hortaliça típica de saladas, considerada como uma planta de propriedades tranquilizantes e que, devido ao fato de ser consumida crua, conserva todas as suas propriedades nutritivas. Sendo uma excelente fonte de vitamina A, possuindo ainda as vitaminas B1, B2, B5 e C, além dos minerais Ca, Fe, Mg, P, K e Na, cujos teores variam de acordo com a cultivar [4].

A alface é rica em água (95%) e baixa em calorias, ela possui benefícios nutricionais devido à sua contribuição para a fibra alimentar, presença de vários minerais importantes da dieta e várias vitaminas e substâncias bioativas compostos (por exemplo, carotenóides e compostos fenólicos). Alface contém baixa quantidade de sódio e fornece uma quantidade relativamente boa de ferro [42]. A Alface é típica de inverno, capaz de resistir a baixas temperaturas e a geadas leves, sendo as temperaturas amenas, essenciais durante toda a fase vegetativa de seu ciclo, especialmente durante o desenvolvimento da cabeça. Temperaturas

elevadas (20-30° C) aceleram o ciclo cultural resultando em plantas menores e induzem a presença de um indesejável sabor amargo [43].

Todos os alimentos devem ser produzidos seguindo práticas que resultem em produtos seguros para serem consumidos. Essa premissa é verdadeira tanto para o sistema orgânico de cultivo, como para o convencional. Os cuidados na aquisição dos alimentos perpassam desde a compra, em pontos de venda, com asseio das instalações e dos manipuladores, condições de armazenamento, embalagem, manuseio e uso de utensílios adequados até o cuidado na aquisição de alimentos expostos a pragas e vetores urbanos. Atualmente, a preocupação do homem com a qualidade e a segurança dos alimentos vem crescendo, desta forma, os consumidores levam em consideração também o valor nutricional do alimento, os aspectos negativos como resíduos de pesticidas, presença de aditivos e gorduras em excesso nos alimentos, entre outros [4].

Assim, uma parte crescente da população está dando preferência para produtos oriundos do cultivo orgânico, por vários fatores, dentre eles, às restrições do uso de pesticidas no modo de produção orgânica. O crescimento de áreas rurais voltadas para a agricultura orgânica tem aumentado no mundo [42]. Grande parte da produção desses agricultores encontra-se próxima às áreas metropolitanas devido ao curto período de vida pós-colheita.

O uso de água inadequada para a irrigação tem se tornado comum, tendo em vista a contaminação das águas por efluentes municipais não tratados, bem como a presença de poluentes provenientes do meio urbano. O setor hortícola possibilita a geração de grande número de empregos devido, sobretudo à elevada exigência de mão de obra, desde a semeadura até a comercialização. Nos últimos dez anos a produção de hortaliças no país aumentou 33%, a produção de hortaliças no Brasil está em torno de 18 mil toneladas, com área plantada de 800 mil hectares e produtividade média de 23 toneladas por hectare, o que é equivalente a 94 kg habitante ano. A produção nacional da alface no Brasil corresponde a 525.602 toneladas; a região nordeste é responsável pela produção de 55.841 t, ou seja, aproximadamente 11% do total cultivado no Brasil. Parte importante no processo de comercialização são as feiras livres uma forma direta de comercialização muito utilizada pelos produtores e consumidores, pois não há

presença de intermediários. Com isso os produtores têm uma margem maior de rendimento [43,44].

Apesar do consumo de hortaliças ser essencial para a saúde, constituindo-se em uma importante fonte de vitaminas e minerais na alimentação humana, quando consumidas cruas e não sanitizadas adequadamente, esses alimentos podem veicular muitos parasitos e microrganismos patogênicos [4]. Estas patologias ocorrem em consequência da ingestão de alimentos que podem estar contaminados com microrganismos patogênicos, substâncias químicas ou até substâncias tóxicas presentes naturalmente em sua composição [8]. Dados do Ministério da Saúde quanto à relação de alimentos envolvidos nos surtos alimentares no Brasil, mostram que 43% deles são de origem alimentar ignorada; 11%, relacionados com patógenos veiculados pela água e 2,3%, por hortaliças [4].

A contaminação de hortaliças pode ocorrer diretamente através da utilização de esterco ou esgotos não tratados, ou tratados inadequadamente, utilizados como fertilizantes, embalagem e temperatura de mostruário inadequados [45]. Tal contaminação pode ser também devido ao uso de águas contaminadas com diversas substâncias, incluindo os HPAs. No Brasil, é estabelecido o reuso de água potável e reuso direto não potável, porém não são estabelecidos os parâmetros e recomendações necessários à esta prática. A escolha do sistema apropriado de aplicação e uso da água poderá ser decisivo na produtividade da cultura, na diminuição da contaminação da cultura e nos riscos de toxicidade [46].

2. 3. Efeitos toxicológicos e o metabolismo da Alface

Em condições naturais ou sob cultivo, as plantas estão frequentemente expostas a fatores de estresses ambientais que, em geral, exercem uma influência desvantajosa sobre a planta, afetando seu crescimento e produtividade. O estresse luminoso, nutricional, hídrico, as temperaturas extremas, a salinidade, estressores bióticos e os gases poluentes são os principais fatores adversos, que restringem o crescimento das plantas. O efeito tóxico dos nutrientes é muito variável entre espécies ou variedades. A resposta das plantas à toxidez envolve alterações

estruturais, fisiológicas e bioquímicas que dependem do tipo e concentração e do tempo de exposição das plantas a esses elementos.

A alface é uma planta que se ajusta às condições de menor fluxo de energia radiante, pelo fato da intensidade luminosa afetar diretamente o seu crescimento e desenvolvimento. Dessa forma, modificações nos níveis de luminosidade, podem condicionar diferentes respostas fisiológicas em suas características bioquímicas, anatômicas e de crescimento. A luz é absorvida, sobretudo, pelos complexos antena, os quais são compostos por clorofilas, pigmentos acessórios (carotenóides) e proteínas, estando localizados nas membranas dos tilacóides dos cloroplastos. Os pigmentos antena transferem a energia para um complexo clorofila-proteína especializado, conhecido como centro de reação. As plantas possuem dois centros de reação localizados, respectivamente, nos fotossistemas I (FSI) e fotossistemas II (FSII) [47]. A partir das clorofilas (a e b), a energia pode ser direcionada para a fotossíntese na dissipação fotoquímica, pode ainda ser dissipada como calor ou ser re-emitida como luz na dissipação não fotoquímica (fluorescência).

Estes três processos de dissipação competem entre si, de tal forma que qualquer incremento na eficiência de um resultará na diminuição do rendimento dos outros dois. As alterações na quantidade e na qualidade luminosa no ambiente de cultivo proporcionam ajustes do aparato fotossintético das plantas, os quais resultam na maior ou menor eficiência na absorção e transferência de energia para os processos fotossintéticos. Nesse contexto, os teores dos pigmentos cloroplastídicos, clorofila e carotenóides podem ser utilizados como importantes marcadores de ambientação do vegetal [48].

A assimilação e alocação de nutrientes nas plantas também são alteradas por fatores ambientais como luminosidade, água, disponibilidade de nutrientes e concentrações atmosféricas de CO₂. Entre os fatores que regulam a quantidade de nutrientes absorvidos pelas raízes das plantas estão: concentração de nutrientes, profundidade da camada superficial do solo, textura e estrutura do solo, tipo de subsolo, pH e compactação do solo [49]. De acordo com a quantidade exigida pelas plantas, os nutrientes são conhecidos como macro: N, P, K Ca, Mg, S e micronutrientes: B, Cl, Cu, Fe, Mn, Mo, Zn e Ni sendo os macro nutrientes N, P e K, de modo geral, usados em maior proporção na adubação [50].

Apesar de todos os esforços, sabe-se que mesmo sob condições normais e mais próximas do natural, o estresse nutricional é quase sempre uma norma. As plantas podem ficar sujeitas as condições de disponibilidade sub ou supra-ótima de nutrientes. Os limites da faixa de concentração considerada adequada variam amplamente com vários fatores, como o elemento mineral, o genótipo, o órgão, entre outros, podendo ser mais estreita ou mais larga.

O suprimento inadequado de um nutriente essencial, por deficiência ou excesso, além de modificações no metabolismo celular, crescimento, desenvolvimento e produtividade, pode se manifestar por meio de sintomas visuais, sendo muitas vezes assim identificado. O adequado balanço nutricional disponível às plantas, obtém como resultado melhor razão de crescimento e qualidade na síntese dos compostos necessários para um crescimento normal [51] e assim servir ao homem como fonte de alimento, medicamento, fibras, entre outros.

2.3.1. Incorporação dos HPA nos vegetais folhosos

Independente do tipo de folha, na sua constituição participam os mesmos padrões celulares característicos. Via de regra a folha apresenta, epiderme superior e inferior, normalmente acompanhadas por uma cutícula. Abaixo da epiderme superior situa-se o parênquima paliçádico, que recebe esse nome devido à disposição de suas células e, em contato com o parênquima paliçádico está o parênquima lacunoso, caracterizado por apresentar grandes espaço intercelulares [52].

As clorofilas e os carotenóides são pigmentos presentes nos vegetais, capazes de absorver a radiação visível, desencadeando as reações fotoquímicas da fotossíntese, processo essencial para a sobrevivência vegetal e por isso denominado metabolismo primário. São os pigmentos naturais mais abundantes presentes nas plantas e ocorrem nos cloroplastos das folhas e em outros tecidos vegetais. As clorofilas não são moléculas isoladas, compreendem uma família de substâncias semelhantes, chamadas clorofilas a, b, c e d. A clorofila está diretamente relacionada

com a atividade fotossintética nas plantas. Assim, o estado nutricional das plantas está relacionado com a qualidade e a quantidade de clorofila [53].

A incorporação de HPA em plantas pode ocorrer pela captação foliar, que inclui a deposição seca (sedimentação de partículas) ou por via úmida (precipitação de chuva ou neve), desta maneira a incorporação ao vegetal ocorrerá através da cera cuticular ou por absorção estomática. A deposição seca de partículas suspensas foi apontada como sendo o principal caminho no processo de exposição de folhas de Azalea (*Rhododendron oomurasaki*) a alguns HPA como benzo(a)pireno. A absorção via radicular também pode ocorrer com possibilidade de translocação para as partes aéreas da planta, porém neste processo as plantas necessitam de água proveniente das raízes em direção as outras extremidades da planta não sendo assim considerado um bom mecanismo de distribuição de moléculas hidrofóbicas como os HPA [54].

2.4. Fluorescência Molecular

Os métodos espectroquímicos têm provido talvez as ferramentas mais amplamente empregadas para a elucidação de estruturas moleculares, bem como na determinação qualitativa e quantitativa de compostos orgânicos e inorgânicos, por meio de métodos que empregam as interações da radiação com a matéria. Os tipos de interação mais interessantes em espectroscopia envolvem transições entre diferentes níveis energéticos das espécies químicas. Os tipos específicos de interações dependem fortemente da energia da radiação empregada e do modo de detecção [55]. Vamos focar aqui a espectroscopia de fluorescência, na qual a espécie excitada com luz na região do visível e UV próximo, então relaxa para o estado fundamental fornecendo seu excesso de energia também como fótons, o que caracteriza uma emissão em geral da região do infra vermelho próximo[55]. Contudo, algumas alterações de energia podem ocorrer durante a absorção, levando a outros processos de absorção e emissão de energia, como a relaxação não-radiativa, relaxação vibracional e etc, como representado nos diagramas da figura 2.

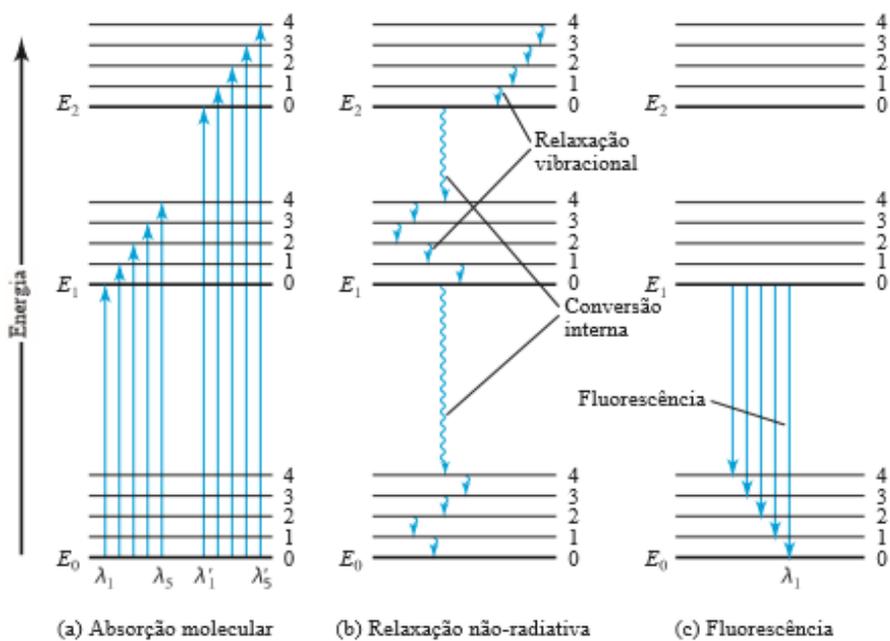


Figura 2. Diagrama de níveis de energia mostrando algumas alterações de energia que ocorrem durante a absorção. Relaxação não-radiativa e fluorescência por uma espécie molecular. Fonte: Skoog, D.A. Referência [55].

Portanto, um espectro de fluorescência consiste normalmente em uma única banda com muitas linhas próximas que representam as transições do estado vibracional mais baixo para os muitos níveis vibracionais diferentes. A fluorescência em moléculas envolve a transição de um estado excitado singlete para o estado fundamental singlete. Essa transição é altamente provável e, assim, o tempo de vida do estado excitado singlete é muito curto (10^{-5} s ou menos) [55].

Uma vertente da técnica de espectroscopia tradicional é a técnica de espectroscopia de fluorescência sincronizada (EFS). Nela, uma seletividade maior dos comprimentos de onda de excitação e emissão podem acontecer, gerando um estreitamento da largura das bandas espectrais. Nesse caso, a aquisição do espectro é feita por movimento simultâneo dos monocromadores de excitação e emissão, e a diferença existente entre os comprimentos de

onda de excitação e emissão, designada como delta lambda ($\Delta\lambda$), é ajustado para obter melhores resultados na identificação dos compostos [56, 57].

O espectro de fluorescência pode ser obtido em três formas, sejam elas emissão, excitação e varredura de excitação e emissão sincronizada. O espectro de emissão é obtido medindo-se a intensidade relativa da radiação emitida como uma função do comprimento de onda (λ), a um comprimento de onda de excitação constante. O espectro de excitação é obtido medindo-se a intensidade de luminescência em um comprimento de onda fixo, enquanto o comprimento de onda de excitação é variado. O espectro de varredura sincronizada de excitação é obtido pela medida da intensidade de fluorescência durante uma varredura simultaneamente de ambos os comprimentos de onda, excitação e emissão, e, mantendo constante entre eles, uma diferença de comprimento de onda otimizada tal que: $\Delta\lambda = \lambda_{em} - \lambda_{exc}$ [57, 58].

Os instrumentos espectroscópicos para as regiões do UV e visível são geralmente equipados com um ou mais dispositivos para restringir a radiação que está sendo medida dentro de uma banda estreita que é absorvida ou emitida pelo analito. Um espectrofluorímetro (figura 6) consiste necessariamente em uma lâmpada de mercúrio ou xenônio que emite luz policromática, esta luz passa por uma rede de difração que seleciona o comprimento de onda para excitação da amostra. O dispositivo que faz esta seleção é denominado monocromador de excitação, que faz o isolamento da banda de comprimento de onda desejada de forma que somente essa banda de interesse é detectada e medida[55].

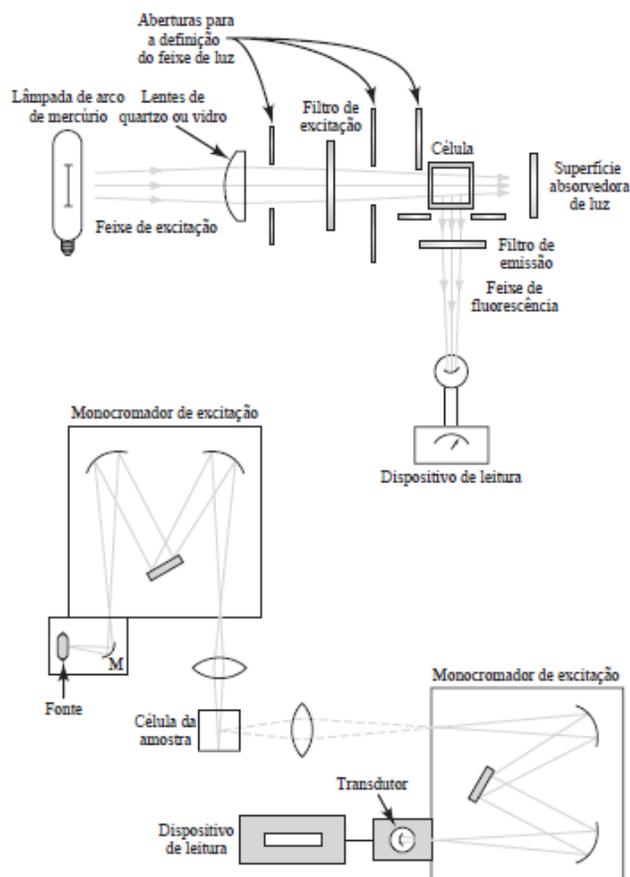


Figura 3. O espectrofluorímetro . Dados obtidos da referência [57]

2.4.1. HPAs e as Propriedades Espectroscópicas

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos absorvem intensamente na região do UV maior que 300 nm (presente na radiação solar) e muitos deles são rapidamente fotooxidados [59]. Os HPA normalmente fluorescem de modo muito eficiente em meios homogêneos, o que torna a fluorescência uma propriedade extremamente útil para desenvolvimento de métodos analíticos para determinação de HPA. Desde os anos 50 vêm sendo desenvolvidos métodos para determinação de HPA por fluorescência devido à alta sensibilidade ($\sim 10^2 - 10^3$) se comparada com a espectroscopia de absorção na região no UV-Vis. Os HPA absorvem na região actínea do UV, $\lambda > 290$ nm. Suas transições do tipo $\pi \rightarrow \pi^*$ são fortes (muito mais intensas que as transições correspondentes $n \rightarrow \pi^*$ em compostos carbonílicos aromáticos). Assim, os HPA apresentam

coeficientes de extinção molares (ϵ) relativamente altos (a exceção é o naftaleno, em que a transição $\pi \rightarrow \pi^*$)[49].

3. Materiais e Métodos

3.1. Técnicas experimentais de caracterização para a detecção e determinação de HPAs

Entre as técnicas instrumentais convencionais utilizadas para a detecção e determinação de HPAs destacam-se a cromatografia gasosa (GC) e a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detecção fluorimétrica. Entretanto, estas técnicas espectroscópicas convencionais envolvem elevados custos e tempo no processo de análise das amostras. Técnicas menos onerosas como Espectroscopia de Fluorescência Molecular demonstraram também ser uma forma eficiente para análise de poluentes químicos em amostras ambientais [60], dando destaque à Espectroscopia de Fluorescência Sincronizada (EFS), com sua simplicidade, seletividade e seu baixo custo de operação.

Assim, procurou dar continuidade as pesquisas realizadas no ano de 2017, onde foi feita uma determinação de HPAs no sistema fluvial da cidade de Dourados [61], buscando fazer uso dos mesmos métodos de aplicação da EFS para a identificação e quantificação de HPAs, figura 4. Os experimentos de EFS foram conduzidos em espectrofotômetro Cary Eclipse modelo (Varian) que possui como fonte de excitação uma lâmpada pulsada de Xenônio (80 Hz), com a potência de pico equivalente a 75 KW; dois monocromadores, um para a seleção do comprimento de onda de excitação e outro para a seleção do comprimento de onda emitido pela amostra. A detecção da fluorescência é feita por um tubo fotomultiplicador (R928). As amostras foram excitadas em dois comprimentos de onda: em 405 nm coletando os espectros de fluorescência entre 420 e 900 nm; e em 532 nm analisando a emissão de fluorescência de 540 a 900 nm de acordo com (Falcon, 2012). Nas análises do extrato de clorofila as medidas foram realizadas utilizando-se uma Cubetas de Quartzo de 3,5 mL (caminho ótico de 1,0 cm) com as quatro faces polidas.



1° Agitação Magnética



2° Separação para remover água



3° Rotroelevaporação



4° Extrato Final

Figura 4. Sequência de procedimento metodológicos realizados. Fonte: Autoria própria.

A fluorescência da clorofila *a* é método amplamente utilizado para estudar as respostas das plantas aos estresses ambientais. É método não-invasivo, confiável, rápido e facilmente mensurável [62]. Foi aplicada a técnica de fluorescência cinética por imagem, utilizando o equipamento Closed FluorCam FC 800-C da marca Photon Systems Instruments, para realizar o estudo da influência do HPA sobre o aparato fotossintético das plantas “in vivo”. Antes das medidas, as plantas foram adaptadas ao escuro por 30 minutos garantindo que todos os centros de reação estejam abertos, obtendo com isso, uma medida mais eficaz da fluorescência. Para a cinética, foi utilizada a luz branca como fonte de excitação, foi empregado um filtro para

selecionar somente a emissão da clorofila a, na região de 680 nm e as medidas foram realizadas em um dos lados da folha. Os parâmetros observados na análise da fluorescência da clorofila foram F_v/F_m Lss, Q_y máx e o NPQ Lss.

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

3.2. Plantio em Ambiente Controlado de Cultivo - ACC

Inicialmente 150 sementes de alface foram distribuídas em caixas do tipo GERBOX forradas com papel germitest ou papel filtro embebidos em água. Essa caixa foi fechada e envolvida com papel filme, e mantida em estufa incubadora BOD de 7 a 10 dias, com uma temperatura de 26 °C, até que o número de amostras geminadas ficasse equilibrado.

Após a germinação das sementes, as mudas foram transferidas para o seu desenvolvimento:

- para o sistema de hidroponia foram utilizadas 4 bancadas de cultivo em bandeja de polipropileno e nove células de 100 mm cada e, introduzidos, em vasilhames de polipropileno, onde ficariam imersos em solução nutritiva por um período de até 15 dias, garantindo que suas raízes ficassem em contato com a solução nutritiva composta com água e os nutrientes. O sistema hidropônico adotado foi o NFT (Nutriente Film Technique). Este sistema, é uma técnica de cultivo em água, no qual as plantas crescem tendo o seu sistema radicular dentro de um canal ou canaleta através do qual circula uma solução nutritiva composta de água e nutrientes. No Brasil, tem crescido nos últimos anos o interesse pelo cultivo hidropônico, predominando o sistema NFT (Nutriente Film Technique).

Neste sistema, segundo FURLANI (1998), as plantas crescem em canais de cultivo por onde a solução nutritiva circula, intermitentemente, em intervalos definidos e controlados por um

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

- para o sistema convencional de cultivo foi utilizado um solo comercial preparado para o cultivo. As mudas se encontravam em bandejas de cultivo com placas de espuma fenólica em cada célula e foram transferidas para vasos individuais. Foram utilizadas 4 bancadas de trabalho, com 20 mudas em cada bancada, totalizando 80 mudas. As bancadas com as mudas foram deixadas em ambiente protegido (estufa) que era do tipo capela, figura 5. A irrigação utilizada foi do tipo borrifamento direto sob a planta, duas vezes ao dia, durante um período de 7 dias, quando as plantas atingiram tamanho satisfatório para as análises. Para o sistema de plantio convencional utilizou-se soluções contendo água da torneira.



Figura 5. Sistema convencional de cultivo, bancadas com as mudas em estufa, da Alface *Lactuca sativa*, L. (Imagens: ROSA, L.S.).

Em ambos os sistemas a contaminação com B(a)P foi mantida nas mesmas concentrações. Para isso preparou-se quatro concentrações para serem usadas nos quatro ensaios diferentes para cada tipo de plantio. A primeira solução, chamada de controle, não continha contaminação com B(a)P. A segunda solução continha 0,15 mL da solução padrão de benzo(a)pireno para cada 1 Litro de solução de irrigação ou nutritiva, obtendo-se uma solução com concentração de B(a)P igual a 2,54 ng / mL. As outras duas soluções continham concentrações de B(a)P igual a 5,09 ng / mL e 50,9 ng / mL.

3.3. Amostra de Ambiente Não Controlado de Cultivo - ANC

Uma parte das amostras foi coletada na feira livre, situado na cidade de Dourados-MS, localizada no Bairro Jardim Rigotti, na Rua Cafelândia. Foram coletados aleatoriamente, alfaces em 4 barracas onde os vendedores comercializam alimentos. As amostras foram acondicionadas em sacos plásticos, identificados e acondicionadas em caixas isotérmicas. As amostras coletadas e devidamente acondicionadas foram encaminhadas ao laboratório para o início do processo de preparo das amostras.

Outra parte das amostras foi coletada em uma horta escolar de um projeto de sustentabilidade, na Escola Estadual Professor José Pereira Lins, localizada na Vila São Braz, Rua Flávio Seabra Calixto, número 525, na região leste da cidade de Dourados/MS. Esta ação aconteceu nos meses de abril a dezembro de 2019, com a construção de uma cisterna para captar água da chuva e dessa forma irrigar a horta escolar, como mostrado na figura 6.



Figura 6. Cisterna para captação de água da chuva., localizada na Escola Estadual Professor José Pereira Lins, Bairro Jockey Clube. . (Imagens: ROSA, L.S.).

A horta foi construída e desenvolvida sob orientação de uma agrônoma e consiste em quinze canteiros que receberiam o plantio. Cada canteiro (unidade experimental) tinha as dimensões de 1,0 m de largura e 5,0 m de comprimento, figura 3. O espaçamento entre as plantas de alface foi de 0,25 x 0,25 m (12 plantas por m²), num total de quatro linhas de plantas por canteiro. A irrigação foi realizada diariamente. O volume total de água em cada um dos tratamentos, utilizando água do depósito superficial, não foi determinado. Com o intuito de obter amostras representativas quanto a sua natureza e características, foram seguidas as precauções e metodologias nos trabalhos das referências [56, 63, 64 e 65].

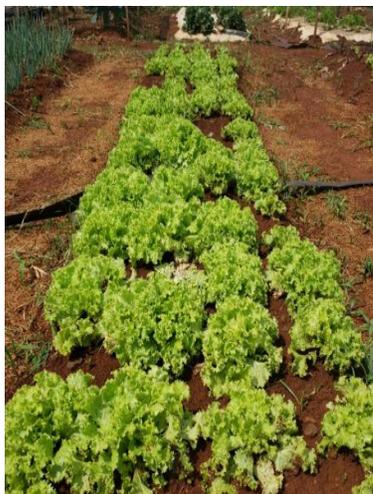


Figura 7. Canteiro de Alface *Lactuca sativa*, L., localizada na Escola Estadual Professor José Pereira Lins, Bairro Jockey Clube. (Imagens: ROSA, L.S.).

3.4. Preparação das amostras para análise

Após o desenvolvimento das amostras, as plantas jovens eram colhidas, e transportadas ao local de secagem, de modo a não receber raios solares. A colheita consistiu em separar a raiz da parte aérea com todas as folhas externas. As amostras foram limpas, lavadas com água potável e, em seguida, enxaguadas com água destilada. Nessa ocasião as amostras do mesmo tratamento foram separadas aleatoriamente, fotografadas e medidas. As medidas foram feitas com uma régua, folhas maiores que 4,0 cm de comprimento, posteriormente eram pesadas, separadamente, por massa seca da parte aérea e da folha verde.

As folhas distendidas da parte externa da planta, foram levadas para análises de fluorescência e outra parte utilizou-se para a obtenção do extrato de clorofila da planta. Para isso pesou-se 5g de folha de alface picadas em pequenos pedaços. Adicionou-se, para cada 1g de folha, 10 mL de metanol, perfazendo um volume total de 50 mL. A mistura foi macerada durante dois minutos e após esse período, mantido, em frasco Âmbar, posteriormente foi conduzida, na geladeira por 72 horas. Após esse período, o extrato obtido foi filtrado e armazenado longe do abrigo da luz. Os extratos de clorofila obtidos das amostras através dos parâmetros das referências 66, 67 e 68 foram submetidos a um preparo

por meio de uma extração líquido-líquido para um melhoramento da possível banda de emissão do B(a)P absorvido pela planta. Para tal, cada alíquota é transferida para um frasco Erlenmeyer, onde foi adicionado 10 mL de Hexano HPLC, considerando as indicações das referências [60,63], a extração do analito, foi feita através de agitador magnético, por rotação durante 20 minutos. Passados 20 minutos o sistema foi mantido em repouso por mais 10 minutos, para separação das fases, em seguida foi passada em um funil de separação para remover água, devido à imiscibilidade dos solventes (água e hexano).

Dada ao coeficiente de partição dos HPAs com o hexano, nesse processo pretende-se a transferência do HPA presente na amostra. O resultado dessa lavagem (em torno de 80 mL de hexano) por sua vez foi transferido para um balão de fundo redondo do retroevaporador (IKA-RV10), misturada com 10 mL de metanol HPLC, utilizou-se este solvente devido ao seu grau analítico e também sua polaridade. A solução, então, foi aquecida a uma temperatura próxima a 40°C e rotovaporada, o que resultou em um extrato final de ± 2 mL. Finalmente o material foi retirado e a parte líquida mantida em recipiente de vidro âmbar, sob refrigeração até o momento das análises.

3.5. Parâmetros de Calibração Instrumental

Calibração, de acordo com o INMETRO, é o conjunto de operações que estabelece, sob condições especificadas, a relação entre os valores indicados por um instrumento de medição ou sistemas de medição ou valores representados por uma medida materializada ou material de referência, e os valores correspondentes das grandezas estabelecidas por padrões [69].

3.5.1. Curva Analítica

A curva analítica apresentada, foi utilizada para gerar equações correlação entre a intensidade de fluorescência e a concentração do HPA [70]. Os parâmetros avaliados neste estudo foram: linearidade (a intensidade de fluorescência, em função da concentração do analito); limites de detecção (LD) e quantificação (LQ), precisão (coeficiente de variação com base no

desvio padrão, repetitividade e reprodutibilidade). Foi utilizado como o guia o documento “Orientação sobre validação de métodos analíticos”- Inmetro e “Guia para Qualidade em Química Analítica” - Anvisa [70, 71].

Após a confecção da curva analítica, foram feitas equações estabelecendo relações entre a intensidade de fluorescência (I_F) e as medidas das concentrações dos HPA's estudados (C_{HPA}). A equação da reta é: $y = ax + b$. Essa equação está relacionada com a lei de Beer, $A = \epsilon bc$, sendo que: y é a absorvância (A), x é a concentração (C) e o coeficiente angular (a) é o produto entre a absorvância molar (ϵ) e o caminho óptico (b), onde a absorvância molar (ϵ) ocorre apenas para a espectrofotometria molecular. O coeficiente linear idealmente é igual a zero, mas na medição podem estar presentes ruídos e desvios que o afastam desse valor [55].

As curvas de calibração para os elementos de interesse foram construídas a partir da diluição de 1 mL da mistura de soluções estoque ou amostra padrão de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Acetona (EPA PAH Mix-B- Aldrich), que foram preparados pela dissolução do soluto em de 50 mL de metanol HPLC. Tal que após a diluição obteve-se uma concentração de $500 \times 10^{-6} \text{ g} : 50 \text{ mL} = 1 \times 10^{-5} \text{ g/mL}$.

3.5.2. Linearidade

É a capacidade de uma metodologia analítica demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado. Recomenda-se que a linearidade seja determinada pela análise de, no mínimo, 5 concentrações diferentes. Se houver relação linear aparente após exame visual do gráfico, os resultados dos testes deverão ser tratados por métodos estatísticos apropriados para determinação do coeficiente de correlação, intersecção com o eixo Y, coeficiente angular, soma residual dos quadrados mínimos da regressão linear e desvio padrão relativo. Se não houver relação linear, realizar transformação matemática. O critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação (r) que deve ser em cerca de 0,99.

3.5.3. Limite de Detecção

Limite de detecção é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas.)

Em que: DPa é o desvio padrão do intercepto com o eixo do Y de, no mínimo, 3 curvas de calibração construídas contendo concentrações do fármaco próximas ao suposto limite de quantificação. Este desvio padrão pode ainda ser obtido a partir da curva de calibração proveniente da análise de um número apropriado de amostras do branco; IC é a inclinação da curva de calibração.

3.5.4. Limite de Quantificação

O limite de quantificação é estabelecido por meio da análise de soluções contendo concentrações decrescentes do fármaco com precisão e exatidão aceitáveis a menor quantidade do analito presente em uma amostra. Pode ser expresso pela equação 2.

$$LQ = \frac{DPa \cdot 10}{IC} \quad (\text{Equação 2})$$

Em que: DPa é o desvio padrão e IC é a inclinação da curva de calibração.

3.5.5. Precisão

É a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. Esta é considerada em três níveis:

Repetibilidade: concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e mesma instrumentação.

Reprodutibilidade: concordância entre os resultados obtidos em laboratórios diferentes como em estudos colaborativos, geralmente aplicados à padronização de metodologia analítica.

Precisão intermediária: concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes.

A precisão pode ser expressa como desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV%), segundo a equação 3.

$$CV = DPR\% = \frac{[DP]}{CDM} \times 100 \quad (\text{Equação 3})$$

O valor máximo aceitável deve ser definido de acordo com a metodologia empregada, a concentração do analito na amostra, o tipo de matriz e a finalidade do método, não se admitindo valores superiores a 5% [72, 73].

A curva analítica que mostra a faixa linear de quantificação do benzo(a)pireno puro, sem estar dissolvido na solução nutritiva, é mostrada na Figura 4. A equação da reta ajustada mostra valores de correlação entre a intensidade de fluorescência (Y) e a concentração do HPA (C), e é mostrada na equação 1:

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

onde C é a concentração de B(a)P em mol/L, Y é a intensidade de fluorescência obtida para o comprimento de onda de 366nm [71].

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

Todas as medidas de fluorescência sincronizada no extrato de clorofila foram feitas em triplicatas. De acordo com dados obtidos em trabalhos anteriores, o máximo da excitação da clorofila ocorre entre 430 e 450nm, com emissão em torno de 670 nm para a clorofila a e 632 nm para a clorofila b [72]. Na maioria dos extratos clorofílicos a excitação ótima é conseguida em 430 nm, onde a luz azul e a luz ultravioleta são as mais indicadas como fonte de excitação [73].

4- Resultados e Discussão

4.1. Obtenção da curva analítica com a amostra padrão

Para a obtenção da curva analítica, figura 8, que representará a intensidade de fluorescência em função da concentração de B(a)P, obtida pela análise por espectroscopia de fluorescência sincronizada (EFS), realizou-se medidas utilizando a solução padrão.

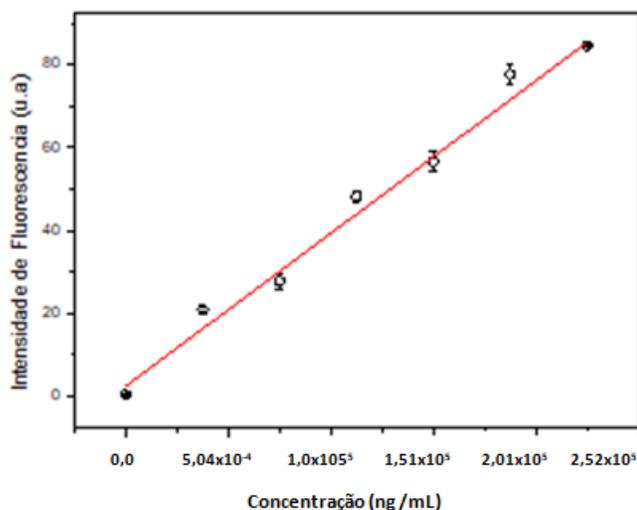


Figura 8. Intensidade de fluorescência em função da concentração de B(a)P, representando uma curva analítica do procedimento proposto.

Pela curva analítica apresentada na figura 4, a linearidade obtida foi de $1,58 \times 10^{-17}$ a $1,89 \times 10^{-16}$ ng/mL, estando de acordo com o valor proposto para o método da referência 49, o que mostra a confiabilidade dos resultados para a detecção do HPA. Já o limite de detecção $9,51 \times 10^{-18}$ ng/mL e limite de quantificação $1,58 \times 10^{-17}$ ng/mL, observa-se que a dependência entre a intensidade fluorescência e a concentração do HPA é aparentemente linear.

A Espectroscopia de Fluorescência Sincronizada (EFS) do B(a)P foi realizada em solução metanólica com concentração de B(a)P de 0,97 ng/mL, utilizando um $\Delta\lambda$ de 40nm. A figura 9, mostra um espectro de fluorescência sincronizada de uma amostra padrão, onde o pico referente à emissão do benzo(a)pireno pode ser identificado em 366nm. Neste estudo foram utilizados o $\Delta\lambda$ e as fendas fundamentados pelo trabalho dos autores [64, 65].

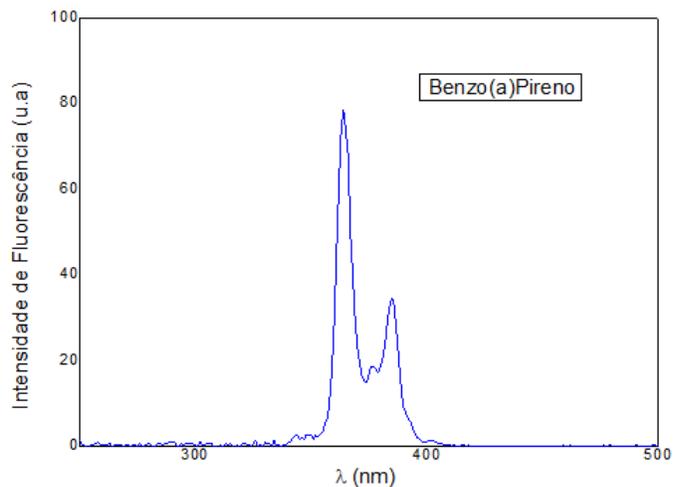


Figura 9. Espectro de emissão de fluorescência sincronizada do B(a)P em solução metanólica para um $\Delta\lambda$ de 40nm. A concentração do B(a)P era de 0,97 ng/mL.

Considerando que o interesse deste trabalho é a determinação do HPA B(a)P, a figura 10 mostra um espectro de fluorescência normalizado, de uma amostra padrão, de benzo(a)pireno em solução com concentração de $4,5 \times 10^{-7}$ mol/L de metanol. Armazenada em vidro âmbar, acondicionada em temperatura ambiente e na geladeira a -10°C . Percebe-se uma diminuição na intensidade de fluorescência da amostra acondicionada em geladeira para amostra acondicionada em temperatura ambiente [74].

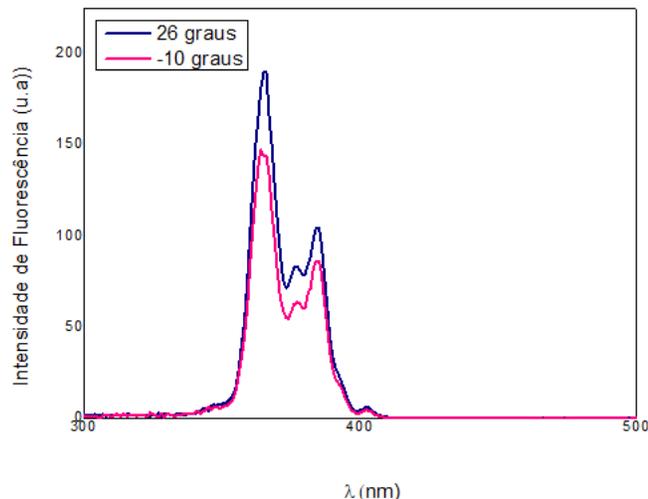


Figura 10. Espectro de EFS de uma solução de benzo(a)pireno acondicionada em temperatura ambiente (26°C) e na geladeira (-10°C).

O fato de todos os experimentos serem realizados a temperatura controlada próxima à ambiente, não verificou-se a degradação do material nessa temperatura. Assim realizou o estudo sobre a estabilidade do B(a)P em função do tempo. A figura 11, nos mostra um gráfico da intensidade de fluorescência do B(a)P como uma função do tempo após o preparo da solução. Observa-se que a intensidade máxima de fluorescência mantém valores estáveis por todo o período de análise, apenas uma pequena variação de ~1%, indicando que, a concentração de B(a)P na solução permanecerá estável em todo o intervalo de um experimento.

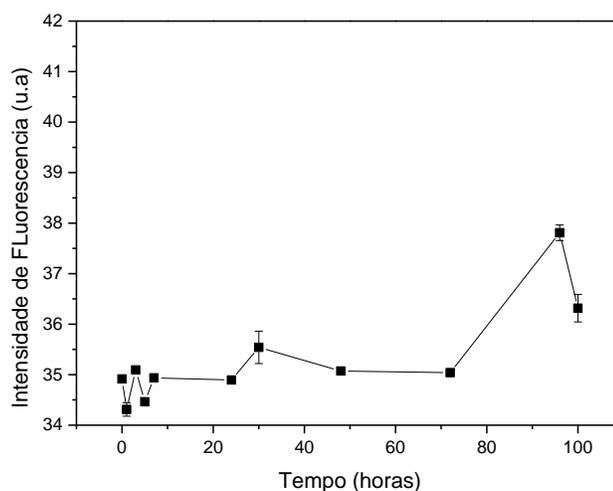


Figura 11. Intensidade de fluorescência do B(a)P em função do tempo (horas) após o preparo da solução de HPA, no laboratório GOA - UFGD.

4.2. Determinação do Teor de Clorofila

Nas Figuras 12 e 13 são apresentadas os espectros de emissão dos extratos da clorofila a da alface cultivada no método convencional e por hidroponia sujeitas às contaminações com B(a)P, onde a solução de irrigação denominada controle, continha somente a solução nutritiva, sem contaminação com B(a)P. O primeiro sistema utilizado, continha a solução nutritiva contaminada com 0,15 mL da solução padrão de benzo(a)pireno para cada 1 Litro de solução nutritiva, obtendo-se uma solução com concentração de B(a)P igual a 2,54 ng / mL. O segundo sistema montado, continha a solução nutritiva contaminada com um volume de 0,300 mL de solução padrão de B(a)P para cada 1 Litro de solução nutritiva, obtendo-se uma solução com concentração de B(a)P igual a 5,09 ng / mL. O terceiro sistema montado, continha a solução nutritiva contaminada com 3mL de benzo(a)pireno para cada 1 Litro de solução nutritiva, obtendo-se uma solução com concentração de B(a)P igual a 50,9 ng / mL.

Os espectros nos mostram que a adição de B(a)P na amostra, seja sob a forma de irrigação ou hidroponia, teve influências na intensidade de luz absorvida / emitida pela planta. Os

valores da intensidade máxima de fluorescência da clorofila em função da concentração de HPA estão nas figuras 14 e 15.

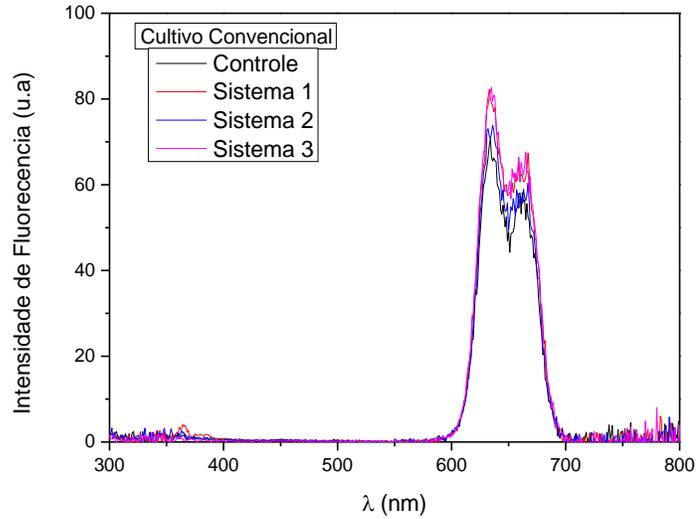


Figura 12. Espectro de emissão do efeito da adição de B(a)P sobre o extrato da clorofila extraída de plantas de alface cultivadas através do sistema de convencional.

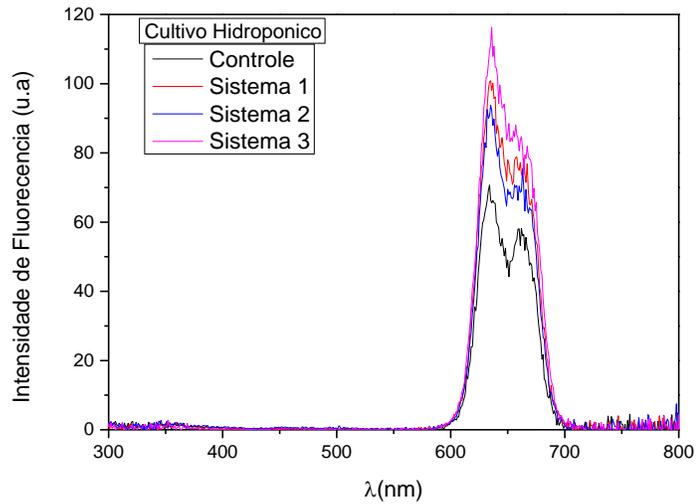


Figura 13. Espectro de emissão do efeito da adição de B(a)P sobre o extrato da clorofila extraída de plantas de alface cultivadas através do sistema de hidropônico.

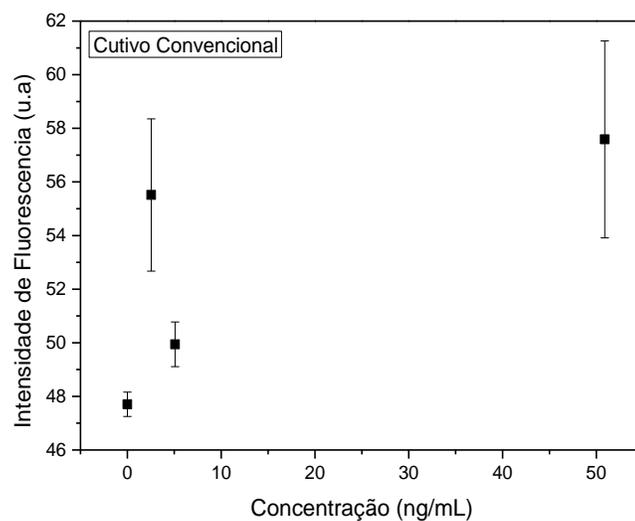


Figura 14. Intensidade de Fluorescência em função da concentração de B(a)P adicionado nas soluções nutritivas e absorvidos pela clorofila de plantas de alface cultivadas através do sistema convencional.

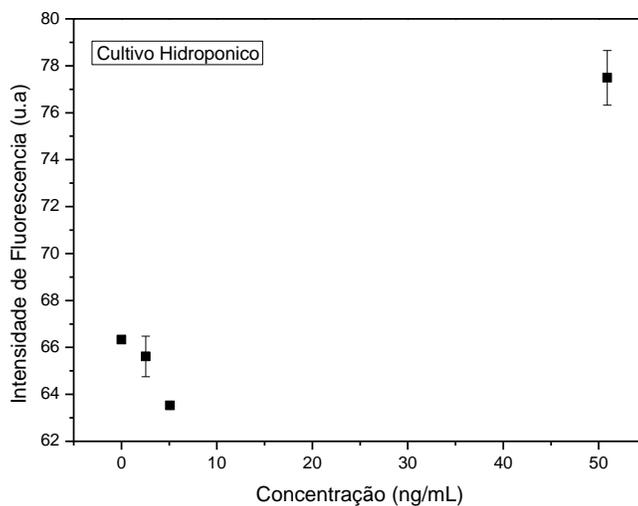


Figura 15. Intensidade de Fluorescência em função da concentração de B(a)P adicionado nas soluções nutritivas e absorvidos pela clorofila de plantas de alface cultivadas através do sistema hidropônico.

A redução da fluorescência da clorofila em plantas também foi associada à necessidade de reorganização do mecanismo de fotossíntese. O estudo relatou que agentes supressores provocaram mudanças no conteúdo de clorofila e proteína de plantas [68]. Os processos de supressão de fluorescência, podem ocorrer de forma estática ou dinâmica. A supressão estática ocorre a inibição de uma parte dos fluoróforos da amostra. Quando o complexo absorve a luz, ele retorna ao nível fundamental sem a emissão de fóton. A intensidade de fluorescência decresce com a adição do supressor, entretanto o tempo de vida dos fluoróforos no estado excitado não é afetado. No entanto, a supressão dinâmica é um processo que diminui a população do estado excitado pela adição de uma taxa de decaimento não-radiativo, provocando um decréscimo do tempo de vida, que é equivalente ao decréscimo da intensidade de fluorescência [68]. Assim, estes resultados sugerem, que a quantidade da fluorescência da clorofila, tem uma interferência direta da concentração do HPA na supressão da fotossíntese.

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

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

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

matéria húmica do solo podem ocorrer por diferentes processos, ainda não completamente conhecidos.

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

Desde que se encontrou influências do HPA na fluorescência da clorofila, realizou-se o estudo dos extratos de clorofila obtidos de alface de cultivo hidropônico e convencional, visando identificar a presença desses HPAs no próprio extrato. Assim, os extratos de clorofila foram submetidos a extração líquido-líquido, afim de se tentar estabelecer uma relação de quanto de B(a)P foi adicionado na solução e quanto foi absorvido significativamente pela planta. As figuras 16 e 17 mostram as intensidades de fluorescência, obtidas pro EFS dos extratos de clorofila obtido do processo de roto-evaporação.

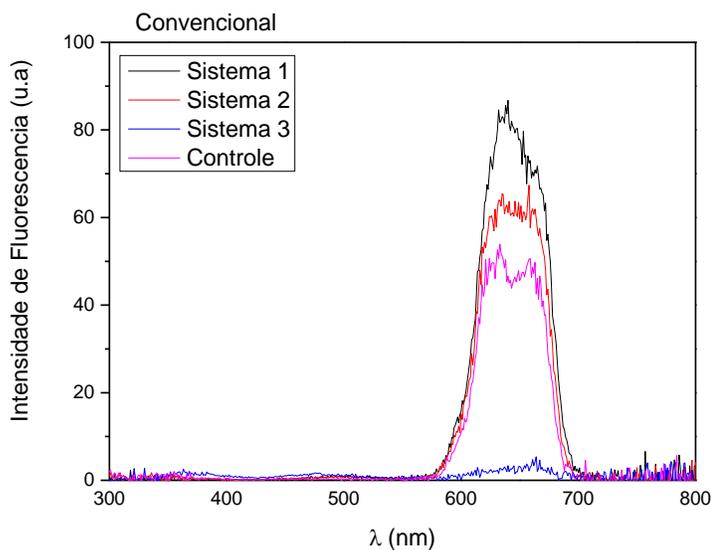


Figura 16. Intensidade de fluorescência sincronizada da extração líquido-líquido de clorofila para o sistema de cultivo convencional

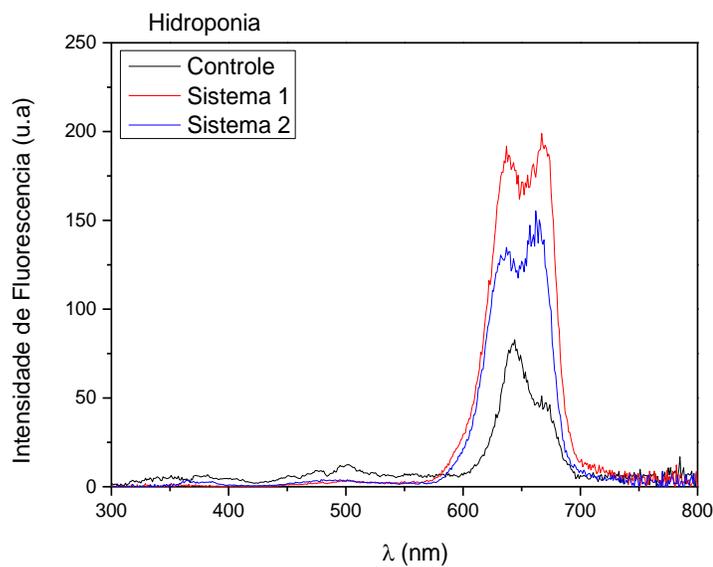


Figura 17. Intensidade de fluorescência sincronizada da extração líquido-líquido clorofila para o sistema de cultivo hidropônico.

Como podemos observar nas figura 16 e 17, os picos da região 366nm referente ao B(a)P presente no extrato clorofílico das plantas, mostrou que o B(a)P não influenciou no processo de fotossíntese e portanto deve estar concentrado em outra região das amostras e não nas folhas. Estudo sobre a concentração de B(a)P nas folhas, caule e raízes foram feitos e apresentados no próximo item, 4.4.

4.4. Influência do benzo(a)pireno sobre a planta cultivada em sistema hidropônico

As plantas apresentam diferentes respostas quanto à tolerância ao sombreamento, refletindo no crescimento e no desenvolvimento. Dessa forma, a eficiência do crescimento pode estar relacionada à habilidade de adaptação das plantas às condições luminosas do ambiente, sendo o crescimento satisfatório de algumas espécies em ambientes com baixa ou alta luminosidade atribuído à capacidade da espécie ajustar rapidamente seu modelo de alocação de biomassa e comportamento fisiológico[75].

A capacidade das plantas para obter água e nutrientes minerais do sistema de cultivo, esta relacionada com sua capacidade para desenvolver um extensivo sistema radicular. A absorção de íons é mais pronunciada em raízes jovens. Além disto, a taxa de absorção de íons das raízes diminui na região mais distante do ápice radicular. No entanto, esta tendência varia bastante, dependendo de fatores, como tipo de íon (nutriente), estado nutricional e espécie vegetal [76]. Em suma, a captação e acumulação de HPAs pelas folhas das plantas é afetada por muitos fatores, e as correlações entre as contribuições desses diferentes fatores continuam a ser explorados.

A figura 18 nos mostra as imagens da fluorescência cinéticas da parte superior das folhas uma planta de alface de cultivo hidropônico, do primeiro parâmetro avaliado, após 192h na solução nutritiva contaminada com benzo(a)pireno, para as concentrações de 0 e 50,9 ng/mL. As imagens mostram as intensidades do parâmetro QY_Max, que quantifica o rendimento máximo do fotossistema II da planta após a adaptação ao escuro. Analisando a figura 14, é possível notar que inicialmente, em 0 horas, as plantas estão nas mesmas condições e o rendimento fotoquímico máximo é semelhante entre as folhas das plantas de ambos os tratamentos. No entanto essa similaridade se perde ao longo do estudo e ao final das 192 horas, o QY Max apresenta valores maiores para a folha da amostra contaminada com B(a)P.

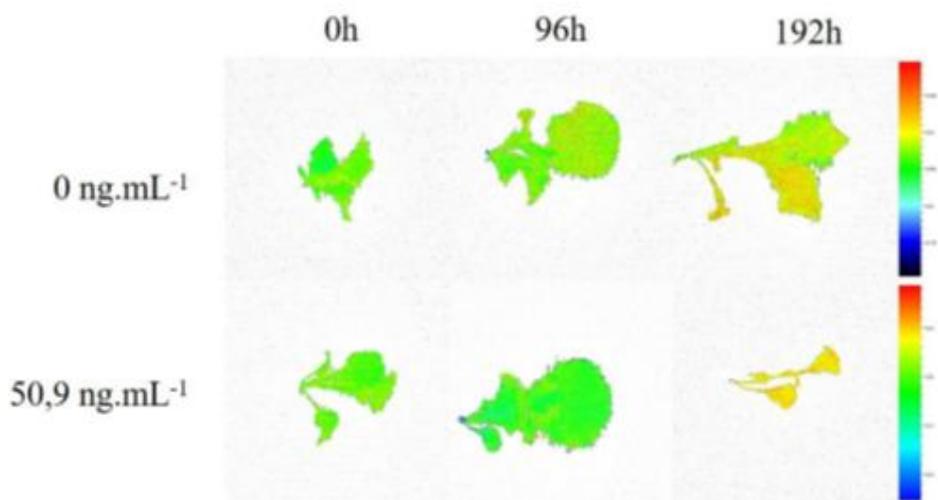


Figura 18. Imagens de QY_Max durante período de análise, obtidas por meio da cinética de fluorescência da clorofila.

A figura 18, mostra o resultados das análises da biometria das raízes, onde pode ser observado que para a menor quantidade de HPA inserido na solução nutritiva (5,09ng/mL) não se nota diferença significativa no valor médio do tamanho das raízes se comparada com a amostra controle (0 ng/mL), o que interfere no crescimento da planta, como visto na imagem anterior. Já para a maior concentração (50,9ng/mL) houve uma redução no tamanho das raízes de em torno de 60%, mostrando que apenas quando são submetidas ao estresse muito agudo de benzo(a)pireno, as plantas tendem a diminuir o tamanho da raiz, figura 19.

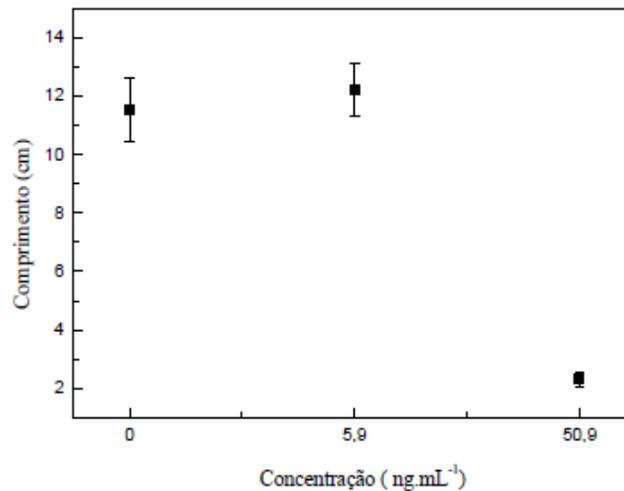


Figura 19. Valores médios de comprimento da raiz, para duas concentrações de benzo(a)pireno, comparadas com as medias do comprimento da controle (solução nutritiva). Fonte: Lucilene S. Rosa.



Figura 20. Raiz de plantas de *Lactuca sativa*, *L.* de cultivo hidropônico, com diferentes concentrações de Benzo(a)Pireno, da esquerda para a direita, planta controle, concentração 5,09 ng/mL e concentração 50,9 ng/mL.

Além dos efeitos, sobre o crescimento da raiz, foi possível observar, perda de vigor aparente das plantas jovens de *Lactuca sativa*, *L.*, submetidas a maior dose de BaP, ainda que a clorose não tenha sido manifestada. A perda de vigor ficou caracterizada pelo retardo do crescimento, alongamento peciolar e menor expansão foliar, figura 20. Estudos mostram, que o BaP em microdoses é um bioestimulador de crescimento para plantas e em altas doses inibe seu crescimento [77].

Como esses processos se referem a distribuição de nutrientes para outros órgãos ou para o ambiente externo, é compreensível encontrar resultados negativos, fato que indica a perda líquida de um determinado composto que pode ser o B(a)P. O teor de clorofila diminuiu nas plantas em uma faixa etária. Além disso, ambos, teores de clorofilas e carotenóides depende da presença e proporção de elementos minerais na planta [72].

Os HPAs podem exercer efeitos sobre o crescimento da planta, dependendo espécies de plantas e seu estágio de crescimento. Nas plantas, existem processos enzimáticos especiais que podem alterar estruturalmente e quimicamente os HPAs. A transformação dos HPAs em plantas é um processo particular que pode ocorrer em um tecido ou órgão, no entanto, as informações

sobre como a planta responde aos HPAs é limitado [78]. Afim de avaliar onde estaria presente o B(a)P na planta, uma vez que as análises realizadas até aqui nas folhas da planta não mostraram muita diferença nos resultados, foi realizado uma extração líquido-líquido (item 4.5) em órgãos específicos da alface (*Lactuca sativa*, L.) cultivada em sistema hidropônico, submetidas ao contato com o benzo(a)pireno da amostra do terceiro sistema montado, contendo uma solução nutritiva contaminada com 3mL de benzo(a)pireno para cada 1 Litro de solução nutritiva, obtendo-se uma solução com concentração de B(a)P igual a 50,9 ng / mL.

4.5. Análises da Extração Líquido-Líquido em órgãos Específicos da Alface (*Lactuca sativa*, L.) Cultivada em Sistema Hidropônico.

Diferentes processos com a finalidade de pré-concentrar poluentes para uma análise mais confiável são encontrados na literatura. No entanto, cada método procura ser eficiente para as diferentes misturas, assim, para realizar as análises da alface optou-se pelo processo de extração líquido-líquido [64, 56].

4.5.1. Absorção de B(a)P na parte aérea da planta – Folha Verde

De acordo com as análises por Espectroscopia, não houve efeito significativo do HPA na amostra. Isso significa que o menor valor de HPA na água com a substância nutritiva não influenciou na absorção e no acúmulo, do HPA na parte aérea da alface, com valores muito próximos aos obtidos na água superficial. O tipo de sistema de irrigação utilizado também não ocasionou diferença significativa entre os tratamentos. A ausência de diferença significativa pode ser devida ao fato da quantidade de nutrientes presente na água ter sido o suficiente para suprir as necessidades da planta. Os HPAs por serem voláteis podem evaporar das folhas por causa das altas temperaturas em primavera e verão, enquanto fenômenos de condensação notáveis são causada por baixas temperaturas no outono e inverno[59].



Figura 21. Amostra da Alface (*Lactuca sativa*, L.) Cultivada em Sistema Hidropônico - Parte Aérea da planta – Folha Verde (Imagens: ROSA, L.S.).

As concentrações médias de HPA na parte aérea da alface, foram obtidas conforme descrito no item 3.4, onde as amostras, foram submetidos a um preparo por meio de uma extração líquido-líquido para um melhoramento da possível banda de emissão do B(a)P absorvido pela planta.. Os resultados de EFS, variaram consideravelmente entre as partes da planta, sendo de $3,59 \text{ ng.mL}^{-1}$ Figura 18, para os tratamentos de folha verde, e de folha seca/amarela, onde os valores de HPA não foram encontrados.

As plantas podem ativar um conjunto de processos de defesa quando os HPAs entram nas células. As respostas das células vegetais aos poluentes orgânicos são classificadas em duas partes: A primeira é realizada por sistema de detecção xenobiótico e o segundo é fornecido pela via de desintoxicação. A remediação xenobiótica inclui três fases bioquímicas: transformação, conjugação e compartimentalização, que foram denominados como “fígado verde”. Essa ideia compara o xenobiótico metabolismo em plantas para aquele no fígado de mamíferos incluindo três etapas: transformação, conjugação e excreção. A excreção raramente acontece em células vegetais e apenas no caso de moléculas de baixa ou alta mobilidade de HPAs com estruturas simples. Assim, o destino dos PAHs na plantas é diferente da dos mamíferos devido à ausência de sistemas de excreção em plantas [78].

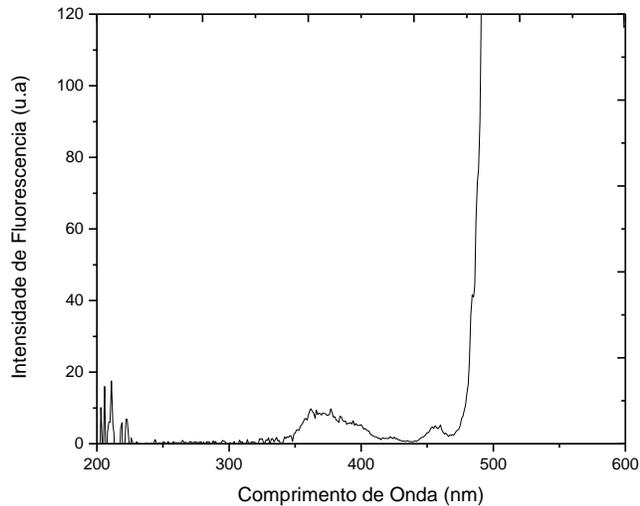


Figura 22. Intensidade de fluorescência em função da concentração de B(a)P na folha verde.

De acordo com a definição do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) nº 357, dispõe que alguns compostos em água como benzo(a)pireno, o Índice de Máxima Ingestão Diária Admissível (IDA) são de $0,018 \text{ ng.ml}^{-1}$ parâmetros para o consumo humano [59]. Observa-se que, mesmo as plantas do sistema de irrigação com água residuária poderão ser consumidas sem perigo de causar danos à saúde, sendo necessário o consumo correspondente a aproximadamente 0,5 kg por dia para atingir o valor do IDA.

Estudos mostram que o valor nutricional da alface é fortemente depende do estágio de crescimento e da composição do solo. Conteúdo mais alto de macrominerais, oligoelementos e pigmentos fotossintéticos foram observado em alfaces jovens; conseqüentemente, essas amostras apresentaram valores mais altos de HPA [74]. O crescimento pode ser definido como mudanças irreversíveis que ocorrem na planta com o passar do tempo, as quais ocorrem principalmente no tamanho, freqüentemente na forma e ocasionalmente no número. A dificuldade de entendimento do crescimento das plantas se dá pelo fato de que o crescimento resulta da interação de mecanismos físicos e bioquímicos bastantes complexos, a maioria dos quais pouco esclarecidos ou mesmo desconhecidos [44].

4.5.2. Absorção de B(a)P na parte aérea da planta – Matéria seca de folha senescente

A matéria seca de folha senescente da parte aérea, Figura 23, apesar de ser um método destrutivo, deve ser considerada, pois indica a presença do HPA em folhas que poderão ser descartadas no ambiente. Após um período de 4 dias sem irrigação, as folhas da alface foram coletadas para as análises de EFS.



Figura 23. Massa verde e matéria seca de folha senescente da parte aérea. (Imagens: ROSA, L.S.).

No experimento em estudo, a análise feita da matéria seca de folha senescente da parte aérea, foi realizada com o objetivo de verificar a influência e a diferença, dos resultados nos tratamentos utilizados na massa verde e na massa seca de folha senescente da parte aérea, ela das plântulas. Por esse teste, as amostras que apresentaram maiores valores de HPA, foi na folha verde de plântulas de alface. Conforme as metodologias apresentadas no item 3.4. A partir das análises por EFS foram obtidos os valores totais do HPA, inferiores comparados com os sistemas de hidroponia com folhas verdes, conforme se pode verificar na Figura 24.

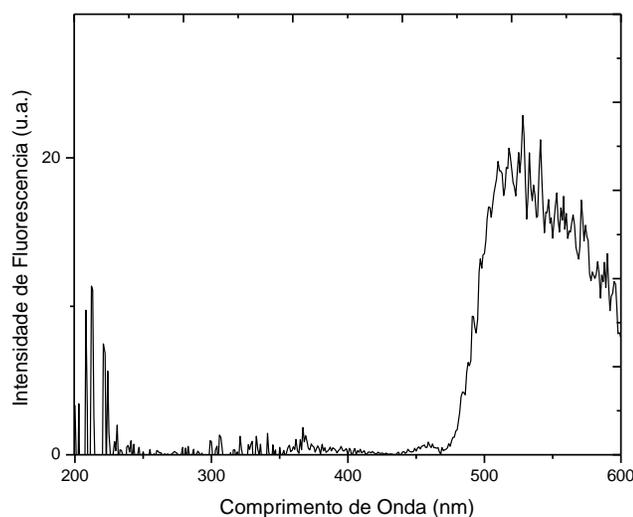


Figura 24. Intensidade de fluorescência em função da concentração de B(a)P na matéria seca de folha senescente da parte aérea.

A provável redução da concentração de HPA nas folhas pode ser atribuída ao efeito da distribuição dos nutrientes ao longo do tempo. É comum encontrar na literatura variações na ordem de absorção e acúmulo de nutrientes nas plantas, principalmente quando se utiliza diferentes meios de cultura e condições ambientais. Se levando em conta a instabilidade do HPA, por um período longo de 4 dias sem a irrigação do mesmo na plântula, era esperado a ausência de B(a)P na folha seca/amarela, além da fotodegradação, que é a transformação química de um composto em compostos mais pequenos, provocada pela absorção de luz (visível, ultravioleta ou infravermelho).

O processo de transformação dos HPAs é causado também pela sua degradação microbiológica no solo, eles passam por várias etapas ativação metabólica com a estimulação de enzimas específicas quando ingeridas em ecossistemas vivos. O sistema enzimático é o principal responsável pela metabolismo dos HPAs, que são convertidos quando ingeridos por um organism [77].

4.5.3. Absorção de B(a)P do Talo da Alface (*Lactuca sativa*, L.)

As maiores taxas de absorção de HPAs em toda a planta foram observadas no talo, que apresentou maior absorção com valor superior aos demais partes da planta. Esse comportamento é provavelmente atribuído à adaptação ao meio de cultura em solução nutritiva e o acúmulo do B(a)P no talo da planta que apresenta uma área maior para a reserva de nutrientes. Onde foi obtidos os maiores valores, apresentando $79,01 \text{ ng.mL}^{-1}$ Figura 08, onde mostra o índice de absorção do B(a)P presente no talo figura 25.



Figura 25. Amostra do Talo da Alface (*Lactuca sativa*, L.) colhida. (Imagens: ROSA, L.S.).

As acumulações médias de HPA foram maiores no Talo e na Raíz, com uma média de e de $79,01 \text{ ng.mL}^{-1}$ e $41,13 \text{ ng.mL}^{-1}$ de B(a)P, nas espécies de alface *Lactuca sativa*, L., respectivamente. Nesse caso a fotodegradação, que é a transformação química de um composto em compostos menores, provocada pela absorção de luz (visível, ultravioleta ou infravermelho), interfere relativamente pouco nos valores encontrado na plântula, já que os nutrientes ficam contido na interior do talo não recendo influência do meio externo.

Desta forma, a ocorrência dos HPAs, em diferentes partes da planta, sugere que não existem mecanismos efetivos, de restrição do deslocamento desses compostos no corpo vegetal. Apesar disso, ainda são escassos os trabalhos relacionados à marcha de absorção de nutrientes em Alfaces. Urge, portanto, estimular pesquisas científicas para as diversas espécies de Alface de interesse econômico em diferentes regiões produtoras a fim de otimizar o potencial que cada uma apresenta dentro de sua mais variadas condições. Ainda nesse sentido, estudos feitos em alfaces

mais jovens tinham um maior valor nutricional do que o dos adultos, esses autores também concluíram que o valor nutricional de a alface era fortemente dependente do solo. O que comprova a diferença de comportamento encontrada em diferentes ensaios [47].

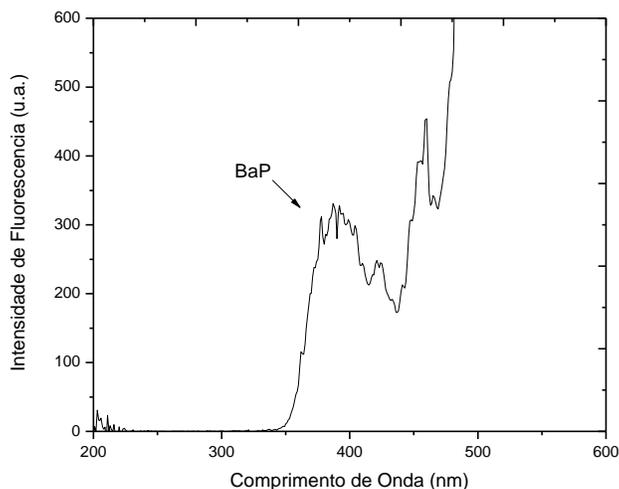


Figura 26. Intensidade de fluorescência em função da concentração de B(a)P no Talo.

4.5.4. Absorção de B(a)P na Raiz da Alface (*Lactuca sativa, L.*)

O sistema radicular da alface apresentou desempenho diferente das variáveis da parte aérea. Ao contrário do que ocorreu com os parâmetros da parte aérea, que apresentavam níveis baixos de HPAs para a alface, os teores de B(a)P, nos tratamentos, apresentaram valores acima do esperado para a alface, que estava entre $3,59 \text{ ng.mL}^{-1}$ na folha verde. No entanto, neste experimento, o maior teor foi de $41,13 \text{ ng.mL}^{-1}$ na Raiz da Alface figura 27, e o menor foi nos resultados, da parte seca/amarela, onde o HPA Benzo(a)pireno não foi encontrado. Esses teores mostram que, ocorreu um acúmulo significativo de HPA nas folhas das plantas nesses tratamentos hidropônicos.

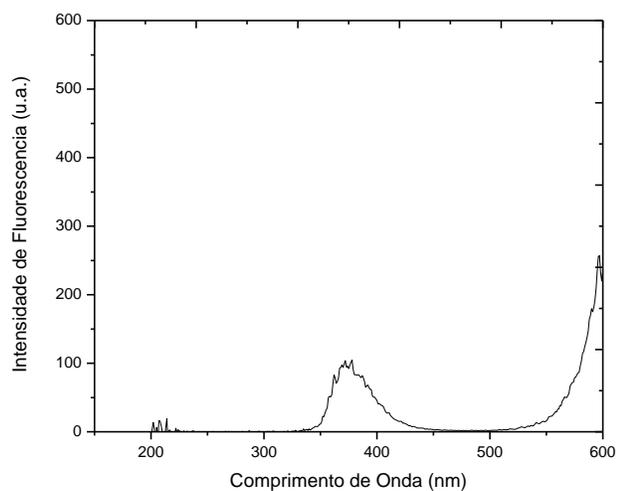


Figura 27. Intensidade de fluorescência em função da concentração de B(a)P na Raiz.

Afim de avaliar onde estaria presente o B(a)P na planta, uma vez que as análises realizadas até aqui nas folhas da planta não mostraram uma diferença muito satisfatória nos resultados, foi realizado uma extração líquido-líquido de uma solução das raízes das plantas submetidas ao contato com o benzo(a)pireno. A figura 28 mostra o resultado da medida de fluorescência sincronizada do extrato da raiz da planta do alface cultivada por meio de hidroponia.

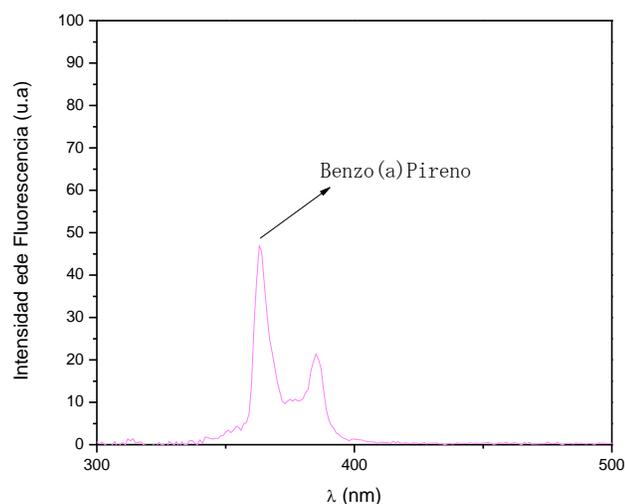


Figura 28. Espectro de emissão do benzo(a)pireno presente na Raiz da alface cultivada por meio de hidroponia.

Pode-se observar neste espectro um pico de emissão característico para o benzo(a)pireno na região de 364-366nm, o que nos mostra que o B(a)P adicionado na soluções nutritivas foram absorvidas e permaneceram em partes nas raízes das plantas, com concentração de $4,66 \times 10^{-7}$ mol/L ou 117 ng/mL. Como no sistema hidropônico a raiz é órgão da planta que fica em contato direto com a solução, acaba sendo o órgão mais sensível a variações. Outra possível causa para a redução do crescimento da raiz, pode estar relacionada a uma resposta fitotóxica à exposição as substâncias químicas [79].

Recentemente, uma pesquisa, mostrou que a resposta da planta está relacionada às características físicas, químicas e características físico-químicas do meio de cultivo utilizado. Sendo assim, os substratos ricos em matéria orgânica têm alta capacidade de retenção e bloqueio de nutrientes. Portanto, os elementos podem ser bloqueados na matriz do solo (material muito orgânico) e não pôde ser disponível para a planta [74]. Além disso, autores sugerem que folhas de plantas jovens forneceram níveis mais altos de compostos bioativos [80]. Fatores como a bioconcentração foram calculados e suas relações com as propriedades físico-químicas dos HPAs foram investigadas. A solubilidade e o coeficiente de partição octanol±água, assim como a

pressão de vapor e o coeficiente de partição octanol±ar mostraram-se bons preditores para a acúmulo de HPAs na raiz interna e tecido foliar [81].

A figura 29 a seguir, apresenta o gráfico com os valores da distribuição do HPA em cada parte da Alface no estudo.

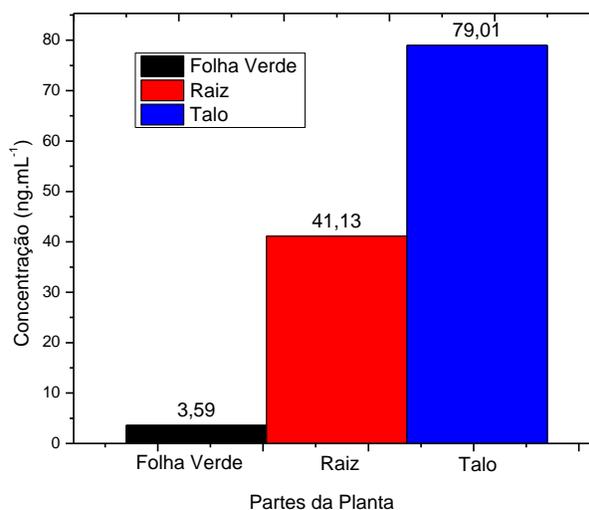


Figura 29. Distribuição do HPA em cada parte da planta.

Observou-se que houve a distribuição da solução nutritiva com a presença do HPA, por toda planta e as condições de cultivo hidropônico para a execução do experimento não limitaram o desenvolvimento de mudas de alface, o que resultou em valores distribuídos na Tabela 2.

O maior crescimento do sistema radicular deve estar relacionado à estrutura e capacidade de retenção de água de cada substrato que pode ter influenciado nessas variáveis, tabela 2. Num substrato com carência de nutrientes, aumentar o comprimento das raízes é uma maneira da plântula buscar os nutrientes necessários ao seu crescimento mesmo que isto implique em gasto de reservas [80]. As hortaliças diferenciam-se nas exigências nutricionais e no padrão de absorção durante o crescimento. Segundo Papadopoulos (1999), nas hortaliças folhosas a absorção de nutrientes durante o primeiro ciclo da cultura é lenta e o índice de absorção de nutrientes acelera-se próximo à colheita [82].

Tabela 2. Absorção média dos valores obtidos pela técnica de EFS em cada parte da planta.

Hidrocarboneto Policíclico Aromático	Alface (<i>Lactuca sativa</i>, L.)	Quantidade de HPA encontrado
Benzo(a)Pireno	Folha Verde	3,59 ng.mL ⁻¹
Benzo(a)Pireno	Talo	79,01 ng.mL ⁻¹
Benzo(a)Pireno	Raiz	41,13 ng.mL ⁻¹
Benzo(a)Pireno	Folha Seca	Não encontrado

4.5.5. Análises da Presença de Benzo(a)Pireno em Alfaces Colhidas na Horta Escolar e na Feira Livre da Cidade de Dourados/MS.

A horta escolar possibilita a criação de um espaço participativo que pode contribuir para a promoção da saúde não apenas dos alunos, mas também do corpo de funcionários da escola. Tais falas apontam, ainda, uma educação diferente do que usualmente se constrói no campo da nutrição, pautada essencialmente pela divulgação de informações científicas, com um discurso normativo e comportamental [82].

Observa-se, pela Figura 30, as concentrações médias de HPA na parte aérea da alface, foram obtidas conforme descrito no item 3.4, onde as amostras da alface colhida na horta da escola, não foi detectada a presença de HPA.

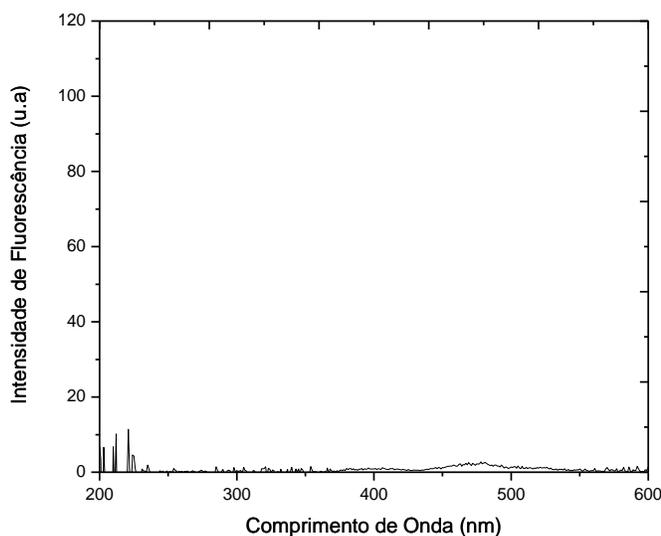


Figura 30. Espectro de emissão do B(a)P presente na alface cultivada na escola.

Os resultados da água da caixa d'água não são considerados críticos para irrigação de hortaliças, conforme descrito pelo (CONAMA) nº 357, dispõe que alguns compostos em água como benzo(a)pireno, o Índice de Máxima Ingestão Diária Admissível (IDA) são de 0,018 ng.ml^{-1} parâmetros para o consumo humano, os valores se encontram dentro do limite estipulado para o consumo humano [40]. Sendo assim, dessa forma não ocorrem efeitos prejudiciais com concentrações encontradas bem abaixo de 0.018 ng.ml^{-1} .

O principal veículo de contaminação hortaliças ocorre principalmente pela água infectada por fezes humana. O Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) nº 357, dispõe que alguns compostos em água como benzo(a)pireno, o Índice de Máxima Ingestão Diária Admissível (IDA) são de 0,018 ng.ml^{-1} parâmetros para o consumo humano [59].

Através das análises por Espectroscopia de Fluorescência Sincronizada, observou-se que as amostras de alface comercializadas na cidade de Dourados, se apresentou de acordo com a legislação vigente. Considerando então, que ao utilizarem no cultivo da alface, irrigação com águas provenientes da companhia de abastecimento local, a Sanesul (Empresa de Saneamento do

Mato Grosso do Sul), foi verificado que atende as exigências do CONAMA, para a segurança alimentar no consumo de hortaliças, levando-nos a concluir que esses produtos estão sendo comercializados com boas práticas de produção, com uma condição que não compromete a qualidade do produto. Pelas análises EFS, foi possível detectar nas amostras de alface analisadas, os valores acima de $0,018 \text{ ng.ml}^{-1}$ parâmetros para o consumo humano.

5. Conclusão

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

Os resultados, obtidos das análises espectroquímicas, obtidas em órgãos específicos da alface, revelaram a seguinte seqüência para a concentração média de HPA absorvido e acumulado, na seguinte ordem: folhas > raízes > talos, na comparação de médias, para os todos os tratamentos. Sendo que as menores concentrações de HPA, foram encontrados na folha verde $3,59 \text{ ng.mL}^{-1}$, enquanto que, os valores mais altos foram encontrados nos talos $79,01 \text{ ng.mL}^{-1}$ e raízes com $41,13 \text{ ng.mL}^{-1}$. De maneira geral, ouve a distribuição da solução nutritiva com a presença do HPA, por toda planta e as condições de cultivo hidropônico para a execução do experimento não limitaram o desenvolvimento de mudas de alface. Mas no entanto, para a maior concentração de HPA ($50,9 \text{ ng/mL}$) houve uma redução no tamanho das raízes, mostrando que quando são submetidas ao estresse muito agudo de benzo(a)pireno, as plantas tendem a diminuir o tamanho da raiz,. As análises realizadas com amostras coletadas no comércio e na escola, revelaram que, o teor de HPA total, para todos os tratamentos foi considerado normal e adequado para o consumo humano.

É crescente o número de trabalhos na área de identificação e doseamento de HPA; contudo, a legislação brasileira é pouco abrangente, o que direciona os estudos desenvolvidos nacionalmente a se adaptarem a regulamentações de outros países. Estas, nem sempre se encaixam nos hábitos alimentares da nossa população, o que pode estar prejudicando a estimativa de níveis de exposição mais realistas. Tal necessidade de ampliação das normas para produtos nacionais se torna ainda mais evidente quando este tema é visto como uma questão de Segurança Alimentar.

6. Referências Bibliográficas

- [1] MUGAGGA, F. et al **The centrality of water resources to the realization of Sustainable Development Goals (SDG). A review of potentials and constraints on the African continent.** International Soil and Water Conservation Research Vol. 4, p. 215–223, 2016.
- [2] PAZ, A. P.; NASCIMENTO, E. C. P.; MARCONDES, H. C. **Presença de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em produtos alimentícios e a sua relação com o método de cocção e a natureza do alimento.** Brazilian Jurnal Food Technology, v. 20, e2016102, Universidade Federal do Pará (UFPA), Instituto de Ciências da Saúde, Faculdade de Nutrição, Belém/PA – Brasil 2017.
- [3] BOFFETTA, P.; Jourenkova, N. & Gustavsson, P., 1997. **Cancer Causes & Control**, 8:444-472.
- [4] SOUZA, H. M. L. **Isolamento e seleção de Fungos filamentosos de sedimentos Contaminados do rio Negro com Potencial para Degradação de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos.** Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede BIONORTE pela Universidade do Estado do Amazonas. Manaus - AM. 2015.
- [5] COSTA, A. F. **Avaliação da Contaminação Humana por Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos: Determinação de 1-Hidroxipireno Urinário.** Dissertação de Mestrado. Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública. Rio de Janeiro - RJ, 2001.
- [6] STOGIANNIDIS, E., LAANE, R. **Source Characterization of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Using Their Molecular Indices.** Reviews of Environmental Contamination and Toxicology. Vol 234, p 49-133. 2015.
- [7] GALLOTTA, F. D. C. **Avaliação dos Níveis de Concentração e Identificação de Fontes de Hidrocarbonetos na bacia do Alto Iguaçu: Estudo de caso Pós Derrame Acidental de óleo na Refinaria Presidente Getúlio Vargas.** Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Geociências da Universidade Federal Fluminense. Niterói – RJ. 2014.
- [8] **Identificação por CG-EM e Análise Comportamental, via ACP, de HPA e suas fontes no Riacho Algodoads Suape-PE.** XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química. Florianópolis - SC. 2014.
- [9] MA, Y. **Quantitative assessment of human health risk posed by polycyclic aromatic hydrocarbons in urban road dust.** ScienceDirect Science of The Total Environment. p. 1 –

10, 2016.

[10] FREIRE, M. M. **Avaliação dos Efeitos da contaminação por Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Peixes (Genidens genidens) do Litoral do Estado do Rio de Janeiro.** Tese de Doutorado apresentada ao Curso de Pós Graduação em Geociências para a obtenção do grau de Doutor da Universidade Federal Fluminense. Niterói –RJ. 2015.

[11] WU, C. **Concentrations and potential health hazards of polycyclic aromatic hydrocarbon in shallow groundwater of a metal smelting area in Southeastern China.** Science of HYPERLINK
"http://www.sciencedirect.com/science/journal/00489697" TheHYPERLINK
"http://www.sciencedirect.com/science/journal/00489697" Total Environment. Vol 569-570, p. 1561 – 1569. 2016.

[12] LUCAS, J. **Effects of Pyrolytic and Petrogenic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons on swimming and Metabolic Performance of Zebrafish Contaminated by Ingestion.** ScienceDirect Ecotoxicology and Environmental Safety, Vol. 132, p. 145-152, 2016.

[13] WHITE, A.J. **Exposure To Multiple Sources Of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons And Breast Cancer Incidence.** ScienceDirect Environment International. Vol. 199, p. 632-638, 2016.

[14] LJINSKY, W. **The Formation and Occurrence of Polynuclear Aromatic Hydrocarbons Associated With Food.** Mutation Research/Genetic Toxicology Vol. 259, p. 251-261, 1991.

[15] AZEVEDO, J. A. H.; ARAUJO, R. S.; SILVA G. M. M. **Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos Atmosféricos de Fontes Automotivas: Uma breve revisão.** Instituto Federal do Ceará/Brasil. Março 2013.

[16] BECKER, MACIEL, E. M.; BRUCKER, N. **Avaliação da toxicidade aguda de benzo[a]pireno em ratos Wistar após exposição inalatória.** Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul 2011.

[17] CARUSO, M. S. F.; ALABURDA, J. **Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos - benzo(a)pireno: uma revisão** Revista do Instituto Adolfo Lutz. [s.l.] Instituto Adolfo Lutz, 2008. Disponível em:
<http://periodicos.ses.sp.bvs.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0073-98552008000100001&lng=pt>. Acesso em: 28 janeiro 2020.

[18] ASHINO T.E.B. **Ação da Piperlongumina em Modelo de Exposição Pulmonar ao Carcinógeno Benzopireno.** Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do

título de Mestre em Biociências. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. São José Do Rio Preto. 2020

[19] LATIMER, J.S. & ZHENG, J. 2003. **The sources, transport, and fate of PAHs in the marine environment. In: PAHs: An ecotoxicological perspective.** John Wiley & Sons, Ltd. ISBN: 0-471-56024-3. Pp 9-33 389

[20] LOPES, W.A. **Determinação de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos Associados ao Material Particulado Atmosférico.** Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal da Bahia. Salvador-BA. 2007.

[21] SUN, H. **In situ Determination of Multiple Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Uptake By Crop Leaf Surfaces Using Multi-Way Models.** ScienceDirect Environmental Pollution p. 1- 7, 2016.

[22] NAIDOO, G. **Uptake of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Their Cellular Effects in the Mangrove Bruguierragymnorhiza.** ScienceDirect Marine Pollution Bulletin, p. 1 – 7. 2016.

[23] ROCHA, S.D. **Estudo da Biodegradação de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPA) após Atuação de Consórcio Fúngico em Meio Mineral Suplementado com Petróleo Bruto.** XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química. Florianópolis - SC. 2014.

[24] CETESB (Companhia de Tecnologia Ambiental do estado de São Paulo). **Relatório de Qualidade das Águas Interiores do Estado de São Paulo.** São Paulo: Governo do Estado de São Paulo, Secretaria do Meio Ambiente, p. 540, 2008.

[25] SILVA, M. I. A. et al. **Estudo das Alterações Bioquímicas em Sangue e Diferentes Órgãos de PhrynopsGeoffroanus (Schweigger, 1812) (Testudines: Chelidae) Coletados em Ambiente Contaminado ou Expostos ao Benzo[a]Pireno.** Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em Biologia Animal, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. São José do Rio Preto – SP, 2015.

[26] GARCIA, A. C. F. S. **Bioprospecção e Obtenção de um Bioproduto Utilizando MicroOrganismos da Turfa para a Biodegradação de Hidrocarboneto Policíclico Aromático (HPA).** Tese apresentada ao Programa Pós-Graduação em Biotecnologia, para a obtenção do título de Doutor em Biotecnologia, da Universidade Federal de Sergipe. São Cristóvão – Sergipe. 2016.

[27] SOUZA, H. M. L. **Isolamento e seleção de Fungos filamentosos de sedimentos Contaminados do rio Negro com Potencial para Degradação de Hidrocarbonetos**

Policíclicos Aromáticos. Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede BIONORTE pela Universidade do Estado do Amazonas. Manaus - AM. 2015.

[28] SABINO, F. C., et. al. **HPA e Nitro-HPA em Ambiente Semifechado Impactado por Emissão da Combustão de Diesel/Biodiesel (B5).** Orbital: The ElectronicJournalofChemistry. Vol 7 N° 3, p. 245-252, 2015.

[29] SCHNEIDER, E. D. **Investigação do Potencial de Contaminação Ambiental Associado à Disposição em Solo de Resíduos Asfálticos.** Trabalho de Conclusão de Curso de graduação em Engenharia de Produção Civil, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR. Curitiba – PR. 2015.

[30]STOGIANNIDIS,E., LAANE, R. **Source Characterization of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Using Their Molecular Indices.** Reviews of Environmental ContaminationandToxicology. Vol 234, p 49-133. 2015.

[31]KOSLOWSK, L.A.D. **Estudo da Emissão Gases de Combustão Provenientes da Queima do Diesel S10 E S50.** XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química Florianópolis - SC. 2014.

[32]MA, Y. **Quantitative assessment of human health risk posed by polycyclic aromatic hydrocarbons in urban road dust.** ScienceDirect [Scienceof The Total Environment](#). p. 1 – 10, 2016.

[33] FREIRE, M. M. **Avaliação dos Efeitos da contaminação por Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Peixes (Genidensgenidens) do Litoral do Estado do Rio de Janeiro.** Tese de Doutorado apresentada ao Curso de Pós Graduação em Geociências para a obtenção do grau de Doutor da Universidade Federal Fluminense. Niterói –RJ. 2015.

[34] BARROSO, H.S. **Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) em organismos marinhos da Baía do Almirantado, Península Antártica.** Tese de Doutorado apresentada ao Instituto Oceanográfico da para a obtenção do grau de Doutor da Universidade São Paulo. São Paulo-SP. 2010.

[35] MENDES, M. F.; FREITAS, S. S., **Estudo de Materias Vegetais como Adsorventes para Remoção dos Agrotóxicos Trifluralina e α -Endossulfam de Solução Aquosa.** Unidade Acadêmica Especial de Física e Química, Universidade Federal de Goiás – Regional Catalão, Catalão, Brasil. 2014.

[36] JUNIOR, B. B. N. **Adsorção de Metanol em Aluminas.** Dissertacao apresentada ao Curso de Mestrado Engenharia Química da Universidade Federal da Paraíba Campina Grande - Paraíba. 1997.

[37] RODRIGUES C. C. S., **Hidrocarbonetos Policíclicos aromáticos em Sedimentos Superficiais de Sistemas Aquáticos Amazônicos (Estados do Pará e Amapá)**. Tese Apresentada Como requisito parcial à obtenção do Grau de Doutor em Ciências na Área de Geoquímica e Petrologia. Belém . 2018.

[38] MORAES, V. M. O.; **Avaliação do Potencial Mutagênico e Bioacumulador de Metais pesados de *Baccharis trimera* LESS E *Equisetum hyemale* L.** Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências e Letras de Assis – UNESP – Universidade Estadual Paulista para a obtenção do título de Mestre em Biociências. Assis – SP. 2014.

[39] WAQAS, M., KHAN, S., CHAO, C., et al., 2014a. **Quantification of PAHs and health risk via ingestion of vegetable in Khyber Pakhtunkhwa Province, Pakistan.** Sci. Total Environ. 497–498, 448–458.

[40] WU, C. **Concentrations and potential health hazards of polycyclic aromatic hydrocarbon in shallow groundwater of a metal smelting area in Southeastern China.** [Science of The Total Environment](#). Vol 569-570, p. 1561 – 1569. 2016.

[41] LUCAS, J. **Effects of Pyrolytic and Petrogenic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons on swimming and Metabolic Performance of Zebrafish Contaminated by Ingestion.** ScienceDirect Ecotoxicology and Environmental Safety, Vol. 132, p. 145-152, 2016.

[42] SOUZA, R. B. G. **Avaliação da Contaminação por hidrocarbonetos do Solo e da Água da Região de Avaré.** Dissertação apresentada como requisito para obtenção do título de Mestre em Engenharia Civil e Ambiental da Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho”. Bauru - SP. 2016.

[43] MOREIRA, I. S.; SOUZA F. C. **Eficiência de Soluções Antimicrobiana na Desinfecção de Alface Tipo Crespa Comercializada em Feira Livre.** Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável. 2013 Universidade Federal de Campina Grande, Pombal - PB.

[44] LIMA, M. E.; **Avaliação do desempenho da cultura da alface (*Lactuca sativa*, L.) cultivada em sistema orgânico de produção, sob diferentes lâminas de irrigação e coberturas do solo.** Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências, no curso de Pós-Graduação em Fitotecnia. Seropédica, RJ Fevereiro de 2007.

[45] SILVA, W. F.; MARQUES, D. J.; SILVA, E. C. **Diagnóstico da produção de hortaliças na região metropolitana de Belo Horizonte.** Universidade de Alfenas, UNIFENAS, Alfenas-MG Março de 2015. [20] SILVA, M. I. A. et al. **Estudo das**

alterações bioquímicas em sangue e diferentes órgãos de Phrynops geoffroanus (Schweigger, 1812) (Testudines: Chelidae) coletados em ambiente contaminado ou expostos ao benzo[a]pireno. Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biologia Animal, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. São José do Rio Preto – SP, 2015.

[46] CUBA, S. R. ; CARMO, R. S. ; SOUZA, F. C. ; BASTOS, G. R. **Potencial de Efluente de Esgoto Doméstico Tratado como Fonte de Água e Nutrientes no Cultivo Hidropônico de Alface.** Rev. Ambient. Água vol.10 no.3 Taubaté July/Sept. 2015. Universidade Federal de São Carlos (UFSCAR) Araras, SP, Brasil

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

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

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

[50] FURLANI PR; SILVEIRA LCP; BOLONHEZI D; FAQUIM V. 1999. **Cultivo hidropônico de plantas.** Campinas: IAC. 52p. (Boletim técnico, 180). FURLANI, P.R.; SILVEIRA, L.C.P.; BOLONHEZI, D.; FAQUIM, V. Cultivo Hidropônico de Plantas: Parte 2 - Solução Nutritiva. 2009. Artigo em Hypertexto. Disponível em: <http://www.infobibos.com/Artigos/2009_2/hidroponiap2/index.htm>. Acesso em: 15/3/2021

[51] GOMES, M. T. ; **Efeito do CO2 Aplicado na Água de Irrigação e no Ambiente sobre a Cultura da Alface (*Lactuca sativa* L.)** Tese de Doutorado apresentada a Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” Universidade de São Paulo, em Outubro Piracicaba SP Brasil 2001.

[52] JUNIOR, J. J. M. S.; **Identificação de Espécies Vegetais por Meio de Análise de Imagens Microscópicas de Folhas.** USP – São Carlos. Março 2008.

[53] SANTOS, A. P. R. ; **Características Agronômicas e Qualidade da Alface (*Lactuca sativa* L.) Sob Fertilização Orgânica e Mineral.** Tese Doutorado em Agronomia. Brasília – DF. Fevereiro 2016.

[54] SUGAUARA, L. E.; **Influência da fuligem da queima da palha de cana-de-açúcar na presença de HPA em hortaliças de consumo humano.** Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química. Araraquara. 2014.

[55] SKOOG;, D.A., et al., **Fundamentals of Analytical Chemistry.** 8ª edição,ed. T. Learning. Belmont-USA. 670 - 703, 2006.

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

[57] ANDRADE, C. S. **Caracterização Geofísica da Vulnerabilidade Ambiental na Cidade de Dourados.** III Congresso Brasileiro de Gestão Ambiental Goiânia-GO. 2012. CARVALHO, V. V. **Caracterização química das frações de N-metil-pirrolidona de asfaltenos por Espectrometria de massas de Ressonância Ciclôtrônica de Íons com Transformada de Fourier.** Dissertação submetida como para obtenção do Grau de Mestre em Química à Universidade Federal de Goiás, UFG. Goiânia – GO. 2016

[58] REQUE, P. T. et al **Avaliação da Biodegradabilidade de Lixiviado de Aterro Sanitário Consorciado com esgoto Doméstico em um Sistema Biológico de Tratamento de Efluentes.** Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRS. Porto Alegre - RS. 2015.

[59] LOPES, W.A. **Determinação de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos Associados ao Material Particulado Atmosférico.** Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal da Bahia. Salvador-BA. 2007.

[60] FREITAS, J. C.; **Avaliação da Alocasia macrorrhiza como Fitorremediadora dos metais Cd, Cr, Cu, Ni, Pb, Zn.** Universidade Federal do Amazonas Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia. Manaus 2009.

[61] ROSA, L. DOS S. **Determinação de HPAs no sistema fluvial do município de**

Dourados. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal da Grande Dourados, 2017.

[62] MARTINAZZO, E. G. **Atividade Fotossintética em Plantas do Gênero *Prunus*.** Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências. Pelotas, Rio Grande do Sul – Brasil, Novembro de 2011.

[63] VO-DINH, T.; Martinez, P.R. Chemistry and Analysis of Hydrocarbons in the Environment. **Anal. Chim. Acta** Vol 13. p. 125. 1981.

[64] RODRIGUES, J. M. **Estudo de Viabilidade da Técnica de Espectroscopia de Fluorescência Sincronizada para Identificação Simultânea de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) em Matrizes Líquidas.** Dissertação para a obtenção do título de Mestre pela Universidade Federal da Grande Dourados – UFGD. 2013.

[65] OLIVEIRA, R. A. N. **Determinação dos Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos Pireno e Bero[a]Pireno em Amostras de Água com Aplicação da Técnica de Espectroscopia de Fluorescência sincronizada com Diferentes extrações.** Dissertação para a obtenção do título de Mestre pela Universidade Federal da Grande Dourados – UFGD. 2015.

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

[67] CARVALHO, J. C. **Uso da Técnica de Espectroscopia para a Análise da Interação entre HPAs e o Sistema Fotossintético da Alface (*Lactuca sativa*, L).** Dissertação para a obtenção do título de Mestre pela Universidade Federal da Grande Dourados – UFGD. 2019.

[68] PINHEIRO, F. C.; MEZACASA, A. ; CAIRES, A. R. L. **Alteração do Status Fisiológico de Plantas de Soja Induzido por Nanopartículas de Prata : Avaliação Via Espectroscopia de Fluorescência.** Faculdade de Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados - UFGD. 2014.

[69] NUPIS - Núcleo de pesquisas em instrumentação e separações analíticas. Métodos de Calibração UFJF. Disponível em: <https://www.ufjf.br/nupis/files/2010/09/M%c3%a9todos-de-Calibra%c3%a7%c3%a3o.pdf> Acesso em 8 de junho 2021.

[70] INMETRO, Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. **DOQ_CGCCRE-008. Orientações Sobre Validação de Métodos Analíticos.** Revisão 04 – JUL/2011.

[71] ANVISA, **Guia para Qualidade em Química Analítica** – Uma Assistência a Acreditação, Vol. 1, 1. ed, Brasília, 2004. Disponível em http://www.anvisa.gov.br/reblas/III_enc_desenvolvimento_anal%EDtico.pdf

[72] KOBAYASHI, Y.; UMEMOTO, T. , TAKESHITA, Y. **Functional characterization and substrate specificity of a novel gene encoding zinc finger-like protein, ZfLp**, in *Xenopus laevis* oocytes. *J Toxicol Sci* 1 de Janeiro de 2012; 37 (4): 699-709.

[73] ARAUJO, S. A. DO C.; DEMINICIS, B. B. **Fotoinibição da Fotossíntese**. v. 4, p. 463–472, 2009.

[74] MATA, A. C.; ALARCON, M. N. **Spent coffee grounds improve the nutritional value in elements of lettuce (*Lactuca sativa* L.) and are an ecological alternative to inorganic fertilizers**. *Food Chemistry* Volume 282, 1 June 2019, Pages 1-8.

[75] LIMA, J. D.; SILVA, B. M. S.; MORAES, W. S. **Efeitos da Luminosidade no Crescimento de Mudanças de *Caesalpinia ferrea* Mart. ex Tul. (Leguminosae, Caesalpinoideae)** *Acta Amaz.* vol.38 no.1 Manaus 2008

[76] NUNES, J.L.S. Eng. Agrº, Dr. em Fitotecnia. **Nutrição via Raízes - Absorção Radicular**. Disponível em: https://www.agrolink.com.br/fertilizantes/nutricao-via-raizes---absorcao-radicular_361459.html#:~:text=A%20capacidade%20das%20plantas%20para,desenvolver%20um%20extensivo%20sistema%20radicular.&text=A%20absor%C3%A7%C3%A3o%20de%20C3%ADons%20C3%A9,mais%20distante%20do%20C3%A1pice%20radicular. Acesso em 07 de maio 2021.

[77] MINKINA, T., SUSHKOVA, S., YADAV, B. K., RAJPUT, V., MANDZHIEVA, S., et al. (2019b). **Accumulation and transformation of benzo[a]pyrene in Haplic Chernozem under artificial contamination**. *Environmental Geochemistry and Health*. <https://doi.org/10.1007/s10653-019-00362-y>.

[78] RAJPUT, V., MINKINA, T., SEMENKOV, I.; **Phylogenetic analysis of hyperaccumulator plant species for heavy metals and polycyclic aromatic hydrocarbons**. *Environ Geochem Health* <https://doi.org/10.1007/s10653-020-00527-0>. Janeiro. 2020.

[79] ANDRADE, R. R.; **Efeito da concentração da solução nutritiva em cultivares de alfaces em sistema hidroponico tipo NFT, em clima semiárido**. Tese apresentada ao Programa de PósGraduação em Engenharia Agrícola da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza 2019.

[80] SANTOS, S. R. N. **Fenologia e propagação de *Amburana cearensis* (Arr. Cam.) A.C. Smith** Universidade Federal da Paraíba Centro de Ciências Agrárias - Areia - PB 2014.

[81] KHAN S., WANG N., REID BJ., FREDDO A., CAI C., **Reduced bioaccumulation of PAHs by *Lactuca sativa* L. grown in contaminated soil amended with sewage sludge and sewage sludge derived biochar.** Environ Pollut 2013;175:64–8.

[82] SOUTO, G. C. **Desempenho Agronômico e Acúmulo de Nutrientes pela Planta de Jambu.** Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia da Universidade Federal Rural do Semi-Árido como requisito para obtenção do título de Doutor em Agronomia: Fitotecnia Mossoró/RN 2016.