

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

**DETERMINAÇÃO DE BENZO(A)PIRENO EM PESCADOS
COMERCIALIZADOS EM CAMPINAS-SP**

PARECER

Este exemplar corresponde à
redação final da tese defendida por
Antonio Azeredo, aprovada pela
Comissão Julgadora em 26 de abril
de 2001.

Campinas, 27 de abril de 2001

maria cecilia f. toledo

Profa. Dra. Maria Cecília de F. Toledo
Presidente da Banca

Antonio Azeredo

Médico Veterinário

Profa. Dra. Maria Cecília de Figueiredo Toledo

Orientadora

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da
Universidade Estadual de Campinas para a obtenção do título de Mestre em
Ciência de Alimentos

CAMPINAS - SP
2001

09/04/01

UNICAMP

71 UNICAMP
 Az24d
 V. 0 Ex.
 TOMBO BC/ 45213
 PROC. 16.392/01
 C ☐ D ☒
 PREÇO R\$ 11,00
 DATA 07/07/01
 N.º CPD

CM00157653-2

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
 BIBLIOTECA DA F.E.A. - UNICAMP

Az24d Azeredo, Antonio
 Determinação de benzo (A) pireno em pescados
 comercializados em Campinas-SP / Antonio Azeredo. –
 Campinas, SP: [s.n.], 2001.

Orientador: Maria Cecília de Figueiredo Toledo
 Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de
 Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos.

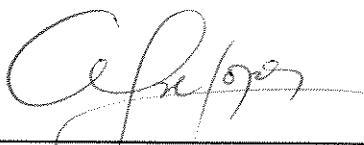
1.Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. 2.Análise.
 3.Peixe. 4.Pescados. 5.Toxicologia. I.Toledo, Maria Cecília de
 Figueiredo. II.Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de
 Engenharia de Alimentos. III.Título.

BANCA EXAMINADORA



Profa. Dra. Maria Cecília de Figueiredo Toledo
(orientadora)

Profa. Dra. Adriana Zerlotti Mercadante
(membro)



Prof. Dr. Celso Costa Lopes
(membro)



Profa. Dra. Helena Teixeira Godoy
(membro)

Aos Meus Pais

À Ana Paula, com amor

Dedico

Agradecimentos

À Maria Cecília de Figueiredo Toledo pela orientação, atenção, dedicação e especialmente pelo suporte técnico da pesquisa;

aos professores Adriana Z. Mercadante, Celso C. Lopes e helena T. Godoy pelas sugestões apresentadas para o trabalho. Em especial à professora Helena pelas dicas e sugestões durante as análises;

aos meus pais Jarbas e Inez e à minha querida Maninha por todo apoio;

à Ana Paula Trovatti Uetanabaro pelo carinho, companheirismo, paciência e incentivo;

à Rita, Sílvia Amélia, Sílvia Helena, Maria José pelos momentos de descontração. Em especial à Rita por toda ajuda e companheirismo.

à Mônica C. R. de Camargo pela valiosa ajuda, por todas as dicas e sugestões que certamente muito enriqueceram este trabalho;

aos funcionários da UNICAMP Waldecy, Edinho, Seu Douglas , Nilo, José Roberto, Caê, Flor, e todos aqueles que de alguma forma colaboraram para a confecção deste trabalho;

ao pessoal da secretaria do depto. de Ciência de Alimentos: Marquinhos, Marcão, Jardete, Ricardo e agregados pelo bom humor, atenção e disposição;

aos amigos Caveira e Biba pelo companheirismo, apoio nas horas difíceis e pelos momentos de lazer.

aos amigos Zequinha e Ana pelo apoio, pelas dicas e pelos cafés;

aos amigos da FEA: Rodrigo, Hélio, Marcus (Acre), Jesuí, Marcelo, Gisele, Lucilene, Luciana, Elenice, Raquel, Karlinha, Simara, Marcela, Juliana, Denise e Mercedes (bioaromas) e todos aqueles que estiveram próximos nesta etapa e

à profa. Maria Regina B. Franco e Natália S. Janzanti pela disposição e pelo suporte técnico.

Índice

Resumo Geral.....	ix
General Summary.....	x
Introdução Geral.....	1
Referências bibliográficas.....	3
 Capítulo 1 – Revisão Bibliográfica.....	 4
1 – HPAs.....	5
2 – HPAs no Ambiente.....	7
3 – HPAs em Alimentos.....	8
4 – HPAs em Pescados.....	12
5 – Aspectos Toxicológicos.....	15
6 – Análise de HPAs.....	18
7 – Avaliação da Metodologia.....	22
Referências bibliográficas.....	26
 Capítulo 2 – Determinação de benzo(a)pireno em pescados comercializados na região de Campinas – SP.....	 41
Resumo.....	42
Abstract.....	43
1 – Introdução.....	44
2 – Materiais e Métodos.....	46

2.1 – Amostras.....	46
2.2 – Metodologia.....	46
2.2.1 – Extração.....	46
2.2.2 – Purificação da amostra.....	47
2.2.3 – Desenvolvimento Cromatográfico.....	48
2.2.4 – Quantificação.....	48
2.2.5 – Recuperação do método.....	49
3 – Resultados e Discussão.....	49
4 – Conclusões.....	58
5 – Referências bibliográficas.....	59

Índice de tabelas e figuras

Capítulo 1 – Revisão Bibliográfica

Figura 1 – Fórmulas estruturais de alguns HPAs.....	16
Tabela 1 – Níveis de B(a)P em alguns alimentos no Brasil.....	11
Tabela 2 – Níveis de B(a)P em alguns peixes e frutos do mar.....	12
Figura 2 – Formação de epóxido a partir do B(a)P.....	16
Tabela 3 – Técnicas usadas para separação e detecção de HPAs.....	19
Tabela 4 – Alguns solventes usados em extrações e como fase móvel de HPAs por CLAE.....	21

Capítulo 2 – Determinação de benzo(a)pireno em pescados comercializados em Campinas-SP

Figura 1 – Cromatograma do padrão de B(a)P e das amostras atum em lata e sardinha em lata.....	51
Figura 2 – Cromatograma da amostra tainha defumada pelo processo caseiro	52
Figura 3 – Cromatograma da amostra salmão defumado em lata.....	53
Tabela 1 – Teor de B(a)P em peixes.....	56
Tabela 2 – Teor de B(a)P em frutos do mar	57

RESUMO GERAL

Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), entre os quais o benzo(a)pireno (B[a]P) é um dos mais estudados, são contaminantes formados pela pirólise incompleta da matéria orgânica e processos tecnológicos. Estes compostos estão presentes no meio ambiente e nos alimentos e caracterizam-se por apresentarem elevada toxicidade. A presença de B(a)P e outros HPAs carcinogênicos no ambiente e a sua transferência para os alimentos de diversas origens têm despertado interesse nos pesquisadores de vários países. Seu potencial tóxico em animais caracteriza-se por sinais clínicos que variam desde lesões em tecidos até a indução de câncer em diferentes órgãos. Tendo em vista a ausência de dados sobre os níveis de contaminação de pescados por HPAs totais ou carcinogênicos no Brasil, o presente estudo teve o objetivo de quantificar B(a)P em amostras de pescados *in natura* e processados e de frutos do mar disponíveis no comércio da cidade de Campinas. A metodologia utilizada envolveu saponificação, extração com n-hexano, limpeza em cartucho de sílica e separação por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fluorescência. A presença de B(a)P foi detectada em todas as amostras analisadas, em quantidades variando na faixa de 0,03 a 3,45 µg/kg. Os maiores níveis de contaminação foram encontrados em produtos defumados e mexilhões.

GENERAL SUMMARY

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), of which benzo(a)pyrene (B[a]P) is the most studied one, are contaminants formed by the incomplete pyrolysis of organic matter and from technological processes. These compounds are present in the environment and in foods, and present potential toxicity. The presence of the B(a)P and other carcinogenic PAHs in the environment and its transference to foods of different origins has aroused interest in many researchers around the world. Its toxic potential is characterized by clinical signs that go from tissue lesions to the induction of cancer in different organs. Considering the lack of data about their levels in fish products in Brazil, this study aimed at quantifying the B(a)P in samples of raw and processed seafoods available on the retail market in Campinas – SP. The methodology involved saponification, extraction by n-hexane, clean-up using silica cartridges, and separation by high performance liquid chromatography with a fluorescence detector. B(a)P was detected in all samples analysed at levels ranging from 0,03 to 3,45 µg/kg. The highest levels of contamination were found in smoked products and mussels.

INTRODUÇÃO GERAL

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) são compostos produzidos pela queima incompleta de matéria orgânica e pela degradação do petróleo por ação de alguns microrganismos presentes no meio ambiente, tais como algas e bactérias (HOWARD e FAZIO, 1980).

Sabe-se que alimentos como óleos e gorduras de origem vegetal ou animal, carnes e derivados, peixes, frutos do mar e vegetais em geral podem ser contaminados por HPAs, tanto devido à deposição de partículas em sua superfície, quanto pela formação destes compostos por processos tecnológicos e métodos tradicionais de preparação, como defumação e grelhagem. Dados da presença de HPAs em alimentos no Brasil têm evidenciado uma concentração relativamente alta de benzo(a)pireno em produtos cárneos e óleos vegetais nacionais (NOLL, 1993; PUPIN, 1994; TOLEDO e CAMARGO, 1998).

Peixes, moluscos, crustáceos e outros organismos marinhos estão sujeitos à contaminação por HPAs, visto que os ambientes aquáticos normalmente são acometidos por acidentes envolvendo derramamento de petróleo e seus derivados, efluxos industriais e outras fontes de HPAs. Tais acidentes são fontes potenciais de HPAs na natureza e podem comprometer a longo prazo as funções dos ecossistemas costeiros e suas populações tradicionais. O binômio HPAs/pescados é de extrema importância pelo fato do pescado contaminado representar uma fonte de exposição humana a estes contaminantes e por

possível perda econômica decorrente da depreciação das carcaças, ocasionada pelo desenvolvimento de processos cancerígenos em peixes e outras espécies marinhas.

Estudos feitos em diversas partes do mundo têm também associado o consumo de alimentos contendo B(a)P à etiologia de vários processos carcinogênicos (como cânceres de pele, pulmão e estômago), mutagênicos e citotóxicos no homem (PHILLIPS, 1999).

Como no Brasil não há dados sobre a contaminação de pescados por B(a)P, torna-se importante a presente investigação, que teve como objetivo gerar dados que subsidiem os órgãos responsáveis pela saúde pública na avaliação do risco potencial da ingestão de B(a)P através deste grupo de alimentos.

O capítulo 1 deste trabalho apresenta uma revisão bibliográfica sobre o assunto, no formato tradicional. O artigo apresentado no capítulo 2 foi redigido segundo as normas da revista Ciência e Tecnologia de Alimentos. Os capítulos estão descritos a seguir.

Capítulo 1. Revisão bibliográfica

Capítulo 2. Determinação de benzo(a)pireno em pescados comercializados na região de Campinas - SP

Referências bibliográficas

HOWARD, J. W. e FAZIO, T. Review of polycyclic aromatic hydrocarbons in foods.

Journal of Association of Official Analytical Chemists, vol.63, n.5, 1980.

NOLL, I. B. Avaliação da contaminação de carnes por hidrocarbonetos policíclicos

aromáticos. **Tese de Doutorado**. Faculdade de Engenharia de Alimentos.

UNICAMP. Campinas, SP, 108p, 1993.

PHILLIPS, D. H. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the diet. **Mutation**

Research, vol.443, p. 139-147, 1999.

PUPIN, A. M. Avaliação da contaminação de óleos e azeites vegetais por

benzo(a)pireno. **Tese de Mestrado**. Faculdade de Engenharia de Alimentos,

UNICAMP. Campinas, SP, 89p, 1994.

TOLEDO, M. C. F. e CAMARGO, M. S. F. O. Benzo(a)pireno em óleos de milho

produzidos e comercializados no Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**,

vol.18, p.73-76, 1998.

Capítulo 1

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1 – HPAs

Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) consistem de dois ou mais anéis benzênicos fundidos em arranjos lineares ou angulares. Eles são formados durante a queima incompleta de matéria orgânica e estão amplamente distribuídos no meio ambiente (BARRICK, 1982; WILSON e JONES, 1993). As estruturas de alguns HPAs estão ilustradas na Figura 1.

Este grupo de contaminantes caracteriza-se por ser constituído exclusivamente de carbono e hidrogênio, por apresentar fluorescência, pelo alto ponto de ebulição e pela alta solubilidade em solventes orgânicos (COOK *et al.*, 1933).

Nos últimos anos, a descoberta da presença de HPAs em diferentes alimentos e seus efeitos no ambiente, bem como em organismos que nele vivem, têm despertado grande interesse na comunidade científica, principalmente devido ao potencial comprovadamente carcinogênico e citotóxico de alguns representantes deste grupo (STRICKLAND *et al.*, 1993).

Os primeiros testes que mostraram a carcinogenicidade dos produtos obtidos pela destilação do alcatrão foram feitos em orelha de coelhos por YAMAGIWA e YCHIGAWA, em 1912 (IARC, 1985). Somente em 1924 foi atribuída a ação carcinogênica aos hidrocarbonetos de alto ponto de ebulição presentes no alcatrão (KENNAWAY, 1955).

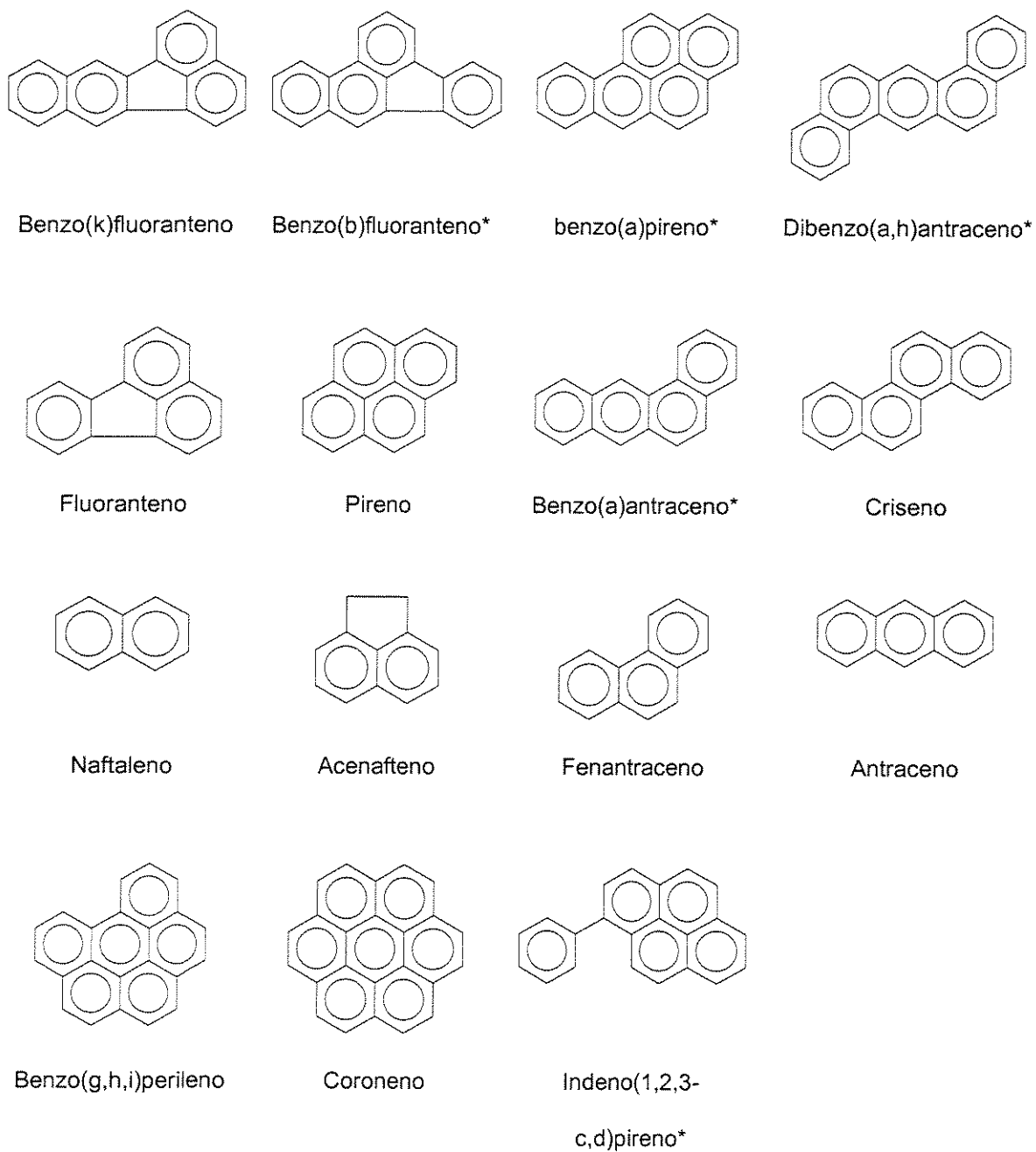


Figura 1- Fórmulas estruturais de alguns HPAs. (*) Compostos carcinogênicos.

Em 1951, através do trabalho de A.C. Miller, evidenciou-se que o B(a)P quando aplicado na pele de ratos produzia compostos intermediários carcinogênicos que se ligavam às proteínas aí presentes. Outras investigações subsequentes indicaram que a aplicação de benzo(a)pireno (B[a]P) e outros HPAs carcinogênicos, também em pele de rato, resultava na ligação covalente dos metabólitos a proteínas, DNA e RNA. A carcinogenicidade do B(a)P se deve à ligação covalente dos seus produtos de metabolismo com o DNA (CONNEY, 1982).

2 – HPAs no Ambiente

Na natureza, a biossíntese de alguns HPAs ocorre em algumas plantas e microrganismos (WILSON e JONES, 1993). Porém, segundo os mesmos autores, esta pode ser considerada uma fonte pouco significativa quando comparada às de origem antrópicas, ou seja, os processos de combustão industrial e domésticos e acidentes ambientais. Como exemplos destes acidentes podem ser citados o derramamento de petróleo, involuntário ou não, e descargas de navios que operam com tais combustíveis (HELLOU *et al.*, 1994).

HPAs já foram encontrados distribuídos no ambiente, especialmente no ar (LODOVICI *et al.*, 1998), água (BEYER *et al.*, 1998) e solos (TRAPIDO, 1999). BAUMARD *et al.* (1989) consideram que o conteúdo dos sedimentos é um bom indicador para a média de contaminação por HPAs no ambiente marinho, principalmente em populações críticas.

A persistência destes contaminantes no ambiente marinho se deve principalmente à baixa solubilidade em água e também à tendência deles associarem-se à matéria orgânica do sedimento, que é fonte constante de alimento para um grande número de organismos aquáticos (PINO *et al.*, 2000). LIPIATOU e SALIOT (1991) encontraram concentrações de benzo(a)pireno entre 1 e 36 µg/kg em sedimento do Golfo de Lyon, enquanto FATTORI *et al.* (1997) relataram contaminação na ordem de 20 µg/kg em sedimento do Mar Adriático.

3 – HPAs em Alimentos

Os alimentos são considerados importantes fontes de exposição humana aos HPAs, havendo inclusive estudos que os relacionam a algumas etiologias de câncer (DE VOS *et al.*, 1990). A contaminação de alimentos por HPAs pode ocorrer por diferentes formas, incluindo contato com solo, ar e água contaminados e pelo emprego de algumas técnicas de processamento caseiro e industrial, como secagem, defumação, tostagem e grelhagem (PHILLIPS, 1999). ZABIK *et al.* (1996) demonstraram que peixes defumados ricos em gordura, assim como as carnes vermelhas, são fonte significativa de exposição aos HPAs.

A presença de HPAs já foi descrita em diferentes grupos de alimentos tais como carnes assadas na brasa (NOLL e TOLEDO, 1997), alimentos defumados (BAILEY e DUNGAL, 1958; FRETEIN, 1976; FAZIO e HOWARD, 1983; GOMAA *et al.*, 1993; YABIKU, *et al.*, 1993; NOLL e TOLEDO, 1997; FALCÓN *et al.*, 1999; MORET *et al.*, 1999), óleos e gorduras (SPEER e MONTAG, 1988; MENICHINI

et al., 1991; PUPIN e TOLEDO, 1996 a e b; TOLEDO e CAMARGO, 1998), vegetais e frutas (VOUTSA e SAMARA 1998; KIPOPOULOU *et al.*, 1999), cereais (LAWRENCE e WEBER, 1984a; DENNIS *et al.*, 1991), açúcar, frutos do mar, fumaça líquida (GOMAA *et al.*, 1993) e bebidas (HOWARD e FAZIO, 1980; DENNIS *et al.*, 1991).

O controle de alguns parâmetros importantes como temperatura, distância da fonte geradora e concentração de fumaça pode contribuir para a diminuição da contaminação de produtos defumados por HPAs. Nos processos de defumação industrial mais modernos a fumaça é gerada numa câmara separada e tratada antes de passar à câmara de defumação. Passagem por filtros eletrostáticos e “lavagem” da fumaça são algumas das técnicas utilizadas para diminuir a contaminação da fumaça por HPAs (MORET *et al.*, 1999).

Ao contrário da defumação, alguns processos tecnológicos são efetivos na diminuição da contaminação por HPAs. Óleos vegetais que sofreram refinamento, desodorização e tratamento com carvão ativado apresentam contaminação mais baixa que os óleos não tratados (MORET e CONTE, 2000).

Diversas pesquisas realizadas no Brasil avaliaram a contaminação em alimentos e bebidas por HPAs. TOLEDO e CAMARGO (1998) investigaram a presença de B(a)P em diferentes marcas de óleo de milho durante o período de dois anos. Os níveis encontrados nas 49 amostras analisadas variaram entre 0,85 e 25,17 µg/kg, sendo que apenas uma delas apresentou níveis de B(a)P abaixo do limite referencial de 1,0 µg/kg.

Determinações de B(a)P em cana de açúcar e derivados, melado, aguardente, carne queimada, açúcar mascavo, demerara e cristal evidenciaram uma contaminação por B(a)P na faixa de 0,10 a 0,40 µg/kg. As amostras de açúcar e derivados que sofreram refinamento apresentaram contaminação mais baixa (SERRA *et al.*, 1995). Outros dados relacionados com a presença de B(a)P em alimentos disponíveis no mercado nacional estão apresentados na Tabela 1.

TAKATSUKI *et al.* (1985) analisaram pescados de uma área não industrializada do Japão e observaram em filés de várias espécies de peixe contaminação abaixo do limite referencial para B(a)P e quantidades superiores a 3 µg/kg nos mariscos. Os peixes, em geral, conseguem biotransformar os HPAs de forma muito mais eficiente que os moluscos. Nestes últimos a contaminação persiste por longos períodos e, quando são coletados em locais poluídos, podem apresentar contaminação com HPAs na ordem de mg/kg (PHILLIPS, 1999).

A avaliação da presença de HPAs em amostras de mexilhões (*Mytilus edulis*) da costa da Finlândia indicou níveis de contaminação por benzo(a)pireno que variaram de 3 a 5 µg/kg (RAINIO *et al.*, 1986). SPEER *et al.* (1990) encontraram níveis de B(a)P na faixa de 0,2 a 2,7 µg/kg em ostras.

KANGSADALANPAI *et al.* (1996) observaram que entre diversos alimentos avaliados, os peixes defumados de água doce: catfish (*Clarias batrachus*), Sheat (*Kytopterus apogon*) e Mimrow (*Crossocheillus reba*) apresentavam teores médios de HPAs carcinogênicos e HPAs totais, na faixa de 0,68 a 3,63 µg/kg e 3,89 a 12,15 µg/kg, respectivamente.

Tabela 1- Níveis de B(a)P em alguns alimentos no Brasil

Amostra	n	B(a)P (µg/kg) média		Referência
Carne bovina ¹	6	ND – 1,15	0,56	NOLL e FIGUEIREDO 1997
Carne bovina ²	6	0,17 – 16,41	7,08	
Picanha defumada ³	9	2,39 – 6,09	4,61	NOLL e TOLEDO 1997
Salame defumado ⁴	3	ND – 0,34	-	
Picanha ⁵	4	3,1 – 10,7	7,8	NOLL e TOLEDO 1995
Picanha ⁶	3	ND – 0,3	0,2	
Óleo de milho	49	0,85 – 25,17	-	TOLEDO e CAMARGO 1998
Azeite de oliva ⁷	7	0,6 – 1,2	0,6	PUPIN e TOLEDO 1996b
Azeite de oliva ⁸	10	0,5 – 164,4	10,3	

(1) Assada a 40 cm da fonte de comburente; (2) Assada a 15 cm da fonte de comburente; (3) Defumado pelo processo caseiro; (4) Defumado industrialmente; (5) Assada a 15 cm da fonte de comburente (madeira)/sem gordura; (6) Assada a 15 cm da fonte de comburente (carvão)/sem gordura; (7) Europeu enlatado na origem; (8) Argentino

ND – Não detectado

n – número de amostras

Outros níveis de contaminação de peixes e frutos do mar por B(a)P são mostrados na Tabela 2.

Tabela 2- Níveis de B(a)P em alguns peixes e frutos do mar

Alimento	B(a)P ($\mu\text{g/kg}$)	Referência
Ostras defumadas (enlatadas)	10,1 – 12,2	SPEER <i>et al.</i> 1990
Mexilhões (enlatados)	0,3 - 1,7	SPEER <i>et al.</i> 1990
Truta defumada	6,22 - 10,27	ZABIK <i>et al.</i> 1996
Truta defumada	tr - 0,3	MORET <i>et al.</i> 1999
Sardinha defumada	2,46	FALCÓN <i>et al.</i> 1999

tr = traços

4 – HPAs em Pescados

A literatura disponível sobre a ocorrência, quantificação e efeitos dos HPAs em pescados é bastante abrangente. Diversos estudos têm sido conduzidos em diferentes países e regiões como Bermudas (SOLBAKKEN *et al.*, 1982), Alemanha (SPEER *et al.*, 1990), Noruega (PALMORK e SOLBAKKEN, 1981), Estados Unidos (HUMASON e GADBOIS, 1982; ROBERTS *et al.*, 1989), Golfo do México (JACKSON *et al.*, 1994) e Índia (SIVASWAMY *et al.*, 1990), o que indica que a distribuição dos HPAs assim como a sua bioacumulação em alguns frutos do mar é um problema mundial.

McLEESE *et al.* (1987) investigaram o acúmulo de HPAs em pescados de interesse comercial, expostos a água e sedimentos contaminados. Os resultados

mostraram que mexilhões, mariscos, e camarões tendem a incorporar este poluente nos seus tecidos em períodos relativamente curtos (4 dias), tornando-os importante fonte de HPAs para o homem.

Os HPAs encontram-se concentrados nos sedimentos marinhos, principalmente em águas costeiras, onde estão disponíveis principalmente para peixes que se alimentam do fundo e para organismos filtradores (PHILLIPS, 1999). Bivalvos, devido a sua capacidade de filtrar eficientemente as partículas suspensas na água do mar, podem estar cronicamente expostos a sedimentos contendo HPAs em estuários poluídos (PRUEL *et al.*, 1987; BAUMARD *et al.*, 1999).

DAWE *et al.* (1964) foram os primeiros a sugerir que a elevada prevalência de neoplasias em populações de peixes estava ligada à contaminação ambiental. Desde então um grande número de estudos observando a ocorrência de neoplasias em populações selvagens de peixes tem sido feito (BAUMANN, 1998).

Alguns pesquisadores observaram vários outros efeitos nocivos dos HPAs em peixes. HARGIS e ZWERNER (1984), por exemplo, detectaram lesões macroscópicas de pele assim como erosões na barbatana e hiperemia. Nas amostras de tecidos coletadas foram encontradas lesões microscópicas tais como hiperplasia e destruição lamelar das brânquias, necrose focal e desorganização mural do fígado, congestão de vasos com degeneração do epitélio tubular renal e rompimento cortical do aparelho ocular, entre outras. Os autores concluíram que os sinais de doença interna e externa estão possivelmente associados aos sedimentos altamente contaminados com HPAs.

VARANASI *et al.* (1989) observaram que linguado (*Parophrys vetulus*), uma espécie de peixe encontrado na Virgínia, Estados Unidos, originário de áreas contaminadas com o benzo(a)pireno, mostravam alta prevalência de neoplasias no fígado.

GEIGER e BUIKEMA (1982) testaram a toxicidade aguda e crônica dos HPAs em *Daphnia pulex* usando óleo combustível e creosoto com cerca de 90% de HPAs. Em testes agudos produziu-se mortalidade no período de até 24 horas de contato e nos testes crônicos foram avaliados os parâmetros crescimento e reprodução. A partir destes resultados, os autores concluíram que os HPAs são responsáveis por efeitos de intoxicação crônica, reduzindo as taxas de crescimento e reprodução do microcrustáceo planctônico *Daphnia pulex*, o que pode ser extrapolado para outros organismos.

Ao contrário dos pesticidas organoclorados e policlorobifenilas, não se observa acumulação de HPAs em tecidos de peixes. Sabe-se que os peixes metabolizam os HPAs rapidamente em compostos intermediários que se ligam ao DNA do fígado ou formam conjugados que passam à bile. Os HPAs são transformados em epóxidos, fenóis, quinonas, dihidrodíóis, ou em outros compostos na primeira fase do processo de biotransformação. Na segunda fase, os produtos formados conjugam-se com substâncias altamente hidrossolúveis como tripeptídeo de glutatona e açúcar derivado do ácido glucurônico (POINTET e MILLIET, 2000).

5 – Aspectos Toxicológicos

De acordo com testes em animais de laboratório, os compostos benzo(a)pireno, benzo(b)fluoranteno, benzo(a)antraceno, indeno(1,2,3-c,d)pireno e dibenzo(a,h)antraceno são apontados como HPAs carcinogênicos (LO e SANDI, 1978; FAZIO E HOWARD, 1983; IARC, 1983; KRAMERS e VAN DER HELJDEN, 1988).

Os HPAs são rapidamente absorvidos pela pele, pulmões e trato gastrointestinal. A exposição a estes compostos é geralmente associada com a formação de cânceres de pele e pulmão, além de outros processos carcinogênicos no homem. Além das propriedades carcinogênicas, os HPAs são conhecidos por serem citotóxicos quando induzidos por metabolismo enzimático (STRICKLAND *et al.*, 1996).

O potencial carcinogênico dos HPAs deve-se ao fato de serem biotransformados por sistemas enzimáticos específicos, formando metabólitos responsáveis por várias etiologias do câncer em animais de laboratório (JERINA *et al.*, 1978; CONNEY, 1982; IARC, 1983). O citocromo P450 é o sistema enzimático responsável pelo metabolismo do B(a)P em benzo(a)pireno diol-epóxido. Por ação subsequente da epóxido hidrolase, os epóxidos são transformados em dióis (Figura 2). Estes dióis sofrem novamente ação do citocromo P450 e transformam-se em 9,10 epóxidos, os quais são considerados carcinogênicos. O B(a)P-7,8-diol-9,10-epóxido é apontado como o metabólito final de efeito carcinogênico e mutagênico, devido seu alto poder de se ligar

covalentemente ao grupo 2-amino da desoxiguanosina na fita dupla de DNA (CONNEY, 1982).

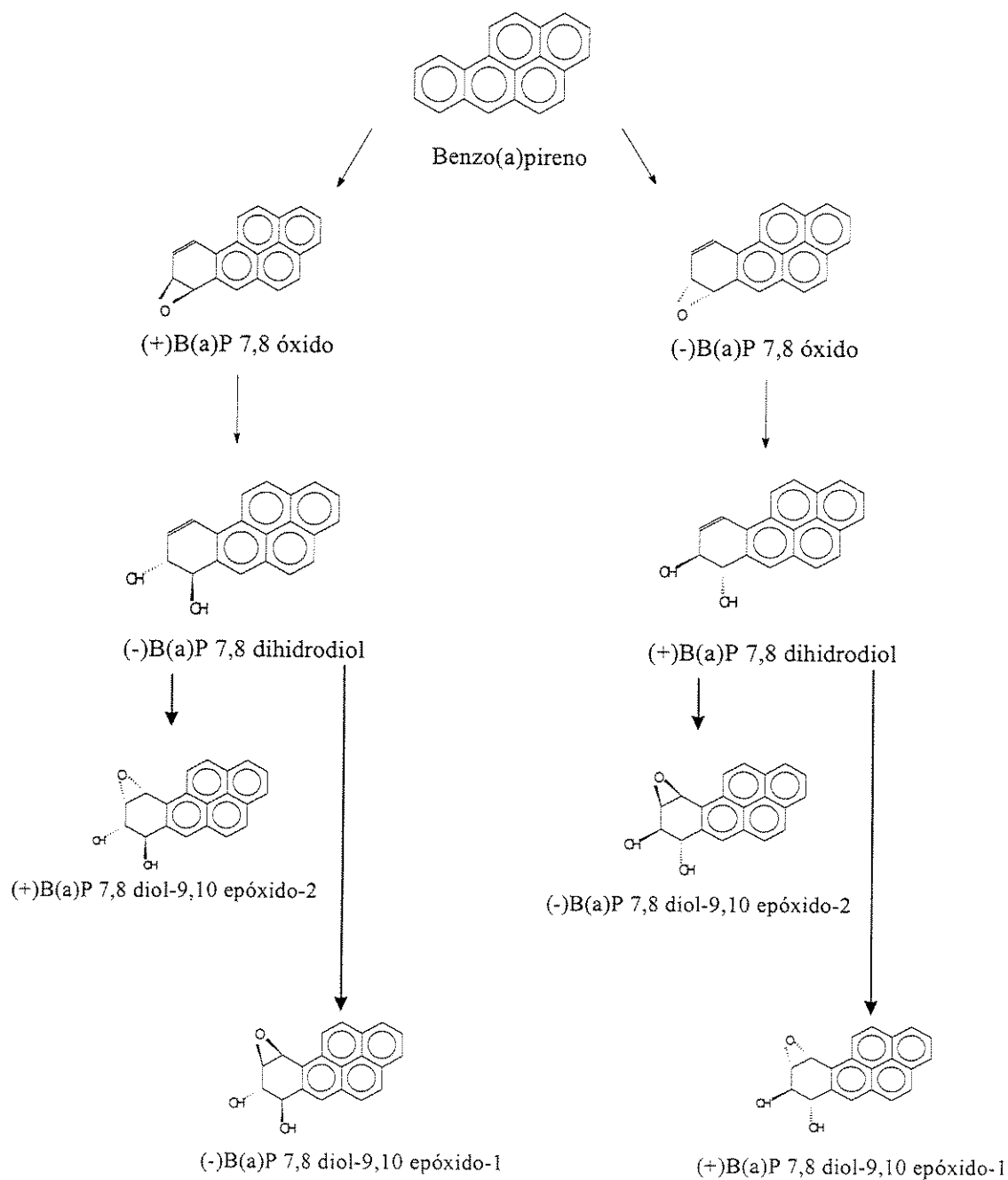


Figura 2 – Formação de epóxido a partir do B(a)P

Percival Pott, em 1775, foi o primeiro autor que relacionou a exposição ocupacional à fuligem com a formação de tumores de escroto em limpadores de chaminé na Europa (IARC, 1985). Hoje, já se sabe que grupos da população que consomem alimentos defumados, indivíduos em contato com ambiente (água e ar) contaminado, fumantes, e trabalhadores que se expõem diretamente aos HPAs (bombeiros, trabalhadores de plantas de alumínio e de aço) eliminam produtos de degradação do B(a)P na urina (STRICKLAND *et al.*, 1996).

Novas técnicas para monitorar a exposição humana a carcinógenos vêm sendo desenvolvidas nos últimos anos. Os segmentos de DNA das células brancas do sangue danificados pelos HPAs e os conjugados como o benzo(a)pireno diol-epóxido excretados na urina são biomarcadores para medir a exposição aos HPAs (STRICKLAND *et al.*, 1996). O benzo(a)pireno diol-epóxido também já foi encontrado ligado ao DNA do cólon humano e em lesões causadas pela aterosclerose (BARTSCH, 2000).

Tanto no Brasil como em outros países não foram estabelecidos limites máximos de tolerância para HPAs em pescados. LARSSON *et al.* (1987) relataram que a Alemanha, a Áustria e a Polônia, entre outros países, estabeleceram o nível máximo de 1,0 µg/kg de B(a)P em carnes defumadas. Este valor tem sido largamente utilizado como indicador arbitrário do potencial carcinogênico de alimentos contaminados com HPAs (NOLL e TOLEDO, 1997).

No Brasil, a Portaria n° 645 de 16 de dezembro de 1997 da Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde, estabeleceu que os aromatizantes/ aromas de fumaça não poderão transferir mais que 0,03 ppb de 3,4-benzopireno

no produto final. Para fins de controle analítico, esse valor será determinado a partir do 3,4-benzopireno presente no aromatizante/aroma de fumaça utilizado e da dose adicionada ao alimento/produto pronto para consumo (BRASIL, 1997).

6 – Análise de HPAs

Alguns procedimentos para extração de HPAs descritos na literatura envolvem as etapas de saponificação (SPEER *et al.*, 1990; BAUMARD *et al.*, 1999), extração pelo método de Soxhlet (BIRKHOLZ *et al.*, 1988; JAOUEN-MDOULET *et al.*, 2000) e banho de ultrassom (FALCÓN *et al.*, 1996; FALCÓN *et al.*, 1999).

Procedimentos mais simples para extração de HPAs, como o proposto por TAMAKAWA *et al.* (1992), têm sido bastante utilizados. Esta técnica consiste em extração da fração lipídica da amostra, previamente saponificada com KOH em meio etanólico, com subsequente limpeza em cartucho Sep-Pak Sílica Plus. Algumas técnicas analíticas que têm sido empregadas para determinação de B(a)P e outros HPAs em alimentos são mostradas na Tabela 3.

O progresso na análise de HPAs é marcado pela melhoria nos métodos cromatográficos e dos sistemas de detecção empregados. A separação de

Tabela 3 - Técnicas usadas para separação e detecção de HPAs.

Alimento	Técnica/ Detector	Coluna	Referência
Peixe, frutos do mar e produtos de carne	CLAE / fluorescência	fase reversa RP-18 ¹	LAWRENCE e WEBER, 1984
Peixe	CG / massa	DB-1301 ²	BIRKHOLZ <i>et al.</i> , 1988
Ostras, mexilhões, peixe e óleo	CG / massa	DB 5 ³	SPEER <i>et al.</i> , 1990
Alimentos defumados e fumaça líquida comercial	CLAE / fluorescência	Supelcosil LC/PAH C ₁₈	GOMMA <i>et al.</i> , 1993
Óleos	CLAE / fluorescência	C ₁₈	PUPIN e TOLEDO 1996 a e b
Carnes defumadas	CG / ionização de chama	DB 5 ⁴	NOLL e TOLEDO 1995
Óleos	CLAE / fluorescência	C ₁₈	TOLEDO e CAMARGO 1998
Truta defumada	CLAE / fluorescência	Supelcosil LC/PAH C ₁₈	MORET <i>et al.</i> , 1999
Carnes, peixes e queijo defumado	CLAE / fluorescência	C ₁₈	FALCÓN <i>et al.</i> , 1999

(¹) octodecilsiloxano

(²) metilpolisiloxano com 6% de cianopropilfenil

(³) metilpolisiloxano com 6% de fenil

(⁴) polifenilsiloxano com 5% de fenil

CLAE: cromatografia líquida de alta eficiência

CG: cromatografia gasosa

extratos purificados de amostra tem sido feita utilizando-se métodos cromatográficos em coluna e em camada delgada (VASSILAROS *et al.*, 1982).

Em estudo conduzido para comparar as técnicas de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e cromatografia gasosa (GC) para análise de HPAs, DENNIS *et al.* (1984) reportaram resultados similares, não havendo diferença significativa entre as duas técnicas quanto à repetibilidade, conforme indicado pelos desvios obtidos.

A separação de HPAs por CLAE usando octadecilsilano (C_{18}) como fase estacionária ligado quimicamente foi descrita pela primeira vez por SCHIMIT *et al.* em 1971. A popularidade do uso de CLAE com fase reversa deve-se à grande seletividade desta técnica para separar isômeros de HPAs (WISE *et al.*, 1993).

É muito comum o uso de solventes orgânicos nas metodologias analíticas que utilizam a CLAE, e isto se deve principalmente à característica apolar dos HPAs. Alguns solventes usados nas extrações e na separação de HPAs por CLAE são mostrados na Tabela 4.

WISE *et al.* (1993) apontam como vantagens do uso técnica de CLAE com detector de fluorescência (CLAE-FL) a aplicabilidade para vários tipos de matrizes (alimentares e ambientais), grande sensibilidade e detecção seletiva para HPAs. Os mesmos autores obtiveram resultados semelhantes comparando a CLAE-FL com a GC com espectrometria de massa (GC-MS), sendo que a CLAE-FL foi considerada mais eficiente por detectar a presença de isômeros mais facilmente que a GC-MS.

Tabela 4 - Alguns solventes usados em extrações e como fase móvel nas análise de HPAs por CLAE.

Matriz	Extração	Fase Móvel	Referência
Peixe, salsicha e presunto defumado	dimetilformamida / ciclohexano	acetonitrila / água	DENNIS <i>et al.</i> , 1984
Óleo comestível, espinafre, leite em pó e outros alimentos	dimetilsulfóxido (DMSO), hexano e metanol	acetonitrila / água	LAWRENCE e WEBER 1984b
Bebida, cereal, farinha, pão, bolo, e outros alimentos	dimetilformamida e ciclohexano	acetonitrila / água	DENNIS <i>et al.</i> , 1991
Bacon, peru, salsicha e outros alimentos defumados	DMSO e 1,1,2-tricloro-1,2,2, trifluoretano	metanol / acetonitrila	YABIKU <i>et al.</i> , 1993
Salsicha defumada e não defumada	DMSO e n-hexano	acetonitrila / água	FALCÓN <i>et al.</i> , 1996
Peixe defumado	clorofórmio	pentano / diclorometano	MORET <i>et al.</i> , 1999
Óleo	acetonitrila e hexano	acetonitrila / água	TROCHE <i>et al.</i> , 2000
Sedimento	polioxietileno (POLE)	acetonitrila / água	PINO <i>et al.</i> , 2000

7 – Avaliação da Metodologia

O protocolo de qualquer método analítico deve conter procedimentos que avaliem a padronização das etapas de extração e quantificação assim como a aferição do equipamento. A padronização analítica é a própria validação analítica e mede a confiabilidade dos resultados analíticos através da estimativa de parâmetros como a linearidade, exatidão, recuperação, precisão, limite de detecção (LD) e de limite de quantificação (LQ) e estabilidade do analito (CHASIN, 1994).

JENKE (1996) considerou que não existe ainda um mecanismo bem definido para o desenvolvimento de uma avaliação analítica. No entanto, é pertinente que se questione quais parâmetros de validação serão testados, quais procedimentos específicos (métodos estatísticos, por exemplo) podem ser usados para avaliar um parâmetro particular e qual é o critério de aceitabilidade para cada parâmetro.

Linearidade

Linearidade é determinada através de gráficos de calibração seguido de um tratamento estatístico. As curvas de calibração (*linearity plot*, *linear range* ou *calibration curve*) têm uso estabelecido pela IUPAC e devem ser representadas por um gráfico que correlacione a resposta do equipamento em função de várias concentrações do analito em estudo (IUPAC, 1993).

A análise de regressão comumente usada é a dos mínimos quadrados, em que a variável independente se refere à concentração teórica da substância em questão e a variável dependente (eixo vertical ou y) corresponde aos valores de área obtidos para cada concentração do padrão (CHASIN, 1994).

Limite de Detecção

Na prática, o limite de detecção é determinado como a menor concentração do analito que pode ser diferenciada do ruído do sistema com segurança. Quando se faz uma medida de uma determinada amostra, o sinal observado no detector (S_t) é na verdade o somatório do sinal da presença de uma certa quantidade de analito (S_x) mais o sinal do ruído (S_b).

Um procedimento comum é aceitar-se como limite de detecção (LD) a concentração ou massa de analito o que gera um sinal três ($K=3$) vezes maior do que o ruído do sistema, ou seja, $LD=3N$ (FABRE, 1999). Outra forma é definir-se o LD como a concentração ou massa de analito que produz um sinal igual a $3s$, onde s é o desvio padrão do ruído medido empregando-se um branco, ao invés de apenas sinal do equipamento (American Chemical Society, 1980).

Limite de Quantificação

O limite de quantificação (LQ) corresponde a menor quantidade de um analito que pode ser quantificada com exatidão e com uma precisão determinada. Esta precisão, na prática, é aceita com um coeficiente de variação de até 10% e uma exatidão de $\pm 10\%$ (FABRE, 1999). Pode também ser definido em relação ao

ruído empregando-se o branco como referência. Valores ao redor de 10s (sendo s o desvio padrão do sinal gerado empregando-se um branco) são comumente aceitos (American Chemical Society, 1980).

Repetibilidade

Em análises cromatográficas é desejável conhecer a repetibilidade de pelo menos dois parâmetros: tempo de retenção e área ou altura do pico. A repetibilidade do tempo de retenção é importante porque, na maioria das análises cromatográficas, ele é usado para confirmar qualitativamente a identidade dos compostos. A repetibilidade da área de um pico tem relevância por ser o parâmetro utilizado na quantificação do composto de interesse.

A forma normalmente usada para estimar repetibilidade é pela equação (CHASIN, 1998) $r = t \times \sqrt{2} \times sr$ onde: t pode ser usado como aproximadamente 2, um valor obtido da tabela de Student a 95% de probabilidade e sr é o desvio padrão da repetibilidade. Não existe uma regra geral para valores de repetibilidade de tempo de retenção e de área (FABRE, 1999).

Precisão

A precisão reflete a variação dos resultados quando análises repetidas são feitas na mesma amostra, e dependem dos erros aleatórios que produzem flutuações ocasionais nos resultados. Uma forma comum de se expressar precisão é pelo coeficiente de variação (CV) ou desvio padrão relativo (RSD), que

é dado pela equação: $CV = \frac{S}{\bar{x}} \times 100$ (CHASIN, 1994), onde S é o desvio padrão e $\bar{x}$ é a média.

Confirmação

Em um protocolo de análise também é necessário que se avalie qualitativamente a similaridade entre o composto de interesse medido na amostra e um padrão químico de referência conhecido. Esta avaliação deve se basear em métodos analíticos ou condições analíticas diferentes daquelas usadas no método analítico testado (American Chemical Society, 1980).

Recuperação

A recuperação do método é derivada das medidas de amostras simuladas, isto é, aquelas que são adicionadas de várias quantidades de analito em concentrações conhecidas. A recuperação é determinada da seguinte forma (American Chemical Society, 1980):

$$\%recuperado = \frac{C(achado)}{C(adicionado)} \times 100$$

Métodos de extração com taxas de recuperações menores que 60% são desaconselhados pela dificuldade de se obter valores exatos com eles. De acordo com JENKE (1996), os resultados dos ensaios de recuperação para serem considerados aceitáveis devem estar entre 75% e 125%.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMERICAM CHEMICAL SOCIETY. Guidelines for data acquisition and quality evaluation in environmental chemistry. **Analytical Chemistry**, vol.52, p.2242-2249, 1980.
- BAILEY, E. J. e DUNGAL, N. Polycyclic hydrocarbons in Iceland smoked food. **British Journal of Cancer**, vol.12, p.348-350, 1958.
- BARRICK, R. C. Flux of aliphatic and polycyclic aromatic hydrocarbons to Central Puget Sound from Seattle (Westpoint) primary sewage effluent. **Environmental Science and Technology**, n.16, p.682-692, 1982.
- BARTSCH, H. Studies on biomarkers in cancer etiology and prevention: a summary and challenge of 20 years of interdisciplinary research. **Mutation Research**, vol. 462, p. 255-279, 2000.
- BAUMANN, P. C. Epizootics of cancer associated with genotoxins in sediment and water. **Mutation Research**, n. 411, p. 227-233, 1998.
- BAUMARD, P.; BUDZINSKI, H.; GARRIGUES, P.; DIZER, H. e HANSEN, P.D. Polycyclic aromatic hydrocarbons in recent sediments in mussels (*Mytillus edulis*) from the Western Baltic Sea: occurrence, bioavailability and seasonal variations. **Marine Environmental Research**, vol.47, p.17-47, 1999.

- BEYER, J.; AAS, E.; BORGENVIK, H. K.; RAVN, P. Bioavailability of PAH in effluent water from an aluminium works evaluated by transplant caging and biliary fluorescence measurements of Atlantic Cod (*Gadus morhua* L.). **Marine Environmental Research**, vol. 46, p. 233-236, 1998.
- BIRKHOLZ, D. A.; COUTTS, R. T. e HRUDEY, S. E. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in fish tissue. **Journal of Chromatography**, n. 449, p. 251-260, 1988.
- BRASIL. Portaria nº 645, de 16 de dezembro de 1997 da SNVS - MS. **Diário Oficial da União**, 1997.
- CHASIN, A. A. M.; CHASIN, M. e SALVADOR, M. C. Validação de métodos cromatográficos em análises toxicológicas. **Revista de Farmácia e Bioquímica da Universidade de São Paulo**, vol.30, p.49-53, 1994.
- CONNEY, A. H. Introduction of microsomal enzymes by foreign chemicals and carcinogenesis by polycyclic aromatic hydrocarbons: G. H. A. CLOWES memorial lecture. **Cancer Research**, vol.42, p.4875-4917, 1982.
- COOK, J. W.; HEWETT, C. L. e HIEGER, I. The isolation of a cancer-producing hydrocarbon from coal tar. **Journal of Chemical Society**, p. 395-405, 1933.

DAWE, J. C.; STANTON, M. F. e SCHWARTZ, F. J. Hepatic neoplasms in native bottom feeding fish of Deep Creek Lake, Maryland. **Cancer Research**, vol. 24, p. 1194-1201, 1964.

DE VOS, R. H.; MASSEY, R. C.; CRYPPS, G.; VENN, I.; JONG-BERKHOUT, P. Polycyclic aromatic hydrocarbons in Dutch total diet samples (1984-1986). **Food Chemical Toxicology**, vol.28, n.4, p.263-268, 1990.

DENNIS, M. J.; MASSEY, R. C.; McWEENY, D. J.; LARSSON, B.; ERIKSSON, A. e SAHLBERG, G. Comparison of a capillary gas chromatographic and a high-performance liquid chromatographic method of analysis for polycyclic aromatic hydrocarbons in food. **Journal of Chromatography**, n.285, p.127-133, 1984.

DENNIS, M. J.; MASSEY, R. C.; CRIPPS, G.; VENN, I.; HOWARTH, N. e LEE, G. Factors affecting the polycyclic aromatic hydrocarbon content of cereals, fats and other food products. **Food Additives and Contaminants**, vol.8, n.4, p. 517-530, 1991.

FABRE, H. Validation des methods d'électrophorese capillaire appliqués à l'analyse des composés pharmaceutiques. **Analisis**, vol.27, p. 155-160, 1999.

- FALCÓN, M. S. G.; AMIGO, S. G.; YUSTY, M. A. L.; ALDA, M. J. L.; LOZANO, J. S. Enrichment of benzo(a)pyrene in smoked food products and determination by high-performance liquid chromatography – fluorescence detection. **Journal of Chromatography A**, vol.753, p.207-215, 1996.
- FALCÓN, M. S. G.; AMIGO, S. G.; YUSTY, M. A. L.; LOZANO, J. S. Determination of benzo(a)pyrene in some Spanish commercial smoked products by HPLC-FL. **Food Additives and Contaminants** vol.16, n.1, p.9-14, 1999.
- FATTORI, E.; BENFENATI, E.; MARIANI, G.; COOLS, E.; VEZZOLI, G.; FANELLI, R. Analysis of organic micropollutants in sediment samples of the Venice Lagoon, Italy. **Water, Air and Soil Pollution**, vol.99, p.237-244, 1997.
- FAZIO, T. e HOWARD, J. W. Polycyclic aromatic hydrocarbons in foods. In: **Handbook of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons**, ed. BJØRSETH, A., Marcel Dekker, New York, vol.1, Cap. 11, p.461, 1983.
- FRETEIN, K. Carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in Norwegian smoked meat sausages. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, vol.24, n.5, p.976-979, 1976.

- GEIGER, G. J. e BUIKEMA Jr, A. L. Hydrocarbons depress growth and reproduction of *Daphnia pulex* (Cladocera). **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science**, vol.31, p.830-836, 1982.
- GOMAA, E. A.; GRAY, J. I.; RABIE, S. LOPEZ-BOTE, C. e BOOREN, A. M. Polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked food products and commercial liquid smoke flavourings. **Food Additives and Contaminants**, vol.10, n.5, p.503-521, 1993.
- HARGIS, W. J. e ZWERNER, D. E. Some effects of PAH-contaminated Elizabeth River sediments on the fish. **Virginia Journal of Science**, vol.35, n.2, p.115, 1984.
- HELLOU, J.; UPSHALL, C.; PAYNE, J. F. e HODSON, P. V. Polycyclic aromatic compounds in cod (*Gadus morhua*) from the Northwest Atlantic and St. Lawrence Estuary. **The Science of the Total Environment**, vol.145, p.71-79, 1994.
- HOWARD, J. W. e FAZIO, T. Review of polycyclic aromatic hydrocarbons in foods. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, vol.63, n.5, 1980.

HUMASON, A. W. e GADBOIS, D. J. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in the New York Bight area. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, vol.29,n.6, p.645-650, 1982.

IARC. Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemical to Humans. Polycyclic Aromatic Compounds. Part 1, Chemical, Environmental and Experimental Data, vol.32. Lyon, France, 1983.

IARC. Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemical to Humans, vol.35. Lyon, France, 1985.

IUPAC. Nomenclature for chromatography. **Pure and Applied Chemistry**, vol.65, p.819-870, 1993.

JACKSON, T.J.; WADE, T.L.; McDONALD, T.J.; WILKINSON, D.L. e BROOKS, J.M. Polycyclic aromatic hydrocarbons contaminants in oysters from the Gulf of Mexico (1996-1990). **Environmental Pollution**, vol.83, p.291-298, 1994.

JAOUEN-MDOULET, A.; ABARNOU, A.; LE GUELLEC, A. M; LOIZEAU, V. e LEBOULENGER, F. Validation of an analytical procedure for polychlorinated biphenyls, coplanar polychlorinated biphenyls and polycyclic aromatic hydrocarbons in environmental samples. **Journal of Chromatography A**, n. 886, p.153-173, 2000.

- JENKE, D. R. Chromatographic method validation: A review of current practice and procedures. II. Guidelines for primary validation parameters. **Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies**, n.19, p.737-757, 1996.
- JERINA, D. M.; THAKKER, D. R.; YAGI, H. Carcinogenicity of benzo(a)pyrene derivatives: the bay region theory. **Pure and Applied Chemistry**, vol.50, p.1033-1044, 1978.
- KANGSADALAMPAI, K.; BUTRYEE, C. e MANOONPHOL, K. Direct mutagenicity of the polycyclic aromatic hydrocarbon-containing fraction of smoked and charcoal-broiled foods treated with nitrite in acid solution. **Food and Chemical Toxicology**, vol.35, p.213-218, 1996.
- KENNAWAY, E. Identification of carcinogenic compounds in coal-tar. **British Medical Journal**, n.24, p.749-752, 1955.
- KIPOPOULOU, A.M.; MANOLI, E.; SAMARA, C. Bioconcentration of polycyclic aromatic hydrocarbons in vegetables grown in an industrial area. **Environmental Pollution**, vol.106, p.369-380, 1999.
- KRAMERS, P. N. G. e VAN DER HELIDEN, C. A. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH): carcinogenicity data and risk extrapolation. **Toxicological and Environmental Chemistry**, vol.16, p.41-351, 1988.

LARSSON, B. K.; ERIKSON, A. T. e CERVENKA, M. Polycyclic aromatic hydrocarbons in crude and deodorized vegetable oils. **Journal of American Oil Chemical Society**, vol.64, n.3, p.365-370, 1987.

LAWRENCE, J. F. e WEBER, D. F. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in some fish, shellfish, and meat products by liquid chromatography with confirmation by gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, vol.32, n.4, p.789-794, 1984a.

LAWRENCE, J. F. e WEBER, D. F. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in Canadian samples of processed vegetable and dairy products by liquid chromatography with fluorescent detection. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, vol.32, n.4, p.794-797, 1984b.

LIPIATOU, E. e SALIOT, A. Flux and transport of anthropogenic and natural polycyclic aromatic hydrocarbons in the western Mediterranean Sea. **Marine Chemistry**, vol.32, p.51-57, 1991.

LO, M. T. e SANDI, E. Polycyclic aromatic hydrocarbons (polynuclears) in foods. **Residue Reviews**, vol.69, p.35-86, 1978.

LODOVICI, M.; AKPAN, V.; CASALINI, C.; ZAPPA, C.; DOLARA, P. Polycyclic aromatic hydrocarbons in *Laurus nobilis* leaves as a measure of air pollution in urban and rural sites of Tuscany. **Chemosphere**, vol.36, p.1703-1712, 1998.

MENICHINI, E; BOCCA, A.; MERLI, F.; IANNI, D.; MONFREDINI, F. C. Polycyclic aromatic hydrocarbons in olive oil on the Italian market. **Food Additives and Contaminants** vol.8, n.3, p.363-369, 1991.

McLEESE, D. W.; BURRIDGE, L. E.; CAPUZZO, J. M. (Ed.) e KESTER, D. R. (Ed.). Comparative accumulation of PAHs in four marine invertebrates. **Oceanic Processes in Marine Pollution. Volume 1: Biological processes and Waste in the Ocean**, p.109-118, 1987.

MORET, S.; CONTE, L. e DEAN, D. Assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons content of smoked fish by means of a fast HPLC/HPLC method. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, vol.47, p.1367-1371, 1999.

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

- NOLL, I. B. e TOLEDO, M. C. F. Benzo(a)pireno em carnes defumadas pelos processos caseiro e industrial. **Revista Brasileira de Toxicologia**, vol.10, n.1, p.19-23, 1997.
- NOLL, I. B. e TOLEDO, M. C. Polycyclic aromatic hydrocarbons in charcoal-broiled meat in Brazil. **Revista Española de Ciencia y Tecnología de Alimentos**, vol.35, n.2, p.209-216, 1995.
- PALMORK, K. H. e SOLBAKKEN, J. E. Distribution and elimination of (9-super(14)C) phenanthrene in the horse mussel (*Modiola modiolus*). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, vol.26, n.2, p.196-201, 1981.
- PHILLIPS, D. H. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the diet. **Mutation Research**, vol.443, p.139-147, 1999.
- PINO, V.; AYALA, J. H.; AFONSO, A. M. e GONZÁLEZ, V. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in marine sediments by high-performance liquid chromatography after microwave-assisted extraction with micellar media. **Journal of Chromatography A**, vol. 869, p.515-522, 2000.
- POINTET, K. e MILLIET, A. PAHs analysis of fish whole gall bladders and livers from the Natural Reserve of Camague by GC/MS. **Chemosphere**, vol.40, p.293-299, 2000.

PRUEL, R. J.; QUINN, J. G; LAKE, J. L.; DAVIS, W. R. Availability of PCBs and PAHs to *Mytilus edulis* from artificially resuspended sediments. in Capuzzo, J. M., ed. **Oceanic Processes in Marine Pollution**. Malabar. Robert E. Krieger Publishing Company, 1987.

PUPIN, M. A. e TOLEDO, M. C. F. Benzo(a)pyrene in olive oils on the Brazilian market. **Food Chemistry**, vol.55, n.2, p.185-188, 1996a.

PUPIN, M. A. e TOLEDO, M. C. F. Benzo(a)pyrene in Brazilian vegetables oils. **Food Additives and Contaminants**, vol.13, n.6, p.639-646, 1996b.

RAINIO, K.; LINKO, R. R. e RUOTSILA, L. Polycyclic aromatic hydrocarbons in mussel and fish from Finnish archipelago sea. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, vol.37, p.337-343, 1986.

ROBERTS, M. H. Jr.; HARGIS, W. J. Jr.; STROBEL, C. J. e De LISLE, P. F. Acute toxicity of PHA contaminated sediments to the estuarine fish, *Leiostomus xanthurus*. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, vol.42, n.1, p.142-149, 1989.

- SERRA, G. E.; PUPIN, M. A.; TOLEDO, M. C. F. Ensaio preliminares sobre a contaminação da cana-de-açúcar e derivados por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, vol.29, n.2, p.134-137, 1995.
- SCHIMIT, J. A.; HENRY, R. A.; WILLIAMS, R. C. e DIECKMAN, J. F. Applications of high speed reversed-phase liquid chromatography. **Journal of Chromatographic Science**, vol.9, p.645-651, 1971.
- SIVASWAMY, S. N.; BALACHANDRAN, B. e SIVARAMAKRISHNAN, V. M. Polynuclear aromatic hydrocarbons in South Indian diet. **Current Science**, vol.59, n.9, p.480-481, 1990.
- STRICKLAND, P.; KANG, D. e SITHISARANKUL, P. Polynuclear aromatic hydrocarbons metabolites in urine as biomarkers of exposure and effect. **Environmental Health Perspectives**, vol.104, p.927-932, 1996.
- SOLBAKKEN, J. E.; KNAP, A. H. e PALMORK, K. H. Disposition of (9-super(14)C) phenantrene in a subtropical marine teleost (*Haemulon sciurus*) **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, vol.38, n.3, p.285-289, 1982.
- SPEER, K e MONTAG, A. Polycyclische aromatische kohlenwassertoffe in native pflanzlichen ölen. **Fat Science and Technology**, vol.90, n.5, p.163-167, 1988

- SPEER, K; STEEG, E.; HORSTMANN, P e MONTAG, A. Determination and distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in native vegetable oils, smoked fish products, mussels and oyster, and bream from the river Elbe. **Journal of High resolution Chromatography**, vol.13, p.104-111, 1990.
- TAKATSUKI, K.; SUZUKI, S.; SATO, N. e USHIZAWA, I. Liquid chromatographic determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in fish and shellfish. **Journal of Association of Official Analytical Chemists**, vol.68, p.945-949, 1985.
- TAMAWAKA, K.; SEKI, T. E TSUNODA, A. (1992) HPLC Detection of Aromatic Hydrocarbons, in Nollet, L. M. L., ed. **Food Analysis by HPLC**. New York. Marcel Dekker, Inc.
- TOLEDO, M. C. F. e CAMARGO, M. S. F. O. Benzo(a)pireno em óleos de milho produzidos e comercializados no Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, vol.18, n.1, p.73-76, 1998.
- TRAPIDO, M. Polycyclic aromatic hydrocarbons in Estonia soil: contamination and profiles. **Environmental Pollution**, vol.105, p.67-74, 1999.
- TROCHE, S. V.; FALCÓN, M. S. G.; AMIGO, S. G.; YUSTY, M. A. L. e LOZANO, J. S. Enrichment of benzo(a)pyrene in vegetable oils and determination by HPLC-FL. **Talanta**, vol.51, p.1069-1076, 2000.

VARANASI, U.; REICHERT, W. L.; LEEBERHART, B. T. e STEIN, J. E. Formation and persistence of benzo(a)pyrene-diolepoxide-DNA adducts in liver of English sole (*Parophrys ventulus*). **Chemicals and Biological Interactions**, vol.69, n.2-3, p.203-216, 1989.

VASSIRALOS, D. L.; STOCKER, P. W.; BOOTH, G. M.; e LEE, M. L. Capillary gas chromatography determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in vertebrate fish tissue. **Analytical Chemistry**, n.54, p.106-112, 1982.

VOUTSA, D.; SAMARA, C. Dietary intake of trace elements and polycyclic aromatic hydrocarbons via vegetables grown in an industrial Greek area. **The Science of the Total Environment**, vol.218, p.203-216, 1998.

WILSON, S. C. e JONES, K. C. Biorremediation of soil contaminated with polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs) a review. **Environmental Pollution**, vol.81, p.229-249, 1993.

WISE, S. A.; SANDER, L. C. e MAY, W. E. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons by liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, n.642, p.329-349, 1993.

YABIKU, H. Y.; MARTINS, M.; TAKAHASHI, M. Y. Levels of benzo(a)pyrene and other polycyclic aromatic hydrocarbons in liquid smoke flavour and some smoked foods. **Food Additives and Contaminants** vol.10, n.4, p.339-405, 1993.

ZABIK, M. E.; BOOREN, A.; ZABIK, M. J.; WELCH, R. e HUPHREY, H. Pesticides residues, PCBs and PAHs in baked, charbroiled, salt boiled and smoked Great Lakes lake trout. **Food Chemistry**, vol.55, n.3, p.231-239, 1996.

Capítulo 2

DETERMINAÇÃO DE BENZO(A)PIRENO EM PESCADOS COMERCIALIZADOS NA REGIÃO DE CAMPINAS - SP

Determinação de benzo(a) pireno em pescados comercializados em Campinas-SP

Azeredo, A. e Toledo, M.C.F.

RESUMO

Peixes, camarões, mexilhões e carnes de siri frescos e processados, comercializados na região metropolitana de Campinas/SP, foram analisados quanto à presença de benzo(a)pireno (B[a]P). A metodologia utilizada envolveu extração com n-hexano, purificação em Sep-Pak sílica Plus e determinação por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fluorescência. A presença de B(a)P foi detectada em todas as amostras analisadas, em quantidades variando na faixa de 0,03 a 3,45 µg/kg. Os maiores níveis de contaminação foram encontrados em produtos defumados e mexilhões.

**Determination of benzo(a)pyrene in seafood
in Campinas (SP) market.**

Azeredo, A. e Toledo, M.C.F.

ABSTRACT

Fresh and processed fish, shrimp, mussels and crab meat commercialized in the metropolitan area of Campinas, SP, Brazil, were analysed for benzo(a)pyrene (B[a]P). The methodology involved extraction with n-hexan, clean-up on Sep-Pak silica Plus and determination by high performance liquid chromatography with a fluorescence detector. B(a)P was detected in all samples analysed at levels ranging from 0,03 to 3,45 µg/kg. The highest levels of contamination were found in smoked products and mussels.

1 – INTRODUÇÃO

Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) são contaminantes amplamente distribuídos no ambiente [10, 27], cuja importância se deve a seu potencial carcinogênico em animais de laboratório [11] e por relacionarem-se com alguns tipos de câncer no homem [24]. Entre os HPAs carcinogênicos destaca-se o B(a)P que, por ser o mais bem estudado do grupo e pela sua potente ação carcinogênica [16, 6], tem sido utilizado como indicador da presença de HPAs em alimentos [5, 26].

A cada ano são derramados nos mares de todo o mundo cerca de cinco milhões de toneladas de petróleo, uma conhecida fonte de HPAs [7]. Estes compostos são persistentes, principalmente em ambientes aquáticos, devido a sua baixa solubilidade em água e pela tendência a se associarem com material particulado, uma importante fonte de alimento para um grande número de organismos marinhos [3, 20].

Peixes não processados apresentam concentrações de HPAs bastante baixas, mesmo quando capturados em locais contaminados. Isto se deve à grande habilidade do sistema metabólico de peixes em biotransformar HPAs em dióis, epóxidos e outras substâncias [21]. Peixes defumados sob condições controladas têm normalmente quantidade inferior a 1 µg/kg de B(a)P (na faixa de 0,1 a 0,5 µg/kg); porém, estes valores podem ser ultrapassados no caso de defumação caseira. A incidência de câncer de estômago em grupos da população da Nigéria

[1] e dos países Bálticos [4] tem sido relacionada com o grande consumo de peixe defumado artesanalmente, contendo elevados níveis de HPAs.

Os moluscos, por não possuírem mecanismos rápidos de biotransformação e, com isso, acumularem HPAs e outros poluentes, são considerados organismos sentinela e têm sido largamente utilizados para monitoramento ambiental [9, 12, 15].

Vários métodos para a determinação de HPAs em alimentos utilizando análise cromatográfica já foram descritos na literatura e muitos deles envolvem etapas de saponificação, extração da fração insaponificável por meio de partição líquido-líquido, purificação da amostra e separação por CLAE [22, 25].

Até o presente, desconhecem-se pesquisas dirigidas ao monitoramento da presença de B(a)P em pescados disponíveis no mercado brasileiro, embora já existam trabalhos que descrevam a ocorrência deste contaminante em outros alimentos como óleos e produtos cárneos [19, 22, 26]. Esta pesquisa teve como objetivo quantificar B(a)P em amostras de pescados frescos e processados disponíveis no comércio local da região metropolitana de Campinas.

2 - MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 – Amostras

Amostras de diferentes marcas de filés de peixe seco e congelados (n=9), mexilhões congelados e enlatados (n=4), peixes defumados (n=4), camarões congelados e enlatados (n=4), carne de siri congelada e enlatada (n=3), sardinha enlatada (n=5) e atum enlatado (n=5) foram adquiridas em supermercados na cidade de Campinas/SP durante o ano de 2000. A amostra de tainha defumada artesanalmente foi obtida no município de Ilha Comprida/SP, junto aos pescadores. Três lotes de cada produto de uma mesma marca foram combinados, homogeneizados em processador alimentos e analisados em duplicata. Todas as amostras enlatadas foram drenadas antes de serem homogeneizadas.

2.2 - Metodologia

2.2.1 - Extração

Foi utilizado o método de extração sugerido por TAKAMAWA *et al.* [25] com algumas modificações, conforme descrito a seguir.

Amostras previamente homogeneizadas em multiprocessador WALITA ® foram pesadas em balões de fundo redondo onde foram adicionados 200mL de etanol, 35mL de solução de KOH 50% e algumas pérolas de vidro. A etapa de

saponificação foi realizada em banho maria a 100° C, sob refluxo, por duas horas. Após resfriamento à temperatura ambiente, os balões com material saponificado foram adicionados de 150mL de n-hexano e agitados. Esta mistura foi transferida quantitativamente para um funil de separação de 500mL, onde foi homogeneizada vigorosamente por 5 minutos. Os balões foram lavados com duas porções de 20mL de etanol e estes volumes adicionados ao funil de separação. O funil de separação foi agitado mais uma vez e esperou-se a separação das fases orgânica e aquosa. A fase aquosa foi transferida para outro funil de separação e a extração foi feita com mais duas porções de 150mL e 100mL de n-hexano. Os volumes de n-hexano resultantes das partições foram combinados e lavados com 100mL de água destilada. O extrato final de n-hexano foi seco por filtração com sulfato de sódio anidro e concentrado até aproximadamente 4mL, em evaporador rotativo a vácuo à 40°C.

2.2.2 - Purificação da Amostra

Um cartucho de Sep-Pak sílica Plus (WATERS ®) foi conectado a uma seringa e lavado com 30mL de n-hexano, antes de receber os 4mL do extrato obtido pelas partições. O cartucho foi eluído com 25mL de n-hexano e o volume final concentrado até securo, em evaporador rotativo a vácuo, à 40°C. O concentrado foi dissolvido em 1mL de acetonitrila e passado em filtro MILLEX (MILLIPORE ®) com poros de 0,45µm de diâmetro. Esta etapa também foi feita de acordo com TAKAMAWA *et al.* [25].

2.2.3 - Desenvolvimento Cromatográfico

A separação foi feita por CLAE em cromatógrafo equipado com bomba quaternária Waters 600 e injetor automático Waters 717. A separação isocrática foi feita em coluna cromatográfica VYDAC C18 (ODS) de 20cm x 4,6mm d.i., com partículas de 5 μ m, à temperatura de 33°C. A fase móvel foi constituída por acetonitrila : água (85 : 15, v/v), em vazão constante de 0,5mL/minuto. A detecção foi feita com λ_{exc} a 294nm e λ_{em} a 404nm. O volume de injeção foi de 20 μ L. A identificação do composto foi feita comparando o tempo de retenção do padrão com o das amostras e por co-cromatografia. A confirmação do pico foi feita nas mesmas condições cromatográficas descritas anteriormente, variando-se apenas o λ_{em} do detector para 424nm. Este procedimento foi sugerido e usado por FALCON *et al.* [5].

2.2.4. Quantificação

Foi empregado o método de padronização externa para a quantificação do B(a)P [17]. Uma curva analítica construída com sete concentrações diferentes de B(a)P (0,5 a 22 μ g/L) foi obtida através de análise de regressão. A concentração do analito foi calculada a partir da equação da reta obtida desta curva, em função da área integrada dos picos. Os limites de detecção e de quantificação foram calculados com base nos procedimentos descritos pela American Chemical Society [2].

2.2.5- Recuperação do Método

Amostras de filé de peixe enriquecidas no princípio da extração com dois níveis conhecidos de padrão de B(a)P foram usadas para avaliar a recuperação do procedimento analítico [2]. As amostras foram analisadas em triplicata. A análise do branco para verificar a pureza dos reagentes usados na etapa de extração também foi executada na avaliação do método.

3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

As recuperações de 88 e 96% para as amostras enriquecidas com 2,3 e 4,5µg de B(a)P/25g de amostra, respectivamente, demonstraram a eficiência do método de extração. De acordo com JENKE [13] os resultados dos ensaios de recuperação, para serem considerados aceitáveis, devem estar entre 75% e 125%. A precisão (CV%) do método foi de 6,7% para o menor nível de fortificação e de 2,9% para o maior nível de fortificação.

A repetibilidade da resposta do detector em relação à área do pico foi e tempo de retenção foi de 97,4% e 99,7% respectivamente. A curva de calibração ($r^2 = 0,9998$) foi linear e a análise de regressão apresentou correlação significativa ($p < 0,0000$ **) entre as variáveis. Os limites de detecção e quantificação do método

foram 0,005 μ g/kg e 0,017 μ g/kg, respectivamente, e ficaram bem abaixo do limite referencial de 1 μ g/kg de B(a)P [6].

Não foi detectada a presença de nenhum interferente nos reagentes. A formação de emulsões durante as etapas de extração é um dos pontos críticos na análise de HPAs em alimentos [6]. No procedimento de extração adotado, observou-se a tendência à formação de emulsão durante a limpeza da fração de n-hexano com água destilada. Este problema foi minimizado com o emprego de agitação menos vigorosa. Os cromatogramas característicos das amostras analisadas são mostrados nas Figuras 1 a 3.

A presença de B(a)P foi detectada em todas as amostras analisadas (Tabelas 1 e 2), sendo que em 8 delas a concentração encontrada ficou acima do limite de referência de 1 μ g/kg. As amostras de filé de peixe não defumado apresentaram contaminação relativamente baixa (<0,27 μ g/kg), o que provavelmente se deve à grande eficiência do sistema metabólico dos peixes para biotransformar e eliminar este contaminante, conforme já comentado por outros autores [14, 18, 20]. A mesma observação pode ser feita para camarões e carnes de siri, os quais apresentaram contaminação média de 0,14 μ g/kg. Assim como os peixes, estes invertebrados têm a habilidade de biotransformar o B(a)P através do sistema de oxidases de função mista [7]. LAWRENCE e WEBER [14] encontraram quantidades inferiores a 0,05 μ g/kg de B(a)P em vários peixes não defumados.

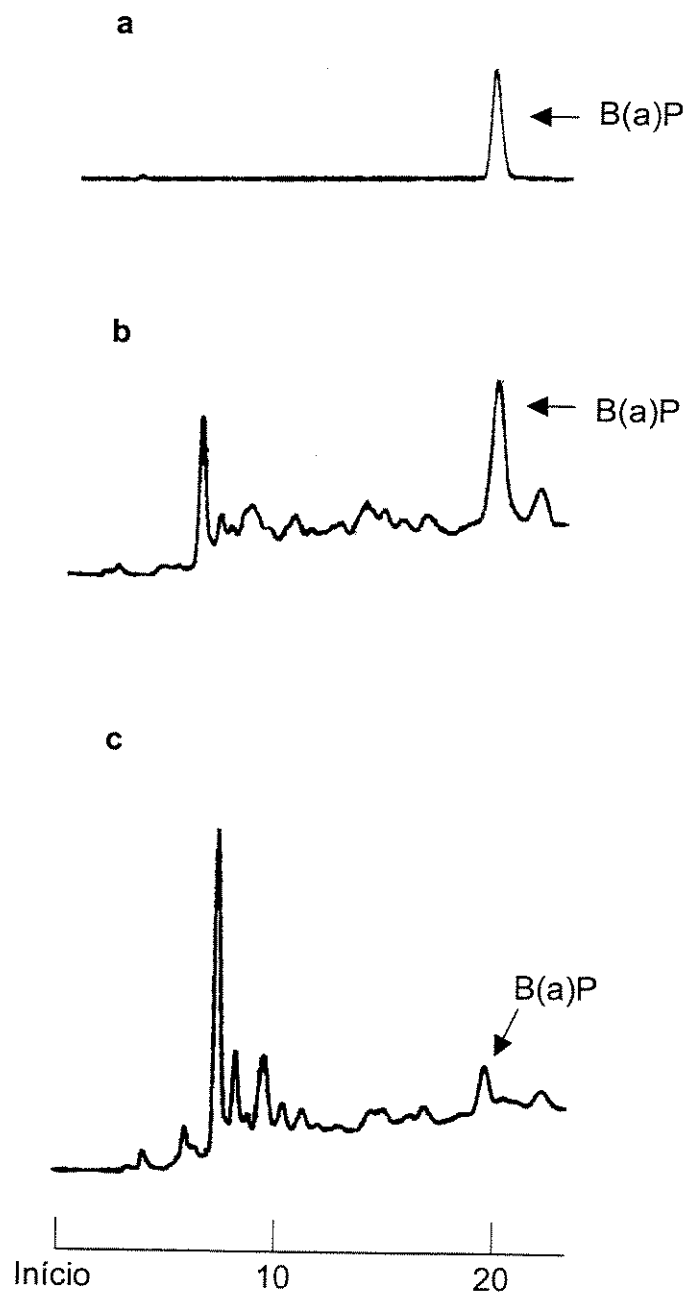


FIGURA 1 – Cromatograma do padrão de B(a)P (a) e das amostras atum em lata (b) e sardinha em lata (c). Condições cromatográficas: fase móvel acetonitrila : água (85 : 15), fluxo 0,5 ml/min, detector de fluorescência, coluna C-18, temperatura de coluna 33°C. B(a)P, benzo(a)pireno.

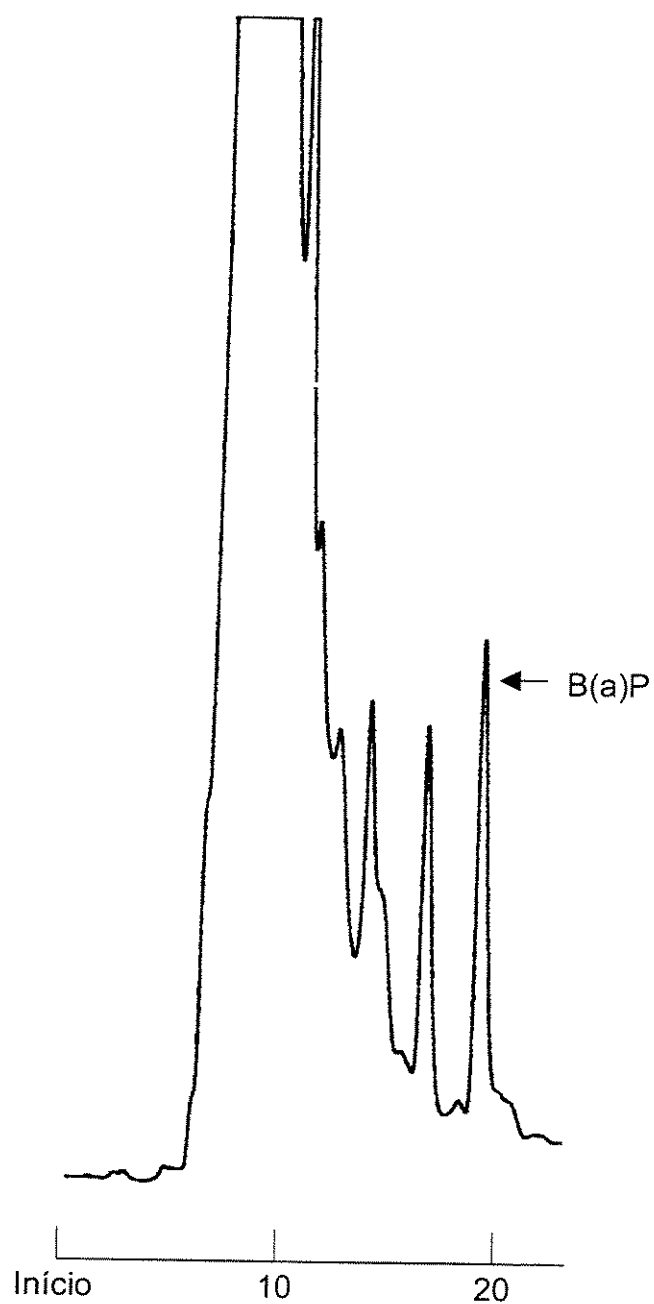


FIGURA 2 – Cromatograma da amostra tainha defumada pelo processo caseiro. Condições cromatográficas: fase móvel acetonitrila : água (85 : 15), fluxo 0,5 ml/min, detector de fluorescência, coluna C-18, temperatura de coluna 33°C. B(a)P, benzo(a)pireno.

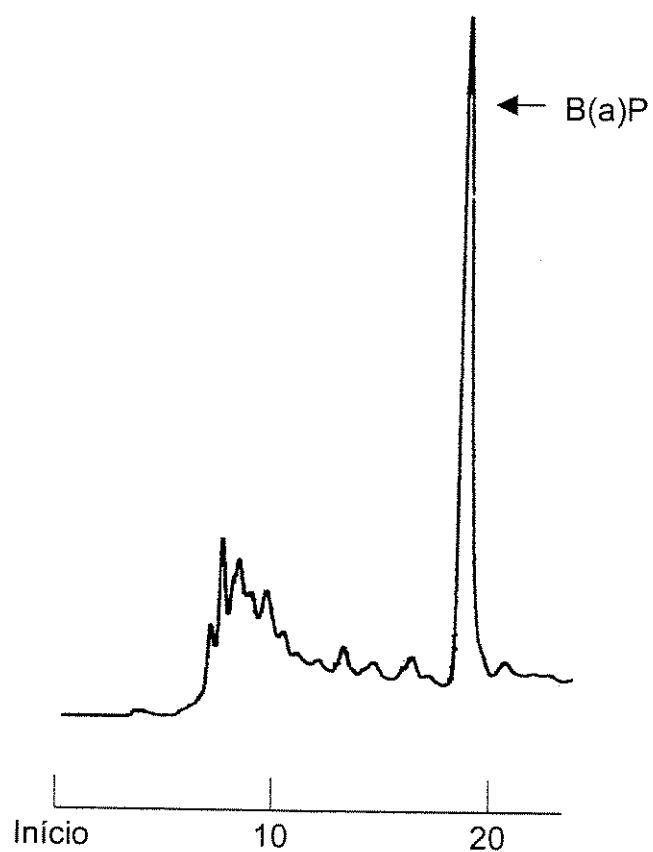


FIGURA 3 – Cromatograma da amostra salmão defumado em lata. Condições cromatográficas: fase móvel acetonitrila : água (85 : 15), fluxo 0,5 ml/min, detector de fluorescência, coluna C-18, temperatura de coluna 33°C. B(a)P, benzo(a)pireno.

Os valores médios de contaminação com B(a)P em sardinha enlatada (0,29µg/kg) foram superiores aos encontrados em atum enlatado (0,16µg/kg) e em filé de peixe (0,08µg/kg). Estes resultados são compatíveis com os obtidos por LAWRENCE e WEBER [14], que observaram níveis médios de B(a)P de 0,5µg/kg em sardinha enlatada e valores menores que 0,05µg/kg em “catfish” não defumado. Não foram encontrados na literatura dados sobre a contaminação de atuns enlatados por B(a)P.

Os mexilhões e os peixes defumados foram os dois produtos que apresentaram os maiores níveis de B(a)P. Das três marcas de mexilhão congelado analisadas, apenas uma apresentou contaminação inferior a 1µg/kg. A amostra de mexilhão enlatado foi a que apresentou maior nível de B(a)P (4,54µg/kg) dentre todas as amostras de analisadas. Este valor é superior aos relatados por SPEER *et al.* [23] para diferentes amostras do mesmo produto (0,8 a 1,7µg/kg) e confirma o fato de os moluscos serem organismos filtradores que, ao contrário dos peixes caracterizam-se por bioacumular HPAs, devido à sua capacidade reduzida de biotransformação e excreção [9, 12, 15]. Níveis relativamente mais elevados de B(a)P em mexilhões e em peixes defumados têm sido evidenciados na literatura científica [14, 23].

Em todas as amostras de peixes defumados a concentração de B(a)P foi superior a 1µg/kg (1,97 a 3,45µg/kg), reforçando a idéia de que o processo de defumação pode aumentar efetivamente o nível de HPAs no produto final [29]. Estes valores são superiores aos relatados por MORET *et al.* [18] e LAWRENCE e WEBER [14], que determinaram o nível máximo de 0,5µg/kg de B(a)P em trutas

defumadas, e inferiores às quantidades encontradas por ZABIK *et al.* [30] (6,22 - 10,27µg/kg). Os níveis médios de 3,9µg/kg e de 2,46µg/kg de B(a)P encontrados em salmão defumado por GOMMA *et al.* [8] e por FALCÓN *et al.* [6], respectivamente, são mais próximos daqueles obtidos no presente estudo.

Os HPAs que se acumulam na superfície de alimentos defumados são formados durante a queima da fonte geradora de fumaça [30]. As diferenças entre os valores encontrados neste estudo e os descritos na literatura podem ser parcialmente atribuídas ao grau e/ou processo de defumação empregado para a defumação dos peixes [8, 14]. Produtos defumados industrialmente em geral apresentam quantidades menores de HPAs relativamente àqueles que receberam defumação artesanal [14]. A amostra de tainha analisada no presente estudo foi defumada a uma distância de 1,50m da fonte comburente, em câmara fechada, por um período de aproximadamente 36 horas. O grande tempo de defumação e o contato direto do peixe com a fumaça podem ser considerados como os principais responsáveis pela alta contaminação por B(a)P deste pescado.

Níveis de B(a)P maiores que os encontrados em pescados já foram descritos em outros alimentos comercializados no Brasil. Teores médios de 10,9µg/kg foram relatados em azeites de oliva [22] e de 7,67µg/kg em óleos de milho [26]. NOLL e TOLEDO [19] determinaram níveis de B(a)P superiores a 6µg/kg em produtos cárneos submetidos à defumação caseira enquanto YABIKU [28] relatou contaminação na faixa de 0,2 a 1,8µg/kg em diferentes produtos defumados industrialmente.

TABELA 1 – Teor de B(a)P em peixes.

Amostras		B(a)P ($\mu\text{g/kg}$)	
Filés de peixes	Produto/marca	Média	Desvio padrão
	Merluza	0,03	0,01
	Cação	0,04	0,01
	Pescada	ND	-
	Mapará	0,11	0,03
	Corvina	0,06	0,08
	Surubim	0,05	0,02
	Truta	0,09	0,03
	Bacalhau salgado	0,27	0,09
	Sardinha fresca	0,11	0,03
	média	0,08	
Sardinha em lata			
	Marca 1	0,53	0,06
	Marca 2	0,12	0,09
	Marca 3	0,28	0,01
	Marca 4	0,18	0,06
	Marca 5	0,32	0,03
	média	0,29	
Atum em lata			
	Marca 1	0,09	0,01
	Marca 2	0,33	0,03
	Marca 3	0,15	0,01
	Marca 4	0,12	0,03
	Marca 5	0,09	0,01
	média	0,16	
Defumados			
	Salmão em lata *	2,44	0,16
	Salmão *	2,74	0,98
	Surubim *	1,97	0,34
	Haddock *	2,01	0,12
	Tainha **	3,45	1,09
	média	2,5	

Os valores correspondem à média de determinações em duplicata

ND = não detectado ($< 0.005\mu\text{g/kg}$)

(*) Defumação industrial

(**) Defumação caseira

TABELA 2 – Teor de B(a)P em frutos do mar

Amostras		B(a)P ($\mu\text{g/kg}$)	
Camarão	Produto/marca	Média	Desvio padrão
	Camarão em lata	0,13	0,01
	Camarão congelado I	0,06	0,02
	Camarão congelado II	0,05	0,03
	Camarão congelado III	0,34	0,18
	média	0,14	
Mexilhão			
	Mexilhão lata	4,54	0,63
	Mexilhão congelado I	1,08	0,32
	Mexilhão congelado II	3,41	1,76
	Mexilhão congelado III	0,45	0,19
	média	2,37	
Carne de siri			
	Carne de siri em lata	0,32	0,2
	Carne de siri congelada I	0,09	0,38
	Carne de siri congelada II	0,02	0,11
	média	0,14	

Os valores correspondem à média de determinações em duplicata

4 – CONCLUSÃO

A presença de B(a)P foi observada em todas as amostras analisadas, embora em níveis relativamente inferiores aos relatados para outras categorias de alimento comercializadas no Brasil. Peixes frescos, camarões e carne de siri, devido ao seu hábil sistema de biotransformação, contêm baixos teores de B(a)P, não representando importante fonte de exposição a este contaminante. Peixes defumados e mexilhões, como esperado, foram os alimentos que mostraram os níveis mais elevados de B(a)P, o que pode se tornar um motivo de preocupação. Recomenda-se, portanto, que esta pesquisa seja repetida, abrangendo um maior número de amostras, de forma a melhor caracterizar a contribuição dos mexilhões e peixes defumados como fonte de B(a)P na dieta de grupos específicos da população, que consomem regularmente estes alimentos.

5 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ALONGE, D.O. Carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) determined in Nigerian Kundi (smoked dried meat). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, vol.43, p.167-172, 1988.
- [2] AMERICAN CHEMICAL SOCIETY. Guidelines for data acquisition and quality evaluation in environmental chemistry. **Analytical Chemistry**, Washington, vol.52, p.2242-2249, 1980.
- [3] BAUMARD, P.; BUDZINSKI, H.; GARRIGUES, P.; DIZER, H. e HANSEN, P.D. Polycyclic aromatic hydrocarbons in recent sediments in mussels (*Mytilus edulis*) from the Western Baltic Sea: occurrence, bioavailability and seasonal variations. **Marine Environmental Research**, Barking, vol.47, p.17-47, 1999.
- [4] DUNGEL, N. The special problem of cancer in Iceland with particular reference to dietary factor. **Journal of the American Medical Association**, Chicago, vol.178, p.93-95, 1961.

- [5] FALCÓN, M. S. G.; AMIGO, S. G.; YUSTY, M. A. L.; VILLAIZÁN, M.J.L.A. e LOZANO, J. S. Enrichment of benzo(a)pyrene in smoked food products and determination by high-performance liquid chromatography-fluorescence detection. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, vol.753, p.207-215, 1996.
- [6] FALCÓN, M. S. G.; AMIGO, S. G.; YUSTY, M. A. L.; LOZANO, J. S. Determination of benzo(a)pyrene in some Spanish commercial smoked products by HPLC-FL. **Food Additives and Contaminants**, London, vol.16, n.1, p.9-14, 1999.
- [7] FOSSI, M. C.; CASINI, S.; SAVELLI, C.; CORBELLI, C.; FRANCHI, E.; MATTEI, N.; SANCHEZ-HERNANDEZ, J. C.; CORSI, I.; BAMBER, S. e DEPLEDGE, H. M. Biomarker responses at different levels of biological organisation in crabs (*Carcinus aestuarii*) experimentally exposed to benzo(a)pyrene. **Chemosphere**, Kindlington, vol.40, p.861-874, 2000.
- [8] GOMAA, E. A.; GRAY, J. I.; RABIE, S. LOPEZ-BOTE, C. e BOOREN, A. M. Polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked food products and commercial liquid smoke flavourings. **Food Additives and Contaminants**, London, vol.10, n.5, p.503-521, 1993.

- [9] HELLOU, J.; UPSHALL, C.; PAYNE, J. F. e HODSON, P. V. Polycyclic aromatic compounds in cod (*Gadus morhua*) from the Northwest Atlantic and St. Lawrence Estuary. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, vol.145, p.71-79, 1994.
- [10] HOWARD, J. W. e FAZIO, T. Review of polycyclic aromatic hydrocarbons in foods. **Journal of Association of Official Analytical Chemists**, Arlington, vol.63, n.5, 1980.
- [11] IARC. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. Part 1, Chemical, Environmental and Experimental Data, Working group on the valuation of the carcinogenic risk of chemical to humans. (Lyon, France: International Agency for Research on Cancer). Vol.32, 1983.
- [12] JACKSON, T.J.; WADE, T.L.; McDONALD, T.J.; WILKINSON, D.L. e BROOKS, J.M. Polycyclic aromatic hydrocarbons contaminants in oysters from the Gulf of Mexico (1996-1990). **Environmental Pollution**, London, vol.83, p.291-298, 1994.
- [13] JENKE, D. R. Chromatographic method validation: A review of current practice and procedures. II. Guidelines for primary validation parameters. **Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies**, Coconut Creek n.19, p.737-757, 1996.

- [14] LAWRENCE, J. F. e WEBER, D. F. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in some fish, shellfish, and meat products by liquid chromatography with confirmation by gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, vol.32, n.4, p.789-794, 1984.
- [15] LEBO, J. A.; ZAJICEK, J. L.; SCHWARTZ, T. D. e SMITH, L. M. Determination of monocyclic and polycyclic aromatic hydrocarbons in fish tissue. **Journal of Association of Official Analytical Chemists**, Arlington, vol.74, p. 538-544, 1991.
- [16] LO, M. T. e SANDI, E. Polycyclic aromatic hydrocarbons (polynuclears) in foods. **Residue Reviews**, London, vol.69, p.35-86, 1978.
- [17] MILLER, J. C. e MILLER, J. N. Statistics for analytical chemistry. Ellis Howood Limited, Chichester, 1993.
- [18] MORET, S.; CONTE, L. e DEAN, D. Assesment of polycyclic aromatic hydrocarbons content of smoked fish by means of fast HPLC/HPLC method. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, vol.47, p.1367-1371, 1999.

- [19] NOLL, I.B. e TOLEDO, M.C.F. Benzo(a) pireno em carnes defumadas pelos processos caseiro e industrial. **Revista Brasileira de Toxicologia**, São Paulo, vol.10, p.19-23, 1997.
- [20] PINO, V.; AYALA, J. H.; AFONSO, A. M. e GONZÁLEZ, V. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in marine sediments by high-performance liquid chromatography after microwave-assisted extraction with micellar media. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, vol.869, p.515-522, 2000.
- [21] POINTET, K. e MILLIET, A. PAHs analysis of fish whole gall bladders and livers from the Natural Reserve of Camague by GC/MS. **Chemosphere**, Kindlington, vol.40, p.293-299, 2000.
- [22] PUPIN, A. M. e TOLEDO, M. C. F. Benzo(a)pirene in olive oils on the Brazilian market. **Food Chemistry**, Oxford, vol.55, p.185-188, 1996.
- [23] SPEER, K; STEEG, E.; HORSTMANN, P e MONTAG, A. Determination and distribution of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in native vegetable oils, smoked fish products, mussels and oyster, and bream from the river Elbe. **Journal of High resolution Chromatography**, Heidelberg, vol.13, p.104-111, 1990.

- [24] STRICKLAND, P.; KANG, D. e SITHISARANKUL, P. Polynuclear aromatic hydrocarbons metabolites in urine as biomarkers of exposure and effect. **Environmental Health Perspectives**, Research Triangle Park, vol.104, p.927-932, 1996.
- [25] TAMAKAWA, K.; SEKI, T. e TSUNODA, A. HPLC detection of aromatic hydrocarbons. In: Nollet, L.M.L., ed. Food Analysis by HPLC. New York. Marcel Dekker, Inc, 1992.
- [26] TOLEDO, M. C. F. e CAMARGO, M. S. F. O. Benzo(a)pireno em óleos de milho produzidos e comercializados no Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, vol.18, p.73-76, 1998.
- [27] TRAPIDO, M. Polycyclic aromatic hydrocarbons in Estonia soil: contamination and profiles. **Environmental Pollution**, London, vol.105, p.67-74, 1999.
- [28] YABIKU, H. Y.; MARTINS, M.; TAKAHASHI, M. Y. Levels of benzo(a)pyrene and other polycyclic aromatic hydrocarbons in liquid smoke flavour and some smoked foods. **Food Additives and Contaminants**, London vol.10, n.4, p.339-405, 1993.

- [29] ZABIK, M. E. e ZABIK, M. J. Influences of processing on environmental contaminants in foods. **Food Technology**, Chicago, vol.10, p.225-229, 1996.
- [30] ZABIK, M. E.; BOOREN, A.; ZABIK, M. J.; WELCH, R. e HUPHREY, H. Pesticides residues, PCBs and PAHs in baked, charbroiled, salt boiled and smoked Great Lakes lake trout. **Food Chemistry**, Oxford, vol.55, n.3, p.231-239, 1996.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE