

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

AVALIAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO DE CARNES POR
Parcer HIDROCARBONETOS POLIAROMÁTICOS

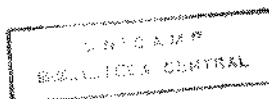
*Este exemplar corresponde a redação final
da tese defendida por Isa Beatriz Noll
e aprovada pela Comissão Julgadora em
29-11-93.*

m. número de f. 100
Profa. Dra. Maria Cecilia de Figueiredo Toledo
Orientadora

Isa Beatriz Noll (m) 192
Orientada

Tese apresentada a Faculdade de Engenharia de Alimentos para a
obtenção do título de Doutor em Ciência de Alimentos.

Campinas, Outubro de 1993



BANCA EXAMINADORA

m. Maria de F. Toledo

Profa. Dra. Maria Cecilia de Figueiredo Toledo
Orientadora

Lucia Valente Soares

Profa. Dra. Lucia Maria Valente Soares
Membro

Waldemar Ferreira de Almeida

Prof. Dr. Waldemar Ferreira de Almeida
Membro

Elizabeth Souza Nascimento

Profa. Dra. Elizabeth de Souza Nascimento
Membro

P. E. de Felício

Prof. Dr. Pedro Eduardo Felício
Membro

Profa. Dra. Concetta Kacheres
Membro

Prof. Dr. Antonio Luis Pires Valente
Membro

Campinas, 29 de novembro de 1993

AGRADECIMENTOS

A Profa. Dra. Maria Cecilia de Figueiredo Toledo minha admiração e meu agradecimento especial por sua orientação incansável e ilimitada disposição em trocar idéias; por sua dedicação e amizade.

A Profa. Dra. Lucia Valente Soares pelo apoio científico, colaborando simpática e dedicadamente na resolução de dúvidas e questionamentos.

Ao colega Antônio Marcos Pupin, por sua amizade muito especial, incentivando nas horas difíceis desta pesquisa, colaborando com experiência e inteligência.

A todos os colegas do Laboratório de Toxicologia de Alimentos e do Laboratório de Análises de Alimentos, pelo carinho e amizade. Menção especial a Regina, a Silvana, ao Eduardo e a Neura.

Ao Marquinhos, por sua criatividade e agilidade (mesmo de pé quebrado), em transformar todos os conhecimentos adquiridos, "num simples XT", na tese propriamente dita.

A ABIA pelo fornecimento das cópias deste trabalho.

A FAPESP e ao CNPq, pela concessão de auxílio à pesquisa, que tornou possível a realização deste trabalho.

A Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP, pela boa acolhida e pelas facilidades oferecidas.

Ao Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos da UFRGS pelo apoio e incentivo em assumir e concluir este empreendimento.

Aos meus familiares pela compreensão e por todo o apoio.

A Rosaleine Grando, por sua amizade e por toda a colaboração, resolvendo os problemas que surgiram em Porto Alegre

O valor de um ideal pode ser medido
pela quantidade de sacrifício que
você é capaz de fazer por ele

Golsworthy

ÍNDICE GERAL

	Página
ÍNDICE GERAL.....	i
ÍNDICE DE TABELAS.....	v
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vii
RESUMO.....	ix
SUMMARY.....	x
I. INTRODUÇÃO.....	1
II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
II.1. Histórico.....	3
II.2. Estruturas Químicas e Propriedades Físico-Químicas dos HPAs.....	4
II.3. Toxicidade dos HPAs.....	6

II.4. Evidências Epidemiológicas por Exposição a HPAs....	11
II.5. Origem dos HPAs.....	12
II.6. Fontes de HPAs em Alimentos.....	13
II.6.1. HPAs em Produtos Defumados.....	14
Tipo de madeira.....	17
Temperatura de combustão.....	18
Aporte de oxigênio.....	19
II.6.2. HPAs em Carnes Grelhadas e em Churrasco.....	23
II.7. Consumo de HPAs Através de Alimentos.....	26
II.8. Legislação.....	27
II.9. Metodologia Analítica.....	30
II.9.1. Extração.....	31
II.9.2. Purificação por Partição e em Coluna.....	35
II.9.2.1. Partição	35
II.9.2.2. Coluna.....	36
II.9.3. Separação, Identificação e Quantificação.....	38
II.9.3.1. Cromatografia em Camada Delgada.....	38
II.9.3.2. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.....	39
II.9.3.3. Cromatografia Gasosa.....	40
III. MATERIAL E MÉTODOS.....	45
III.1. Reagentes.....	45

III.2. Equipamentos.....	46
III.3. Amostras.....	46
III.3.1. Carnes Defumadas.....	47
a. Carnes defumadas industrialmente.....	47
b. Carnes defumadas pelo processo caseiro.....	47
III.3.2. Churrasco.....	48
III.4. Procedimentos.....	51
III.4.1. Extração e Purificação.....	51
III.4.2. Cromatografia gasosa em coluna capilar.....	53
a. Programação rápida de temperatura.....	53
b. Programação lenta de temperatura.....	53
III.4.3. Confirmação.....	54
III.4.4. Recuperação.....	55
III.4.5. Limite de quantificação.....	55
IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	56
IV.1. Metodologia Analítica.....	56
IV. 1.1. Extração e Purificação.....	56
IV. 1.1.1. Método com Saponificação.....	56
IV. 1.1.2. Método sem Saponificação.....	57
IV.1.2. Cromatografia Gasosa.....	59
IV.1.3. Quantificação.....	68
IV.1.4. Confirmação.....	69

IV.1.5. Recuperação..... 72

IV.1.6. Limite de Quantificação do Método..... 74

IV.2. B(a)P em Carnes Defumadas..... 74

IV.3. HPAs em Carnes Processadas como Churrasco..... 80

IV.4. Considerações Finais..... 91

V. CONCLUSÕES..... 93

VI. BIBLIOGRAFIA..... 95

ÍNDICE DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Fontes e vias de contaminação dos alimentos..	15
Tabela 2. Concentração de B(a)P em alimentos.....	16
Tabela 3. Teores de benzo(a)pireno em produtos defumados.....	22
Tabela 4. Teores de benzo(a)pireno em produtos cárneos grelhados.....	25
Tabela 5. Sistemas de partição utilizados por diferen- tes autores.....	36
Tabela 6. Fases estacionárias usadas em colunas capila- res para separação de HPAs.....	42
Tabela 7. Programações de temperatura utilizadas por diferentes autores.....	68
Tabela 8. Recuperação de benzo(a)pireno em diferentes carnes.....	72
Tabela 9. Teores de B(a)P ($\mu\text{g/kg}$) em derivados de suíno defumados pelo processo industrial.....	75
Tabela 10. Teores de B(a)P ($\mu\text{g/kg}$) em lombo de suíno defu- mado pelo processo industrial.....	75
Tabela 11. Teores de B(a)P ($\mu\text{g/kg}$) em produtos de aves defumados industrialmente.....	76
Tabela 12. Teores de B(a)P ($\mu\text{g/kg}$) em produtos defumados pelo processo caseiro.....	79
Tabela 13. Teores de HPAs ($\mu\text{g/kg}$) em coxa/sobre coxa de frango assadas sobre carvão.....	81

Tabela 14. Teores de HPAs ($\mu\text{g/kg}$) em lombo de porco assado sobre carvão.....	82
Tabela 15. Teores de HPAs ($\mu\text{g/kg}$) em asas de frango assadas sobre carvão.....	83
Tabela 16. Teores de HPAs ($\mu\text{g/kg}$) em linguças de origem industrial e caseira, assadas sobre carvão....	84
Tabela 17. Teores de HPAs ($\mu\text{g/kg}$) em churrasco de picanha sem gordura.....	86
Tabela 18. Teores de HPAs ($\mu\text{g/kg}$) em churrasco de picanha com gordura.....	87
Tabela 19. Teores de HPAs ($\mu\text{g/kg}$) em churrasco de picanha sem gordura, assada com gordura depositada sobre a brasa.....	89
Tabela 20. Teores de HPAs ($\mu\text{g/kg}$) em churrasco de picanha sem gordura, assada sobre madeira.....	90

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Estruturas químicas de alguns HPAs.....	5
Figura 2. Principal via de toxificação do B(a)P.....	7
Figura 3. "Bay-region" de diol-epóxidos de diversos HPAs.....	8
Figura 4. Ligação covalente do B(a)P com a guanina.....	9
Figura 5. Aspectos do metabolismo do B(a)P.....	10
Figura 6. Esquema hipotético de formação de HPAs.....	13
Figura 7. Procedimento de extração e purificação segundo LARSSON (1982).....	33
Figura 8. Procedimento de extração e purificação segundo GRIMMER & JACOB (1987).....	34
Figura 9. a. Churrasqueira de alvenaria.....	49
b. Churrasqueira portátil.....	49
Figura 10. a. Picanha com gordura.....	50
b. Picanha ao ponto.....	50
Figura 11. Cromatograma por CG dos padrões.....	60
Figura 12. Cromatograma por CG de salame defumado caseiro.....	61
Figura 13. Cromatogramas por CG de asa de frango assada a 15 cm do fogo.....	62
Figura 14. Cromatograma por CG de lombo assado a 15 cm do fogo.....	63

Figura 15. Cromatograma de picanha sem gordura, assada sobre madeira, a 40 cm do fogo.....	64
Figura 16. Cromatograma de picanha sem gordura, assada sobre madeira, a 15 cm do fogo.....	65
Figura 17. Cromatograma de picanha sem gordura, assada com gordura na brasa, distante a 40 cm do fogo.....	66
Figura 18. Cromatograma de picanha sem gordura, assada com gordura na brasa, distante a 15 cm do fogo.....	67
Figura 19a. Cromatograma por CG-MS de churrasco de lombo.....	70
19b. Espectro de massa dos picos A e B.....	
Figura 20a. Cromatograma por CG-MS de churrasco de lombo.....	71
20b. Espectro de massa dos picos C, D e E.....	
Figura 21. Cromatograma por CG-MS de óleo de oliva, conforme apresentado por VREULS (1991).....	72
Figura 22. Espectros obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fotodiodos....	73

RESUMO

No presente estudo investigou-se a presença de alguns hidrocarbonetos poliaromáticos (HPAs) em produtos cárneos defumados pelos processos industrial e caseiro e em carnes suína, bovina e frango, assadas como churrasco. Neste último experimento estudou-se também a influência de alguns fatores na formação de HPAs. A metodologia utilizada para a determinação de HPAs envolveu extração com n-hexano, limpeza do extrato por partição líquido-líquido e por coluna de sílica gel, separação por cromatografia gasosa com coluna capilar e detecção por ionização de chama. Entre 17 amostras de carnes defumadas industrialmente, 12 não apresentaram contaminação por benzo(a)pireno B(a)P e em apenas 3 produtos o teor deste composto ultrapassou o limite de 1 µg/kg. Nas carnes defumadas pelo processo caseiro a contaminação foi relativamente maior, correspondendo a níveis de B(a)P entre 1,80 e 6,09 µg/kg. Em geral, as carnes assadas a uma menor distância do carvão apresentaram níveis elevados de HPAs. O teor de B(a)P para picanhas com gordura, assadas imediatamente acima do fogo (15 cm), variou entre 3,11 e 16,41 µg/kg, enquanto que para aquelas assadas a uma maior distância (40 cm), os valores variaram entre n.d. e 1,15 µg/kg. A presença de gordura separável na carne representou um papel fundamental para sua contaminação, independentemente da distância da fonte calórica. Os resultados obtidos evidenciam a importância das condições de processamento para a formação de HPAs em carnes e destacam a contribuição do churrasco como fonte de HPAs na dieta do consumidor brasileiro.

SUMMARY

In the present study the occurrence of polyaromatic hydrocarbons (PAHs) in home and commercially smoked meat and in charcoal broiled meat was investigated. In the grilling experiment the conditions that lead to the formation of PAHs were also studied. The analytical method used to determine the PAHs included extraction with n-hexane, clean-up by liquid-liquid partition and column chromatography, and separation by capillary gas chromatography with detection by flame ionization. No detectable level of B(a)P was found in 12 out of 17 commercial smoked products analyzed while 3 samples presented levels above 1 µg/kg. The levels of B(a)P in the home smoked meats were relatively higher, corresponding to values between 1.80 and 6.09 µg/kg. In general, the meat cooked closer to the charcoal presented the highest levels of PAHs. For fatty cap of rumps cooked immediately above (15 cm) and far (40 cm) from the heating source, the amount of B(a)P ranged from 3.11 to 16.41 µg/kg and from n.d. to 1.15 µg/kg, respectively. These results show the importance of the processing conditions for the formation of PAHs in meat and the contribution of the grilled meat as a source of PAHs in the Brazilian diet.

I. INTRODUÇÃO

Hidrocarbonetos poliaromáticos (HPAs) são compostos formados em processos de combustão incompleta de todas as espécies de matérias orgânicas, podendo ser encontrados como contaminantes em matrizes complexas do meio ambiente, incluindo os alimentos.

O potencial carcinogênico de alguns HPAs, principalmente o benzo(a)pireno (B(a)P), testado e comprovado em animais de laboratório, tem estimulado pesquisas no sentido de se identificar e quantificar as prováveis fontes de exposição humana a estes compostos, entre elas a dieta.

Evidências epidemiológicas indicam uma associação entre câncer de pele e de pulmão em humanos e exposição ocupacional a hidrocarbonetos poliaromáticos. Quanto à associação entre câncer e ingestão destes compostos, até o presente existem apenas algumas suposições.

A presença de HPAs em alimentos pode ter origem tanto na poluição ambiental como no processamento. No caso específico de produtos cárneos, a defumação e a pirólise da gordura destacam-se entre as principais fontes de formação de HPAs, enquanto que em vegetais a poluição ambiental parece ser a responsável pela contaminação.

No Brasil, não existe uma legislação específica que regule a presença de HPAs em alimentos. Alguns países, entretanto, consideram o benzo(a)pireno como um indicador arbitrário para o potencial carcinogênico de alimentos, e estabelecem o valor de 1 µg/kg como a tolerância máxima para produtos cárneos.

Quando esta pesquisa foi iniciada, em 1990, não havia qualquer informação disponível sobre a ocorrência de HPAs na dieta brasileira.

Considerando-se, portanto, o risco potencial à saúde humana por exposição a hidrocarbonetos poliaromáticos, e o fato de que a nível de Brasil não existem dados referentes à análise sistemática e comparativa destes compostos, o presente trabalho teve por objetivos:

1. Avaliar metodologias de extração e de determinação de HPAs, descritas na literatura.
2. Determinar os níveis de B(a)P em produtos cárneos defumados industrializados e caseiros.
3. Verificar a presença de alguns HPAs em carnes assadas como churrasco, estudando-se a influência da proximidade da fonte de calor, bem como do teor de gordura da carne.

II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

II.1. Histórico

Os fundamentos para o estudo científico da carcinogênese química em geral e da carcinogênese dos hidrocarbonetos, em particular, datam de 1775, quando PERCIVAL POTT atribuiu o câncer de escroto de limpadores de chaminés a sua exposição ocupacional à fuligem (DIPPLE, 1984). Os primeiros testes de carcinogenicidade, relacionados com os produtos obtidos da destilação do alcatrão, datam, entretanto, de 1912 (publicado em 1915), quando YAMAGIWA e YCHIGAWA induziram a formação de tumores após aplicação persistente destes produtos em orelhas de coelhos (IARC, 1985).

KENNAWAY, em 1924, segundo citação do próprio autor em trabalho publicado em 1955, sugeriu que a fração carcinogênica tinha as características químicas dos hidrocarbonetos e que apresentava alto ponto de ebulição. MAYNEORD (1927), (citado por COOK et alii, 1932) atribuiu a esta fração características fluorescentes.

Finalmente em 1933, os mesmos autores, COOK et alii, partindo de 2 toneladas de piche, isolaram a fração com as características acima citadas e conseguiram identificar o benzo(a)pireno como o principal componente carcinogênico. Além dele, foram identificadas as estruturas do perileno, do benzo(a)antraceno e do benzo(e)pireno.

As pesquisas referentes à presença de HPAs em carnes grelhadas tiveram início, no mundo ocidental, nos anos 60, com o trabalho de SEPPILLI & SFORZOLINI (1963). No bloco comunista, as pesquisas se iniciaram na década de 50, com a análise de produtos defumados (DOBES et alii, 1955; GORELOVA & DIKUN, 1958).

A associação da incidência de câncer com o consumo de HPAs foi inicialmente sugerida por DUNGAL (1961), que procurou

relacionar a causa da excepcional frequência de câncer do aparelho digestivo na Islândia com o elevado consumo de produtos defumados.

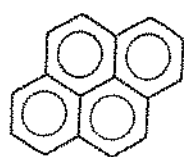
II.2. Estruturas Químicas e Propriedades Físico-Químicas dos HPAs

Os hidrocarbonetos poliaromáticos são compostos orgânicos formados pela fusão de dois ou mais anéis benzênicos, que podem ou não possuir grupos substituintes ligados a um ou mais anéis (LO & SANDI, 1978). A estrutura química de alguns destes compostos pode ser observada na Figura 1.

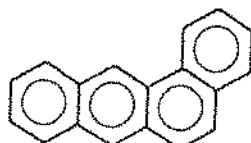
Uma elevada solubilidade em solventes orgânicos e, conseqüentemente, uma baixa solubilidade em água é uma das principais características dos HPAs. Entretanto, em presença de outros compostos orgânicos e de detergentes aniônicos, a solubilidade em água pode aumentar sensivelmente, facilitando sua adsorção em diferentes superfícies e favorecendo sua passagem tanto pelo meio ambiente como pela cadeia alimentar (ANDELMANN & SUESS, 1970; BORIES, 1989).

A estabilidade dos HPAs pode ser afetada pela luz e pelo oxigênio; neste sentido, é de importância fundamental o ambiente que envolve estes contaminantes, sendo tanto maior sua degradação quanto maior for a intensidade de luz, a concentração de oxigênio, a temperatura e a polaridade (ANDELMANN & SUESS, 1970; LOWE et alii, 1987).

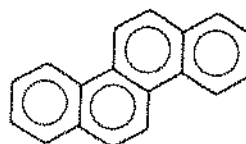
TAKATSUKI et alii (1985) estudaram a degradação fotoquímica do B(a)P em meio alcalino e comprovaram que este composto se decompõe facilmente neste meio, pela incidência da luz. É imprescindível, portanto, proteger da luz todo o material utilizado ou usar material de vidro âmbar durante todo o procedimento de análise deste composto.



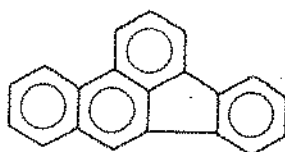
PIRENO



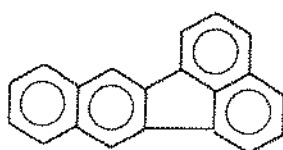
BENZO(a)ANTRACENO



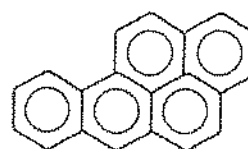
CRISENO



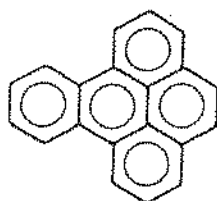
BENZO(b)FLUORANTENO



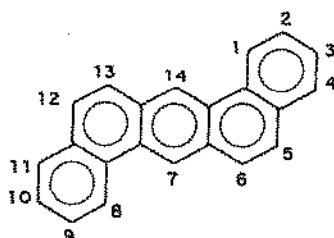
BENZO(k)FLUORANTENO



BENZO(a)PIRENO



BENZO(e)PIRENO



DIBENZO(a,h)ANTRACENO

Figura 1. Estruturas químicas de alguns HPAs.

A absorção no U.V. e a fluorescência, propriedades inerentes à maioria dos hidrocarbonetos poliaromáticos, podem ser aproveitadas para sua identificação e quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência e também por cromatografia em camada delgada (FRITZ, 1979; HELLMANN, 1983; STOYKE & MULLER, 1991; PERFETTI et alii, 1992).

II.3. Toxicidade dos HPAs

A partir das associações de PERCIVAL POTT (1775) entre a atividade ocupacional de limpadores de chaminés com o câncer de escroto, os hidrocarbonetos poliaromáticos passaram a ser estudados quanto ao seu potencial carcinogênico (IARC, 1985).

Para exercer ação toxicológica, estes compostos necessitam de biotransformação; isto significa que os responsáveis pela atividade carcinogênica são metabólitos intermediários, formados por sistemas enzimáticos específicos (JERINA et alii, 1978; HERNDON, 1981; PELKONEN & NEBERT, 1982; CONNEY, 1982; IARC, 1983; DIPPLE et alii, 1984; AGARWAL et alii, 1991).

O principal sistema enzimático envolvido no metabolismo dos HPAs é o sistema das oxidases de função mista, que tem o citocromo P 450 como o representante mais significativo. NADH, NADPH e oxigênio molecular são necessários para transformar estes compostos não polares em derivados hidroxí ou epoxi mais polares (JERINA et alii, 1978; DIPPLE et alii, 1984; WALL et alii, 1991). Assim sendo, por ação do sistema P 450, os HPAs são inicialmente transformados em óxidos, que depois são metabolizados estereoespecificamente pelas epóxido-hidrolases, dando intermediários que, por sua vez, são biotransformados estereoseletivamente pelo citocromo P 450 no carcinógeno final. A via mais importante do metabolismo do B(a)P, evidenciada pelas setas mais fortes, é mostrada na Figura 2, que identifica o 7,8-dihidrodiol-9,10-epóxido-benzo(a)pireno como o principal metabólito ativo deste composto (CONNEY, 1982).

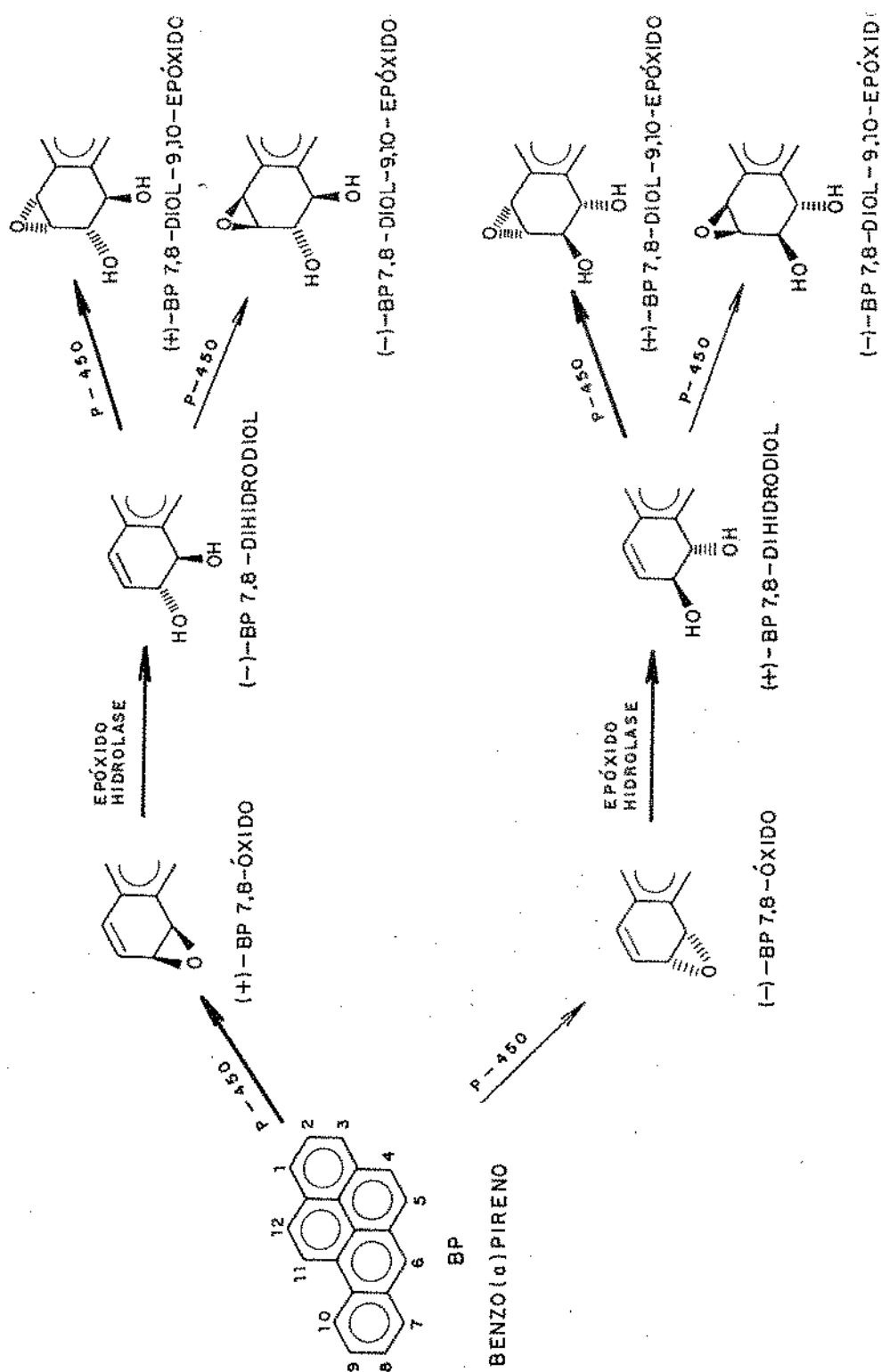


Figura 2. Principal via de biotransformação do B(a)P que leva à formação de metabólitos ativos (CONNEY, 1984).

De acordo com os estudos de JERINA et alii (1978), a estrutura química responsável pela atividade carcinogênica dos HPAs tem relação com a chamada "bay-region". Esta região, formada pela adição angular de um anel benzênico a uma porção linear de um hidrocarboneto poliaromático, pode ser visualizada, p.ex., entre as posições 10 e 11 do B(a)P (Figura 3) (DIPPLE et alii, 1984).

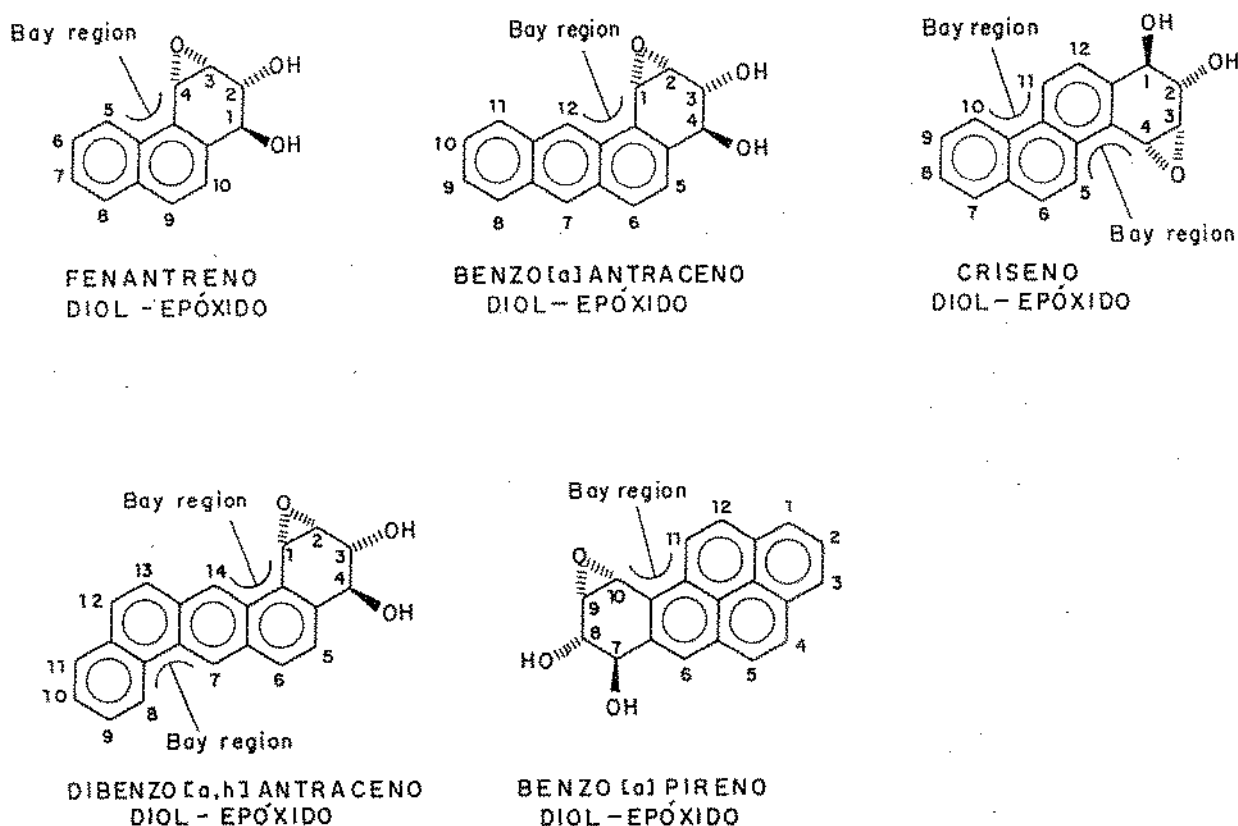


Figura 3. "Bay-region" de diol-epóxidos de diversos HPAs.
(CONNEY, 1982).

Os trabalhos de JERINA et alii (1978), de HERNDON (1981) e de PELKONEM & NEBERT (1982) mostraram que os dihidrodiol epóxidos, formados em anéis benzênicos saturados e adjacentes a "bay-region", sofrem abertura do anel para formar um ion carbônio com muito mais facilidade do que os dihidrodiol epóxidos que não fazem parte de uma "bay-region".

Os estudos de CONNEY (1982), de PHILLIPS (1983) e de DIPPLE et alii (1984) também demonstraram a ativação estereoespecífica do B(a)P, destacando a importância da bay-region para sua interação com componentes celulares. Segundo estes autores, a interação dos diol-epóxidos do B(a)P com o DNA e com polinucleotídeos ocorre principalmente entre o C-10 do B(a)P e o grupo exocíclico 2-amino da guanina (Figura 4).

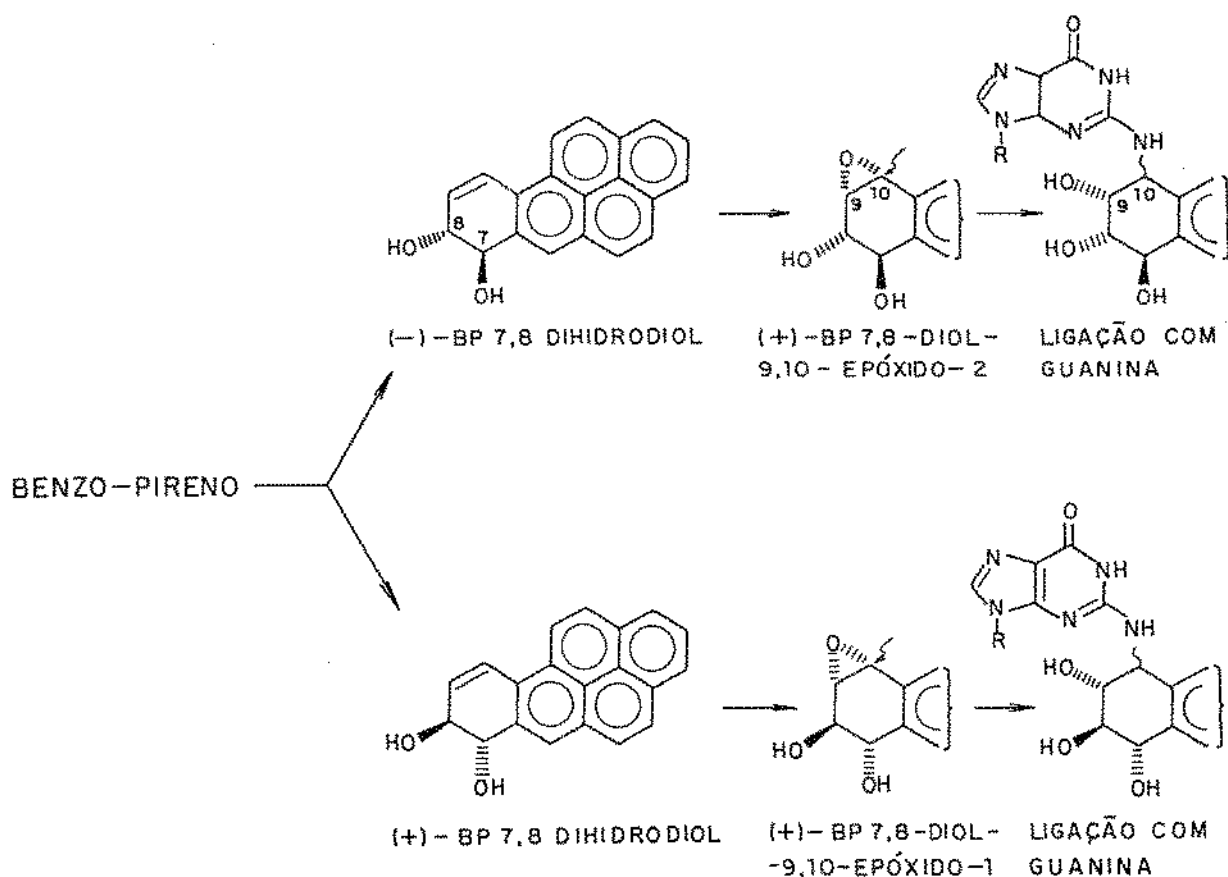


Figura 4. Ligação covalente do B(a)P com a guanina.

(CONNEY, 1982)

II.4. Evidências Epidemiológicas por Exposição a HPAs

A relação entre câncer e ingestão de HPAs teve como pioneiro o pesquisador DUNGAL (1961), que tentou correlacionar a alta incidência de câncer de estômago, na Islândia, com o consumo de carnes e peixes defumados. Apesar de indícios de uma associação positiva, não foi possível, segundo o próprio autor, estabelecer conclusões definitivas.

Segundo a International Agency for Research on Cancer (IARC, 1983), a comprovação de carcinogenicidade para humanos requer estudos muito detalhados para que se possa concluir que um determinado composto realmente é o causador do câncer em um órgão ou em um sistema determinado. Para a maioria dos compostos avaliados pela IARC, para os quais existem evidências suficientes de carcinogenicidade em animais, os dados relativos à carcinogenicidade em humanos são, ou insuficientes, ou inexistentes.

De acordo com os conhecimentos atuais, é difícil estabelecer uma relação entre a dose (mg/kg p.c./dia) de um determinado composto químico necessária para produzir câncer em animais de laboratório e a dose que induziria uma incidência de câncer semelhante em humanos. Os dados disponíveis, contudo, sugerem que pode existir esta relação, pelo menos para algumas classes de carcinógenos químicos. Entretanto, não existem métodos aceitáveis que permitam quantificar os possíveis erros que tais procedimentos de extrapolação envolveriam (IARC, 1983).

Portanto, na ausência de dados adequados para humanos, atenção especial deve ser dedicada àqueles compostos químicos para os quais existem evidências suficientes quanto a sua carcinogenicidade em animais, uma vez que eles podem representar riscos quanto à incidência de câncer também em humanos (IARC, 1983).

Segundo a mesma monografia, existem evidências suficientes de que o B(a)A, o B(b)F, B(k)F e o B(a)P sejam

carcinogênicos em animais de experimentação e evidências limitadas quanto ao críseno.

Apesar das dificuldades de extrapolação, WALL et alii (1991), realizando testes em ratos transplantados e não transplantados, concluíram que o fígado representa um papel importante no metabolismo de HPAs. Os autores sugerem estratégias para interromper o processo, e consideram que isto poderia representar um avanço no combate à manifestação de carcinogênese em humanos, cujo contato com esta classe de compostos é intenso.

II.5. Origem dos HPAs

A origem dos hidrocarbonetos poliaromáticos está na combustão incompleta de qualquer substância orgânica, envolvendo dois processos principais, que são:

- a. pirólise, quando ocorre a decomposição dos compostos de alto peso molecular em estruturas menores, na maioria radicais livres;
- b. pirossíntese, quando estes compostos formados durante a pirólise se recombinaem para formar estruturas relativamente estáveis, entre elas os HPAs. A formação destes contaminantes sempre acontece em altas temperaturas (BADGER et alii, 1960; RUSZ & MULLER, 1977; POTTHAST, 1979).

A Figura 6 mostra um esquema hipotético da formação dos HPAs durante a combustão de substâncias orgânicas (BADGER, et alii, 1960).

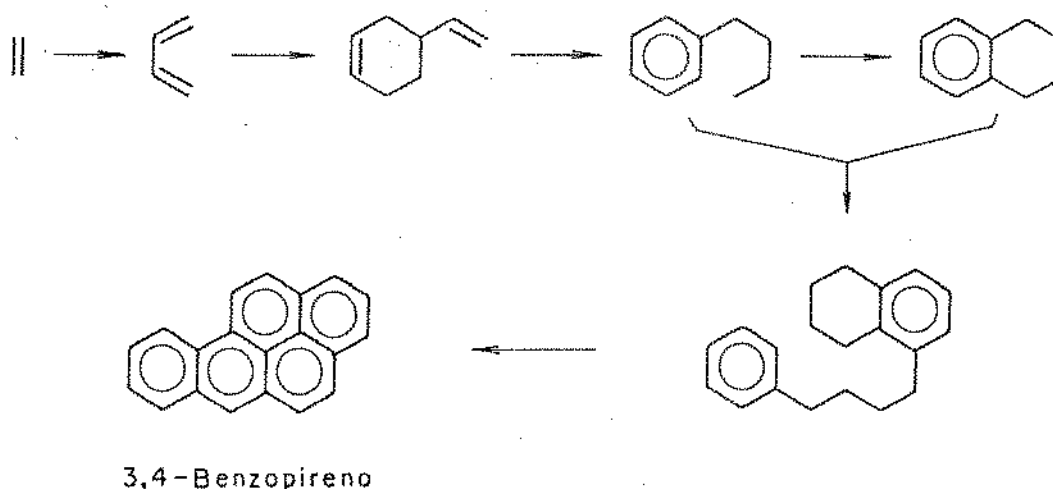


Figura 6. Esquema hipotético de formação de HPAs.

(BADGER, et alii, 1960).

II.6. Fontes de HPAs em Alimentos

Os hidrocarbonetos poliaromáticos são poluentes ubíquos, formados tanto de fontes naturais como de fontes antropogênicas (TANAKA & SAITO, 1988). Entre as fontes naturais podem-se incluir as queimadas nas florestas (GUNTHER et alii, 1967; AUER & MALISSA, 1990) e os processos geoquímicos, isto é, a conversão natural a longo prazo da biomassa em petróleo e carvão (LARSSON, 1986).

As fontes antropogênicas, o tráfego, os sistemas de aquecimento, tanto a nível industrial como residencial, a

incineração, os mais variados processos industriais e os vazamentos acidentais de óleo são os maiores contribuintes para a poluição ambiental, contaminando o solo, o ar e a água (VASSILAROS et alii, 1982; TIEFENBACHER et alii, 1982; LARSSON, 1986; AUER & MALISSA, 1991).

A contaminação dos alimentos pode ter origem tanto na poluição ambiental como no processamento. O primeiro caso atinge as frutas e as verduras cultivadas em regiões industriais ou em beira de estradas movimentadas (LARSSON, 1982), e os alimentos de origem aquática, como os peixes, as ostras e as algas, em função dos efluentes das indústrias (VASSILAROS, et alii, 1982; UTHE & MUSIAL, 1987; LEBO et alii, 1991).

Alguns tipos de processamento, incluindo a defumação, a secagem direta, a torrefação, alguns tipos de cozimento e a refinação podem contaminar, por exemplo, carnes, queijos, grãos, cereais, café e óleos vegetais (HOWARD & FAZZIO, 1969; LAWRENCE & WEBER, 1984; LARSSON, 1986; SPEER et alii, 1990).

Na Tabela 1, elaborada por LARSSON (1986), as principais fontes e vias de contaminação dos alimentos estão evidenciadas, incluindo-se a possível biossíntese de HPAs por microorganismos, algas e plantas. Esta última possibilidade tem sido causa de controvérsia entre alguns pesquisadores, conforme descrição do mesmo autor.

A Tabela 2 mostra alguns dados da literatura referentes à contaminação por B(a)P de alguns alimentos de origem vegetal, de óleos e gorduras e de alimentos marinhos.

II.6.1. HPAs em Produtos Defumados

A contaminação de produtos defumados por HPAs tem origem na combustão incompleta dos componentes da madeira, durante o processo de defumação. Assim sendo, através das reações pirolíticas e pirossintéticas, a celulose, a lignina e a

Tabela 1. Fontes e vias de contaminação dos alimentos.

Fonte	Processo/ Atividade	Via de Contaminação	Alimento
Ambiental:			
Exógena:	Industria Aquecimento Prod. Energia Transporte Incineração Queimadas	Ar Solo Água	Vegetais Frutas Cereais Sementes oleosas
	Vazamento de óleo	Água	Alimentos marinhos
Endógena:	Biossíntese por plantas e micorganismos		Vegetais
Processamento:			
Exógena:	Defumação Churrasco Secagem direta	Fumaça	Defumados Carnes Alimentos secos Café
	Torrefação		
	Extração com solventes derivados do petróleo	Solventes	Óleos e gorduras vegetais
	Uso de embala- gens plásticas	Plásticos	Certos alimentos embalados
Endógena:	Cozimento em altas temperaturas(?)		Alimento bem passado

LARSSON, 1986

Tabela 2. Concentração de B(a)P em alimentos.

Alimento	B(a)P (µg/Kg)	Referência
alface	6,20	LARSSON, 1982
espinafre	7,40	IARC, 1973
tomate	0,20	IARC, 1973
café torrado moderadamente	0	LO & SANDI, 1978
cereais	0,19	DENNIS et alii, 1991
óleo de soja	2,18	DENNIS et alii, 1991
óleo de milho	1,54	DENNIS et alii, 1991
óleo de colza	2,46	DENNIS et alii, 1991
mariscos	0,40	TAKATSUKI et alii, 1985
mariscos enlatados (Dinamarca)	1,70	SPEER et alii, 1990
mariscos enlatados (Alemanha)	1,50	SPEER et alii, 1990
ostras (Japão)	0,80	TAKATSUKI et alii, 1985
ostras (Alemanha)	0,60	SPEER et alii, 1990
ostras (França)	1,00	SPEER et alii, 1990
couve	12,6 - 48,1	IARC, 1973
maçã	0,1 - 0,5	IARC, 1973
café (semente)	200 - 400	LO & SANDI, 1978
café torrado fortemente	0 - 4	LO & SANDI, 1978
óleo de coco	8 - 10	LO & SANDI, 1978

hemicelulose, entre os principais componentes, vão se degradando pela ação do calor, e formando a fumaça que, além de componentes responsáveis pelo sabor e aroma, pela ação conservadora, antioxidante e pela coloração (DAUN, 1979; BARYLKO-PIKIELNA, 1977), carrega substâncias indesejáveis como os HPAs (TILGNER, 1977; WEINACKER & BITTNER, 1990)

Segundo TOTH & BLAAS (1972), a composição da fumaça depende principalmente do tipo de madeira, da temperatura de combustão e do aporte de oxigênio.

Tipo de madeira

Do ponto de vista dos componentes benéficos da fumaça, não existe praticamente qualquer inconveniente quanto à utilização de madeiras duras ou macias (TILGNER, 1958; DRAUDT, 1963), já que a diferença seria notada apenas pela análise sensorial. Madeiras duras produzem mais derivados do siringol, enquanto que as macias produzem mais derivados do guaiacol (TOTH, 1980; GARCIA-ECHANIZ, 1989).

Do ponto de vista toxicológico, entretanto, a preferência recai sobre as madeiras duras (DRAUDT, 1963), já que as macias, sendo mais ricas em lignina e, portanto, mais resinosas, tendem a formar mais hidrocarbonetos poliaromáticos (SIMON et alii, 1969; FRETHEIM, 1976; POTTHAST, 1978; MAGA, 1986).

Entretanto, POTTHAST (1982) demonstrou que a produção de B(a)P é muito menos dependente do tipo de madeira do que da temperatura, concluindo que em condições controladas as madeiras macias não diferem das duras.

Temperatura de combustão

Altas temperaturas de combustão sempre acarretam produção elevada de HPAs (DRAUDT, 1963; RUITER, 1979), enquanto que métodos controlados tendem a produzir fumaças praticamente isentas dos compostos carcinogênicos (POTTHAST, 1982; WIENACKER & BITTNER, 1990).

No método tradicional de defumação ou na defumação dita caseira, a madeira ou a serragem é queimada com ou sem produção de chama, atingindo temperaturas entre 700 e 1000°C. Neste caso, a produção de HPAs aumenta linearmente com o aumento da temperatura (TOTH & BLAAS, 1972). Além disso, os produtos a serem defumados geralmente se encontram no mesmo recinto onde a fumaça é gerada (THORNSTEINSSON, 1969; ALENCAR, 1985; MULLER, 1992), quase sempre um espaço pequeno, onde pouco ar circula, acarretando uma maior concentração de fuligem que vai se depositando sobre os produtos (TOTH, 1982; MULLER, 1992).

Já a defumação industrial utiliza equipamentos que possibilitam o controle da temperatura de combustão, do ar circulante e, geralmente, apresenta a câmara de defumação separada do gerador de fumaça, havendo ductos de condução da mesma, num longo trajeto até chegar ao produto a ser defumado. Dos processos empregados pela indústria, de acordo com DRAUDT (1963), POTTHAST (1978), MOHLER (1978), RUITER (1979), DAUN (1979), POTTHAST (1982), WEINACKER & BITTNER (1990), os mais comuns são a aplicação de calor por:

- a) fricção;
- b) ardido;
- c) vapor superaquecido.

A obtenção de fumaça por fricção se baseia no contato intermitente da madeira contra uma roda dentada, que gira rapidamente. A entrada de ar acontece pela parte central do rotor e circula entre os "dentes friccionadores" ocorrendo,

simultaneamente, um efeito de resfriamento, importante para a produção de fumaça sem chama. A temperatura não ultrapassa os 450°C. Os restos da madeira friccionada caem para um recipiente contendo água, evitando a formação de chama e auxiliando no resfriamento. A fumaça passa para o interior da câmara de defumação, ambiente separado da fonte geradora de fumaça (MOHLER, 1978; POTTHAST, 1979; POTTHAST, 1982; WEINACKER & BITTNER, 1990).

No caso da fumaça obtida por ardido, a serragem entra em contato com uma resistência elétrica através de um alimentador rotatório ocorrendo, simultaneamente, um aporte adequado de oxigênio, num processo contínuo e controlado. Da mesma maneira que no caso anterior, a fumaça é conduzida por ductos à câmara de defumação (WEINACKER & BITTNER, 1990). A faixa de temperatura neste caso é de 500 a 600°C (POTTHAST, 1980).

Na produção de fumaça por vapor superaquecido, a temperatura pode ser medida com precisão, não ultrapassando a faixa dos 300-400°C. Ao entrar em contato com a serragem, a mistura de ar e vapor super-aquecido produz a fumaça, que chega à câmara de defumação a uma temperatura de aproximadamente 80°C (WEINACKER & BITTNER, 1990).

Segundo POTTHAST (1979), os métodos por fricção e por vapor permitem um melhor controle de temperatura que o método por ardido. Entretanto, comparativamente com a defumação caseira, todos eles apresentam a vantagem de produzir muito menos hidrocarbonetos poliaromáticos (THORNSTEINSSON, 1969; TOTH & BLAAS, 1972; POTTHAST, 1978; MULLER, 1992).

Aporte de oxigênio

A combustão em ausência de oxigênio acarreta uma produção intensa de HPAs, que cresce exponencialmente com o aumento de temperatura, segundo experiências realizadas por GRIMMER et alii (1966) (Citação POTTHAST, 1978). Estes autores

identificaram na queima do cigarro teores de 4 a 1000 ug de B(a)P/100 g de tabaco, numa faixa de temperatura subindo de 400 a 900°C. Na combustão em presença de ar, o teor de B(a)P aumentou linearmente até 12 ug/100g.

A produção da fumaça pode ser comparada à queima do cigarro em presença de ar, como demonstrou TOTH & BLAAS (1972) obtendo fumaça em laboratório, numa faixa de temperatura de 400 a 1000°C. Neste caso, os teores de B(a)P aumentaram de 5 a 20 ug/100 g de madeira, comprovando a mesma linearidade.

DRAUDT (1963), RUITER (1979), TILGNER (1977) e POTTHAST (1979) também consideraram a importância do controle de ar circulante na câmara de defumação, para a obtenção de produtos de melhor qualidade e maior segurança toxicológica.

As pesquisas quanto à presença de HPAs em alimentos defumados se iniciaram com o trabalho de DOBES et alii (1955) que, além de determinarem o B(a)P, observaram também a sua penetração na carne durante o processo de estocagem.

GORELOVA & DIKUN (1958) observaram a penetração do B(a)P através da pele de salsichas, o que foi contestado por MALANOWSKI et alii (1968) e RHEE & BRATZLER (1970). Estes autores sugeriram que a pele serve como barreira para os HPAs, principalmente quando o envoltório é de celulose, com caráter hidrofílico.

SIMON et alii (1969) e FILIPOVIC & TOTH (1971) também realizaram testes com envoltórios de salsichas, observando a barreira que a celulose oferece e evidenciando a permeabilidade das tripas naturais, o que tinha sido constatado por GORELOVA & DIKUN (1958).

Já neste período, TILGNER (1958) havia sugerido que a temperatura de combustão da madeira não deveria ultrapassar os 400°C para se obter um produto de qualidade, tanto do ponto de vista sensorial como do ponto de vista toxicológico. Para esta conclusão, foram importantes, do ponto de vista tecnológico, os

trabalhos de TOTH & BLAAS (1972), KERSKEN (1974), STEINIG & MEYER (1976), POTTHAST (1978, 1979), entre outros.

Inúmeros trabalhos foram realizados quanto à qualidade de produtos defumados, em diferentes países, destacando-se os seguintes:

- BAILEY & DUNGAL (1958) e THORSTEINSSON (1969) na Islândia;
- MALANOWSKI et alii (1968) e RHEE & BRATZLER (1970) nos EUA;
- FILIPOVIC & TOTH (1971) na Iugoslávia;
- FRETHEIM (1976), na Noruega;
- SAITO et alii (1978), no Japão;
- LINTAS et alii (1979), na Itália;
- STEINIG (1976) e POTTHAST (1980), na Alemanha;
- LARSSON (1982), na Suécia e
- SIMKO et alii (1991), na Tchecoslováquia.

A Tabela 3 apresenta alguns dados da literatura sobre a presença de B(a)P em produtos cárneos submetidos a diferentes processos de defumação.

No Brasil, YABIKU et alii (1992) analisaram 44 amostras de alimentos defumados, encontrando B(a)P em 23 amostras, em níveis que variaram entre 0,1 e 5,9 µg/kg.

Interessantes também são as pesquisas de SIMKO (1991), que determinou os níveis de B(a)P durante a estocagem de peixes. O autor observou a diminuição gradativa deste composto como resultado de vários fatores que influenciam o processo de degradação, bem como sua difusão para as camadas internas, onde seus níveis permaneciam relativamente estáveis devido à ausência tanto de luz como de oxigênio.

Tabela 3. Teores de benzo(a)pireno em produtos defumados.

Produto	Tipo de defumação	B(a)P (µg/kg)	Referências
carneiro	industrial	traços	THORNSTEINSSON, 1969
carnes	industrial	0,11-3,63	TIEFENBACHER, 1982
salsicha "slovak"	industrial	0,95	SIMKO, 1991
salsicha de frango	industrial	0,87	SIMKO, 1991
"salami fino"	industrial	4,18	SIMKO, 1991
linguiça	normal	0,5-2,5	BINEMANN, 1978
presunto	forte	0,14-56,04	HAMM & POTTHAST, 1976***
presunto	leve	0,07-12,56	HAMM & POTTHAST, 1976***
presunto	n.c.	0,2	JOE et alii, 1984
frango fatiado	n.c.	0,1	JOE et alii, 1984
peru fatiado	n.c.	0,1	JOE et alii, 1984
presunto	n.c.	0,2	BORIES, 1989
frango	n.c.	0,2	BORIES, 1989
carnes	caseira	0,95-10,46	TIEFENBACHER, 1982
carneiro	caseira	1,30	BAILEY & DUNGAL, 1958
carneiro	caseira*	107,0	THORNSTEISSON, 1969
carneiro	caseira**	21,0	THORNSTEINSSON, 1969
carne (suya)	caseira	8,5±2	EMEROLE, 1980
carne (kundi)	caseira	10,60-66,90	ALONGE, 1988

*próximo do fogão; **distante do fogão; ***citado por POTTHAST, 197
n.c. não consta

SIMKO & KNEZO (1992) estudaram a influência do cozimento no conteúdo de B(a)P em salsichas tipo "frankfurter". Os autores concluíram que, como a gordura neste tipo de salsichas se encontra muito fortemente estabilizada, não ocorrendo trocas durante o processo de cozimento, o teor de B(a)P também não é influenciado, permanecendo constante durante todo o período de cocção.

Nos dias atuais, o processo de defumação é utilizado quase que exclusivamente com a finalidade de conferir o sabor e o aroma característicos de defumado. Entretanto, na Nigéria, carnes e peixes ainda são submetidos a este processo com fins de conservação, sendo a tecnologia empregada a mais simples possível. Os níveis de contaminação, neste caso, são elevados, atingindo valores entre 2,1 e 4,5 µg/Kg de B(a)P em peixes (EMEROLE, 1980) e entre 10,5 e 66,9 µg/Kg em carnes (ALONGE, 1988).

Além dos procedimentos tradicionais de defumação de alimentos, podem também ser utilizados para o mesmo fim condensados de fumaça (TILGNER, 1966; POTTHAST & EIGNER, 1988), fumaças líquidas (GORBATOV et alii 1971; TOTH & BLAAS, 1972; KERSKEN, 1974; HOLLENBECK, 1977) ou ainda ingredientes defumados (sal, açúcar, hidrolisados de proteína), que são misturados com a massa de embutidos (MOHLER, 1978). A principal vantagem da sua utilização é a possibilidade de obtenção de produtos isentos ou com baixos teores de HPAs, dependendo da tecnologia empregada na elaboração dos preparados de fumaça (POTTHAST & EIGNER, 1988).

II.6.2. HPAs em Carnes Grelhadas e em Churrasco

A avaliação da contaminação por HPAs de carnes assadas sobre grelha teve início com o trabalho de SEPPILI & SFORZOLINI (1963), que analisaram carnes "alla fiorentina", ou seja, assadas sobre uma grade colocada sobre chama de gás. Foi constatada a presença dos seguintes HPAs: 1,2,5,6-dibenzoantraceno, pireno, 3-metilpireno, 1,2-benzopireno, fenantreno e 3,4-benzofenantreno.

Na mesma década, LIJINSKI & SHUBIK (1964) conduziram estudo semelhante em carnes processadas sobre carvão, assando "steaks" sobre uma grelha distante 15 cm do fogo. Foram identificados 15 HPAs em quantidades variando entre 0,2 e 20 µg/Kg, estando a contaminação por B(a)P em torno de 8 µg/Kg. Foram estes autores os pioneiros a associar a contaminação por HPAs, neste tipo de processamento, com a presença de gordura na carne. Ainda segundo os mesmos autores a gordura, pela ação do calor, pinga sobre o fogo, pirolisa e retorna na forma de fumaça, que carrega os compostos carcinogênicos, contaminando a carne.

FRITZ (1973) encontrou elevados teores de B(a)P em salsichas grelhadas sobre fogo de nó de pinho. Neste caso, segundo o autor, a gordura parece ter tido pouca influência, ficando a contaminação por conta da combustão incompleta da fonte de calor propriamente dita.

DOREMIRE et alii (1979) realizaram um estudo com carne moída, à qual foram adicionados teores conhecidos da gordura previamente retirada da própria carne, e constataram que quanto maior o teor de gordura, maior a contaminação por B(a)P. As carnes foram assadas a 15 cm do fogo.

LARSSON et alii (1983) assaram salsichas tipo "frankfurters" (sem a pele) sobre carvão e sobre fogo de madeira. No experimento onde as salsichas foram assadas sobre fogo de madeira, as distâncias da grelha variaram entre 1 e 26 cm e a altura das chamas variou entre 15 e 35 cm. As salsichas foram assadas durante 3,5 min., resultando em produtos desde levemente grelhados até queimados, dependendo da distância da fonte de calor. Os resultados destes experimentos mostraram que os níveis de HPAs são fortemente dependentes da posição das amostras em relação à chama durante o processamento e que as variações nos teores reflete a distribuição dos HPAs na própria chama.

A teoria apresentada por LIJINSKI & SHUBIK, (1964), de que a presença de HPAs em produtos assados sobre carvão depende da gordura que pinga sobre a brasa, também foi avaliada por

LARSSON et alii (1983). Segundo estes autores, houve pouca contaminação nas salsichas assadas nestas condições, o que se deve, provavelmente, ao fato da gordura nestes produtos estar fortemente ligada à massa que as compõem. Esta hipótese tem fundamento, já que a contaminação aumentou consideravelmente quando as salsichas foram assadas juntamente com costeletas de porco.

Testando tanto fonte de calor como teor de gordura, MAGA (1986) comprovou que para um mesmo teor de gordura a contaminação por HPAs era muito maior quando se utilizava brasa de madeiras macias, relativamente a madeiras duras, sendo que com carvão a contaminação era extremamente baixa.

A Tabela 4 apresenta dados da literatura sobre os teores de B(a)P em diferentes produtos cárneos grelhados.

Tabela 4. Teores de benzo(a)pireno em produtos cárneos grelhados.

Produto	B(a)P (µg/kg)	Referências
carne de vaca	8,0	LIJINSKI & SHUBIK, 1964
bisteca de vaca	50,4	LIJINSKI & ROSS, 1967*
bisteca de porco	5,0	PANALAKAS, 1976*
frango	0,5	PANALAKAS, 1976*
frango	3,7	LIJINSKI & ROSS, 1967*
carnes grelhadas (em geral)	0,33- 10,15	TIEFENBACHER et alii, 1982
carne de vaca	18,8 - 24,1	DOREMIRE et alii, 1979
bisteca de vaca	0, - 2,0	PANALAKAS, 1976*
carne de porco	25,8 - 31,6	DOREMIRE et alii, 1979

*citação de FRETHEIM (1983).

II.7. Consumo de HPAs Através de Alimentos

Na Rússia, a quantidade de benzo(a)pireno que entra no organismo do consumidor médio, via ingestão de alimentos, atinge, de acordo com a UNEP (1983), valores entre 1 - 2 mg/ano. Neste estudo, foram considerados os seguintes alimentos: carnes, banha, produtos lácteos, ovos, peixes e produtos de pescado, óleos vegetais, batatas, vegetais, melões, pães e produtos de padaria. Somando-se todas as fontes de contaminação, estes valores se elevariam para 3 - 4 mg/ano.

No mesmo ano, DENNIS et alii (1983) concluíram que os óleos vegetais e os cereais são os alimentos que mais contribuem para a ingestão de HPAs na dieta total dos ingleses, e que as carnes e os peixes defumados, embora possam estar altamente contaminados, não tem muita representatividade, pois participam pouco da dieta total. Segundo estes autores, a quantidade de HPAs ingerida por pessoa, por dia, numa dieta total, seria de 3,7 µg.

HOPPIA et alii (1986) avaliaram a importância dos óleos e gorduras como fonte de exposição a HPAs na dieta. Analisando manteiga, margarina e óleos vegetais, determinaram que a ingestão de HPAs através destes alimentos, na Finlândia, era de 0,6 µg/dia/pessoa. Comparando este valor com dados de ingestão relativos à dieta total, ou seja, 1,6 - 16 µg/dia (SANTODONATTO, 1983, citação do artigo) e 3,7 µg/dia (DENNIS et alii, 1983), os autores concluíram que as gorduras devem ser consideradas uma fonte importante de HPAs na dieta.

LARSSON (1986), analisando a dieta normal da Suécia, concluiu que os cereais são os maiores contribuintes para o consumo de HPAs, seguidos dos vegetais e dos óleos e gorduras. Os alimentos com os níveis mais altos de HPAs, que são os peixes defumados e os alimentos grelhados, acabam tendo uma modesta contribuição, uma vez que o consumo destes alimentos naquele país é baixo. Entretanto, considera que sua importância não deve ser

minimizada, uma vez que o teor de HPAs ingerido por refeição pode ser consideravelmente elevado, principalmente quando se trata dos produtos assados sobre fogo de madeira. A ingestão total de HPAs estimada para a dieta sueca estaria em torno de 1 mg/ano, um pouco abaixo dos valores encontrados por DENNIS et alii (1983), de 1,3 mg/pessoa/ano.

De acordo com as pesquisas de de VOS et alii (1990), os cereais são os maiores contribuintes para o consumo de HPAs, seguidos de açúcar e doces e dos óleos e gorduras. Os autores também consideram que os produtos cárneos, principalmente os defumados, contribuem pouco para o consumo total de HPAs, apesar da possibilidade de estarem altamente contaminados. De acordo com este trabalho, os valores de ingestão média de todos os HPAs analisados, por dia, na dieta total, estariam entre 5,22 µg (estimativa baixa) e 17,06 µg (estimativa alta). A ingestão dos HPAs carcinogênicos seria 2,89 µg/dia (estimativa baixa) e 7,21 µg/dia (estimativa alta).

II.8. Legislação

Na Alemanha, de acordo com uma portaria publicada em 06/06/1973, ficou estabelecido o limite de 1 µg/kg de B(a)P em produtos cárneos defumados (WIGAND & JAHR, 1985). A partir de então, outros países adotaram este limite, como Áustria, Israel, Suíça e Polônia (LARSSON, 1986; ALONGE, 1988).

WALKER (1977) fez uma avaliação relativa ao estabelecimento de limites em alimentos para os hidrocarbonetos poliaromáticos carcinogênicos, tecendo as seguintes considerações:

- o B(a)P é comumente utilizado como indicador da contaminação por HPAs e também é o único para o qual existe legislação; contudo, é questionável se este composto realmente representa um guia adequado para o risco à saúde dos seres humanos. Existem trabalhos que ilustram a existência de uma diferença considerável no perfil de HPAs para diferentes produtos defumados;
- como não só o B(a)P é comprovadamente carcinogênico em animais de laboratório, seria importante analisar o maior número possível de HPAs, o que proporcionaria uma visão mais real da exposição a estes compostos através de um determinado alimento. Neste sentido, HAMM (1977) considerou a co-carcinogenicidade e os efeitos antagônicos que possam ocorrer entre os diferentes compostos, salientando a importância da determinação dos outros HPAs, e não só do B(a)P;
- são tantos os fatores de incerteza quanto à carcinogenicidade, que parece impossível propor um limite seguro para qualquer substância carcinogênica, prevalecendo até hoje o que foi proposto em 1956, no simpósio da UICC (União Internacional Contra o Câncer), que recomendou que qualquer substância que se mostre carcinogênica em qualquer dose, em qualquer espécie e por qualquer via de administração, não deveria ser autorizada para uso em alimentos;
- existe um risco em se estabelecer concentrações máximas permitidas para substâncias carcinogênicas, uma vez que estes valores podem ser confundidos com limites de segurança.

POTTHAST (1979) realizou um estudo para testar se o B(a)P tinha ou não significado como indicador dos HPAs carcinogênicos ou se a legislação alemã deveria ser alterada,

concluindo que os HPAs carcinogênicos aparecem em baixas quantidades, de tal maneira que o B(a)P pode perfeitamente ser o indicador do potencial carcinogênico do alimento defumado. Considerou, entretanto, o pouco conhecimento que se tem a respeito da co-carcinogênese e de efeitos antagônicos. O autor também estabeleceu um fator de 10, que multiplicado pelo teor obtido para o B(a)P, resultaria no teor dos outros HPAs carcinogênicos.

Em 1982, o Comitê para Dieta, Nutrição e Câncer, constituído pelo Conselho Nacional de Pesquisa dos EUA, considerou que na dieta média do americano ocorrem apenas 3 HPAs carcinogênicos para animais de laboratório, quando administrados por via oral; estes compostos são o B(a)P, o dibenzo(a,h) antraceno e o B(a)A. De acordo com este comitê, seria prudente minimizar a exposição a HPAs através da dieta, já que alguns estudos tem evidenciado que os compostos citados são carcinogênicos por via oral em animais de laboratório e também porque o câncer de pele e de pulmão em humanos tem sido associado à exposição ocupacional aos HPAs.

O trabalho de LARSSON (1986) mostra que na Suécia não existe ainda limite máximo estabelecido para os HPAs; entretanto, no sentido de evitar a ingestão excessiva destes compostos, a Administração Nacional Sueca para Alimentos distribuiu recomendações em relação aos produtos grelhados e recomendações especiais para evitar o cultivo de vegetais próximo a estradas movimentadas e complexos industriais.

Na opinião de MULLER (1992), o limite máximo de 1 µg/kg de B(a)P em produtos cárneos foi fixado não com base em considerações toxicológicas, mas sim de acordo com o que era possível realizar tecnicamente. Segundo o autor, isto significa que após vários estudos levados a termo na Alemanha, os pesquisadores concluíram que a maioria dos produtos tinha teores inferiores a 1 ppb e que este limite, portanto, era tecnologicamente possível de ser conseguido. Este autor também considerou o fato de que nos alimentos de origem vegetal é

praticamente impossível controlar a contaminação proveniente da poluição ambiental; já as carnes não processadas se encontram praticamente isentas destes compostos. Neste caso, o controle das carnes processadas recebe um significado particular, sendo o ponto onde se pode manter um controle dos níveis dos HPAs carcinogênicos na cadeia alimentar.

No Brasil, não existe legislação quanto aos teores de B(a)P em produtos cárneos produzidos pelo processo de defumação; existindo apenas limite estabelecido para o aroma de fumaça que, segundo Resolução nº 20/72 da Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos (CNNPA), é de 0,1 µg de B(a)P/kg de aroma. A quantidade de aroma a ser utilizada em derivados de carne é de no máximo 90 mg/kg de produto (ABIA, 1989).

Segundo o Comitê Misto da FAO/OMS para Aditivos e Contaminantes (JECFA), o teor de B(a)P nos condensados de fumaça e nas fumaças líquidas não deve ser superior a 10 µg/kg. Segundo o IOFI (Code of practice Industrial Organization of the Flavour Industrie, 1988) e o OJEC (Official Journal of the European Communities, 1988) o limite máximo de B(a)P não deve ultrapassar 0.03 µg/kg no produto acabado.

II.9. Metodologia Analítica

As metodologias empregadas para a análise de HPAs em alimentos envolvem uma combinação de técnicas que podem ser divididas em três etapas principais:

1. extração, com ou sem saponificação;
2. purificação, por partição e em coluna;
3. separação, identificação e quantificação por cromatografia em camada delgada (CCD), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) ou cromatografia gasosa (CG), sendo a detecção

nos dois primeiros casos feita por espectroscopia de ultravioleta ou fluorescência, e na cromatografia gasosa, por ionização de chama (DIC) ou espectrometria de massa (MS) (VAESSEN et alii, 1984; BORIES, 1980).

II.9.1. Extração

A maioria dos métodos de extração para produtos cárneos envolve a etapa de saponificação (1 - 4 horas) com solução de hidróxido de potássio, que pode ser:

a. metanólica (GRIMMER & BOHNKE, 1975; FRITZ, 1979; SAGREDOS et alii, 1981; LARSSON, 1982; DENNIS et alii, 1983; LAWRENCE & WEBER, 1984; SIMKO, 1991)

b. etanólica (HOWARD et alii, 1966; BORIES et alii, 1978; DUNN & ARMOUR, 1980; STIVE & HISCHENHUBER, 1987; de VOS et alii, 1990). SAITO et alii (1978) utilizaram uma solução etanólica de hidróxido de sódio.

GRIMMER & BOHNKE (1975) comprovaram um aumento de 60% na extração dos HPAs quando se utiliza a saponificação, principalmente a partir de produtos ricos em proteína. Tendo em vista a possibilidade destes compostos, quando da extração direta por solvente, se ligarem adsortivamente a estruturas moleculares não destruídas, como por exemplo proteínas e lipídios, os autores concluíram que, para se isolar quantitativamente os HPAs, a etapa de saponificação é imprescindível.

Segundo os mesmos autores, o tempo de saponificação tem uma grande influência sobre a formação de emulsões durante a etapa de partição líquido-líquido. Estes autores comprovaram que

tempos curtos de saponificação conduzem à formação de emulsões estáveis, difíceis de separar, enquanto que tempos mais longos evitam estas emulsões e aumentam o rendimento.

LARSSON (1982) empregou em suas pesquisas o método de GRIMMER & BOHNKE (1975), adaptando-o principalmente através da redução das quantidades de amostra e de solventes utilizados, conforme representado esquematicamente na Figura 7.

Alguns autores, entretanto, tem utilizado métodos que não envolvem a etapa de saponificação, sendo a amostra diretamente submetida à ação de um solvente orgânico (LIJINSKI & SHUBIK, 1964; RHEE & BRATZLER, 1970; MOROZZI et alii, 1985; GRIMMER & JACOB, 1987. Segundo MOROZZI et alii (1985), a omissão da saponificação não parece influenciar de maneira significativa os resultados, pelo menos quando se trata da determinação isolada do B(a)P.

O método de GRIMMER & JACOB (1987), que é o recomendado pela IUPAC, exclui a etapa de saponificação, acrescentando, porém, mais uma etapa de purificação, que é a cromatografia sobre Sephadex LH 20, conforme fluxograma da Figura 8.

Entre os solventes recomendados para extração de HPAs, os mais utilizados são: ciclohexano (BAILEY & DUNGAL, 1958; GRIMMER & BOHNKE, 1975; DOREMIRE et ALII, 1979; LAWRENCE & WEBER, 1984; SAGREDOS et alii, 1981; LARSSON, 1983; GRIMMER & JACOB, 1987; SIMKO, 1991) isoctano (HOWARD et alii, 1966; DUNN & ARMOUR, 1980; DENNIS et alii, 1983;), hexano (LIJINSKI & SHUBIK, 1964; SAITO et alii, 1978) e triclorofluoroetano (MOROZZI, et alii, 1985; GRIMMER & JACOB, 1987).

POTTHAST & EIGNER (1975), não concordando com a etapa de saponificação, devido às altas temperaturas a que as amostras são submetidas, e observando que os HPAs são mais solúveis em carbonato de propileno do que em outros solventes orgânicos, desenvolveram um método de extração utilizando este solvente, que seria responsável por um extrato livre de gordura. Com este

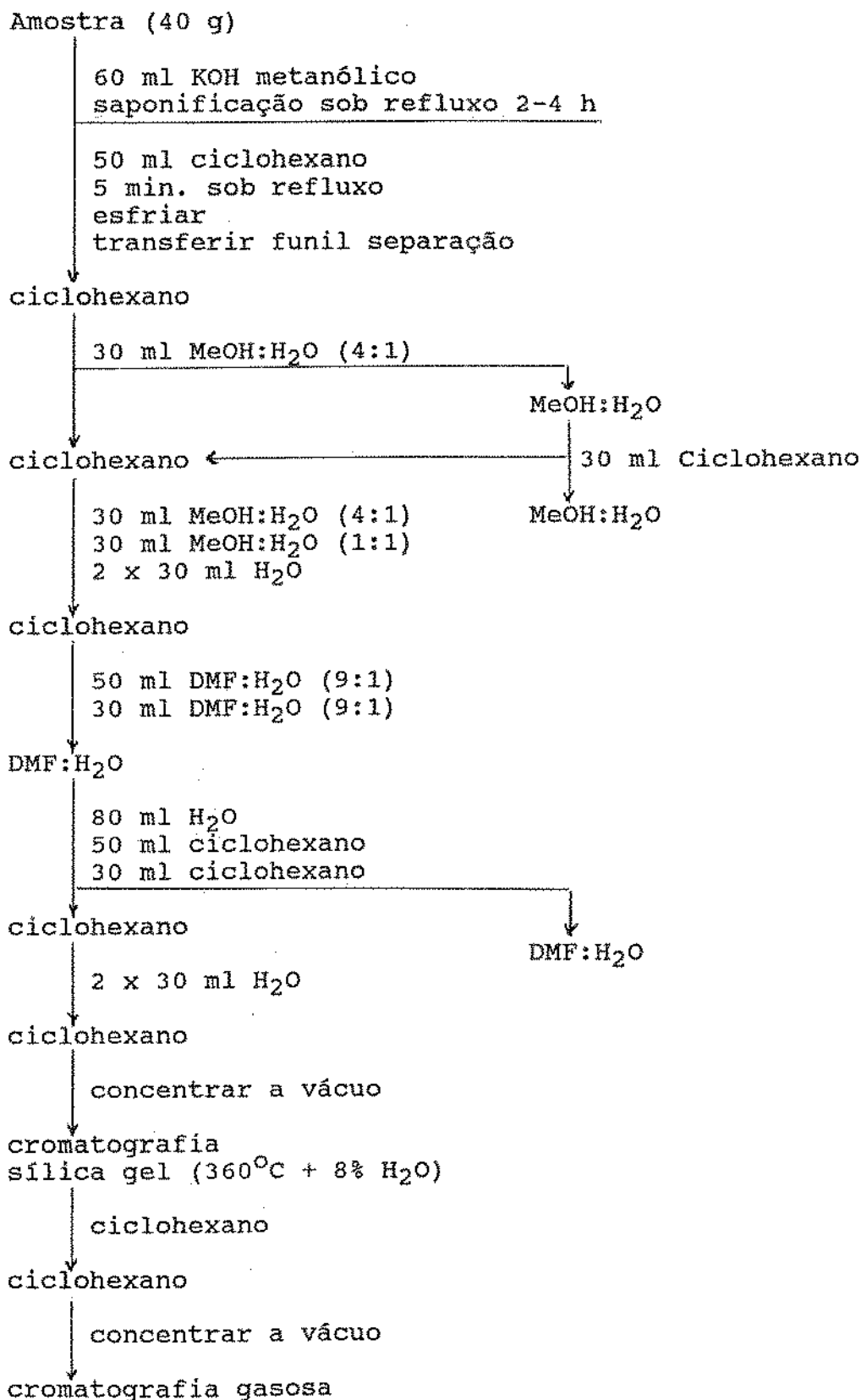


Figura 7. Procedimento de extração e purificação segundo LARSSON (1982).

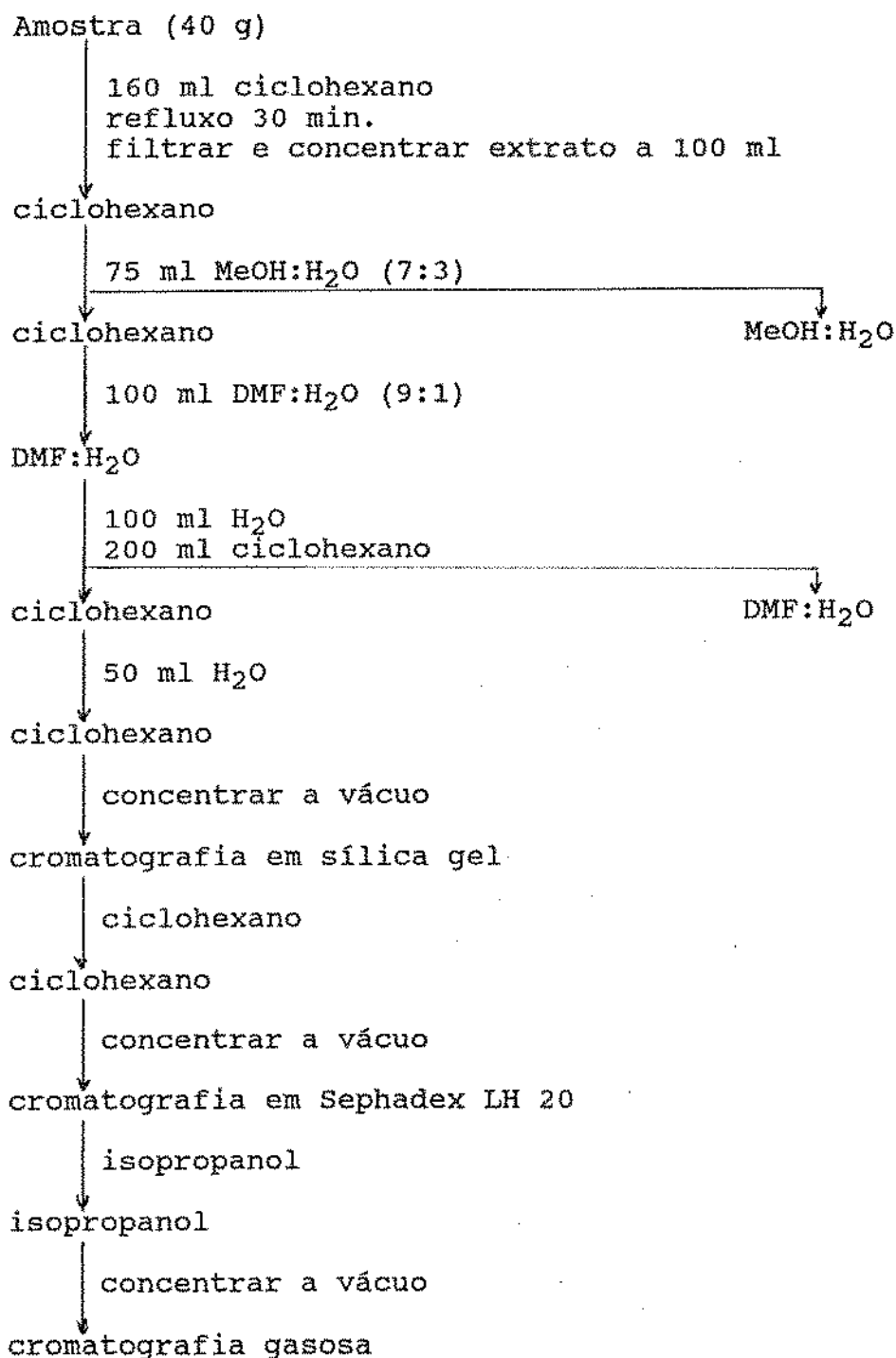


Figura 8. Procedimento de extração e purificação segundo GRIMMER & JACOB (1987).

procedimento, a extração e o isolamento dos HPAs ocorrem quase que simultaneamente. Este método tem sido empregado por alguns autores, entre eles STEINIG & MEYER (1976), EMEROLE (1980) e ALONGE (1988).

II.9.2. Purificação, por Partição e em Coluna

Nas complexas matrizes que são os alimentos, os HPAs estão acompanhados por inúmeros compostos orgânicos, exigindo procedimentos extensos de purificação para seu isolamento e posterior determinação individual (JOE et alii, 1984).

II.9.2.1. Partição

A separação de HPAs de possíveis interferentes (geralmente gorduras), baseia-se na sua maior afinidade por determinados solventes como dimetilformamida (DMF) e por dimetilsulfóxido (DMSO), o que possibilita a separação das gorduras que permanecem no solvente de extração (BORIES, 1980). A Tabela 5 apresenta diferentes sistemas de partição, mencionando os autores que os utilizaram.

Em vez da purificação do extrato por partição líquido-líquido, GERTZ (1978) e SAGREDOS et alii (1981), independentemente, propuseram um método para ser utilizado em rotina diária, no controle de produção de laboratórios industriais modestamente equipados. O procedimento envolve, basicamente, a complexação dos HPAs com cafeína, através da adição de uma solução a 15% de cafeína em ácido fórmico 90%. O complexo HPA-cafeína é então quebrado pela diminuição da concentração de ácido no meio, pela adição de água (GERTZ, 1978) ou pela adição de uma solução aquosa de NaCl (SAGREDOS et alii, 1981), passando os HPAs da fase hidrofílica para a orgânica. Segundo os autores, este método é duas vezes mais rápido que os que utilizam partição líquido-líquido, não havendo formação de emulsões, ficando os extratos finais livres de interferentes.

Tabela 5. Sistemas de partição utilizados por diferentes autores na extração de HPAs.

Sistemas de partição	Referência
Ciclohexano:DMF	GRIMMER & BOHNKE (1975)
DMF:H ₂ O:ciclohexano	DOREMIRE et alii (1979)
	LARSSON (1982 e 1983)
	MOROZZI et alii (1985)
	GRIMMER & JACOB (1987)
Isoctano:DMSO	HOWARD et alii (1966)
DMSO:H ₂ O:isooctano	DENNIS et alii (1983)
Hexano:DMSO	LIJINSKI & SHUBIK (1964)
DMSO:H ₂ O:Hexano	SAITO et alii (1978)
	LAWRENCE & WEBER (1984)

II.9.2.2. Coluna

A segunda etapa na purificação do extrato envolve uma cromatografia em coluna, que pode ser de:

- alumina (BAILEY & DUNGAL, 1958; GRIMMER & HILDEBRANDT, 1972; EMEROLE, 1980),
- florisil (HOWARD et alii, 1966; DUNN & ARMOUR, 1980; ALONGE, 1988; SIMKO, 1992)
- sílica gel (RHEE & BRATZLER, 1978; GRIMMER & BOHNKE, 1975; BORIES et alii, 1978; SAITO et alii, 1978; GERTZ, 1978; LARSSON, 1983; GRIMMER & JACOB, 1987; SIMKO, 1991).

Em todos estes trabalhos estão detalhados os tratamentos a que foram submetidas estas fases estacionárias, em termos de ativação e desativação, e também quanto às fases móveis, geralmente ciclohexano, hexano, tolueno, benzeno ou isoctano.

JOE et alii (1984) efetuaram a etapa de limpeza utilizando na coluna uma mistura de sílica gel e alumina. O solvente proposto foi o triclorofluoroetano.

NOVOTNY et alii (1974) apresentaram algumas desvantagens do uso dos adsorventes clássicos na purificação dos extratos de HPAs, citando-se entre elas:

- a. perdas em análises de traços, devido à adsorvidade destes materiais;
- b. comprometimento da reprodutibilidade do fracionamento, pela modificação do adsorvente ante a presença de pequenas quantidades de água e de outros compostos na amostra.

Em função disto, os autores recomendaram Sephadex LH 20 e isopropanol como sendo o sistema mais adequado para o isolamento dos HPAs.

GRIMMER & BOHNKE (1975) e GRIMMER & JACOB (1987) utilizaram a coluna proposta por NOVOTNY et alii (1974), efetuando uma separação prévia por grupos, ou seja, separando primeiro os compostos de 2 e 3 anéis e posteriormente os de maior peso molecular (4 - 7 anéis). Neste sistema, os HPAs tem um comportamento atípico, observando-se uma maior retenção dos compostos de P.M. maior, ao contrário do que ocorre normalmente neste tipo de cromatografia (WILK et alii, 1966; OELERT, 1969).

No método de POTTHAST & EIGNER (1975), que utilizaram carbonato de propileno para extrair os HPAs, a segunda fase de purificação consiste na saponificação deste solvente com NaOH,

formando propileno-glicol. O isolamento dos HPAs pode ser obtido facilmente com a adição de eter de petróleo, sendo o extrato posteriormente submetido à cromatografia em coluna com florissil.

II.9.3. Separação, Identificação e Quantificação

Após as fases de extração e purificação do extrato, a terceira etapa da análise de HPAs geralmente envolve uma das seguintes técnicas: cromatografia em camada delgada (CCD), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) ou cromatografia gasosa (CG) (HAMM, 1977).

II.9.3.1. Cromatografia em Camada Delgada

As placas empregadas para a separação de HPAs por CCD podem ser de sílica gel, alumina ou celulose acetilada, sendo esta última a mais utilizada (BORIES, 1980).

Segundo SEIFERT (1977), a sílica gel torna os HPAs mais instáveis e, para solucionar este problema, a mesma deve ser impregnada com uma solução de parafina a 5%.

GENEST & SMITH (1964) & EMEROLE (1980) realizaram suas análises com placas de sílica gel G, sem modificações.

HOWARD et alii (1966), WOIDICH et alii (1977), GERTZ (1978), MOROZZI et alii (1985), GRIMMER & JACOB (1987) e ALONGE (1988) separaram os HPAs sobre placa de celulose acetilada.

Os HPAs podem ser identificados e quantificados "in situ" por fluorimetria (WOIDICH et alii, 1977), ou raspando-se as manchas, que são eluídas com um solvente orgânico apropriado, registrando-se os espectros de U.V. ou fluorescência (EMEROLE, 1980).

O método recomendado pela IUPAC para a determinação de B(a)P por CCD (GRIMMER & JACOB, 1987) especifica o procedimento para uma rápida determinação deste composto, utilizando celulose acetilada e fluorimetria "in situ".

II.9.3.2. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

A CLAE, juntamente com a CG, se constitui numa das ferramentas mais importantes para a determinação de HPAs (BLANCO, 1989).

O interesse pelo uso da CLAE aumentou com o desenvolvimento de fases estacionárias quimicamente ligadas. Para alimentos, são empregadas principalmente colunas de fase reversa de octadecilsilano (C18), usando-se metanol-água ou acetonitrila-água como fase móvel (LARSSON, 1986).

DUNN & ARMOUR (1980), JOE et alii (1984), LAWRENCE & WEBER (1984), STIVE & HISCHENHUBER (1987), SIMKO (1991) e PERFETTI et alii (1992) determinaram recentemente HPAs em alimentos usando CLAE em fase reversa, técnica que foi bastante aprimorada na última década (BRINDLE & LI, 1990).

Em linhas gerais, as vantagens (+) e desvantagens (-) da CLAE, na análise de HPAs, incluem:

- (+) detectores seletivos de UV e fluorescência que, quando utilizados em série, permitem uma correta identificação
- (+) alta sensibilidade do detector de fluorescência
- (+) separação seletiva dos isômeros de HPAs
- (+) detectores não destrutivos, que podem ser utilizados em série
- (-) a especificidade da fluorescência complica a quantificação; padrões analíticos são necessários para todos os compostos a serem quantificados (LARSSON, 1986).

Segundo DENNIS et alii (1984), detectores de fluorescência modernos permitem trocas automáticas de comprimentos de onda durante a corrida cromatográfica, o que facilita a determinação simultânea de um grande número de HPAs em baixas concentrações.

II.9.3.3. Cromatografia Gasosa

A estabilidade térmica e a ampla faixa de pontos de ebulição dos HPAs fazem da cromatografia gasosa um método eficiente de separação, principalmente quando são utilizadas colunas capilares (BORIES et alii, 1978).

Na década de 70, a determinação de HPAs por CG era efetuada com colunas empacotadas, conforme os trabalhos de FRYCKA (1972), LANE et alii (1973), GRIMMER & BOHNKE (1975), FRETHEIM (1976) e SAITO et alii (1978).

A introdução de novas técnicas de injeção (p.ex. "splitless", "solid injection" e "on-column"), em meados desta mesma década, permitiu que a CG com coluna capilar se tornasse uma das principais ferramentas utilizadas para a análise de HPAs. Estas técnicas efetivamente aumentaram a sensibilidade da CG com coluna capilar, uma vez que toda a amostra ou grande parte dela penetra na coluna para ser cromatografada e detectada (LARSSON, 1986).

A técnica "on column" eliminou os problemas da discriminação, causados por diferenças na volatilidade, polaridade ou concentração (LEE & WRIGHT, 1980).

ARRENDALE & CHORTYK (1985) relataram sobre a análise de uma mistura padrão de HPAs com injeção "on-column", descrevendo as vantagens da sua utilização em termos de reprodutibilidade, repetibilidade e linearidade da resposta do detector, próxima à unidade para todos os componentes da mistura.

LARSSON et alii (1987) e SPEER et alii (1990) efetuaram análises de alguns tipos de alimentos utilizando injetor "on column", sem maiores considerações a respeito.

A injeção "splitless", no caso de análises de traços, é muito mais aplicável do que a injeção "splitt" (LEE & WRIGHT, 1980). Segundo BAYONA et alii (1986), o problema da discriminação na injeção "splitless" é minimizado usando-se:

- a. solvente de alto P.E.
- b. injeção rápida
- c. alta temperatura do injetor
- d. injeção "hot needle".

Importante também para a efetividade da injeção "splitless" é a temperatura inicial da coluna, definindo-se o tipo de reconcentração no topo da mesma, quer seja por "cold-trapping" ou pelo efeito do solvente (BRINDLE & LI, 1990)

Nesta mesma linha de pensamento, a escolha do solvente de injeção é de fundamental importância. Segundo LEE et alii (1987), o isooctano transfere com mais eficiência os HPAs do injetor para a coluna, em injeção "splitless". Estes autores, entretanto, escolheram o tolueno como solvente de injeção, porque ele é compatível com o DIC e com a detecção seletiva de massa, sem troca posterior de solvente. Além disso, a baixa volatilidade do tolueno reduz a evaporação do solvente nos extratos e nas soluções padrão de estoque.

Segundo BRINDLE & LI (1990) o tolueno é muito mais eficaz em transferir os HPAs de alto peso molecular para a coluna.

Ainda, de acordo com estes autores, o efeito da temperatura na determinação dos HPAs mostrou ser mais significativo no início da programação do que durante os estágios posteriores da corrida cromatográfica. Os estudos de BRINDLE & LI (1990) definiram que a melhor temperatura da coluna no início

da programação é 120°C, utilizando-se tolueno como solvente de injeção.

A ampla faixa de volatilidade dos HPAs exige programação de temperatura e colunas que suportem altas temperaturas. Recentemente, foram desenvolvidas excelentes colunas de vidro termoe estável e de sílica fundida que podem ser empregadas para a análise destes compostos (LARSSON, 1986).

A Tabela 6 mostra algumas das fases estacionárias usadas em colunas capilares para a separação de HPAs e as respectivas polaridades. As fases mais utilizadas são a SE-52 e a SE-54 (LARSSON, 1986), levemente polares, cujo comportamento, segundo BLANCO et alii (1989), é muito semelhante.

Tabela 6. Fases estacionárias usadas em colunas capilares para separação de HPAs.

Fase Estacionária	Descrição	Polaridade ^a
SE-30	Metilsilicone	216
OV-1	Metilsilicone	217
OV-101	Metilsilicone	229
SE-52	5 % fenil- metilsilicone	334
SE-54	1% vinil, 5% fenil- metilsilicone	337
OV-17	50% fenil metilsilicone	884
XE-60	25% cianoetil metilsilicone	1785

LEE & WRIGHT, 1980

^aSoma das constantes de McReynolds ($\sum \Delta I$)

CANTUTI et alii (1965), avaliando as colunas capilares SE-30, SE-52 e XE-60, concluíram que a fase SE-52, de baixa polaridade, era a mais efetiva com respeito à estabilidade de temperatura, fornecendo uma resolução de isômeros próximos superior àquela obtida com fases relativamente menos polares. Com fases mais polares, entretanto, os efeitos de seletividade são muito menores.

BORWITZKY & SCHOMBURG (1979) enfatizaram que a ordem de eluição dos HPAs é praticamente independente da polaridade da fase estacionária, embora a seletividade para alguns grupos de isômeros seja bastante diminuída.

Fases de cristal líquido estudadas por JANINI et alii (1975, 1976a,b) são eficientes para a separação de isômeros. Segundo LEE et alii (1979), estas fases mostram seletividades muito pronunciadas, embora a eficiência e estabilidade térmica deixem muito a desejar, especialmente no campo da cromatografia gasosa com coluna capilar.

KONG et alii (1982) e MARKIDES et alii (1985) realizaram estudos comparativos entre colunas capilares revestidas com cristais líquidos e colunas capilares revestidas com as fase estacionárias SE-52 e SE-54. Os autores comprovaram uma separação de isômeros muito mais eficiente quando foram utilizados cristais líquidos, sendo que a maioria das fases testadas mostrou elevada estabilidade térmica.

O detector de ionização de chama é o mais usado na análise de HPAs por cromatografia gasosa devido, principalmente, a sua excelente linearidade de resposta, sensibilidade e confiabilidade quantitativa no dia a dia.

Entretanto, este detector não é específico para os HPAs, o que exige muito esforço e cuidado na separação e purificação das frações antes da análise cromatográfica (LEE & WRIGHT, 1980).

A cromatografia gasosa acoplada a um espectrômetro de massa tem sido utilizada na análise de HPAs, tanto para uma identificação qualitativa, isto é, para confirmação da identidade do composto de interesse, como para a quantificação dos compostos (BRINDLE & LI, 1990; VREULS et alii, 1991).

Para que o detector de massa cumpra sua missão, é importante que a separação por CG seja suficientemente boa, já que muitos HPAs tem o mesmo peso molecular (HAMM, 1977).

Segundo SCHMID (1990), a sensibilidade da CG-MS pode ser aumentada em uma ou duas ordens de magnitude se apenas poucos ions são monitorados em vez do espectro total, usando-se o monitoramento seletivo de ions.

Recentemente, VREULS et alii (1991) conduziram um experimento utilizando a combinação em série de um cromatógrafo líquido, um cromatógrafo a gás e um detector de massa, o que permitiu a análise de óleos vegetais sem qualquer limpeza da amostra. Segundo os autores, esta é uma nova ferramenta poderosa da análise química e está ganhando importância para análises nas áreas de alimentos, médica e meio ambiente.

Em linhas gerais, as vantagens (+) e desvantagens (-) da CG com coluna capilar, na análise de HPAs, podem ser resumidas, como segue:

- (+) alto poder de resolução
- (+) resposta uniforme do DIC para todos os HPAs, o que permite a quantificação
- (+) fácil conexão ao detector de massa
- (-) exige uma limpeza eficiente dos extratos das amostras (LARSSON, 1986).

III. MATERIAL E MÉTODOS

III.1. Reagentes

n-Hexano puríssimo (>95%) Merck (destilado)

Etanol absoluto p.a. Merck (destilado)

Dimetilformamida (DMF) p.a. Merck (destilado)

Tolueno p.a. Ecibra

Acetona p.a. Merck

Hidróxido de potássio p.a. Merck

Sulfato de sódio anidro para resíduo Merck (aquecido em mufla por 4 horas a 400°C)

Sílica gel para coluna, 70-230 mesh (aquecida em mufla a 360°C por 4 horas e adicionada de 8% de água)

Água destilada ultrapurificada no sistema Ultra Pure Water System, marca Millipore

Padrões:

Benzo(a)pireno, 98% de pureza (SIGMA)

Criseno (SUPELCO)

Benzo(a)antraceno (SUPELCO)

Benzo(b)fluoranteno (SUPELCO)

Benzo(k)fluoranteno (SUPELCO)

III.2. Equipamentos

Multiprocessador Walita

Evaporador rotatório TECNAL modelo TE 120

Cromatógrafo a gás marca VARIAN, modelo 3400, equipado com detector de ionização de chama, injetor splitless e coluna capilar, de sílica fundida, tipo DB5 (polimetilfenilsiloxano, 5 % de fenila), 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 μ de espessura do filme.

Sistema CG-MS, modelo HP 5988 A que utiliza um cromatógrafo a gás HP 5890 série II, equipado com injetor split/splitless, coluna ultra-2 (polimetilfenilsiloxano, 5 % de fenila), 25 m de comprimento, 0,2 mm de diâmetro interno e 0,33 μ de espessura do filme.

Cromatógrafo líquido de alta eficiência equipado com detector de varredura de fotodiodos (UV - Diode array detector), marca Waters, modelo 991, e coluna C18, com 25 cm x 4,6 mm (tamanho da partícula 5 μ).

III.3. Amostras

Os produtos analisados foram carnes defumadas disponíveis no comércio e carnes assadas como churrasco

III.3.1. Carnes Defumadas

Foram analisadas carnes defumadas industrialmente e carnes defumadas artesanalmente pelo processo dito caseiro, conforme especificado a seguir:

a. Carnes defumadas industrialmente

- Frango defumado, com e sem pele (1 marca)
- Lombo defumado (2 marcas)
- Lombo defumado canadense (3 marcas)
- Peito de frango defumado sem pele (1 marca)
- Peito de peru defumado (1 marca)
- Linguiça calabreza (3 marcas)
- Linguiça portuguesa (2 marcas)
- Linguiça tipo cocktail (1 marca)
- Salame (1 marca)
- Paio (1 marca)

b. Carnes defumadas pelo processo caseiro

- Frango defumado (1 fornecedor)
- Picanha defumada (*M. biceps femoris p. superior*)
(3 fornecedores)
- Cupim defumado (*M. rhomboideus cervicis*) (1 fornecedor)
- Lagarto defumado (*M. semitendinosus*) (1 fornecedor)
- Salame defumado (1 fornecedor)

A amostragem foi feita a nível de consumidor, sendo os produtos adquiridos no comércio local, em número de três unidades para cada produto e marca. Algumas amostras caseiras foram adquiridas diretamente com o fornecedor.

As amostras (três unidades de cada produto) foram trituradas em multiprocessador, homogeneizadas e analisadas em triplicata.

III.3.2. Churrasco

A formação de hidrocarbonetos poliaromáticos em carnes assadas foi estudada em função da distância da fonte de calor e do tipo/corte de carne, principalmente quanto à presença de gordura separável.

Foram utilizados dois tipos de churrasqueira:

- a. churrasqueira de alvenaria, com a grelha a 40 cm de distância do fogo (Figura 9a).
- b. churrasqueira portátil, com a grelha a 15 cm do fogo (Figura 9b).

Carnes bovina, suína e frango, representadas respectivamente por: picanha; lombo e linguiça e coxa, sobrecoxa e asinha, foram assadas, sem tempero, em ambas as churrasqueiras.

A picanha, por apresentar gordura separável e ser uma das carnes mais comumente consumidas em churrascos, foi a carne escolhida para o estudo da influência da gordura na formação de benzo(a)pireno. Assim, peças de picanha com cerca de 1 cm de gordura externa (Figura 10a) e peso aproximado de 1 kg, foram assadas sobre carvão durante aproximadamente 40 min. ou até que a carne estivesse ao ponto (Figura 10b). O mesmo procedimento foi



a



b

Figura 9. a. Churrasqueira de alvenaria.
b. Churrasqueira portátil.

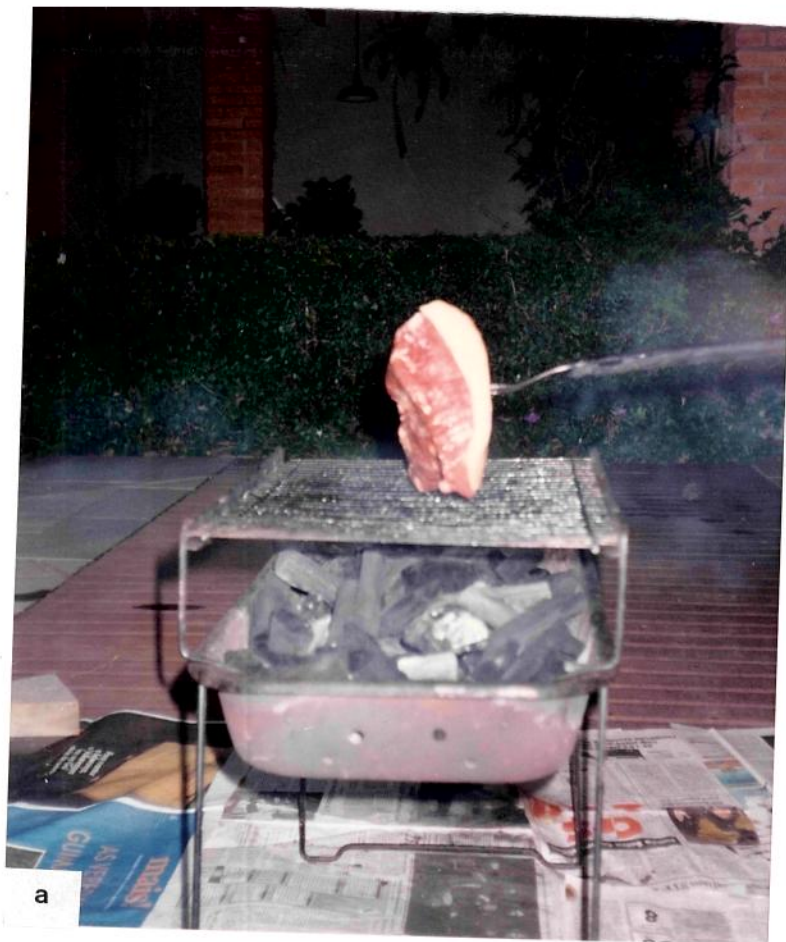


Figura 10. a. Picanha com gordura.
b. Picanha ao ponto.

repetido para picanhas cuja gordura foi previamente retirada e para picanhas cuja gordura foi retirada e depositada sob o carvão em brasa. A picanha sem gordura foi também processada sobre fogo de madeira (eucalipto). As carnes de suíno e de frango foram assadas somente sobre carvão.

Todas as carnes foram adquiridas no comércio local, em diferentes épocas, sendo cada amostra analisada no mínimo em duplicata.

III.4. Procedimentos

III.4.1. Extração e Purificação

O método utilizado no presente trabalho para a determinação de HPAs foi adaptado do método de LARSSON (1982) e envolveu as seguintes etapas:

1. Pesar 40 g da amostra e submeter à saponificação com 100 ml de solução de KOH etanólica (11 %), por um período de 4 horas, sob refluxo em banho-maria;
2. Retirar do aquecimento, lavar o condensador com 15 ml de etanol:água (4:1) e transferir o saponificado para um funil de separação (250 ml), lavando o balão com 15 ml de etanol:água (4:1) e com 50 ml de hexano, sucessivamente. Agitar durante 2,5 minutos e deixar separar as fases;
3. Transferir a fase etanólica para um segundo funil de separação, adicionar 40 ml de hexano, 30 ml de água e agitar por 2,5 minutos;

4. Descartar a fase etanólica inferior, reunir os extratos de hexano e lavar com 30 ml de etanol 4:1, 30 ml de etanol 1:1 e 2 x 30 ml de água;
5. Adicionar 50 ml e 30 ml de dimetilformamida:água (9:1), sucessivamente, agitando cada vez por 2,5 minutos. Descartar o hexano e reunir as frações de DMF;
6. Adicionar 80 ml de água e 50 + 30 ml de hexano sucessivamente agitando por 2,5 minutos. Descartar a fase de DMF e reunir os extratos em hexano;
7. Lavar duas vezes com 30 ml de água, concentrar em evaporador rotatório até um volume aproximado de 2 ml e proceder a cromatografia em coluna de sílica gel;
8. Preparar a coluna com 5 g de sílica gel (tratada conforme item III.1.) e 40 ml de hexano, adicionando-se sulfato de sódio anidro no topo da mesma e eluindo mais 40 ml de hexano até que o solvente atinja a parte superior da coluna, para onde será transferida quantitativamente a amostra;
9. Eluir com 150 ml de hexano e concentrar o extrato purificado até um volume aproximado de 2 ml;
10. Transferir o extrato quantitativamente para um frasco de concentração e secar sob nitrogênio. Diluir a amostra em 20 μ l de tolueno para a análise cromatográfica.

III.4.2. Cromatografia gasosa em coluna capilar

A análise cromatográfica foi realizada em cromatógrafo marca Varian, modelo 3400, equipado com injetor splitless e detector de ionização de chama. A coluna capilar de escolha foi a DB 5, com 25 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µ de espessura do filme polimetilfenilsiloxano, com 5 % de fenila (SE 52). O gás de arraste foi o hidrogênio.

Foram testadas duas programações de temperatura, uma com ascensão rápida e outra com ascensão lenta e constante, conforme detalhado a seguir:

a. Programação rápida de temperatura

Temperatura inicial 120°C, aquecimento de 15°C/ min até 165°C e de 5°C/min até 270°C.

b. Programação lenta de temperatura

Temperatura inicial 120°C, aquecimento de 4°C / min até 270°C.

As condições cromatográficas em relação aos outros parâmetros foram:

Temperatura do injetor: 250°C

Temperatura do detector: 300°C

Fluxo dos gases:

Chama:	hidrogênio:	30 ml/min.
	ar sintético:	300 ml/min.
Make up	nitrogênio:	30 ml/min.

Gás de arraste	hidrogênio:	12 psi
Limpeza da purga	hidrogênio:	30 ml/min
Tempo de abertura da purga do injetor:		0,75 min.

A identificação dos compostos foi feita pela comparação dos seus tempos de retenção com os dos respectivos padrões.

A quantificação foi feita pelo método do padrão externo. Foram feitas curvas de calibração, construídas a partir das seguintes concentrações:

B(a)P: 5,24; 10,48; 15,72; 20,96 ng/ μ l e 2,08; 4,16 e 6,24 ng/ μ l
B(a)A: 2,34; 4,68; 7,02 ng/ μ l
Cris: 2,26; 4,52; 6,78 ng/ μ l
B(b)F: 2,14; 4,28; 6,42 ng/ μ l
B(k)F: 2,28; 4,56; 6,84 ng/ μ l

III.4.3. Confirmação

A confirmação da identidade dos compostos analisados foi efetuada por cromatografia gasosa acoplada a um espectrômetro de massa, fazendo-se uso do monitoramento de ions selecionados.

O cromatógrafo CG-MS, marca HP, modelo 5988 A, equipado com injetor split/splitless e coluna capilar HP 5, foi operado nas seguintes condições:

Temperatura do injetor: 250°C
Temperatura do detector: 285°C
Fluxo do gás de arraste (He): 0,6 ml/min.
Tempo de abertura da purga do splitless: 0,75 min.
Programação de temperatura da coluna: Temperatura inicial: 120°C, aquecimento de 20°C/min até 200°C; aquecimento de 4°C até 270°C.

Uma segunda confirmação do B(a)P foi realizada com a utilização de um detector de varredura de fotodiodos acoplado a um cromatógrafo líquido de alta eficiência, equipado com coluna C18 de 25 cm de comprimento, 4,6 mm de diâmetro interno e 5 μ de tamanho de partícula, operado isocraticamente com acetonitrila: água (80:20) num fluxo de 0,7 ml/min.

III.4.4. Recuperação

Os testes da recuperação foram conduzidos em amostras não contaminadas de frango, peito de peru e lombo defumados e em churrasco de picanha sem gordura, adicionando-se quantidades conhecidas do padrão de benzo(a)pireno.

III.4.5. Limite de quantificação

O limite de quantificação foi considerado como sendo o valor mínimo que pôde ser determinado nas amostras.

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

IV.1. Metodologia Analítica

A proposta inicial do presente trabalho foi determinar o B(a)P em produtos cárneos, considerando-o como um indicador arbitrário para o potencial carcinogênico destes alimentos. Como visto na revisão bibliográfica, até os dias atuais o B(a)P é o principal representante dos compostos carcinogênicos da classe dos HPAs (SIMKO, 1992).

Nos churrascos de picanha, lombo, cortes de frango e linguiças, entretanto, considerando-se a limpeza dos cromatogramas, a disponibilidade dos padrões de benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno e benzo(k)fluoranteno, e suas ótimas resoluções cromatográficas, decidiu-se também pela determinação destes compostos. Nas carnes defumadas, seguiu-se a proposta inicial.

IV. 1.1. Extração e Purificação

Foram testadas duas metodologias, uma envolvendo a etapa de saponificação, baseada nos estudos de GRIMMER & BOHNKE (1975), e outra sem saponificação, baseada no método recomendado pela IUPAC (GRIMMER & JACOB, 1987).

IV. 1.1.1. Método com Saponificação

As primeiras tentativas de extração, seguindo-se a metodologia empregada por LARSSON (1982), com carnes defumadas, mais especificamente lombo defumado, evidenciaram a formação de emulsões estáveis, praticamente impossíveis de serem eliminadas,

mesmo após 4 horas de saponificação. Este problema fez com que se testasse outro solvente para o hidróxido de potássio, a saber, o etanol, citado em outras metodologias (DUNN & ARMOUR, 1980; de VOS et alii, 1990). Com este solvente, o problema das emulsões foi praticamente eliminado. O etanol substituiu também as soluções metanólicas utilizadas na primeira fase de purificação, antes da lavagem com água destilada. Assim, o metanol foi substituído pelo etanol em todas as etapas do método de LARSSON (1982).

Outra alteração efetuada neste método foi a substituição do solvente de extração, ciclohexano, pelo hexano. Tal mudança foi determinada pela impossibilidade de se trabalhar com o ciclohexano adquirido após os testes preliminares, o qual apresentou inúmeros interferentes em quantidades bastante elevadas. Esta alteração na qualidade do solvente teve origem, aparentemente, na troca de fabricante, posteriormente admitida pelo fornecedor. Assim sendo, o solvente de extração empregado para determinar os HPAs no presente trabalho foi o n-hexano puríssimo Merck.

IV. 1.1.2. Método sem Saponificação

O método recomendado pela IUPAC (GRIMMER & JACOB, 1987) prevê a extração tanto com triclorofluoretano como com ciclohexano. Os testes foram realizados com ciclohexano, sendo importante mencionar que o ciclohexano utilizado era de um lote anterior ao contaminado, não apresentando interferentes indesejáveis.

Em relação a esta metodologia, cabe ressaltar o emprego de uma coluna em sistema fechado para cromatografia com Sephadex LH 20 utilizada na última fase de purificação do extrato. Como o Sephadex LH 20 se constitui numa fase estacionária muito cara para ser preparada diariamente, as colunas eram guardadas sob refrigeração e reutilizadas. Entretanto, acredita-se que o

assentamento das partículas do gel interferiu no bom desenvolvimento cromatográfico, suscitando dúvidas quanto à reutilização das colunas.

Após estes testes preliminares, a escolha do método de análise que foi utilizado no presente trabalho foi feita com base nas seguintes considerações:

- a. GRIMMER & BOHNKE (1975) caracterizaram a saponificação como uma etapa imprescindível para a total recuperação dos HPAs a partir de matrizes ricas em gorduras e proteínas.
- b. A substituição do ciclohexano por hexano eliminou os problemas relativos à presença de interferentes.
- c. No método recomendado pela IUPAC, obteve-se uma recuperação cerca de 12% inferior à do método de LARSSON, (1982) adaptado. Também, encontrou-se certa dificuldade na utilização do Sephadex LH 20.

Com o intuito de se conseguir um extrato o mais puro possível, foram ainda tomadas as seguintes providências:

- a. Devido à variabilidade dos teores de gordura e diversidade de tipos de carnes analisadas, a quantidade de hidróxido de potássio etanólico utilizada foi aumentada de 60 ml para 100 ml, de forma a garantir uma hidrólise completa durante a fase de saponificação.
- b. A água destilada foi ultrapurificada no Ultra Pure Water System;
- c. o hidróxido de potássio foi lavado com hexano, antes do uso.

Além disso, para garantir a total eluição do B(a)P, a quantidade de hexano eluída da coluna de sílica gel foi aumentada de 100 para 150 ml.

Estas alterações foram imprescindíveis para se obter cromatogramas limpos, com o menor número de interferentes possíveis, como pode ser observado nos cromatogramas obtidos para os diferentes tipos de amostras (Figuras 11 a 18).

IV.1.2. Cromatografia Gasosa

Foram testadas duas programações de temperatura, denominadas de método curto e método longo, tendo sido este último o escolhido.

Com o método curto, os 5 HPAs analisados poderiam ser perfeitamente bem resolvidos e identificados, mesmo porque a partir de 165°C a temperatura subiu gradualmente 5°C/min. A opção pelo método longo, entretanto, foi influenciada principalmente pela presença de um interferente que apareceu em todas as análises, com tempo de retenção muito próximo ao do B(a)P. Com a programação de temperatura escolhida, ajustando-se a pressão do gás de arraste para 12 psi, o B(a)P ficou bem isolado do referido interferente.

KUSHWAHA et alii (1985) comprovaram a melhor resolução dos isômeros benzo(a)antraceno e criseno bem como do benzo(b)fluoranteno e benzo(k)fluoranteno com programações de temperatura lentas e constantes.

A Tabela 7 apresenta algumas das programações encontradas na revisão bibliográfica.

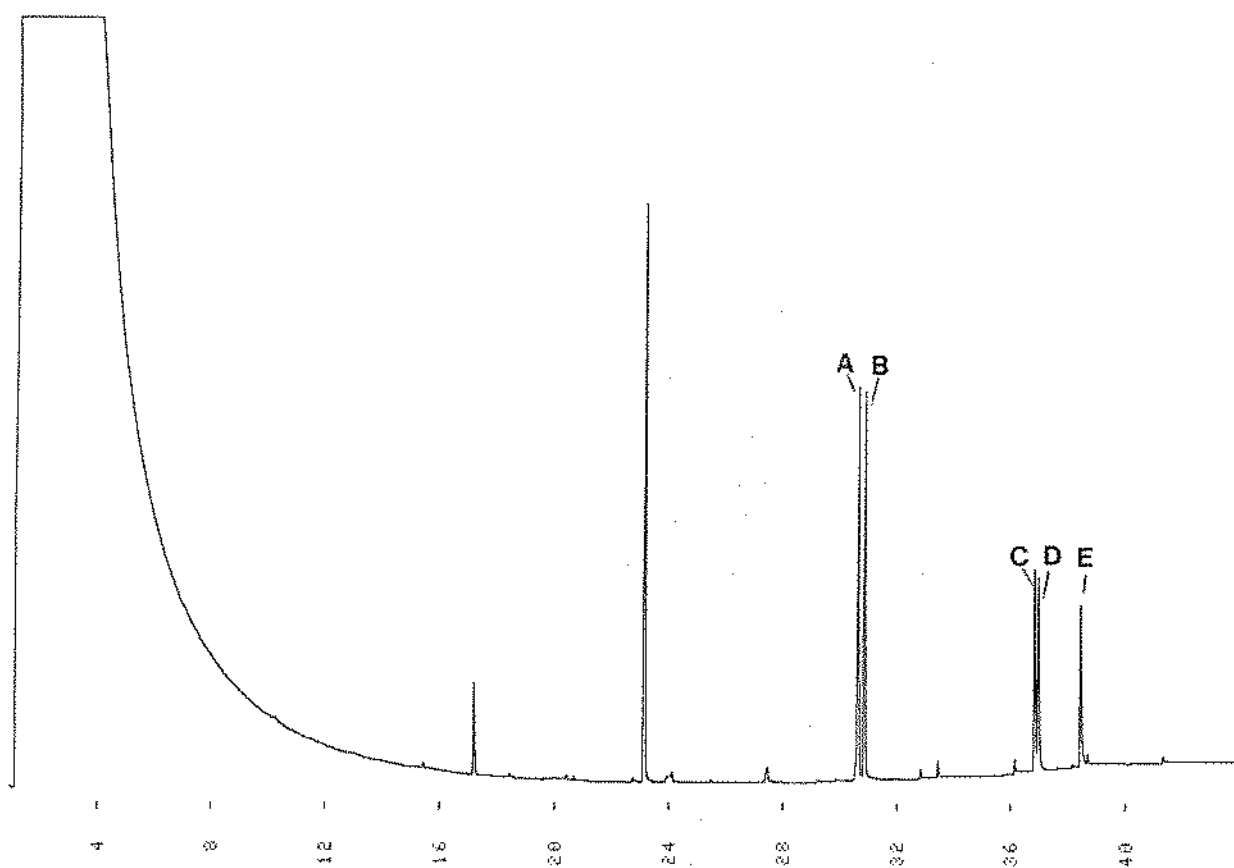


Figura 11. Cromatograma por CG dos padrões:

- A = Benzo(a)antraceno
- B = Criseno;
- C = Benzo(b)fluoranteno
- D = Benzo(k)fluoranteno
- E = Benzo(a)pireno.

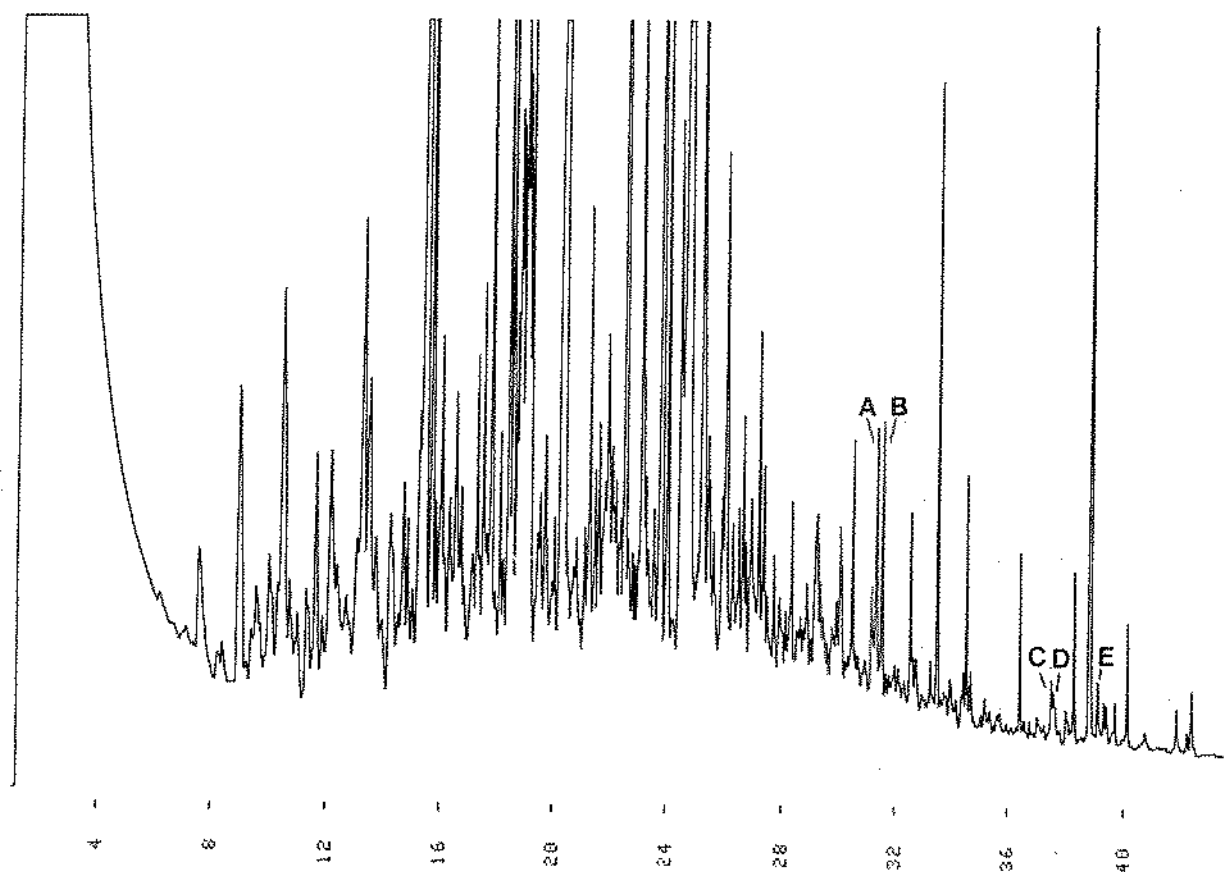


Figura 12. Cromatograma por CG de salame defumado caseiro.

- A = Benzo(a)antraceno
- B = Criseno;
- C = Benzo(b)fluoranteno
- D = Benzo(k)fluoranteno
- E = Benzo(a)pireno.

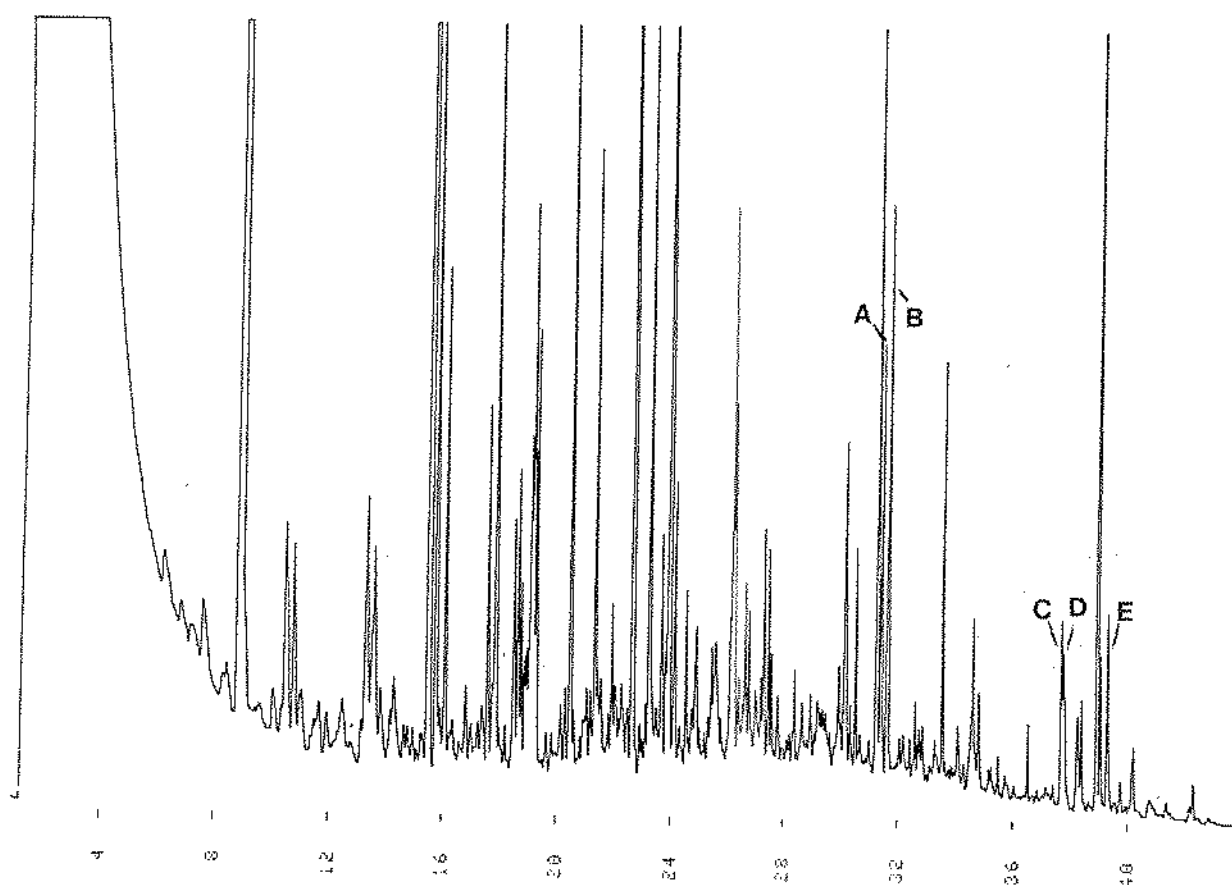


Figura 13. Cromatogramas por CG de asa de frango assada a 15 cm do fogo.

A = Benzo(a)antraceno

B = Criseno;

C = Benzo(b)fluoranteno

D = Benzo(k)fluoranteno

E = Benzo(a)pireno.

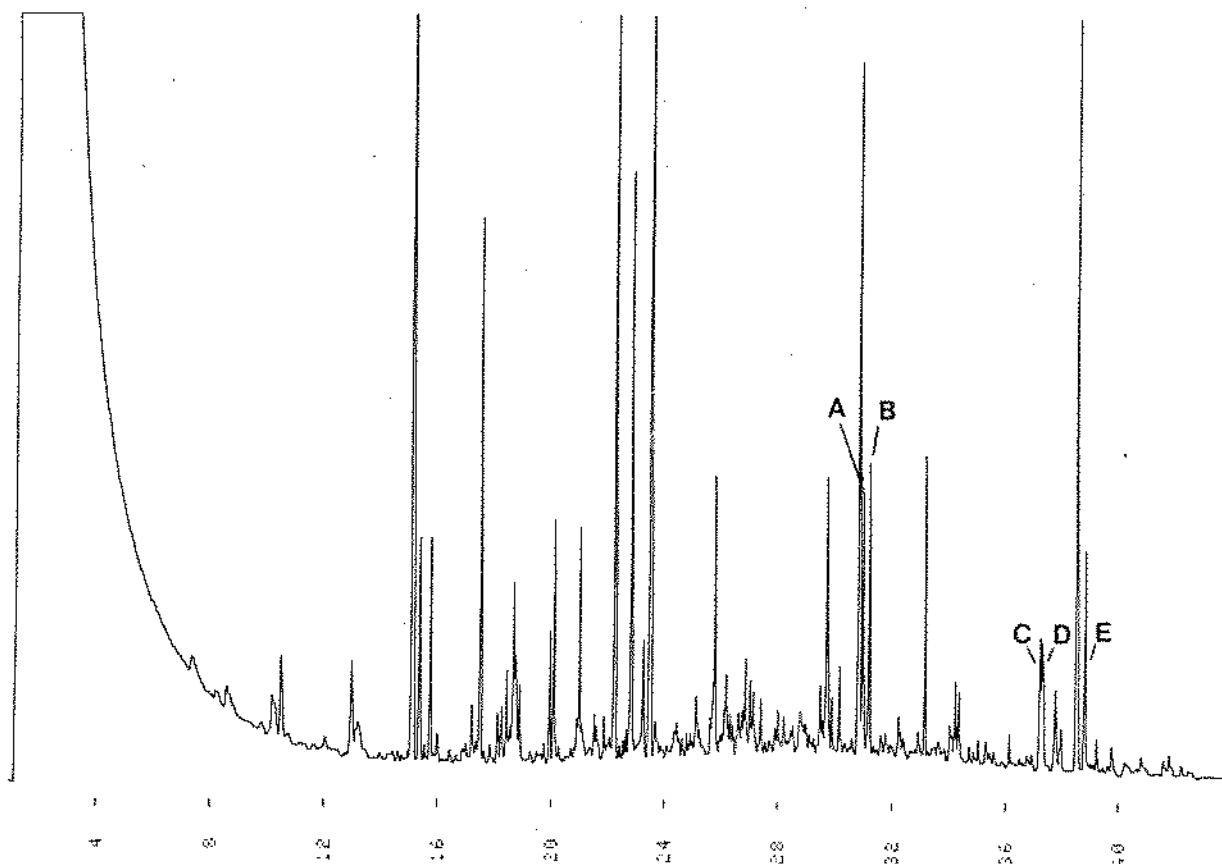


Figura 14. Cromatograma por CG de lombo assado a 15 cm do fogo

- A = Benzo(a)antraceno
- B = Criseno;
- C = Benzo(b)fluoranteno
- D = Benzo(k)fluoranteno
- E = Benzo(a)pireno.

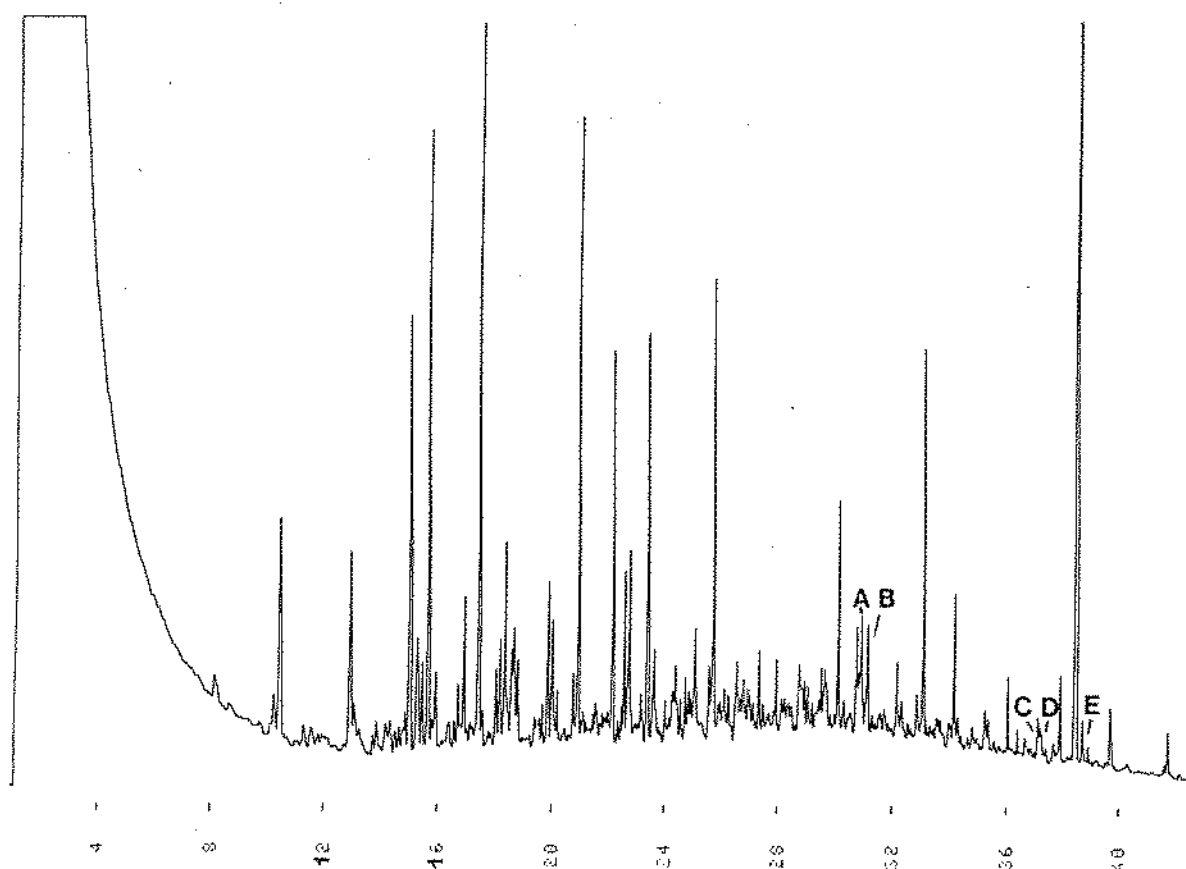


Figura 15. Cromatograma de picanha sem gordura, assada sobre madeira, a 40 cm do fogo.

A = Benzo(a)antraceno

B = Criseno;

C = Benzo(b)fluoranteno

D = Benzo(k)fluoranteno

E = Benzo(a)pireno.

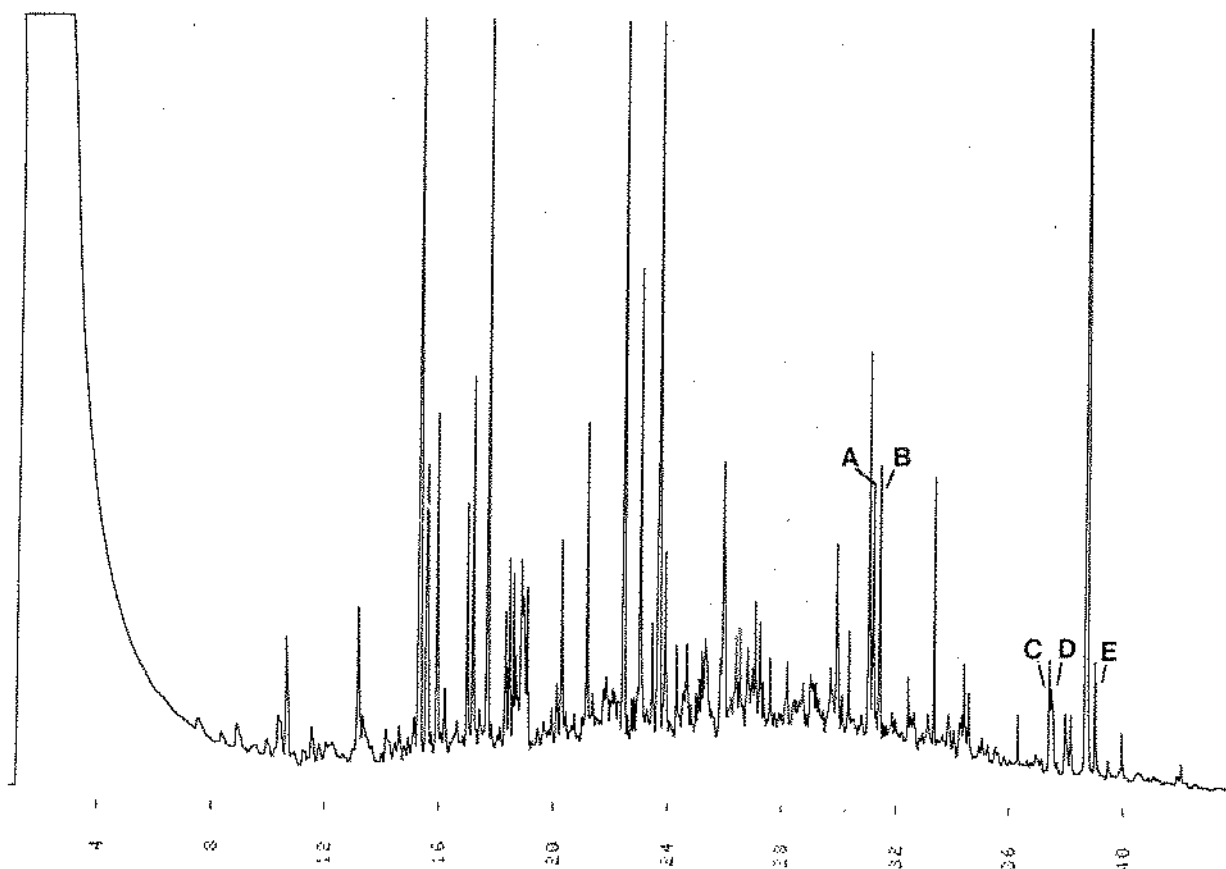


Figura 16. Cromatograma de picanha sem gordura, assada sobre madeira, a 15 cm do fogo.

A = Benzo(a)antraceno

B = Criseno;

C = Benzo(b)fluoranteno

D = Benzo(k)fluoranteno

E = Benzo(a)pireno.

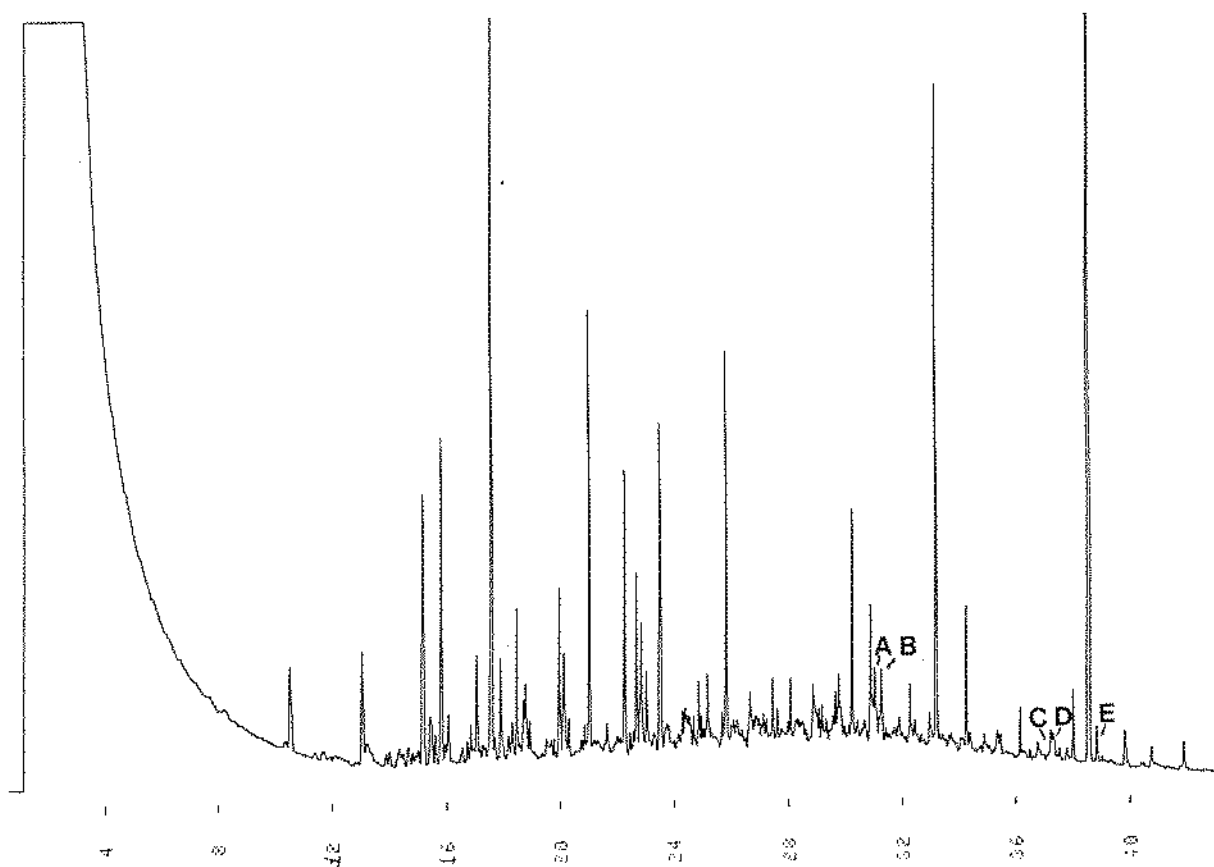


Figura 17. Cromatograma de picanha sem gordura, assada com gordura na brasa, distante a 40 cm do fogo.

- A = Benzo(a)antraceno
- B = Criseno;
- C = Benzo(b)fluoranteno
- D = Benzo(k)fluoranteno
- E = Benzo(a)pireno.

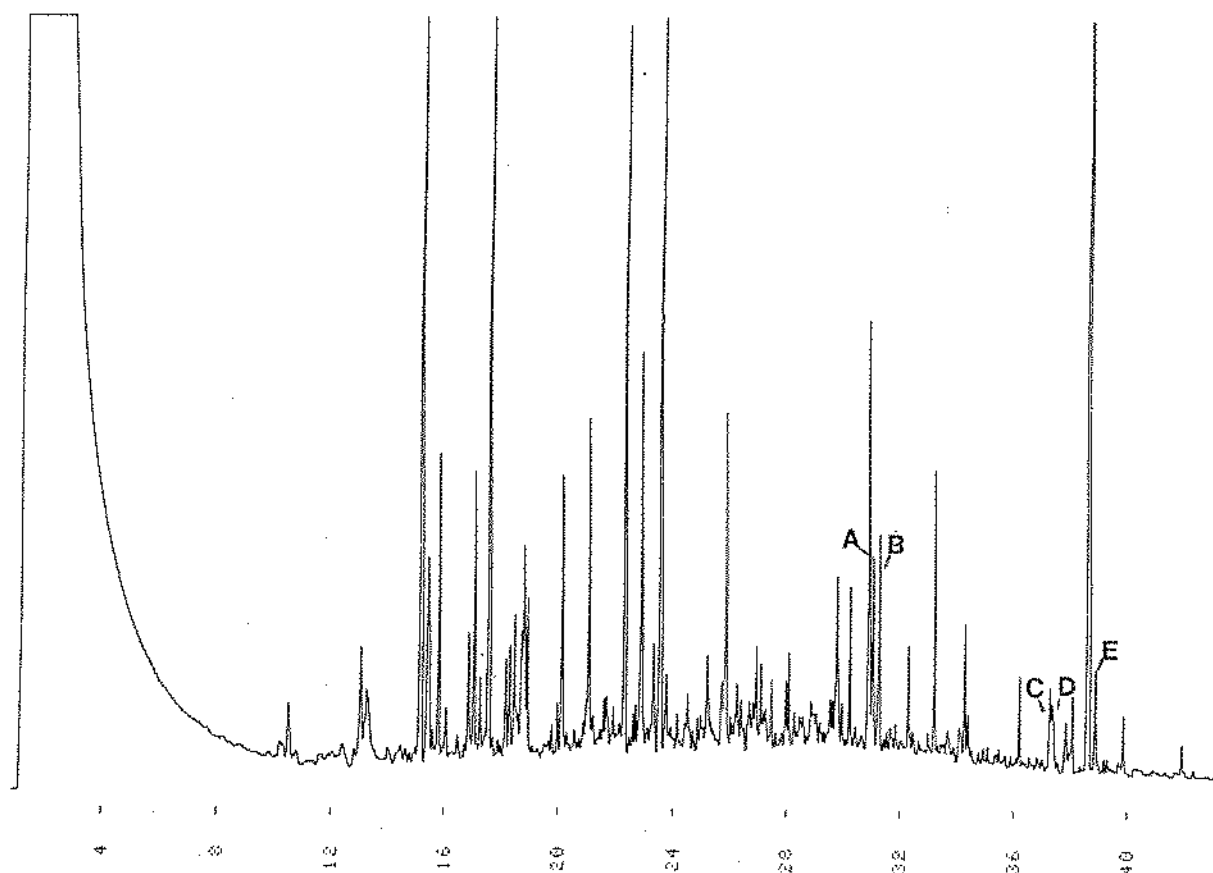


Figura 18. Cromatograma de picanha sem gordura, assada com gordura na brasa, distante a 15 cm do fogo.

- A = Benzo(a)antraceno
- B = Criseno;
- C = Benzo(b)fluoranteno
- D = Benzo(k)fluoranteno
- E = Benzo(a)pireno.

Tabela 7. Programações de temperatura utilizadas por diferentes autores.

Programação de temperatura			Referência
165°C	4°C/min	255°C	LARSSON, 1982
40°C	4°C/min	260°C	VASSILAROS et alii, 1982
100°C	3°C/min	260°C	AFOLABI et alii, 1983
70°C	5°C/min	280°C	SPEER et alii, 1990
110°C	30°C/min	160°C	GRIMMER & JACOB, 1987
160°C	1,5°C/min	270°C	
70°C	30°C/min	140°C	LEE et alii, 1987
140°C	2,3°C/min	260°C	
82°C	30°C/min	170°C	VREULS et alii, 1992
170°C	5°C/min	295°C	

Como pode ser observado, a maioria das programações tem uma tendência gradual e constante, ocorrendo o aumento rápido, principalmente quando a temperatura inicial é relativamente baixa.

IV.1.3. Quantificação

A quantificação dos HPAs foi efetuada pelo método do padrão externo, sendo realizadas injeções diárias dos padrões, correndo nas mesmas condições das amostras. A repetibilidade dos cromatogramas serviu como parâmetro de controle, podendo-se confiar, dia após dia, nas determinações das amostras, sem o uso do padrão interno que, de acordo com a literatura, é o método mais comumente empregado (LARSSON, 1982; MOROZZI et alii, 1985; GRIMMER & JACOB, 1987).

IV.1.4. Confirmação

De acordo com BARTLE et alii (1981) e CHOUDHURY & BUSH (1981) (citação de KUSHWAHA et alii, 1985), o espectro de massa por si só não é suficiente para estabelecer a identidade de certos HPAs, já que diversos isômeros dão um mesmo espectro. Os HPAs só podem ser identificados reunido-se os dados do espectro de massa com os tempos de retenção obtidos na cromatografia gasosa. No presente estudo, amostras e padrões foram cromatografados nas mesmas condições em ambos cromatógrafos, adaptando-se as condições do VARIAN 3400 às já estabelecidas para o cromatógrafo acoplado com detector de massa.

A confirmação da identidade dos compostos, portanto, foi efetuada por cromatografia gasosa acoplada a um espectrômetro de massa, fazendo-se uso do monitoramento de ions selecionados. Para o benzo(a)antraceno e o criseno foram selecionados os ions 114 e 228; para os outros três isômeros, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno e benzo(a)pireno, os ions selecionados foram 126 e 252. As Figuras 19a e 19b mostram os cromatogramas de churrasco de lombo, evidenciando os picos do benzo(a)antraceno e criseno e as Figuras 20a e 20b os picos do benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno e benzo(a)pireno, respectivamente. Nas Figuras 21a e 21b são mostrados os cromatogramas dos mesmos compostos identificados por VREULS et alii (1991), em óleos vegetais.

A Figura 22a e 22b mostram os espectros do B(a)P, confirmado por um detector de fotodiodos acoplado a um cromatógrafo líquido de alta eficiência, que foi a segunda confirmação da identidade deste composto carcinogênico.

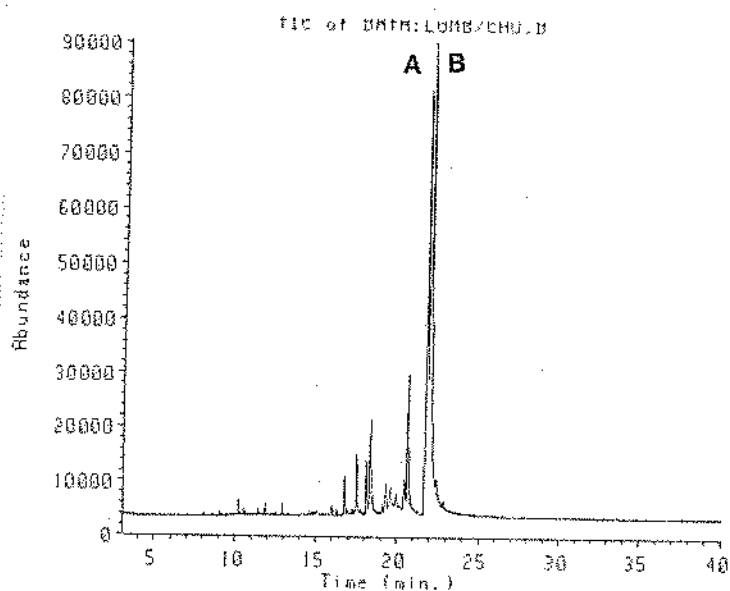


Figura 19a. Cromatograma por CG-MS de churrasco de lombo.
 A = Benzo(a)antraceno
 B = Criseno

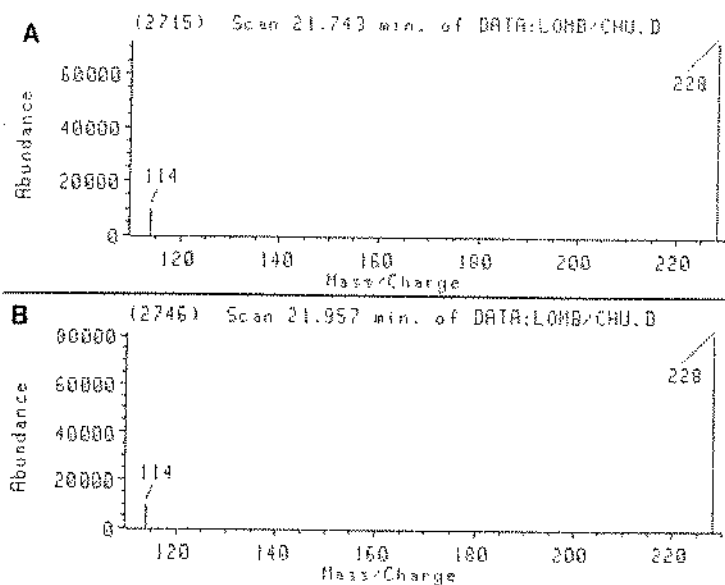


Figura 19b. Espectro de massa dos picos A e B.

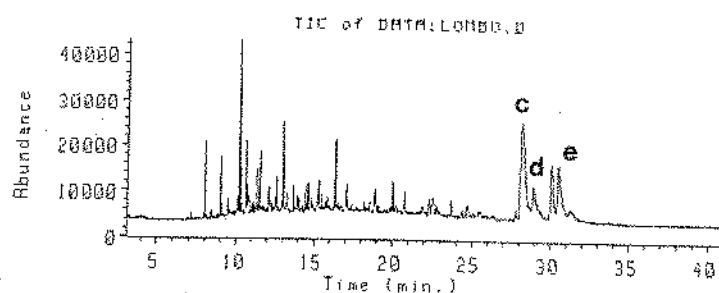


Figura 20a. Cromatograma por CG-MS de churrasco de lombo.
 C = Benzo(b)fluoranteno
 D = Benzo(k)fluoranteno
 E = Benzo(a)pireno.

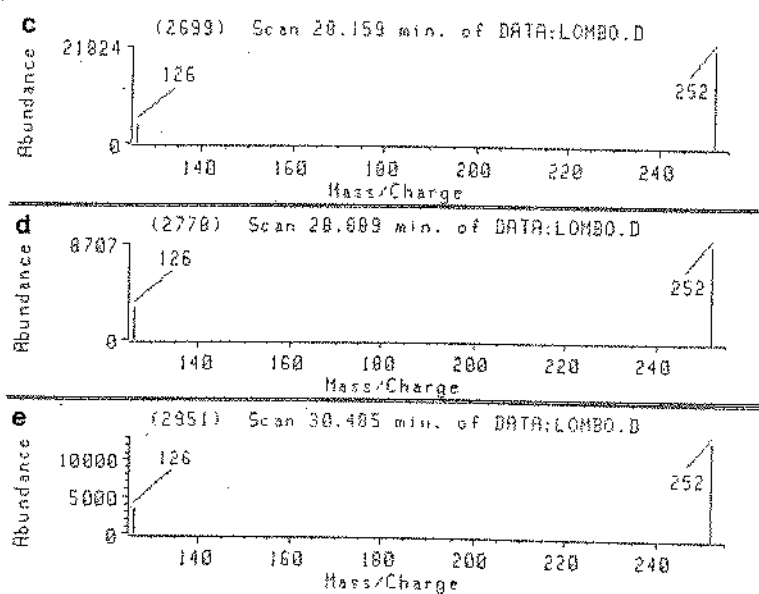
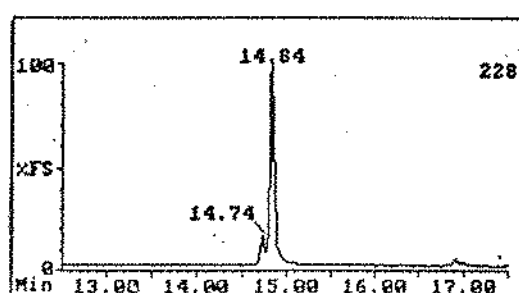
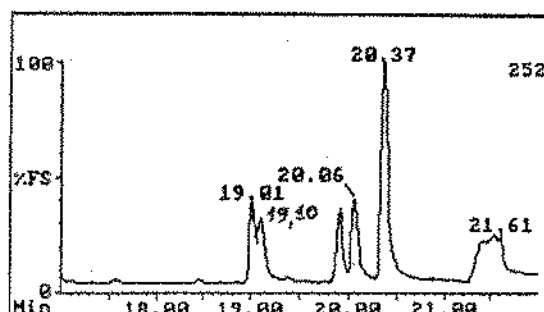


Figura 20b. Espectro de massa dos picos C, D e E.



a



b

Figura 21. Cromatograma por CG-MS de óleo de oliva, conforme apresentado por VREULS (1991).

a. Benzo(a)antraceno 14,74 min.; criseno 14,84 min.

b. Benzo(b)fluoranteno 19,01 min.; Benzo(k)fluoranteno 19,10 min; Benzo(a)pireno 20,06 min.

IV.1.5. Recuperação

Os resultados dos testes de recuperação estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8. Recuperação de benzo(a)pireno em diferentes carnes.

Tipo de carne	Fortificação (µg/kg)	Recuperação*
Frango defumado	2,62	73% (15,07)
	5,24	79% (16,39)
Lombo defumado	2,62	68% (7,69)
	5,24	70% (9,57)
Peito de peru defumado	7,86	64% (18,67)
Churrasco de picanha	5,24	67% (8,34)
	7,86	65% (5,32)

Os resultados correspondem à média de duas determinações.

*Os valores em parênteses referem-se ao coeficiente de variação.

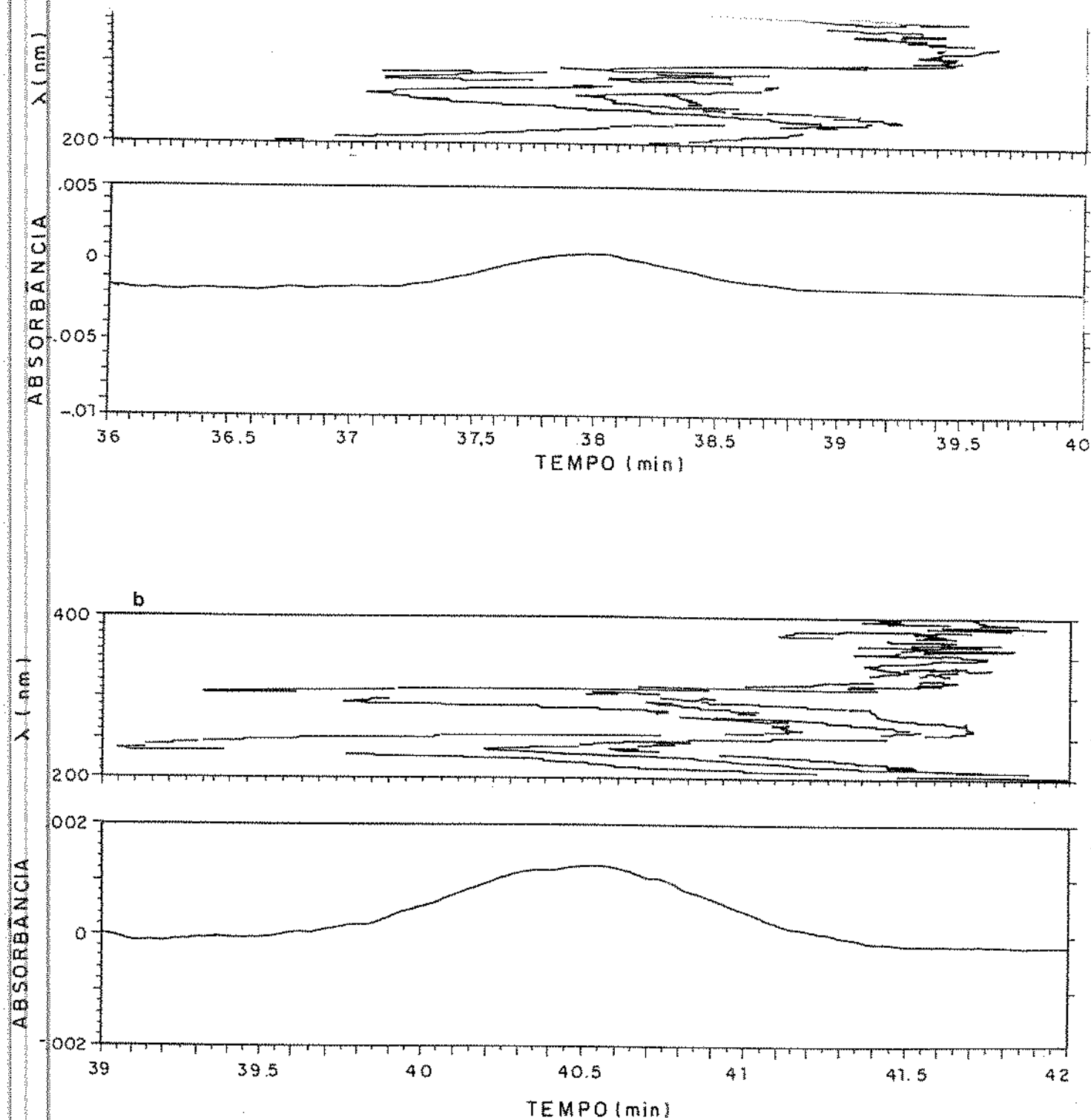


Figura 22. Espectros obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fotodiodos
a. Padrão de benzo(a)pireno
b. Amostra de picanha assada

Os valores obtidos (64 - 79%) encontram-se dentro da faixa de recuperação (59 - 118%) relatada por GRIMMER & JACOB (1987) para estudos intra e inter laboratórios, realizados em carnes defumadas utilizando-se o método recomendado pela IUPAC.

LAWRENCE & WEBER (1984), PERFFETTI et alii (1992) e SIMKO & KNEZO (1992) utilizaram método de extração semelhante ao empregado neste trabalho e obtiveram valores de recuperação em torno de 75%, 78% e 76-94%, respectivamente.

IV.1.6. Limite de Quantificação do Método

O limite de quantificação nas condições da análise, independentemente do tipo de carne, foi de 0,2 µg/kg para todos os HPAs.

IV.2. B(a)P em Carnes Defumadas

Os níveis de benzo(a)pireno determinados em carnes processadas industrialmente estão apresentados nas Tabelas 9, 10 e 11.

Como pode ser observado, não foi detectada a presença de B(a)P em 12 dos 17 produtos analisados. Nos demais, os níveis encontrados variaram entre 0,34 e 1,36 µg/kg. Somente 3 produtos (17%) apresentaram-se contaminados com níveis de B(a)P superiores a 1 µg/kg. Este valor é adotado pela legislação de alguns países como sendo o limite máximo permitido de B(a)P em carnes defumadas. No Brasil, assim como em outros países, não existe ainda legislação específica a respeito e, portanto, para efeito de comparação, assumiu-se no presente trabalho ser este um nível de referência.

Tabela 9. Teores de B(a)P ($\mu\text{g/kg}$) em derivados de suíno defumados pelo processo industrial.

Produto	Marcas					
	A	B	D	E	F	G
Linguiça cocktail	-	-	-	-	-	n.d.
Linguiça calabreza	n.d.	0,71	1,36	-	-	-
Linguiça portuguesa	-	1,16	1,02	-	-	-
Salame	-	-	-	-	0,34	-
Paio	-	-	-	-	-	n.d.
Presunto tenro sem osso	n.d.	-	-	-	-	-

os valores são média de três determinações
n.d. não detectado (abaixo de $0,2 \mu\text{g/kg}$)
- produto não disponível nesta marca

Tabela 10. Teores de B(a)P ($\mu\text{g/kg}$) em lombo de suíno defumado pelo processo industrial.

Produto	Marcas		
	A	B	C
Lombo	n.d.	n.d.	-
Lombo Canadense	n.d.	n.d.	n.d.

os valores são média de três determinações
n.d. não detectado (abaixo de $0,2 \mu\text{g/kg}$)
- produto não disponível nesta marca

Tabela 11. Teores de B(a)P ($\mu\text{g/kg}$) em produtos de aves defumados industrialmente.

Produto	Marcas	
	A	B
Peito de frango sem pele	-	n.d.
Frango sem pele	n.d	-
Pele de frango	1,81	-
Peito de peru	n.d.	-

os valores são média de três determinações

n.d. não detectado

- produto não disponível nesta marca

Embora em carne de frango não tenha sido detectada a presença de B(a)P, sua pele, analisada separadamente, apresentou teor acima de $1 \mu\text{g/kg}$. Este resultado sugere que a pele atua como uma barreira para a penetração de HPAs, evitando a contaminação do músculo propriamente dito. Não se encontrou na revisão de literatura referências que relatassem sobre a pesquisa semelhante, para termos de comparação.

A função da pele como barreira e os mecanismos que envolvem a penetração do B(a)P foram estudados por SIMKO (1991), em peixes defumados. O autor constatou uma maior concentração de B(a)P na pele logo após o processo da defumação e sua diminuição durante o período de estocagem. Segundo o autor, esta diminuição se deve, por um lado, à degradação fotolítica e por outro, à penetração através da pele. Assim sendo, não fica descartada a possibilidade da passagem do B(a)P para o músculo, embora isto ocorra em quantidades bem baixas.

GORELOVA & DIKUN (1958) observaram a penetração de B(a)P através de tripas naturais que envolvem salsichas, enquanto que MALANOWSKI et alii (1968), RHEE & BRATZLER (1970), SIMON et alii (1969) e FILIPOVIC & TOTH (1971) observaram a barreira oferecida pela pele de material hidrofílico, como a celulose.

A ausência ou a presença em baixas concentrações de B(a)P em carnes defumadas industrialmente tem sido atribuída aos seguintes fatores:

- a. em instalações modernas de defumação, a fumaça é produzida em geradores que permitem um controle relativamente preciso da temperatura de produção da fumaça. Estes geradores se encontram separados da câmara de defumação e se baseiam em técnicas como a fricção da madeira ou no uso de vapor superaquecido (POTTHAST, 1978; WEINACKER & BITTNER, 1990; MULLER, 1992). O uso de geradores externos permite ainda a purificação da fumaça por resfriamento ou filtração anterior a sua entrada na câmara de defumação (TOTH & BLAAS, 1972).
- b. algumas indústrias utilizam condensados de fumaça, fumaças líquidas ou condimentos defumados, em substituição ao processo de defumação. Estes preparados, dependendo dos cuidados seguidos durante sua obtenção, podem estar completamente isentos de HPAs, principalmente os de alto peso molecular (POTTHAST, 1988).

Embora tenham sido feitas tentativas para se visitar a área de defumação das indústrias produtoras das carnes analisadas, pouco sucesso foi obtido, havendo aparentemente um certo receio por parte da indústria. Entretanto, em visita realizada a uma indústria nas proximidades de Campinas, foi constatado que a técnica empregada para a produção de fumaça utilizava fricção da madeira, guardando todos os requisitos encontrados na descrição desta técnica (WEINACKER & BITTNER,

1990), com a câmara de defumação localizada bem distante da fonte geradora. É importante a constatação da existência de preocupação por parte desta indústria quanto à possibilidade de formação de HPAs, o que contribui para a produção de produtos mais seguros do ponto de vista toxicológico.

Entretanto, contatos feitos com o pessoal técnico de outras indústrias evidenciaram que, na maioria delas, o processo de defumação é ainda bastante rudimentar, não existindo aparentemente qualquer controle do processo ou seleção de madeiras apropriadas para a queima. Dos representantes das firmas fornecedoras de preparados de fumaça, por outro lado, obteve-se a informação de que o consumo destes produtos para uso em derivados de carnes é grande.

Em vista destas constatações e do grande número de variáveis que influenciam a presença de HPAs em carnes defumadas, não é possível se atribuir a um único fator os baixos níveis desses compostos nos produtos analisados.

A Tabela 12 apresenta os níveis de B(a)P em carnes defumadas pelo processo caseiro.

Comparativamente aos produtos industrializados, o teor de benzo(a)pireno nestes alimentos é bastante elevado, sendo em algumas carnes superior a 6 µg/kg. Esta observação pode ser justificada pelas condições utilizadas na defumação caseira, que envolvem:

- produção de fumaça por queima direta de madeira ou serragem, sem controle de temperatura e do fluxo de ar circulante;
- proximidade do produto com a fonte geradora de fumaça;
- utilização indiscriminada de qualquer tipo de madeira.

Tabela 12. Teores de B(a)P ($\mu\text{g/kg}$) em produtos defumados pelo processo caseiro.

Produto	Fornecedor*		
	A	B	C
Picanha	5,36	6,09	2,64
Cupim	3,65	-	-
Frango com Pele	3,21	-	-
Salame	1,80	-	-
Lagarto	-	n.d.	-

os valores são média de três determinações

*refere-se à pessoa que processou as carnes artesanalmente

n.d. não detectado (abaixo de $0,2 \mu\text{g/kg}$)

- produto não disponível neste fornecedor

Segundo POTHAST (1982), havendo um controle adequado da temperatura de produção da fumaça, o tipo de madeira não tem importância significativa na contaminação de produtos defumados por HPAs. Caso o controle não seja possível, o tipo de madeira influencia consideravelmente o teor de HPAs pois, segundo SIMON et alii (1969), FRETHEIM (1976), POTHAST (1978) e MAGA (1986), madeiras macias produzem maiores quantidades destes compostos do que madeiras duras.

Realmente, em visita realizada a um fornecedor de produtos defumados artesanalmente, constatou-se que a serragem utilizada na produção de fumaça, além de ser adquirida sem discriminação de tipo, era queimada sem qualquer possibilidade de controlar a temperatura. Os produtos se encontravam bem próximos da fonte geradora, em ambiente muito pequeno e totalmente

fechado, não existindo, também, possibilidade de controle do ar circulante.

Com base nos resultados obtidos, pode se considerar que a defumação caseira é um processo potencial de formação de HPAs, devendo sua utilização ser orientada e fiscalizada.

Os níveis de contaminação determinados no presente estudo (n.d. - 6,09 µg/kg) encontram-se dentro da faixa de valores detectados em alimentos comercializados em países desenvolvidos, destacando-se a defumação caseira como responsável pelos maiores teores de B(a)P (Tabela 3).

É importante ressaltar que embora não exista no Brasil uma legislação específica em relação à presença de B(a)P em carnes defumadas, para aromas de fumaça a Portaria 20/72 fixa este limite em 0,1 µg/kg. Ainda, segundo a legislação, a quantidade máxima de aroma a ser adicionado em carnes e peixes é de 90 mg/kg, o que equivale, aproximadamente, a um teor máximo de 0,01 ng de B(a)P por kg de produto (ABIA, 1989). Este limite não somente condena todos os produtos que foram analisados, como representa um valor praticamente impossível de ser quantificado pelos métodos de análise atualmente disponíveis, devendo, portanto, ser revisado pelas autoridades competentes.

IV.3. HPAs em Carnes Processadas como Churrasco

A utilização de dois tipos de churrasqueiras possibilitou que se avaliasse a influência da distância entre a carne e a fonte de calor na presença de HPAs no produto assado.

As Tabelas 13, 14, 15 e 16 apresentam os níveis de HPAs em carnes assadas sobre carvão, nas duas churrasqueiras.

Tabela 13. Teores de HPAs ($\mu\text{g/kg}$) em coxa/sobre coxa de frango assadas sobre carvão.

Amostra	B(a)P	B(a)A	Cris	B(b)F	B(k)F
Churrasqueira de alvenaria					
1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Churrasqueira portátil					
1	1,03	1,66	1,92	1,13	0,69
2	1,32	1,34	1,57	0,55	0,50
3	1,72	2,06	2,67	1,47	1,05

os valores são média de duas determinações

B(a)P = benzo(a)pireno; B(a)A = benzo(a)antraceno; cris = criseno;

B(b)F e B(k)F = benzo(b)fluoranteno e benzo(k)fluoranteno

n.d. não detectado

Para todas as carnes, observa-se que os níveis de HPAs foram maiores quando se utilizou a churrasqueira portátil, ou seja, quando a fonte de calor estava mais próxima. Aparentemente, a maior distância da brasa possibilitou uma maior dispersão dos HPAs transportados pela fumaça formada durante o processo e, conseqüentemente, a sua menor absorção pela carne.

É interessante observar que para diferentes amostras de um mesmo tipo de carne, assadas nas mesmas condições, a variabilidade de resultados foi maior quando se utilizou a churrasqueira portátil. Os níveis de B(a)P em asa de frango, p. ex., variaram na faixa de 1,87 a 8,22 $\mu\text{g/kg}$ quando assadas nesta churrasqueira, enquanto que na churrasqueira de alvenaria os valores encontrados foram mais próximos (Tabela 15). Provavelmente, um dos fatores que contribuiu para isto foi o fato de que na churrasqueira portátil as carnes foram assadas ao ar

Tabela 14. Teores de HPAs ($\mu\text{g/kg}$) em lombo de porco assado sobre carvão.

Amostra	B(a)P	B(a)A	Cris	B(b)F	B(k)F
Churrasqueira de alvenaria					
1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Churrasqueira portátil					
1	3,60	2,68	3,03	2,29	2,14
2	9,59	6,76	8,41	5,54	5,30
3	10,41	9,69	11,12	7,77	8,25

os valores são média de duas determinações

B(a)P = benzo(a)pireno; B(a)A = benzo(a)antraceno; cris = criseno; B(b)F e B(k)F = benzo(b)fluoranteno e benzo(k)fluoranteno.

n.d. não detectado

livre, sujeitas à ação do vento, que pode atuar dispersando a fumaça. Como consequência, a absorção da fumaça e, consequentemente de HPAs pode não ter sido uniforme. Estas considerações servem também para o B(a)P analisado em lombo de porco, assado na churrasqueira portátil (Tabela 14), e ainda para os demais HPAs analisados nestes dois tipos de carne, na mesma churrasqueira.

Os valores relativamente altos encontrados nas asas, assadas na churrasqueira portátil, comparados com os valores baixos das coxas e sobre coxas, assadas na mesma churrasqueira, podem ser analisados em função do teor de músculo proporcional ao teor de pele. Nas asas, envolvidas totalmente pela pele, a quantidade de gordura separável é grande comparada com o teor de carne propriamente dita. Nas coxas e sobre coxas, só um lado é recoberto de pele e, comparativamente às asas, o teor de músculo é relativamente superior ao teor de pele.

Tabela 15. Teores de HPAs ($\mu\text{g/kg}$) em asas de frango assadas sobre carvão.

Amostra	B(A)P	B(A)A	Cris	B(b)F	B(k)F
Churrasqueira de alvenaria					
1	0,93	1,19	1,93	1,62	1,39
2	0,96	2,25	1,51	1,62	1,39
3	1,03	2,06	3,03	1,29	1,10
Churrasqueira portátil					
1	1,87	2,56	3,84	1,79	1,38
2	3,15	6,19	5,08	2,43	1,69
3	3,65	2,17	2,33	1,39	1,60
4	4,82	6,00	8,27	4,73	3,62
5	8,22	12,53	8,43	4,54	3,09

os valores são média de duas determinações

B(a)P = benzo(a)pireno; B(a)A = benzo(a)antraceno; cris = criseno; B(b)F e B(k)F = benzo(b)fluoranteno e benzo(k)fluoranteno

Analisando-se a Tabela 16 pode se observar que nas linguças praticamente não houve contaminação, em qualquer das churrasqueiras. Os seguintes fatores podem ter contribuído para a baixa contaminação:

- O envoltório das linguças, dependendo da sua natureza lipofílica (tripa natural) ou hidrofílica (celulose), pode facilitar ou impedir, respectivamente, a passagem da gordura durante o processamento (SIMON et alii, 1969).
- A pequena área superficial das linguças pode limitar a absorção de fumaça produzida pela queima da gordura.

Tabela 16. Teores de HPAs ($\mu\text{g/kg}$) em linguças de origem industrial e caseira, assadas sobre carvão.

Amostra	B(a)P	B(a)A	Cris	B(b)F	B(k)F
Industrial					
	churrasqueira de alvenaria				
1	n.d.	n.d.	n.d.	n.D	n.d.
2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	churrasqueira portátil				
1	n.d.	0,58	0,78	n.d.	n.d.
2	0,43	0,73	1,08	n.d.	n.d.
3	0,57	0,78	1,1.	n.d.	n.d.
Caseira					
	churrasqueira de alvenaria				
1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	churrasqueira portátil				
1	0,27	0,48	0,64.	n.d.	n.d.
2	0,39	0,44	0,69	n.d.	n.d.
3	0,38	0,39	0,59	n.d.	n.d.

os valores são média de duas determinações

B(a)P = benzo(a)pireno; B(a)A = benzo(a)antraceno; cris = criseno;

B(b)F e B(k)F = benzo(b)fluoranteno e benzo(k)fluoranteno

n.d. não detectado (abaixo de $0,2 \mu\text{g/kg}$)

- c. A gordura nestes produtos está muito bem aderida a massa que os compõem, o que torna mais difícil sua liberação (LARSSON, 1983).
- d. O toucinho que acompanha a formulação destas linguiças, tem um ponto de fusão bem mais elevado do que a gordura que normalmente faz parte da massa, não derretendo facilmente, diminuindo assim o risco de formação de HPAS. Apesar de se ter a impressão visual de que nas linguiças o teor de gordura separável é muito alto, na verdade o que pinga durante o processamento é água que vai sendo liberada, enquanto que a gordura, por ser de ponto de fusão elevado, permanece praticamente inalterável.

Na Tabela 17 encontram-se os dados relativos à presença de HPAs em churrascos de picanha assada sem gordura em ambas as churrasqueiras. Apesar de ter sido detectada a presença de B(a)P, B(a)A e criseno nas carnes assadas na churrasqueira portátil, a contaminação foi muito baixa, em concordância com os resultados de FRITZ (1973) e DOREMIRE et alii (1979). Estes autores mostraram que carnes sem gordura, assadas sobre carvão, contem níveis muito baixos de HPAs. MAGA (1986) também realizou experimentos assando carnes com diferentes teores de gordura e concluiu que quanto menos gordura, menor a contaminação.

É importante frisar que o processamento de carnes sobre grelha ("grill"), empregado por diferentes autores, corresponde à churrasqueira portátil utilizada na presente pesquisa, sendo a distância do fogo também em torno de 15 cm, conforme consta nos trabalhos de LIJINSKI & SHUBIK (1964), DOREMIRE et alii (1979) e TIEFENBACHER et alii (1982).

Não foram encontradas referências a pesquisas que tivessem utilizado churrasqueira semelhante à de alvenaria, e tampouco pesquisas realizadas com cortes de carne tipo "picanha", muito apreciada pelos brasileiros.

Tabela 17. Teores de HPAs ($\mu\text{g/kg}$) em churrasco de picanha sem gordura.

Amostra	B(a)P	B(a)A	Cris	B(b)F	B(k)F
Churrasqueira de alvenaria					
1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Churrasqueira portátil					
1	n.d	0,69	0,63	n.d.	n.d.
2	0,20	0,84	0,69	n.d.	n.d.
3	0,27	0,46	0,30	n.d.	n.d.

os valores são média de duas determinações

B(a)P = benzo(a)pireno; B(a)A = benzo(a)antraceno; cris = criseno; B(b)F e B(k)F = benzo(b)fluoranteno e benzo(k)fluoranteno.

n.d. não detectado (abaixo de $0,2 \mu\text{g/kg}$)

Os resultados encontrados para picanhas com gordura, assadas em ambas as churrasqueiras, encontram-se na Tabela 18.

Neste caso, ficam evidenciados dois fatores principais que influenciaram a formação dos HPAs:

- Presença da gordura: comparando-se os resultados obtidos com os dados da carne sem gordura, onde houve muito baixa contaminação, fica evidenciado o papel preponderante que a gordura tem na formação dos HPAs. LIJINSKI & SHUBIK (1964) e DOREMIRE et alii (1979) também relataram sobre a importância da gordura na contaminação das carnes assadas sobre carvão. De acordo com esses autores, a contaminação ocorre à medida que a gordura pinga sobre o fogo, pirolisa e retorna junto com a

Tabela 18. Teores de HPAS ($\mu\text{g/kg}$) em churrasco de picanha com gordura.

Amostra	B(a)P	B(a)A	CRIS	B(b)F	B(k)F
Churrasqueira de alvenaria					
1	n.d.	0,59	0,60	n.d.	n.d.
2	n.d.	0,62	0,53	n.d.	n.d.
3	0,24	1,35	1,17	n.d.	n.d.
4	0,89	1,75	0,75	0,43	0,44
5	1,06	2,20	1,95	0,64	0,77
6	1,15	1,80	1,81	0,78	0,81
Churrasqueira portátil					
1	3,11	3,40	3,79	3,30	3,17
2	3,56	3,08	2,65	1,87	1,82
3	3,98	3,56	3,35	2,29	2,23
4	5,66	4,88	5,77	3,65	3,62
5	9,75	10,17	11,29	5,74	5,44
6	16,41	14,11	14,86	10,08	11,44

os valores são média de duas determinações

B(a)P = benzo(a)pireno; B(a)A = benzo(a)antraceno; cris = criseno;

B(b)F e B(k)F = benzo(b)fluoranteno e benzo(k)fluoranteno.

n.d. não detectado (abaixo de $0,2 \mu\text{g/kg}$)

fumaça, carregando os HPAs que são então adsorvidos pela carne.

- b. Proximidade da fonte calórica: as picanhas assadas mais próximas da brasa apresentaram teores de HPAs até dez vezes superiores aos encontrados para as picanhas assadas na churrasqueira de alvenaria. Embora a maior distância tenha diminuído em muito a contaminação, não chegou a evitá-la completamente.

Para confirmar a participação da gordura na formação dos HPAs, delinear-se o experimento no qual a gordura retirada da carne foi colocada para queimar junto à brasa do carvão. Neste caso, observou-se contaminação da carne, embora esta não tivesse gordura (Tabela 19). Não existem dados comparativos na literatura.

Na Tabela 20 estão apresentados os níveis de B(a)P em picanhas sem gordura, assadas sobre madeira (eucalipto). Diferentemente dos resultados obtidos quando se utilizou carvão, nas carnes assadas sem gordura, sobre a brasa de madeira, a contaminação por HPAs foi evidente em ambas as churrasqueiras, confirmando a produção dos compostos carcinogênicos pela combustão da madeira.

Segundo LARSSON (1986) o carvão, sendo uma fonte calórica pré-pirolisada, produz somente pequenas quantidades de HPAs. FRITZ (1973) relatou que a contaminação produzida pela queima da madeira é influenciada pela combustão da fonte de calor propriamente dita e que a gordura, neste caso, parece não ter influência nos níveis de HPAs. MAGA (1986) concluiu, entretanto, que também neste caso a contaminação é tanto maior quanto maior for o teor de gordura.

MAGA (1986) constatou também que carnes magras assadas sobre carvão ficam praticamente isentas de contaminação. Sobre madeira macia, contudo, o teor de B(a)P chega a 26 µg/kg. No

Tabela 19. Teores de HPAs ($\mu\text{g/kg}$) em churrasco de picanha sem gordura, assada com gordura depositada sobre a brasa.

Amostra	B(a)P	B(a)A	CRIS	B(b)F	B(k)F
Churrasqueira de alvenaria					
1	0,23	0,62	0,74	n.d.	n.d.
2	0,78	1,21	1,08	0,52	0,39
3	1,27	1,66	1,73	0,98	0,87
4	1,78	2,14	2,11	1,46	1,40
5	1,81	2,01	2,22	1,18	1,05
Churrasqueira portátil					
1	1,02	1,17	1,28	0,49	0,52
2	1,43	1,26	1,17	0,56	0,35
3	3,69	5,17	6,42	3,46	2,76
4	5,04	5,85	6,45	4,29	3,67
5	8,32	7,20	8,21	4,96	4,36

os valores são média de duas determinações
 B(a)P = benzo(a)pireno; B(a)A = benzo(a)antraceno; cris = criseno;
 B(b)F e B(k)F = benzo(b)fluoranteno e benzo(k)fluoranteno
 n.d. não detectado

presente trabalho, o teor máximo de B(a)P encontrado foi de 10,68 µg/kg (Tabela 20). Isto se deve, provavelmente, ao fato de se ter usado eucalipto, uma madeira que, dependendo da variedade, pode ser desde moderadamente dura até dura (RIZINI, 1971).

Tabela 20. Teores de HPAs (µg/kg) em churrasco de picanha sem gordura, assada sobre madeira.

Amostra	B(a)P	B(a)A	CRIS	B(b)F	B(k)F
Churrasqueira de alvenaria					
1	1,26	2,06	1,99	0,97	0,70
2	1,60	2,87	2,95	1,72	1,25
3	1,81	3,37	3,29	1,90	1,52
Churrasqueira portátil					
1	3,09	5,21	5,15	2,70	2,33
2	6,69	13,89	9,48	5,78	4,29
3	10,50	11,92	6,26	9,48	8,79
4	10,68	15,88	9,81	6,74	4,75

os valores são média de duas determinações

B(a)P = benzo(a)pireno; B(a)A = benzo(a)antraceno; cris = criseno; B(b)F e B(k)F = benzo(b)fluoranteno e benzo(k)fluoranteno.

Através da Tabela 4, observa-se que os níveis de B(a)P encontrados por alguns autores são similares aos obtidos nesta pesquisa.

Alguns valores, entretanto, ultrapassam em muito a faixa de concentração encontrada (n.d. - 16,41 µg/kg), o que pode ser atribuído à maneira de assar as carnes, se inteira ou moída,

e ao tipo de amostragem após o processamento. LIJINSKI & SHUBIK (1964), p.ex., assaram as carnes inteiras, mas retiraram apenas as camadas externas de 1 cm para a análise e DOREMIRE et alii (1979) analisaram amostras de carne moída, adicionadas da gordura previamente retirada.

IV.4. Considerações Finais

De acordo com os resultados obtidos no presente estudo, as carnes defumadas de origem industrial encontram-se pouco contaminadas com benzo(a)pireno, enquanto que aquelas defumadas artesanalmente apresentam uma contaminação elevada, ultrapassando em muito o limite referencial de 1 µg/kg. Também as carnes assadas em churrasqueira portátil, principalmente aquelas com maior teor de gordura separável, podem apresentar níveis elevados de HPAs.

Embora não seja hábito do brasileiro consumir carnes defumadas ou churrascos diariamente, é importante que se faça uma estimativa da contribuição destes alimentos como fonte de HPAs na dieta.

Tomando-se como exemplo um churrasco de fim de semana (uso de churrasqueira portátil), quando em geral se assam linguças, asas de frango e picanhas e, considerando-se que um adulto consome em média 3 asinhas (85 g de carne), picanha (200 g) e linguça (100 g), esta refeição corresponderia a uma ingestão média de benzo(a)pireno de 1,35 µg/kg. Considerando-se ainda a soma dos cinco HPAs carcinogênicos analisados, esta ingestão se elevaria para 5,40 µg.

Comparando-se este valor com dados da literatura, observa-se que para brasileiros, a ingestão de HPAs através de uma única refeição tipo "churrasco" corresponde a 2 vezes a

ingestão total diária de 2,7 µg, estimada para a dieta sueca (LARSSON, 1986) e 1,5 vezes o valor de 3,7 µg, estimada para ingleses (DENNIS, 1983).

Convém ressaltar que na estimativa feita para brasileiros, considerou-se apenas uma refeição e somente a carne como fonte de HPAs, enquanto que nos outros países os dados se referem a uma dieta diária total, incluindo a contribuição de outros alimentos como fonte de HPAs.

Assim, fica comprovada a importância do churrasco como fonte de HPAs na dieta do brasileiro, cujo hábito alimentar, bastante característico, envolve quase que semanalmente um churrasco informal, feito em churrasqueiras improvisadas, utilizando-se muitas vezes madeira como fonte de calor.

Quanto à defumação caseira, faz-se necessário um programa de orientação para os fornecedores, no sentido de alertar sobre a importância do controle do processamento para obtenção de produtos com menor teor de HPAs.

Apesar de não haver evidências epidemiológicas conclusivas associando a ingestão de HPAs ao desenvolvimento de câncer em humanos, recomenda-se que se evite a exposição a estes compostos, e que todo conhecimento tecnológico seja empregado no sentido de minimizar a contaminação de alimentos por HPAs.

V. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos no presente estudo, pode-se concluir que:

1. A adaptação de metodologias existentes para a análise de HPAs em produtos cárneos resultou em um método de quantificação que permite a determinação destes compostos em níveis superiores a 0,2 µg/kg, utilizando-se cromatografia gasosa com coluna capilar e detector de ionização de chama.
2. Na maioria dos produtos cárneos defumados pelo processo industrial, disponíveis no comércio local, o teor de B(a)P encontra-se abaixo do limite de tolerância referencial de 1 µg/kg.
3. A defumação caseira de carnes é comprovadamente um processo formador de hidrocarbonetos poliaromáticos, resultando em elevada contaminação. Em vista disto, recomenda-se um programa de orientação para os fornecedores destes produtos.
4. O teor de gordura separável da carne é um elemento determinante para a produção de HPAs em churrasco.
5. A contaminação por HPAs em carnes assadas como churrasco é tanto maior quanto menor for a sua distância do fogo.
6. O churrasco se constitui numa importante fonte de HPAs na dieta do consumidor brasileiro.
7. É necessária uma revisão da legislação vigente no país quanto à presença de benzo(a)pireno em aromas de fumaça e em alimentos.

8. Para se minimizar a formação de HPAs e a contaminação de carnes assadas como churrasco, recomenda-se o seguinte:
- a. evitar o uso de madeira no lugar de carvão;
 - b. utilizar carnes magras. Caso sejam assadas carnes gordas, evitar que a gordura pingue sobre o carvão;
 - c. evitar assar a carne muito próxima do fogo. A distância de 40 cm diminui a contaminação da carne.

VI. BIBLIOGRAFIA

- ABIA. (1989). Compêndio da Legislação de Alimentos. Vol. 1. Atos do Ministério da Saúde. Res. 20/72
- AFOLABI, O.A.; ADESULU, E.A.; OKE, O.L. Polynuclear aromatic hydrocarbons in some Nigerian preserved freshwater fish species. J. Agric. Food Chem., 31: 1083-1090, 1983.
- ANDELMAN, J.B.; SUESS, M.J. Polynuclear aromatic hydrocarbons in the water environment. Bull. Wld. Hlth. Org., 43: 479-508, 1970.
- AGARWAL, R.; MEDRANO, E.E.; KHAN, I.U. NORDLAND, J.J.; MUKHTAR, H. Metabolism of benzo(a)pyrene by human melanocytes in culture. Carcinogenesis, 12(10): 1963-1966, 1991).
- ALENCAR, N. Fabricação de linguiças e chouriços defumados. Balde Branco, 20(244): 16-20, 1985.
- ALONGE, D. Carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) determined in Nigerian Kundi. J. Food Sci., 43: 167-172, 1988.
- ARRENDALE, R.F.; CHORTYK, O.T. Construction and application of a cold on-column injection system for capillary gas chromatography. J.H.R.C. & C.C., 8(2): 62-68, 1985.
- AUER, W.; MALISSA, H.Jr. Determination of trace amounts of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. Anal. Chim. Acta, 237: 451-457, 1990.
- BADGER, G.M.; KIMBER, W.L.; SPOTSWOOD, T.M. Mode of formation of 3,4-benzopyrene in human environment. Nature, 187: 663-665, 1960.
- BAILEY, E.J.; DUNGAL, N. Polycyclic hydrocarbons in Icelandic smoked food. Brit. J. Cancer, 12: 348-350, 1958.
- BARTLE, K.D.; LEE, M.L.; WISE, S.A. Modern analytical methods for environmental polycyclic aromatic compounds. Chem. Soc. Rev., 10: 113-158, 1981.

- BARYLKO-PIKIELNA, N. Contribution of smoke compounds to sensory, bacteriostatic and antioxidative effects in smoked foods. Puree & Appl. Chem., 49: 1667-1671, 1977.
- BAYONA, J.M; APARICIO, X.; ALBAIGÉS, J. A comparison of vaporizing injectors for trace analysis in capillary gas chromatography. J.H.R.C. & C.C., 9(1): 59-60, 1986.
- BINEMANN, P.H. Benz(a)pyren in Fleischerzeugnissen. Z. Lebensm. Unters. Forschung., 16(6): 447-452, 1979.
- BLANCO, C.G.; BLANCO, J.; BERMEJO, J.; GULLÉN, M.D. Capillary gas chromatography of some polycyclic aromatic compounds on several stationary phases. J. Chromatog., 465(2): 378-385, 1989.
- BORIES, G.; TCHINBAKALA, A.; TCHIMBAKALA, E. Enquete sur la contamination des aliments par le 3,4-benzopyrene. I e II. Ann. Nutr. Alim., 32: 801-818, 1978.
- BORIES, G. Problèmes analytiques posés par la dosage des hydrocarbures aromatiques polycycliques dans les denrées alimentaires. Ann. Fals. Exp. Chim., 73(789): 477-486, 1980
- BORIES, G. Toxicité des hydrocarbures aromatiques polycycliques et des produits de pyrolyse. Toxicologie & Sécurité des Aliments-Tecmique et Documentation. R. Derache Coord., Lavoisier, 1989
- BORWITZKY, H.; SCHOMBURG, G. Separation and identification of polycyclic aromatic compounds in coal tar by using glass capillary chromatography including combined CG-MS. J. Chromatog., 170: 99-124, 1979.
- BRINDLE, J.D.; LI, X. Investigation into the factors affecting performance in the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons using capillary gas chromatography - mass spectrometry with splitless injection. J. Chromatog.
- CANTUTI, V.; CARTONI, G.P.; TORRI, A.G. J. Chromatog., 17: 60-65, 1965.
- CODE OF PRACTICE INTERNATIONAL ORGANIZATION OF THE FLAVOR INDUSTRIE. Edition, 1985. 1ST. Amendment, 1988.

- CONNEY, A.H. Induction of microsomal enzymes by foreign chemicals and carcinogenesis by polycyclic aromatic hydrocarbons: G.H.A. CLOWES memorial lecture. Cancer Research, 42: 4875-4917, 1982.
- COOK, J.; HEWETT, C.; HIEGER, I. Coal tar constituents and cancer. Nature, 17: 926, 1932.
- COOK, J.; HEWETT, C.L.; HIEGER, I. The isolation of a cancer producing hydrocarbon from coal tar. Parts I, II, III. J. Chem. Soc., 395-405, 1933.
- DAUN, H. Interaction of wood smoke components and foods. Food Technol., 5: 66-71, 1979.
- DENNIS, M.J.; MASSEY, R.C.; McWEENY, D.J.; KNOWLES, M.E.; WATSON, D. Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in UK total diets. Food Chem. Toxicol., 21(5): 569-574, 1983.
- DENNIS, M.J.; MASSEY, R.C.; McWEENY, D.J.; LARSSON, B.; ERIKSSON, A.; SAHLBERG, G. Comparison of a capillary gas chromatographic and a high-performance liquid chromatographic method of analysis for polycyclic aromatic hydrocarbons in food. J. Chromatog., 285: 127-133, 1984.
- DENNIS, M.J.; MASSEY, R.C.; CRIPPS, G.; VENN, I.; HOWARTH, N.; LEE, G. Factors affecting the polycyclic aromatic content of cereals, fats and other food products. Food Addit. and Contam., 8(4): 517-530, 1991.
- DIPPLE, A.; MOSCHEL, R.C.; BIGGER, C.A.H. Polynuclear Aromatic Carcinogens. In: Chemical Carcinogens. SEARLE, C.E. (Ed.). vol. 1, American Chemical Society, Washington, pp. 41-163, 1984.
- DOBES, M.; HOPP, K.; SULA, J. Examination of smoked food for the presence of benzo(a)pyrene. Chem. Abstr., 49: 4199i, 1955.
- DOREMIRE, M.; HARMON, G.E.; PRATT, D. 3,4-benzopyrene charcoal grilled meats. J. Food Sci., 44(2): 622-623, 1979.
- DRAUDET, H.N. The meat smoking process: a review. Food Technol., 17(12): 85-90, 1963.

- DUNGAL, N. The Special problem of stomach cancer in Iceland. J.A.M.A., 178(8): 789-798, 1961.
- DUNN, B.P.; ARMOUR, R.J. Sample extraction and purification for determination of polycyclic aromatic hydrocarbons by reversed-phase chromatography. Anal. Chem., 52: 2027-2031, 1980.
- EMEROLE, G.O. Carcinogenic polynuclear aromatic hydrocarbons in some nigerian foods. Bull. Environm. Contam. Toxicol., 24(5): 641-646, 1980.
- FILIPOVIC, J.; TOTH, D.J. Polycyclischen Kohlenwasserstoffe in geräucherten jugoslawischen Fleischwaren. Fleischwirtschaft, 51(9): 1323-1325, 1971.
- FRETHEIM, K. Carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in norwegian smoked meat sausages. J. Agric. Food Chem., 24(5): 976-979, 1976.
- FRETHEIM, K. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in grilled meat products - a review. Food Chem., 10: 129-139, 1983.
- FRITZ, W. Zur Bildung cancerogener Kohlenwasserstoffe bei der thermischen Behandlung von Lebensmitteln. Dtsch. Lebensm. Rdsch., 69: 119-122, 1973.
- FRITZ, W. Methodik zur Identifizierung und Bestimmung von polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffen in Lebensmittel, im Boden und Trinkwasser. Nahrung, 23(1): 63-81, 1979.
- FRYCKA, J. Evaluation of separation of phenantrene, anthracene and carbasole in pure tar products by gas-solid chromatography. J. Chromatog., 65: 341-344, 1972.
- GARCIA-ECHANIZ, A.B. Tecnologia des ahumado. Origen y composition del humo. Alimentaria, jun., 45-49, 1989.
- GENEST, C.; SMITH, D.M. A simple method for detection of Benzo(a)pyrene in smoked foods. J.A.O.A.C., 47(5): 894-897, 1964.

- GERTZ, C. Schnellmethode zur Isolierung und Bestimmung von 3,4-benzpyren in Lebensmitteln. Z. Lebensm. Unters. Forsch., 167(4): 233-237, 1978.
- GILBERT, J., KNOWLES, M.E. The chemistry of smoked foods: a review. J. Food Techn., 19(3): 245-261, 1975.
- GORBATOV, V.M.; KRYLOVA, N.N.; VOLOVINSKAYA, V.P.; LYASKOVSKAYA, Yu.N.; BAZAROVA, K.I.; KHLAMOVA, R.I.; YAKOVLEVA, G.Ya. Liquid smokes for use in cured meats. Food Technol., 25: 71-77, 1971.
- GORELOVA, N.D.; DIKUN, P.P. 3-4-benzopyrene in smoked sausage and bologna (fluorescent spectral analysis). Chem. Abstr., 53: 6468.
- GRIMMER, G.; HILDEBRANDT, A. Kohlenwasserstoffe in der Umgebung des Menschen. 1. Mitt. eine Methode simultanen Bestimmung von dreizehn polycyclischen Kohlenwasserstoffen. J. Chromatog., 20: 89-99, 1972.
- GRIMMER, G.; BOHNKE, H. Polycyclic Aromatic hydrocarbon profile of high-protein foods, oil and fats by gas chromatography. J.A.O.A.C., 58(4): 724-733, 1975.
- GRIMMER, G.; JACOB, J. (IUPAC) Recommended method for the gas chromatographic profile analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked food. Puree & Appl. Chem., 59(12): 1729-1734, 1987.
- GUNTER, F.A.; BUZZETTI, F.; WESTLAKE, W.E. Residue behavior of polynuclear hydrocarbons on and in oranges. Res. Rev., 17: 81-104, 1967.
- HAMM, R. Analyse von Räucherrauch und geräucherten Lebensmitteln. Fleischwirtschaft, 57(1): 92-99, 1977.
- HELLMANN, H. Vergleich von Gruppen- und Einzelbestimmung bei der Analyse von polycyclischen Aromaten durch Fluoreszenzdetektion. Fresenius Z. Anal. Chem., 314: 125-128, 1983.

- HERNDON, W.C. Model calculations for reativities of polycyclic aromatic hydrocarbons metabolites. Tetrahedron Leteers, 22: 983-986, 1981.
- HOLLENBECK, C.M. Novel concepts in technology and design of machinery for production and application of smoke in the food industry. Puree & Appl. Chem., 49: 1687-1702, 1977.
- HOPIA, A.; PYYSALO, H.; WICKSTRÖM, K. Margarines, butter and vegetable oils as sources of polycyclic aromatic hydrocarbons. J.A.O.C.S., 63(7): 889-893, 1986.
- HOWARD, J.W.; WHITE, R.H.; FRY, B.E.Jr.; TURICCHI, E.W. Extraction and estimation of polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked foods. II. Benzo(a)pyrene. J.A.O.A.C., 49(3): 612-617, 1966.
- HOWARD J.W.; FAZIO, T. A review of polycyclic aromatic hydrocarbons in food. J. Agric. Food Chem., 17(3): 527-531, 1969.
- IARC (1973). Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemical to Humans. Certain Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Heterocyclic Compounds. Lyon, France.
- IARC (1983). Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemical to Humans. Polynuclear Aromatic Compounds. Part 1, Chemical, Environmental and Experimental Data. Vol 32.
- IARC (1985). Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemical to Humans, Vol.35.
- JERINA, D.M.; THAKKER, D.R.; YAGI, H. Carcinogenicity of Benzo(a)pyrene derivatives: the bay region theory. Puree & Appl. Chem., 50: 1033-1044, 1978.
- JANINI, G.M.; JOHNSTON, K.; ZIELINSKI, W.L.Jr. Use of a nematic liquid crystal for gas-liquid chromatographic separation of polyaromatic hydrocarbons. Anal. Chem., 47(4): 670-674, 1975.

- JANINI, G.M.; MUSCHIK, G.M.; ZIELINSKI, W.L.Jr. N,N'- Bis[p-butoxybenzylidene]- , '-bi-p-toluidine: thermally stable liquid crystal for unique gas-liquid chromatography separations of polycyclic aromatic hydrocarbons. Anal. Chem., 48(6): 809-813, 1976a.
- JANINI, G.M.; MUSCHIK, G.M.; SCHROER, J.A.; ZIELINSKI, W.L.Jr. Gas-liquid chromatographic evaluation and gas chromatography/mass spectrometric application of new high-temperature liquid crystal stationary phases for polycyclic aromatic hydrocarbon separations. Anal. Chem., 48(13): 1879-1883, 1976b.
- JOE, F.L.; SALEME, J.Jr.; FAZIO, T. Liquid Chromatographic determination of trace residues of polynuclear aromatic hydrocarbons in smoked foods. J.A.O.A.C., 67(6): 1076-1082, 1984.
- KENNAWAY, E. The identification of carcinogenic compound in coal-tar. Brit. Med. J., 24: 749-752, 1955.
- KERSKEN, H. Räuchern heute. Fleischwirtschaft, 54(11): 1721-1726, 1974.
- KONG, R.C.; LEE, M.L.; TOMINAGA, Y.; PRATAP, R.; IWAQ, M.; CASTLE, R.N. Mesogenic polysiloxane stationary phase for high resolution gas chromatography of isomeric polycyclic aromatic compounds. Anal. Chem., 54: 1802-1806, 1982.
- KUSHWAHA, S.C; CLARKSON, S.G.; MEHKERI, K.A. Polycyclic aromatic hydrocarbons in barbecue briquets. J. Food Safety, 7: 177-201, 1985.
- LANE, D.A.; MOE, H.K.; KATZ, M. Analysis of polycyclic aromatic, some heterocyclics and aliphatics with a single gas chromatograph column. Anal. Chem., 45(9): 1776-1778, 1973.
- LARSSON, B.K. Polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked fish. Z. Lebens Unters. Forsch., 174: 101-107, 1982.
- LARSSON, B.K.; SAHLBERG, G.P.; ERIKSSON, A.T.; BUSK, L.A. Polycyclic aromatic hydrocarbons in grilled food. J. Agric. Food Chem., 31: 867-873, 1983.

- LARSSON, B. Polycyclic aromatic hydrocarbons in swedish food aspects on analysis, occurrence and intake. Doctoral thesis. Swedish University of Agricultural Science, Uppsala, 1986.
- LARSSON, B.K.; ERIKSSON, A.T.; CERVENKA. Polycyclic aromatic hydrocarbons in crude and deodorised vegetable oils. J. Amer. Oil. Chem Soc. 64(3): 365-370, 1987.
- LAWRENCE, J.F.; WEBER, D.F. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in canadian ssamples of processed vegetable and dairy products by liquid chromatography with fluorescence detection. J. Agric. Food Chem., 32: 794-797, 1984.
- LEE, M.L.; WRIGHT, B.W. Capillary column gas chromatography of polycyclic aromatic compounds - a review. J. Chromatog. Sci., 18: 345-358, 1980.
- LEE, H-B.; SWAZIOLA, R.; CHAN, A.S.Y. Solvent effects on response factor for polycyclic aromatic hydrocarbon determined by C.G.C. using splitless injection. J.A.O.A.C., 70(5): 929-930, 1987.
- LEBO, J.A.; ZAJICEK, L.; SCHWARTZ, T.R.; SMITH, L.M.; BEASLEY, M.P. Determination of monocyclic and polycyclic aromatic hydrocarbons in fish tissue. J.A.O.A.C., 74(3): 538-544, 1991.
- LIJINSKI, W.; SHUBIK, P. Benzo(a)pyrene and other polynuclear hydrocarbons in charcoal-broiled meat. Science, 145: 53-55, 1964.
- LINTAS, C.; MATTTAEIS, M.C. de.; MERLI, F. Determination of benzo(a)pyrene smoked, cooked and toasted food products. Food Cosmetol. Toxicol., 17: 325-328, 1979.
- LO, M.; SANDI, E. Polycyclic aromatic hydrocarbons (polynuclears) in foods. Res. Rev., 69: 35-86, 1978.
- MAGA, J.A. Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) composition of mesquite (Prosopia fuliflora) smoke and grlled beef. J. Agric. Food Chem., 34: 249-251, 1986.

- MALANOWSKI, A.J.; GREENFIELD, E.L.; BARNES, C.J.; WORTHINGTON, J.M. Survey of polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked foods. J.A.O.A.C., 51(1): 114-121, 1968.
- MARKIDES, K.E.; CHANG, C.M.; SCHREGENBERGER, C.M.; TARBET, B.J.; BRADSHAW, J.S.; LEE, M.L. Evaluation of smectic biphenylcarboxylate ester liquid-crystalline polysiloxane stationary phases for capillary column gas chromatography. J.H.R.C. & C.C., 8(9): 516-520, 1985.
- MOHLER, K. El ahumado. Ed. Acribia, Zaragoza, 1978.
- MOROZZI, G.; GAMBELUNGHE, C.; MANENTI, R. Metodica analitica per la determinazione de B(a)P e di altri idrocarburi aromatici policiclici in alimenti affumicati o cotti. La Riv. Società. Ital. Sci. dell Alim., 14(5): 351-356, 1985.
- MULLER, W.D. Curado Y ahumado. Fleischwirtschaft, 1: 3-10, 1992.
- NOVOTNY, M.; LEE, M.L.; BARTLE, K.D. The methods for fractionation, analytical separation and identification of polycyclic aromatic hydrocarbons in complex mixtures. J. Chromatog. Sci., 12:606-612, 1974.
- OELERT, H.H. Atypische gel-chromatographie in system Sephadex-Isopropano. Z. Anal. Chem., 244: 91-101, 1969.
- OFFICIAL JOURNAL OF THE EUROPEAN COMMUNITIES. N^o I.184/65, 184/66, 184/67, Luxemburgo, 1988.
- PELKONEN, O.; NEBERT, D. PELKONEN, O.; NEBERT, D.W. Metabol. hydrocarbons: etiologic role in carcinogenesis. Pharmacol. Rev., 34(2): 189-222, 1982.
- PERFETTI, G.A.; NYMAN, P.J.; FISHER, S.; JOE, F.L.; DIACHENKO, G.W. Determination of polynuclear aromatic hydrocarbons in seafood by liquid chromatography with fluorescence detection. J.A.O.A.C. International, 75(5): 872-877, 1992.
- PHILLIPS, D.H. Fifty years of benzo(a)pyrene. Nature, 303(9): 468-472, 1983.

- POTTHAST, K. Verfahren de Räucherns und ihr Einfluss auf Gehalt an 3,4-Benzpyren und anderen Inhaltsstoffen des Räucherrrauches in geräucherten Fleischerzeugnissen. Fleischwirtschaft, 58(3): 340-348, 1978.
- POTTHAST, K. Einfluss der Räuchertechnologie auf die vollständige Zusammensetzung der polycyclischen Kohlenwasserstoffe in geräucherten Fleischwaren, in Rauchkondensaten und in den Abgasen von Räucher-anlagen. Fleischwirtschaft, 59(10): 1515-1523, 1979.
- POTTHAST, K. Neuere Ergebnisse über den Benzo-a-pyrengehalt von Fleischerzeugnissen. Fleischwirtschaft, 60(11): 1941-1949, 1980.
- POTTHAST, K. Dark smoking at a high smokehouse temperature. Fleischwirtschaft, 62(12): 1578-1582, 1982.
- POTTHAST, K.; EIGNER, G. Neuere Ergebnisse über die Zusammensetzung von Räucherrrauch. 1. Fleischwirtschaft, 68(5): 651-655, 1988.
- RHEE, K.S.; BRATZLER, L.T. Benzo(a)pyrene in smoked meat products. J. Food Sci., 35: 146-149, 1970.
- RIZINI, C.T. Árvores e madeiras úteis do Brasil. Manual de Dendrologia Brasileira. EDUSP, São Paulo, pp. 294, 1971.
- RUITER, A. Collor of smoked foods. Food Technol., 54-63, 1979.
- RUSZ, J.; MILER, K.B.M. Physical and chemical process involved in the production and aplication of smoke. Puree and Appl. Chem., 49: 1631-1654, 1977.
- SAGREDOS, A.N.; SINHA-ROY, D.; von JAN, E. A contribution to the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked fodstuffs via caffeine complexes. Deutsche Lebensm. Rundschau, 77(1): 33-36, 1981.
- SAITO, Y.; SEKITA, H.; TAKEDA, M.; UCHIYAMA, M. Determination of benzo(a)pyrene in foods. J.A.O.A.C., 61(1): 129-135, 1978.

- SCHMID, E.R. Chromatography and mass spectrometry - an overview. Chromatographya, 30(9/10): 573-576, 1990.
- SEIFERT, B. Stability of benzo(a)pyrene on sulica gel plates for high-performance thin layer chromatography. J. Chromatog., 131: 417-421, 1977.
- SEPPILLI, A; SFORZOLINI, G.S. Sulla presenza di hidrocarburi policiclici cancerogeni nelle carni cotte alla graticola. 1963.
- SIMKO, P. Changes of benzo(a)pyrene contents in smoked fish during storage. Food Chem., 40: 293-300, 1991.
- SIMKO, P.; GOMBITA, M.; KAROVICOVA, J. Determination and occurrence of benzo(a)pyrene in smoked meat products. Die Nahrung, 35: 103-104, 1991.
- SIMKO, P.; KNEZO, J. Influence of cooking on benzo(a)pyrene content in frankfurters. Nahrung, 36(2): 208-209, 1992.
- SIMON, S.; RYPINSKI, A.A.; TAUBER, F.W.; PENCYLA, R.M.; WESTERBERG, D.O. Effect of cellulose casing on absorption of polycyclic hydrocarbons in wood smoke absorbents. J. Agric. Food. Chem., 17(5): 1128-1134, 1969.
- SPEER, K.; STEEG, E.; HORSTMANN, P.; KUHN, Th. MONTAG, A. Determination and distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in native vegetable oils, smoked fish products, mussels and oysters, and bream from the river Elbe. J.H.R.C. & C.C., 13(2): 104-111, 1990.
- STEINIG, J. 3,4-Benzpyren-Gehalte in geräucherten Fischen in Abhängigkeit von der Räucherthermethode. Z. Lebensm. Unters. Forsch., 162(3): 235-242, 1976.
- STEINIG, J.; MEYER, V. 3,4-benzpyren in geräucherten. Fischen. Lebensm. Wissensch. und Technol., 9(4): 215-217, 1976.
- STIJVE, T. & HISCHENHUBER, C. Simplified determination of benzo(a)pyrene and other polycyclic aromatic hydrocarbons in various food material by HPLC and TLC. Dtsch. Lebensm. Rdsch., 83(9): 276-282, 1987.

- STOYKE, M.; MULLER, L. Screening test zur Analytik von Benzo(a)pyrene in thierischen. Fetten. Fresenius J. Anal. Chem., 339(5): 312, 1991.
- TAKATSUKI, K.; SUZUKI, S.; SATO, N.; USHISZAWA, I. Liquid chromatographic determination for PAH in fish and shellfish. J.A.O.A.C., 68(5): 945-949, 1985.
- TANAKA, L.; SAITO, M. High performance liquid chromatographic separation and synchronous fluorimetric determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. Analyst, 113: 509-510, 1988.
- TIEFENBACHER, K.; PFANNHAUSER, W.; WOIDICH, H. Investigation on contamination of food by polycyclic aromatic hydrocarbon in: Recent development in food analysis. Proceedings of the First European Conference on Food Chemistry (Euro Food Chem. I), Feb. 1982.
- THORNSTEINSSON, T. Polycyclic hydrocarbons in commercially and home-smoked food in Iceland. Cancer, 25(2): 455-457, 1969.
- TILGNER, D.J. Herstellung und Anwendung des Räucherrauches. Fleischwirtschaft, 38(11): 751-757, 1958.
- TILGNER, D.J. Aus natürlichen Rauch gewonnene Räucher kondensate. Fleischwirtschaft, 46(5): 501-503, 1966.
- TILGNER, D.J. The phenomena of quality in the smoke curing process. Puree & Appl. Chem., 49: 1629-1638, 1977.
- TOTH, L.; BLAAS, W. Einfluss der Räuchertechnologie auf den Gehalt von geräucherten Fleischwaren an cancerogenen Kohlenwasserstoffen. I. Fleischwirtschaft, 52(9): 1121-1124, 1972.
- TOTH, L.; BLAAS, W. Einfluss der Räuchertechnologie auf den Gehalt von geräucherten Fleischwaren an cancerogenen Kohlenwasserstoffen. II. Fleischwirtschaft, 53(11): 1419-1422, 1972.

- TOTH, L. Einfluss der Räuchertechnologie auf die Phenole des Rauches. Fleischwirtschaft, 60(8): 1472-1477, 1980.
- TOTH, L. Einfluss der rauchertechnologie auf Rauchbestandteile in Fleischerzeugnissen. Fleischwirtschaft, 62(2), 1982.
- UNITED NATIONS ENVIRONMENT PROGRAMME (UNEP). Benzo(a)pyrene. Moscow, 1983. IZMEROV, N.F. (Ed.). CENTRE OF INTERNATIONAL PROJECTS, GKNT.
- UTHE, J.F.; MUSIAL, J. Intercomparative study on the determination of polynuclear aromatic hydrocarbons in marine shellfish tissue. J.A.O.A.C., 71(2): 363-368, 1987.
- VAESEN, H.A.M.G.; SCHULLER, P.L.; JEKEL, A.A. WILBERS. Polycyclic aromatic hydrocarbons in selected foods: Analysis and occurrence. Toxicological and Environmental Chemistry, 7: 297-324, 1984.
- VASSILAROS, D.L.; STOKER, P.W.; BOOTH, G.M.; LEE, M.L. Capillary gas chromatographic determination of polycyclic aromatic compounds in vertebrate fish tissue. Anal. Chem., 54(1): 106-112, 1982.
- de VOS, R.H.; van DOKKUM, W.; SCHOUTEN, A.; de JONG-BERKHOUT, P. Polycyclic aromatic hydrocarbons in dutch total diet samples. Food Chem. Toxic., 28(4): 263-268, 1990.
- VREULS, J.J.; de JONG, G.J.; Th. BRINKMAN, U.A. On-line coupling of liquid chromatography, capillary gas chromatography and mass spectrometry for the determination and identification of polycyclic aromatic hydrocarbons in vegetable oils. Chromatographia, 31(3/4): 113-118, 1991.
- WALKER, E.A. Some facts and legislation concerning polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked foods. Puree & Appl. Chem., 49: 1673-1686, 1977.
- WALL, K.L.; GAO, W.; KOPPELE, J.M.; KWEI, G.Y.; KAUFFMAN, F.C.; THURMAN, G. The liver plays a central role in the mechanism of chemical carcinogenesis due to polycyclic aromatic hydrocarbons. Carcinogenesis, 12(5): 783-786, 1991.

- WEINACKER, K.; BITTNER, S. Procesos de ahumado y coccion. Alimentos, 3(15): 39-46, 1990.
- WIGAND, W.; JAHR, D. Benz(a)pyren-gehalt geräucherter Fleisch-
erzeugnisse. Fleischwirtschaft, 65(8): 908-915, 1985.
- WILK, M.; ROCHLITZ, J.; BENDE, H. Säulenchromatographie von
polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffen an lipophilen
Sephadex LH-20. J. Chromatog., 24: 414-416, 1966.
- WOIDICH, H.; PFANNHAUSER, W.; BLAICHER, G.; TIEFENBACHER, K. Zur
dünnschicht-chromatographischen Trennung und in-situ Auswer-
tung polycyclischer aromatischer Kohlenweasserstoffe.
Chromatographia, 10(3): 140-146, 1977.
- YABIKU, H.Y.; MARTINS, H.S.; TAKAHASHI, M.Y. Determinação de
compostos aromáticos polinucleares em aromas naturais de
fumaça e produtos alimentícios defumados. Anais do XIII
Congresso da S.B.C.T.A., 13-26 de Junho de 1992. pg 313.