

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

AVALIAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO DE ÓLEOS VEGETAIS

E AZEITES POR BENZO(A)PIRENO

Parceiro
Este exemplar corresponde a redação final da Tese defendida por
Antonio Marcos Pupin e aprovada pela Comissão julgadora em
17.03.94.

Antonio Marcos Pupin

M. Cecilia de T. Toledo

Orientadora: Prof. Dra. Maria Cecilia Figueiredo Toledo

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos, da
Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de
Mestre em Ciência de Alimentos.

Campinas, Março de 1994

BANCA EXAMINADORA

m. Maria de F. Toledo

Prof. Dra. Maria Cecília Figueiredo Toledo
(orientadora)

Lireny Aparecida Guaraldo Gonçalves

Prof. Dra. Lireny Aparecida Guaraldo Gonçalves
(membro)

Heloisa M. Cecchi

Prof. Dra. Heloisa M. Cecchi
(membro)

Suplente

Prof. Dr. Walter Esteves
(membro)

Campinas, 17 de março de 1994

AGRADECIMENTOS

A Profa. Dra. Maria Cecília Figueiredo Toledo, meu agradecimento especial pela orientação, apoio e amizade durante o transcorrer do trabalho.

Aos membros da banca examinadora, pelas sugestões apresentadas à redação final da tese.

Aos amigos do laboratório de Toxicologia pela amizade e apoio recebido durante o trabalho, em especial à Isa Beatriz Noll.

Ao Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas da Unicamp, pelas facilidades apresentadas na execução da parte prática.

A Vera Lúcia Amaro Oliveira, pelo auxílio no preparo e limpeza dos materiais.

A FAPESP pela concessão de auxílio à pesquisa possibilitando a execução deste projeto.

A Cleuza pelo auxílio nas correções das referências bibliográficas.

A Faculdade de Engenharia de Alimentos da Unicamp pela boa acolhida e facilidades oferecidas.

Aos meus familiares pelo apoio e incentivo.

A todas as pessoas que de alguma forma possibilitaram a conclusão deste trabalho.

ÍNDICE GERAL

Índice de figuras	iv
Índice de tabelas	vii
Resumo	ix
Summary	xi
1. Introdução	1
2. Revisão bibliográfica	3
2.1. Histórico	3
2.2. Estrutura e propriedades físico-químicas dos HPAs ...	4
2.3. Formação de HPAs	6
2.4. Toxicidade dos HPAs	7
2.4.1. Absorção, distribuição e excreção	8
2.4.2. Biotransformação	8
2.5. Fontes de contaminação de óleos vegetais por HPAs ..	10
2.6. Ocorrência de HPAs em alimentos	13
2.6.1. Alimentos em geral	13
2.6.2. HPAs em dietas totais	17
2.6.3. Presença de HPAs em óleos vegetais	21
2.7. Influência do processamento na contaminação de óleos por HPAs	25
2.8. Métodos de análise de HPAs	27

2.8.1. Limpeza das amostras	31
2.8.2. Detecção de HPAs	31
2.8.3. Confirmação da identidade de HPAs	33
2.9. Legislação	34
2.10. Avaliação toxicológica	35
3. Material e métodos	36
3.1. Amostras	36
3.2. Equipamentos	36
3.3. Material de consumo	37
3.4. Vidraria	38
3.5. Curva de calibração	38
3.6. Avaliação da metodologia e controle de qualidade ...	38
3.7. Sensibilidade e repetibilidade analítica	38
3.8. Recuperação	39
3.9. Metodologia	38
3.9.1. Extração	39
3.9.1.1. Óleos vegetais	39
3.9.1.2. Hexana	40
3.9.1.3. Grãos de soja e milho	40
3.10. Limpeza em coluna de sílica gel	40
3.10.1. Desativação da sílica gel	40
3.10.2. Preparação da coluna de sílica gel e limpeza	40
3.11. Determinação cromatográfica	41
3.12. Custos dos reagentes por análise	44

4. Resultados e Discussão	45
4.1. Avaliação do "branco"	45
4.2. Método de quantificação	45
4.3. Limpeza das amostras	45
4.4. Avaliação da metodologia e controle de qualidade analítica	47
4.5. Sensibilidade do método	49
4.6. Repetibilidade da metodologia	49
4.7. Alterações nas condições da análise cromatográfica .	50
4.8. Confirmação da Identidade do B(a)P	50
4.9. Benzo(a)pireno em óleos vegetais	52
4.10. Benzo(a)pireno em azeites	58
4.11. Fontes de contaminação por HPAs	62
4.12. Estimativa de ingestão de benzo(a)pireno através de óleos vegetais	73
4.13. Considerações finais	77
5. Conclusões	79
6. Referências bibliográficas	80

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismo de formação do benzo(a)pireno (BADGER et alii, 1958)	7
Figura 2. Metabolismo do B(a)P para óxidos de arenos, dihidrodíóis e diastereoisômeros 7,8-diol-9,10-epóxidos B(a)P. P450= citocromo P450; EH= epóxido hidrolase (COONEY, 1982)	11
Figura 3. Estrutura da "bay-region" de díóis epóxidos para vários HPAs (COONEY, 1982)	12
Figura 4. Fluxograma de extração de HPAs para óleos vegetais (SPEER et alii, 1990)	42
Figura 5. Fluxograma de limpeza da amostra de óleo vegetal (SPEER et alii, 1990)	43
Figura 6. Cromatograma por CLAE com detector de fluorescência (a) "branco" e (b) padrão de B(a)P Coluna ODS, 25cm x 4,6mm d.i., fase móvel acetonitrila:H ₂ O (8:2), vazão 0,7 mL/min.	46
Figura 7. Curva de calibração do B(a)P, utilizando CLAE com detector de fluorescência	46
Figura 8. (a) Cromatograma por CLAE do padrão de B(a)P a 295 nm; (b) varredura do espectro do padrão de B(a)P entre 200 e 400 nm, no início, meio e fim do pico; (c) cromatograma de CLAE do pico de B(a)P a 295 nm em amostra de óleo de milho, (d) varredura do espectro do pico do B(a)P entre 200 e 400 nm em amostra de óleo de milho	51

Figura 9. Cromatogramas por CLAE com detector de fluorescência de azeites de oliva de diversas origens: (a) argentino; (b) misto; (c) europeu embalado na origem; (d) europeu embalado no Brasil. Coluna ODS, 25cm x 4,6mm d.i., fase móvel acetonitrila:H ₂ O (8:2), vazão 0,7 mL/min.	61
Figura 10. Faixa de concentração de B(a)P em azeites de oliva de diversas procedências	65
Figura 11. Faixa de concentração de B(a)P em óleos e azeites comerciais	66
Figura 12. Cromatogramas por CLAE com detector de fluorescência de amostras de grãos de milho e soja: 1. grão de milho (a) antes da secagem; (b) após a secagem. 2. (a) antes da secagem; (b) grãos de soja após a secagem. Coluna ODS, 25cm x 4,6mm d.i., fase móvel acetonitrila:H ₂ O (8:2), vazão 0,7 mL/min.	68
Figura 13. Cromatogramas por CLAE com detector de fluorescência de amostras de óleo de milho e soja: (a) óleo de milho bruto; (b) óleo de milho desodorizado; (c) óleo de soja bruto; (d) óleo de soja desodorizado. Coluna ODS, 25cm x 4,6mm d.i., fase móvel acetonitrila:H ₂ O (8:2), vazão 0,7 mL/min.	72

Figura 14. Cromatograma por CLAE com detector de fluorescência de hexana: (a) "nova"; (b) "reprocessada". Coluna ODS, 25cm x 4,6mm d.i., fase móvel acetonitrila:H₂O (8:2), vazão 0,7 mL/min. 75

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1.	Comprimento de onda de excitação e emissão para vários HPAs utilizados em detector de fluorescência de CLAE com fase móvel acetonitrila : H ₂ O (PERFETTI et alii, 1992)	5
Tabela 2.	Teores de HPAs em solventes utilizados na extração de óleos vegetais (LO & SANDI, 1978)	14
Tabela 3.	Teor de B(a)P em alimentos	18
Tabela 4.	Dados de ingestão diária de B(a)P através de dietas	20
Tabela 5.	Teor de benzo(a)pireno (µg/Kg) em vários tipos de óleo	26
Tabela 6.	Valores de fortificação e recuperação de B(a)P em óleo de milho	47
Tabela 7.	Resultados de recuperação de B(a)P conduzidos com amostras de diferentes óleos	48
Tabela 8.	Reprodutibilidade da determinação de benzo(a)pireno em óleo de milho	49
Tabela 9.	Teores de benzo(a)pireno (µg/Kg) em óleos de milho comerciais	52
Tabela 10.	Teores de benzo(a)pireno (µg/Kg) em óleos de soja refinados	53
Tabela 11.	Teores de benzo(a)pireno (µg/Kg) em vários tipos de óleos refinados.....	54

Tabela 12. Teores de benzo(a)pireno ($\mu\text{g/Kg}$) em óleo de soja usados	57
Tabela 13. Teores de benzo(a)pireno ($\mu\text{g/Kg}$) em azeite de oliva	59
Tabela 14. Teores de benzo(a)pireno ($\mu\text{g/Kg}$) em azeites de oliva de diversas origens	63
Tabela 15. Teores de benzo(a)pireno ($\mu\text{g/Kg}$) em vários tipos de óleo	64
Tabela 16. Teores de benzo(a)pireno em diversas etapas de refinação do óleo de milho	69
Tabela 17. Teores de benzo(a)pireno ($\mu\text{g/Kg}$) em óleo de soja em diferentes etapas do processo de refino	69
Tabela 18. Teores de benzo(a)pireno ($\mu\text{g/Kg}$) em hexana "nova" e "reprocessada"	75
Tabela 19. Quantidade e custos dos reagentes utilizados para análise de 10 amostras	78

RESUMO

Amostras de óleos comerciais de alho, arroz, canola, girassol, milho, palma (azeite de dendê) e soja e de azeites de oliva foram analisadas quanto ao teor de benzo(a)pireno (B(a)P). Foram também avaliadas possíveis fontes de contaminação de óleos de milho e soja, incluindo a secagem do grão, diferentes etapas do processo de refino e o solvente de extração.

A metodologia analítica envolveu extração líquido-líquido, limpeza em coluna de sílica gel e determinação por cromatografia líquida de alta eficiência. O limite de detecção do B(a)P foi de 0,5 µg/Kg e sua recuperação média, 97,2%.

Os teores médios de B(a)P encontrados em óleos de arroz, girassol, milho, palma, soja e em azeite de oliva foram respectivamente: 1,8 ; 0,2 ; 10,8 ; 2,1; 2,2 e 10,9 µg/Kg. Nos óleos de alho e canola não foi detectada a presença de B(a)P.

As amostras de azeites de oliva apresentaram níveis variados de contaminação. Os menores níveis de B(a)P (n.d. a 1,2 µg/Kg) foram determinados em azeites de oliva importados da Europa. Azeites importados da Europa, porém embalados no Brasil, e azeites de oliva mistos com óleos de soja e milho mostraram teores relativamente maiores de B(a)P, variando entre n.d. a 9,7 e 2,2 a 9,2 µg/Kg, respectivamente. Azeites de oliva provenientes da Argentina apresentaram os maiores níveis de contaminação, com até 164,4 µg/Kg de B(a)P.

Não foi detectada a presença de B(a)P em grãos de milho e de soja antes e após o processo de secagem. A hexana, solvente de extração do óleo, mostrou-se contaminada com níveis médios de B(a)P de 4,1 µg/Kg, sugerindo sua participação na contaminação de óleos.

A partir dos níveis de B(a)P encontrados nos óleos analisados e com base em dados de consumo destes produtos pela população, estimou-se que os óleos de soja e de milho contribuem com 0,09 e 0,4 µg de B(a)P na dieta total diária do consumidor brasileiro, respectivamente.

SUMMARY

Samples of vegetable oils on the Brazilian market including canola, corn, soybean, sunflower, rice, palm, garlic and olive oils were analysed for benzo(a)pyrene (B(a)P). Possible sources of contamination of soybean and corn oils, such as the grain drying, different steps of the refining process and the extraction solvent were also evaluated.

The analytical method involved liquid-liquid extraction, clean-up on silica gel column and determination by high performance liquid chromatography with fluorescence detector. The limit of detection was 0.5 µg/Kg, and the mean recovery was 92,7%.

The mean level of B(a)P in rice, sunflower, soybean, corn, palm and olive oils were: 1.8 ; 0.2 ; 2.1 ; 10.8 ; 2.2 and 10.9 µg/Kg, respectively. No B(a)P was detected in garlic and rapeseed oils.

Samples of olive oils showed variable levels of contamination. The lowest B(a)P levels (n.d. to 1.2 µg/Kg) were determined in olive oil imported from Europe. European olive oils packed in Brazil and olive oils blended with soybean and corn oils showed relatively higher levels of B(a)P, in the range of n.d. to 9.7 and 2.2 to 9.2 µg/Kg, respectively. Olive oils imported from Argentina showed the highest levels of contamination, up to 164.4 µg/Kg.

No B(a)P was found in soybean and corn grains either before or after the drying process. Hexan, the oil extraction solvent, showed a mean level of 4.1 µg/Kg B(a)P, suggesting its participation in the oil contamination.

Based on the average consumption of vegetable oils in Brazil and on their content of B(a)P, individual daily intakes of 0.09 and 0.4 μg B(a)P through the consumption of soybean and corn oils were estimated, respectively.

1- INTRODUÇÃO

Os hidrocarbonetos poliaromáticos (HPAs) são um grupo de compostos que têm sido objeto de muito interesse, já que alguns deles apresentam propriedades tóxicas comprovadas, como o benzo(a)pireno (B(a)P), reconhecidamente carcinogênico. Esses compostos são considerados contaminantes altamente estáveis, presentes em diferentes alimentos como carnes processadas, vegetais, cereais, óleos, gorduras, bebidas e água.

Os HPAs se originam principalmente da queima de compostos orgânicos como o petróleo e derivados, madeira e hulha, e apresentam na sua estrutura dois ou mais anéis de benzeno conjugados. Aqueles que tem estrutura molecular com quatro a seis anéis são considerados, na maior parte, carcinogênicos.

Desde o início do século dezoito têm sido observado efeitos tóxicos relacionados à presença de HPAs em fuligem, óleos minerais, parafina e alcatrão da hulha. No entanto, somente no início deste século, é que se correlacionou a presença destes HPAs e o aparecimento de certos tipos de câncer, tendo sido isolados e identificados alguns hidrocarbonetos, como por exemplo o B(a)P.

Devido ao potencial carcinogênico dos HPAs, a presença desses compostos em alimentos consumidos pelo homem tem recebido considerável atenção por parte de pesquisadores em vários países, estimulando pesquisas direcionadas a sua determinação nos mais diversos gêneros alimentícios. Entre os hidrocarbonetos estudados, destaca-se o benzo(a)pireno, que tem sido considerado por alguns países como indicador da contaminação de alimentos por HPAs.

Dos alimentos que compõem uma dieta básica para o homem, os óleos vegetais têm sido considerados a segunda fonte em importância para a ingestão de HPAs. Nestes produtos os HPAs podem

se originar da contaminação de plantas pelo ar e solo, do solvente de extração de óleos, ou ainda devido à secagem da matéria prima com gases de combustão. Durante a refinação do óleo, as etapas de desodorização e branqueamento têm se mostrado efetivas para a redução dos níveis de HPAs.

Até o presente, a legislação brasileira não especifica tolerância para hidrocarbonetos poliaromáticos em óleos vegetais e tampouco estão disponíveis dados relativos à presença destes compostos nesses alimentos.

Em vista do exposto, o presente estudo teve como objetivos:

1- determinar o teor de benzo(a)pireno em óleos e azeites vegetais disponíveis no comércio,

2- avaliar o efeito do processo de refino no teor final de benzo(a)pireno nos óleos de soja e milho,

3- verificar a influência da secagem dos grãos de milho e de soja na contaminação dos respectivos óleos.

Através de dados de consumo médio anual de óleos vegetais no Brasil, também foi estimada a contribuição desta fonte para a ingestão potencial de B(a)P pela população.

2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1- HISTÓRICO

Já em 1775, o cirurgião britânico Percival Pott presumiu que o contato repetido com o alcatrão da hulha, fuligem, escória e breu pudesse ter uma relação causal com determinadas doenças cancerígenas de pele e câncer de escroto, especialmente nos limpadores de chaminé (SCHAAD, 1970; WALKER, 1977; WILLIAMS & WEISBURGER, 1980; VAESSEN et alii, 1984). No século seguinte, com o desenvolvimento industrial, outros compostos como parafinas e óleos minerais foram também associados com a ocorrência de câncer ocupacional (SCHAAD, 1970; WALKER, 1977).

Nas décadas de 1910 a 1930 é que foram obtidos resultados concretos quanto à identificação, fracionamento e síntese de vários compostos que eram suspeitos de provocar câncer. Testes realizados em 1915 e 1918 comprovaram que o alcatrão da hulha, quando aplicado em orelhas de coelho e camundongo, induzia a formação de tumores malignos (PHILLIPS, 1983).

Em 1921 descobriu-se que a atividade carcinogênica do alcatrão da hulha estava concentrada em uma fração isenta de nitrogênio, arsênio e enxofre, que apresentava propriedades semelhantes às dos hidrocarbonetos poliaromáticos. Alguns anos mais tarde, foi provado que o alcatrão poderia ser sintetizado em laboratório, concluindo-se que os hidrocarbonetos eram os responsáveis pelas atividades carcinogênicas da mistura (SCHAAD, 1970).

O primeiro hidrocarboneto isolado do alcatrão da hulha foi o dibenzo(a,h)antraceno, em 1930, tendo sido demonstrada a sua atividade carcinogênica em pele de camundongo (VAESSEN et alii, 1984). Três anos mais tarde, isolou-se o benzo(a)pireno, que também produzia tumores malignos quando aplicado topicamente em camundongos (COOK, 1933).

Nos anos 70, um grupo de especialistas avaliou os dados de todos experimentos realizados com HPAs e concluiu que os estudos com animais deixavam pouca dúvida de que muitos desses compostos apresentam um risco potencial para o homem (VAESSEN et alii, 1984). Esta observação despertou na área científica um grande interesse para pesquisas sobre câncer, e também motivou estudos epidemiológicos em diversos países.

Como consequência, foram conduzidas pesquisas sobre a correlação entre câncer de estômago e o consumo de alimentos defumados na Islândia (BAILEY & DUNGAL, 1958), e de peixe defumado no Japão (MASUDA et alii, 1966; citado por WALKER, 1977). Também na Rússia, uma alta taxa de incidência de câncer na população foi relacionada com o tipo de dieta (IZMEROV, 1983).

2.2- ESTRUTURA E PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICA DOS HPAs

Os hidrocarbonetos poliaromáticos, também conhecidos como hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, são compostos orgânicos contendo 2 ou mais anéis de benzeno conjugados, os quais podem ou não ter grupos substituintes ligados a um ou mais anéis.

Devido a sua estrutura, os hidrocarbonetos poliaromáticos são compostos fluorescentes. Esta propriedade se deve ao grande número de ligações conjugadas, e também de estruturas rígidas, que evitam perdas de energia no estado excitado provocadas por processos de rotação ou torção (CHRISTIAN, 1986).

Como nosso estudo trata especificamente do benzo(a)pireno, são apresentadas a seguir algumas de suas propriedades físico-químicas, evidenciando-se sua baixa solubilidade em água (LO & SANDI, 1978).

peso molecular : 252 g/mol
 ponto de ebulição : 310 °C (10 mmHg)
 ponto de fusão : 176 °C
 solubilidade em água: 0,012 mg/L
 solubilidade em solventes orgânicos: muito solúvel em
 benzeno, tolueno, xileno e pouco solúvel em etanol e
 metanol.

A tabela 1 apresenta o comprimento de onda de excitação e emissão para vários hidrocarbonetos poliaromáticos.

Tabela 1. Comprimentos de onda de excitação e emissão para vários HPAs, utilizados em detector de fluorescência de CLAE com fase móvel acetonitrila : H₂O (PERFETTI et alii, 1992).

HPA	λ excitação nm	λ emissão nm
naftaleno	270	350
acenafteno	270	350
fluoreno	270	350
fenantreno	270	350
antraceno	250	420
fluoranteno	250	420
pireno	250	420
benzo(a) antraceno	270	390
criseno	270	390
benzo(b) fluoranteno	290	410
benzo(k) fluoranteno	290	410
benzo(a)pireno	290	410
dibenzo(a,h) antraceno	290	410

2.3- FORMAÇÃO DE HPAs

Os hidrocarbonetos poliaromáticos podem ser formados através de fontes naturais e combustões induzidas pelo homem, sendo a última de maior importância (LEE et alii, 1981; BARTLE et alii, 1981).

As fontes naturais incluem queimadas de florestas, vulcões, síntese a partir da degradação de material biológico, fósseis e combustíveis fósseis (BARTLE et alii, 1981). Entre os processos de combustão provocados pelo homem, destacam-se o aquecimento residencial (carvão, fogão à lenha e lareira), plantas industriais, gases de exaustão de veículos e fumaça de cigarro, os quais contaminam o ar, água, alimento, solo e sedimento (LARSEN, 1991).

Os mecanismos de formação dos HPAs durante a combustão incompleta de material orgânico ainda não foram completamente esclarecidos. Acredita-se, entretanto, que duas etapas distintas de reação estejam envolvidas, a pirólise e a pirossíntese. Em altas temperaturas, materiais orgânicos são parcialmente decompostos, formando moléculas instáveis (pirólise). Esses fragmentos, na maior parte radicais livres, recombina-se formando moléculas estáveis de HPAs (pirossíntese) (LEE et alii, 1981).

Em 1958, BADGER et alii propuseram uma série clássica de etapas para a síntese de benzo(a)pireno, que pode ser vista na figura 1. De acordo com o mecanismo proposto, a síntese do B(a)P envolve radicais livres contendo 1, 2 ou mais átomos de carbono, os quais reagem rapidamente dando origem a este hidrocarboneto, que é altamente resistente à degradação térmica.

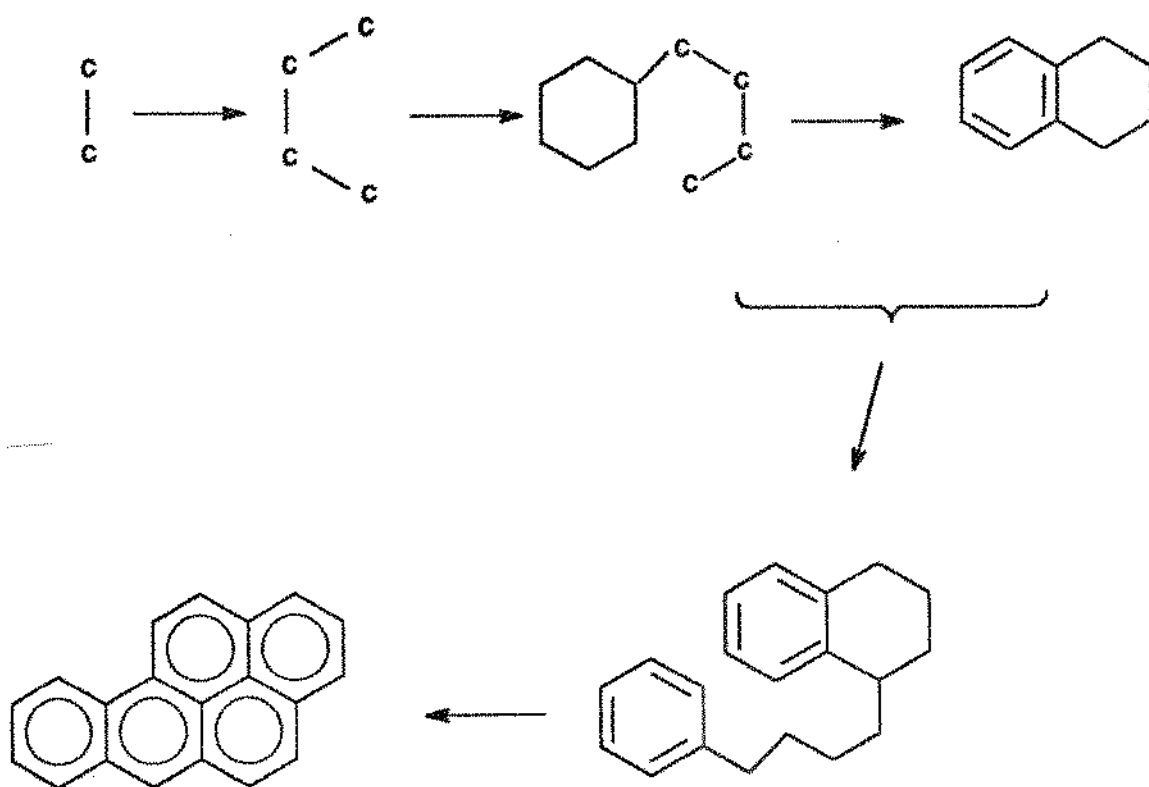


Figura 1. Mecanismo de formação do benzo(a)pireno (BADGER et alii, 1958).

2.4- TOXICIDADE DOS HPAs

Os hidrocarbonetos poliaromáticos são carcinógenos químicos que pertencem à categoria dos genotóxicos, isto é, se ligam ao DNA. São também considerados pró-carcinógenos, precisando sofrer reação metabólica para se tornarem ativos (WILLIAMS & WEISBURGER, 1980).

Diferentemente da maioria dos pró-carcinógenos, que frequentemente manifestam seus efeitos tóxicos em tecidos distantes do local de aplicação, os HPAs produzem câncer no sítio de aplicação (WILLIAMS & WEISBURGER, 1980).

2.4.1- ABSORÇÃO, DISTRIBUIÇÃO E EXCREÇÃO

As principais vias de exposição humana aos HPAs são: trato gastro-intestinal, pela ingestão de água ou alimento contaminado, pulmões, por inalação de aerossóis e/ou hidrocarbonetos adsorvidos em partículas, e pele, através do contato direto com os HPAs (IARC, 1983).

Uma vez que os HPAs foram absorvidos ou injetados pela corrente sanguínea eles são rapidamente e amplamente distribuídos. Após administração intravenosa de B(a)P marcado, este foi eliminado do sangue de ratos com uma meia-vida menor que um minuto, não sendo observadas quantidades detectáveis no sangue 10 minutos após a injeção (IARC, 1983).

Após a biotransformação, a excreção hepatobiliária e a eliminação através das fezes são as principais rotas pelas quais os HPAs são removidos do corpo, independentemente da forma original de administração. KOTIN et alii, 1959 (citado por LARSEN, 1991), observou que 4 a 12% de uma dose de B(a)P injetada subcutaneamente eram eliminados pela urina de camundongos após seis dias, enquanto que 70 a 75% da dose eram recuperados nas fezes.

2.4.2- BIOTRANSFORMAÇÃO

Muitos xenobióticos são lipofílicos, podendo permanecer no corpo indefinidamente, a não ser que reações metabólicas aconteçam e os transformem em derivados mais solúveis. Esses sistemas enzimáticos se localizam principalmente no fígado (mas podem estar também presentes em outros tecidos do corpo), participando da fase I e fase II da biotransformação. Durante o metabolismo da fase I, um grupo polar é introduzido na molécula, tornando-a um substrato adequado para a fase II. Na fase II, ocorre a combinação dos compostos produzidos na fase I com substratos endógenos, resultando em um produto de conjugação bastante solúvel

em água, que é facilmente eliminado pelo organismo (PELKOLNEN & NEBERT, 1982).

Embora a sequência destas etapas em geral resulte na eliminação (destoxificação) do composto, podem existir casos onde são gerados metabólitos altamente reativos, que são mais tóxicos que o composto original (biotoxicação). Esses intermediários podem então reagir com centros nucleofílicos de importância biológica, ligando-se covalentemente com macromoléculas celulares, como por exemplo o ácido desoxirribonucléico (DNA) (PHILLIPS, 1983).

As primeiras evidências da ativação metabólica dos hidrocarbonetos poliaromáticos foram registradas em 1951. Após a aplicação de B(a)P em pele de camundongo, ligações covalentes deste composto foram encontradas na proteína da pele do animal. Estudos posteriores também comprovaram que a aplicação de HPAs carcinogênicos em pele de camundongo resultava em ligação covalentes de metabólitos ao ácido desoxirribonucléico, ácido ribonucléico e proteínas (COONEY, 1982).

A mutagenicidade e a atividade carcinogênica do B(a)P estão associadas com sua ativação metabólica, iniciada pelo citocromo P450. Este sistema enzimático bioativa o B(a)P em vários epóxidos, os quais são hidrolisados pela epóxido hidrolase, formando os B(a)P-7,8-dióis correspondentes. Entre os possíveis dióis formados, o *trans*-B(a)P-7,8-diol é o carcinógeno inicial ("proximate carcinogen"), o qual é posteriormente metabolizado pelo citocromo P450, formando o B(a)P-7,8-diol-9,10-epóxido. A forma *anti*-B(a)P-7,8-diol-9,10-epóxido é o metabólito carcinogênico final ("ultimate carcinogen"), que se liga covalentemente a macromoléculas como o DNA, iniciando o processo de carcinogênese (COONEY, 1982).

A figura 2 apresenta um esquema do metabolismo do B(a)P e a figura 3 mostra para vários HPAs a chamada "bay region", que é o ângulo formado entre o anel benzênico fundido com a parte não linear da cadeia de anéis, responsável pela ativação da molécula através da formação do ion carbanion.

2.5- FONTES DE CONTAMINAÇÃO DE ÓLEOS VEGETAIS POR HPAs

LARSSON et alii (1987) e WELLING & KAANDORP (1986) sugeriram várias rotas para a contaminação de óleos por HPAs, a saber:

- contaminação de plantas oleaginosas pela poluição atmosférica
- secagem direta de sementes com gases de combustão
- absorção por plantas a partir de solos contaminados
- absorção a partir de solventes a base de petróleo

Dentre as possíveis vias de contaminação citadas, a literatura sugere que a principal fonte de contaminação dos óleos por HPAs é a poluição atmosférica (HAENNI, 1968; VAN HEDDEGHEM, 1980; WELLING & KAANDORP, 1986; LARSSON et alii, 1987; LARSSON, 1991; MENICHINI et alii, 1991a; MENICHINI et alii, 1991b).

As possíveis fontes de HPAs são os gases de combustão, tanto de automóveis, como de indústrias e queimadas, os quais vão para atmosfera e posteriormente se depositam sobre as plantas. Trabalhos neste sentido foram realizados por TILGNER (1970), citado por HOWARD & FAZIO, 1980, que detectou uma forte associação entre o ar poluído e a ocorrência de B(a)P em grãos e vegetais.

GRIMMER & HILDEBRANDT (1965), citados por HOWARD & FAZIO (1980), encontraram aproximadamente 10 vezes mais HPAs em amostras obtidas no distrito altamente industrializado de Rhur, na Alemanha, que em amostras provenientes do distrito de Holstein, distante de regiões industrializadas.

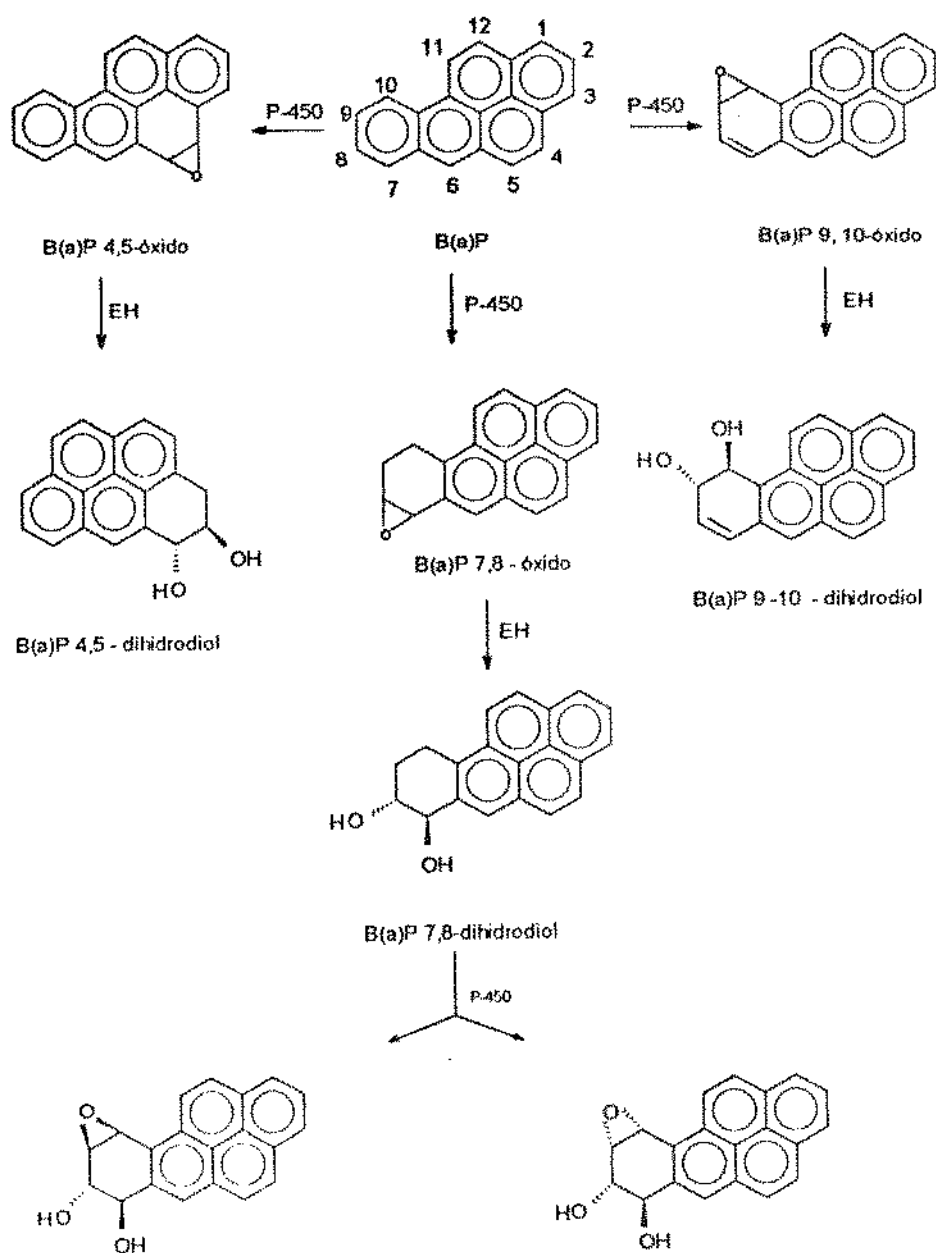


Figura 2. Metabolismo do B(a)P para óxidos de arenos, dihidrodióis e diastereoisômeros 7,8-diol-9,10-epóxidos B(a)P. P450= citocromo P450; EH= epóxido hidrolase (COONEY, 1982).

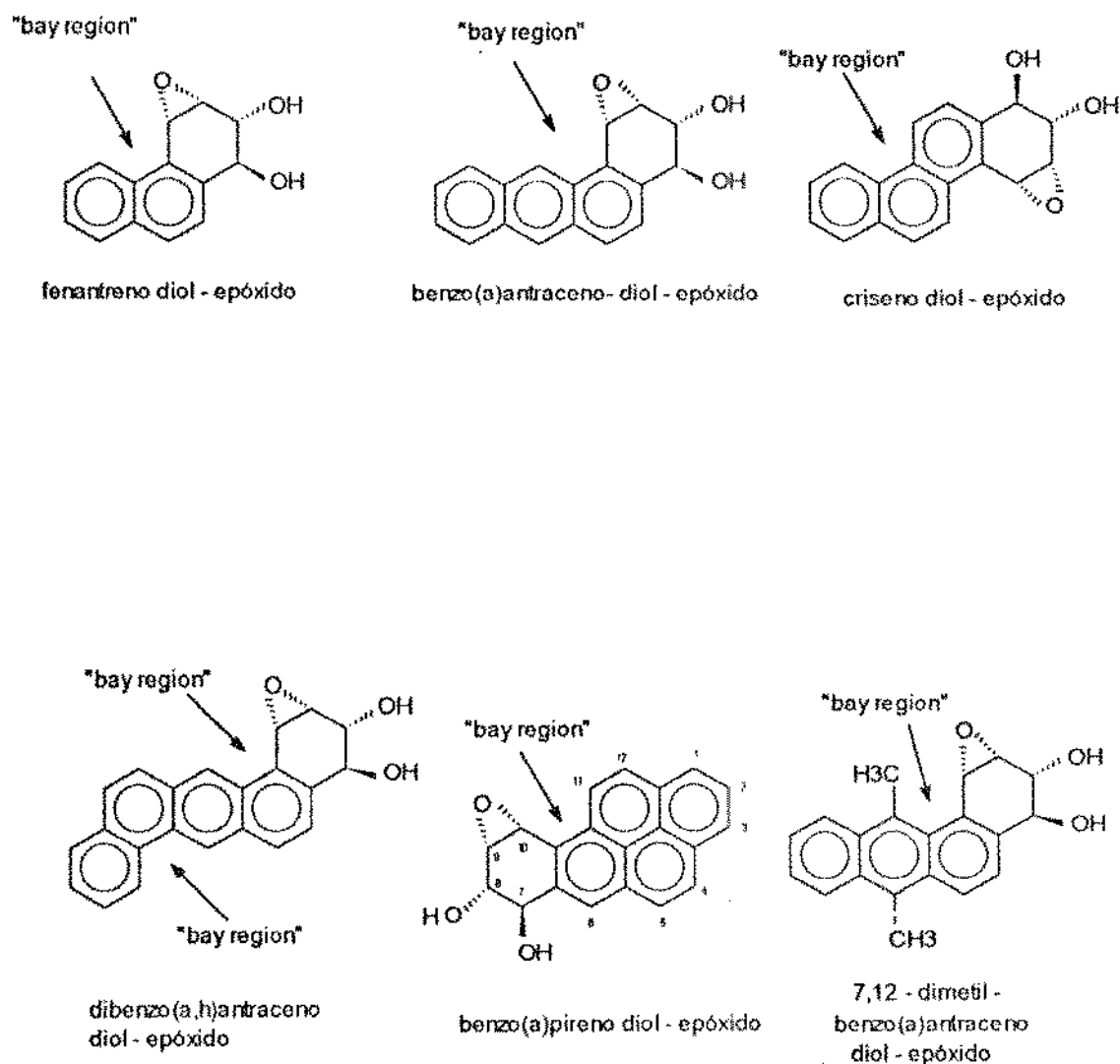


Figura 3. Estrutura da "bay-region" de dióis epóxidos para vários HPAs (COONEY, 1982).

Também têm sido realizados trabalhos no sentido de se verificar se o processo de extração com solventes a base de petróleo (hexana) poderia ser uma das fontes de contaminação.

Em 1961, LIJINSKY & RAHA, citados por HAENNI (1968), detectaram a presença de HPAs cancerígenos em várias amostras de solventes comerciais, incluindo hexana.

RYDER & SULLIVAN (1962), utilizando uma metodologia com sensibilidade de 10 µg/Kg, não detectaram a presença de HPAs carcinogênicos em solventes utilizados na extração de óleos vegetais. Resultados semelhantes foram encontrados por HOWARD et alii (1966c); GRIMMER & HILDEBRANDT (1967) e HOWARD et alii (1968a).

A tabela 2 mostra dados da literatura sobre os teores de HPAs em hexana utilizada na extração de óleos vegetais.

2.6- OCORRÊNCIA DE HIDROCARBONETOS POLIAROMÁTICOS EM ALIMENTOS

A contaminação de alimentos por HPAs se dá via poluição atmosférica ou ainda pela água e solo contaminados. Em alguns casos o processamento pode contribuir para aumentar o teor de HPAs, como acontece com a defumação e a secagem de grãos.

2.6.1- ALIMENTOS EM GERAL

Os primeiros trabalhos relacionados à presença de HPAs em alimentos são da década de 50, conforme apresentado por GUNTHER & BUZZETTI (1965). Além de presentes no ar, os HPAs foram também detectados em sedimentos marinhos, frutos do mar como ostras e moluscos, café torrado, alimentos defumados, pães, óleos minerais, parafinas, fumaça de cigarro, e até mesmo em gordura de cabelo.

Em 1967, GUNTHER et alii analisaram laranjas provenientes de regiões da Califórnia altamente poluídas e laranjas de áreas desertas irrigadas, supostamente não poluídas. O autor relatou a

Tabela 2. Teores de HPAs em solventes utilizados na extração de óleos vegetais (LO & SANDI, 1978).

Solvente	HPA ($\mu\text{g/Kg}^*$)				
	P	Fl	An	Fn	Fn-s
hexana pura	0,8 (1/5)	0,8 (1/5)	8,1 (2/5)	4,6 a 35,0 (3/5)	5,3 (2/5)
hexana comercial pura	- (0/1)	- (0/1)	- (0/1)	- (0/1)	- (0/1)
hexana reciclada	0,7 a 2,6 (2/6)	1,5 a 2,3 (2/6)	2,4 (1/6)	6,0 a 14,4 (2/6)	0,6 (1/6)
hexana comercial reciclada	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)

*: Os dados em parênteses referem-se ao número de amostras com HPAs em relação ao total de amostras analisadas.

P= perileno; Fn= fenantreno; Fl= fluoranteno; An= antraceno;

Fn-s= fenantreno substituído.

- : não detectado

presença de antraceno, a um nível de 5 ppm, e também de 6 HPAs não identificados, nas cascas de laranjas oriundas de regiões poluídas, ao passo que nas frutas originárias de regiões desérticas, estes hidrocarbonetos não foram detectados.

Em 1969, HOWARD & FAZIO apresentaram uma revisão sobre HPAs em alimentos. Os autores relataram níveis de B(a)P e de outros hidrocarbonetos em alimentos defumados, óleos vegetais, dieta total, plantas, frutas e frutos do mar. Os autores também relataram que o modo de preparo do alimento pode alterar o teor de hidrocarbonetos. Teores de até 50 µg/Kg foram detectados em amostras de bistecas grelhadas próximas ao carvão, ao passo que menores teores deste hidrocarboneto foram obtidos assando-se a carne a distâncias maiores da fonte de calor.

Na Nova Zelândia, SWALLOW (1976) determinou o teor de HPAs em diversos tipos de alimentos e aditivos. A análise em produtos defumados mostrou a presença de diversos HPAs, sendo que o B(a)P foi detectado com um teor máximo de 9 µg/Kg em ostras defumadas. Amostras de rum, parafina, extrato de levedura e aroma de fumaça líquida também apresentaram B(a)P, cuja concentração variou entre 1 a 4 µg/Kg. Concentrações de até 15 µg/Kg do mesmo hidrocarboneto foram detectadas no principal tipo de gordura utilizada para fritura naquele país. Em manteigas e margarinas foram encontradas pequenas quantidades de B(a)P.

Uma revisão, não somente da presença de HPAs em alimentos, mas também da sua formação, origem nos alimentos, métodos de análise, metabolismo e carcinogenicidade foi apresentada por LO & SANDI (1978).

Em 1980, DUNN & ARMOUR analisaram amostras de sedimentos marinhos e moluscos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e detectaram qualitativamente a presença de 20 HPAs.

Neste mesmo ano, uma segunda revisão foi apresentada por HOWARD & FAZIO sobre a presença de HPAs em alimentos. Os autores destacaram a presença de HPAs em alimentos defumados, óleos e gorduras, plantas, frutos do mar, bebidas e aroma de fumaça líquida.

CROSBY et alii (1981) determinaram a presença de 6 HPAs em alimentos defumados, em água e em "stubble smoke", usando CLAE, com detector de ultravioleta (UV) e de fluorescência. Os teores de B(a)P variaram entre 0,05 e 0,20 µg/Kg para os defumados, 0,2 a 20 ng/L para água proveniente do rio Tâmsa e no caso da "stubble smoke", somente foi confirmada a presença do B(a)P, mas a sua quantificação não foi realizada.

Maltes de cevada seca com gases de combustão foram analisados quanto à presença de HPAs, sendo o benzo(a)pireno detectado em mais de 50% das amostras, em níveis que variaram entre <0,1 a 0,2 µg/Kg (JOE et alii, 1982).

Trabalhando com cereais, leite em pó, espinafre, peixes, ostras e produtos cárneos, os pesquisadores canadenses LAWRENCE & WEBER (1984a,b) pesquisaram a presença de HPAs. O teor de B(a)P nestes alimentos variou entre n.d. (<0,1) a 25 µg/Kg. Teores elevados foram detectados em crustáceos marinhos (25 µg/Kg), moluscos defumados (3,9 µg/Kg) e em hambúrgueres fritos (4,0 µg/Kg). Os resultados mostraram que os níveis encontrados eram similares aos de outros países, e que o processamento de certos alimentos por aquecimento direto pode provocar um aumento significativo no teor de HPAs do produto final.

TAKATSUKI et alii (1985) determinaram a presença de 5 HPAs em peixes e ostras no Japão. O teor de B(a)P variou entre 0,21 e 2,64 µg/Kg.

Amostras de produtos defumados, peixes, óleos vegetais, café torrado e solúvel, aromatizantes, ervas, chás e condimentos

foram analisados quanto ao teor de HPAs por STIJVE & HISCHENHUBER (1987). Os teores variaram desde alguns décimos até 220 µg/Kg de B(a)P, para amostras de pimenta vermelha.

Na França, SALAGOITY et alii (1990) analisaram a presença de B(a)P em frutas secas, café torrado, alimentos grelhados e defumados. Os teores médios de B(a)P variaram entre 0 e 3,35 µg/Kg, sendo o teor máximo de 29,5 µg/Kg detectado em amostras de ameixa seca proveniente da Iugoslávia.

MENECHINI & ROSSI (1992) publicaram uma compilação sobre a exposição a HPAs pela população italiana e de outros países, bem como uma revisão sobre as propriedades químicas, toxicológicas e metabolismo desses hidrocarbonetos. A ocorrência em água, solo, alimentos e ar também foi destacada.

SAGREDOS (1992) determinou a presença de HPAs em cápsulas de óleo de peixe. O teor de B(a)P variou entre 0,6 a 380 µg/Kg.

A tabela 3 mostra teores de B(a)P citados na literatura para diversos alimentos.

2.6.2- HPAs EM DIETAS TOTAIS

A maioria dos trabalhos publicados envolvendo a contaminação de alimentos por HPAs se restringe a um número limitado de itens. Como os hidrocarbonetos estão presentes na grande maioria dos alimentos consumidos diariamente pelo homem, alguns pesquisadores destacaram a necessidade de se quantificar os níveis de HPAs na dieta total, possibilitando, desta forma, a determinação de quais grupos alimentícios contribuem com o maior teor destes compostos, e ainda a estimativa da ingestão diária destes hidrocarbonetos através da dieta.

HOWARD et alii, 1968c, analisaram HPAs em uma dieta alimentar, tendo sido detectados pireno e fluoranteno em amostras

Tabela 3. Teores de B(a)P em alimentos.

ALIMENTO	B(a)P (µg/Kg)	REFERÊNCIA	TÉCNICA
defumados			
peixes	0,3 a 2,1	BAILEY & DUNGAL, 1958	CCD / UV
peixes	< 0,5	SWALLOW, 1976	CG / DIC
peixes	0,2 a 1,2	STIJVE & HISCHENHUBER, 1987	CLAE / CCD
ostras	12,2 a 10,1	SPEER et alii, 1990	CG / DM
ostras	9	SWALLOW, 1976	CG / DIC
ostras	0,4 a 77	LAWRENCE & WEBER, 1984b	CLAE
presunto	0,6 a 1,8	STIJVE & HISCHENHUBER, 1987	CLAE
bacon	0,3 a 2,7	STIJVE & HISCHENHUBER, 1987	CLAE
linguiça	0,6	STIJVE & HISCHENHUBER, 1987	CLAE
carne	< 0,5	SWALLOW, 1976	CG / DIC
não defumados			
queijo	0,20	CROSBY et alii, 1981	CLAE
café	0,97	SALAGOITY et alii, 1990	CLAE
ameixa	0 a 3,35	SALAGOITY et alii, 1990	CLAE
pimenta preta	0,45	STIJVE & HISCHENHUBER, 1987	CLAE
folhas de chá	4,5 a 16,1	STIJVE & HISCHENHUBER, 1987	CLAE
chá defumado	103 a 180	STIJVE & HISCHENHUBER, 1987	CLAE
cereais matinais	< 0,1 a 0,8	LAWRENCE & WEBER, 1984b	CLAE
leite desidratado	< 0,1 a 1,2	LAWRENCE & WEBER, 1984b	CLAE

CCD, cromatografia em camada delgada; CLAE, cromatografia líquida de alta eficiência; CG, cromatografia em fase gasosa; UV, ultra violeta; DIC, detector de ionização de chama; DM, detector de massa.

de carne, peixe, aves, leite e laticínios, raízes de vegetais e bebidas. A maior concentração dos dois hidrocarbonetos citados (2 µg/Kg) foi observada em um lote de alimentos composto por carne, peixe e aves. Além destes hidrocarbonetos mencionados, benzo(e)pireno, benzo(ghi)perileno e benzo(a)antraceno foram também detectados em vários lotes de óleos, gorduras, manteigas e margarinas, em quantidades inferiores a 0,5 µg/Kg.

Em 1979, JOE et alii analisaram diversos alimentos de uma cesta básica que incluía produtos defumados, óleos de frituras, mariscos, salsichas, bebidas, margarinas, maioneses, leite em pó instantâneo, massas, aves e outros. De um total de 24 amostras analisadas, B(a)P foi detectado somente em uma amostra de molusco, em um nível máximo de 3 µg/Kg. Pireno e fluoranteno foram detectados em 19 amostras.

Analisando amostras de dietas na Inglaterra, DENNIS et alii, (1983), detectaram a presença de 12 HPAs. Os dados mostraram que a maior contribuição de HPAs na dieta total era dada pelo grupo de óleos e gorduras, seguido de cereais. O teor máximo de B(a)P detectado foi de 3,74 µg/Kg para os óleos e gorduras. Considerando uma dieta diária de 1,46 Kg de alimentos e bebidas por pessoa, os autores calcularam que uma quantidade de 0,25 µg de B(a)P eram ingeridos diariamente por indivíduo.

A presença de HPAs em dietas foi estudada por VAESSEN et alii (1984) na Holanda. Além de revisarem metodologias e ocorrência desses hidrocarbonetos, os autores relataram teores de B(a)P variando entre 0,01 a 110 µg/Kg em vários alimentos. O nível mais elevado de HPAs foi detectado em folhas de chá.

Em 1990, DE VOS et alii determinaram o teor de 17 HPAs em amostras de dietas totais na Holanda. As maiores contribuições para a ingestão diária de HPAs eram dadas pelos açúcares e produtos açucarados, cereais, óleos, gorduras e castanhas. Os autores

concluíram que a média diária de ingestão de HPAs estava entre 5 µg (estimativa inferior) e 17 µg (estimativa superior).

Mais recentemente, DENNIS et alii (1991) investigaram os fatores que afetam o teor de HPAs em cereais, gorduras e outros produtos alimentícios. Entre os óleos vegetais analisados, o teor médio de B(a)P foi de 1,29 µg/Kg. Foram detectadas concentrações de até 2,2 µg/Kg de B(a)P em produtos derivados de cereal com alto teor de óleos vegetais, sugerindo que os óleos comestíveis podem contribuir para o incremento do teor de HPAs nestes produtos. Os autores constataram que dentro do grupo dos óleos e gorduras, a maior contribuição de B(a)P numa dieta total era oriunda de margarinas (70%), seguidas pelos óleos vegetais (11%), banha de porco (9%), manteiga (3%) e queijos. DENNIS et alii destacaram que os gases de combustão utilizados para a secagem de sementes não tinham efeito sobre os HPAs pesados como o B(a)P, mas aumentavam em 41 a 126% os teores de fluoranteno, pireno e criseno.

A tabela 4 fornece dados da literatura sobre a ingestão diária de B(a)P em dietas da Holanda e Inglaterra.

Tabela 4. Dados de ingestão diária de B(a)P através da dieta.

País	B(a)P (µg)	Referência
Inglaterra	0,25	DENNIS et alii, 1983
Holanda	0,5	VAESSEN et alii, 1984
Holanda	0,08	VAESSEN et alii, 1988, citado por DE VOS et alii, 1990
Holanda	0,12 a 0,2	DE VOS et alii, 1990

2.6.3- PRESENÇA DE HPAs EM ÓLEOS VEGETAIS

A contaminação de óleos por B(a)P e outros HPAs foi primeiramente relatada por JUNG & MORAND (1962, 1963 e 1964) em azeite de oliva, utilizando a técnica de espectroscopia de fluorescência. Os hidrocarbonetos identificados, embora não quantificados, foram pireno, benzo(e)pireno e benzo(a)pireno.

CIUSA et alii (1965), citados por HOWARD & FAZIO (1969), através de espectroscopia de ultravioleta detectaram em azeites de oliva a presença de vários HPAs, exceto B(a)P. A metodologia descrita era semi-quantitativa, não apresentando dados de recuperação.

Em 1966, BORNEFF & FABIAN, citados por HOWARD & FAZIO (1980), estimaram níveis de B(a)P de até 1 µg/Kg em óleos e gorduras.

HOWARD et alii, (1966c), encontraram traços de B(a)P em óleos de soja, algodão, milho e amendoim e em azeite de oliva, utilizando técnicas de UV e espectrofluorimetria. O maior teor de B(a)P encontrado foi de 1,4 µg/Kg, em uma amostra de óleo de soja.

No ano seguinte, GRIMMER & HILDEBRANDT (1967) relataram que o processo de secagem de "copra" (parte branca do coco, da qual se extrai o óleo) através de gases de combustão provocava o aumento excessivo de HPAs no óleo. Foram observados para óleo de coco não seco e seco com gases de combustão níveis de HPAs de 3,2 e 2679 µg/Kg, respectivamente. Os autores também analisaram 8 tipos de óleo e uma amostra de margarina de coco. Os maiores teores de B(a)P foram detectados em óleos de girassol e de palmiste com 10,6 e 4,1 µg/Kg, respectivamente.

Como sequência do trabalho desenvolvido em 1966, HOWARD et alii (1968c) estimaram os teores de HPAs em vários alimentos, incluindo óleos vegetais, utilizando cromatografia de camada

delgada (CCD) e espectrofotometria, a um nível de detecção abaixo de 2 µg/Kg. Os hidrocarbonetos benzo(a)pireno, benzo(e)pireno, benzo(g,h,i)perileno, fenantreno, benzo(a)antraceno e benzo(b,K)fluorantenos foram detectados em quantidades inferiores a 0,5 µg/Kg nos óleos analisados.

Em revisão de 1969, HOWARD & FAZIO relataram a presença de B(a)P em óleos de soja, algodão, milho, amendoim e azeite de oliva, com teores médios variando entre 0,6 e 1,4 µg/Kg.

CIUSA et alii (1970) determinaram 14 HPAs em diferentes amostras de azeites, sendo detectadas quantidades de HPAs totais da ordem de 500 a 700 µg/Kg.

Analisando diferentes alimentos por cromatografia em fase gasosa (CG), SWALLOW (1976) determinou em azeite de oliva e em óleos de girassol, amendoim, soja, milho e coco teores de B(a)P variando entre n.d. (< 0,5 µg/Kg) e 9 µg/Kg. Segundo o autor, os teores de B(a)P e de outros hidrocarbonetos observados neste trabalho, quando comparados com os de outros países, eram semelhantes, à exceção do óleo de soja, que mostrou-se mais contaminado.

JOE et alii, (1979), determinaram os teores de HPAs em vários grupos de alimentos consumidos pelos norte-americanos. Para os óleos de amendoim, milho e azeite de oliva foram determinados níveis de HPAs de 23,4 ; 2,6 ; 21,4 e de 9,5 ; 5,6 ; 8,2 µg/Kg em 1979 e 1966, respectivamente. Entre os óleos analisados (óleo vegetal, óleos de amendoim e milho e azeite de oliva), não foi detectada a presença de B(a)P.

VAN HEDDEGHEM et alii (1980), utilizando cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fluorescência, analisaram HPAs em produtos gordurosos como óleos e manteigas. O teor médio encontrado para o B(a)P foi de 0,74 µg/Kg.

KOLAROVIC & TRAITLER (1982), usando CG com coluna capilar, determinaram teores de HPAs em seis tipos de óleos vegetais comerciais. Os maiores teores de B(a)P foram encontrados em óleos de soja e amendoim, que se apresentaram contaminados com 28,45 e 105,74 $\mu\text{g/Kg}$, respectivamente. O óleo de semente de girassol apresentou o teor mais baixo de HPAs entre os óleos analisados.

Em 1984, LAWRENCE & WEBER (1984b) analisaram, por cromatografia gasosa, óleos de soja, de milho e de canola/soja, entre outros alimentos. Os teores de B(a)P encontrados foram de traços para o óleo de canola/soja, e de 0,2 e 0,3 $\mu\text{g/Kg}$ para os óleos de soja e milho, respectivamente.

MARIANI & FEDELI (1984) apresentaram uma revisão de várias metodologias para a determinação de HPAs em azeites de oliva, bem como relataram resultados publicados na literatura sobre os teores de HPAs em diversos tipos de óleos.

WELLING & KAANDORP (1986) analisaram óleos vegetais, utilizando um sistema de CLAE com detector de fluorescência programável. Entre 5 óleos analisados, os maiores teores de B(a)P foram encontrados em óleo para salada (6,8 $\mu\text{g/Kg}$) e óleo de milho (26,1 $\mu\text{g/Kg}$).

Pesquisadores finlandeses (HOPIA et alii, 1986) determinaram o teor de HPAs em margarinas, manteigas e óleos vegetais, com um sistema de CG acoplado a um detector de massa. Foi concluído que o consumo anual de HPAs por pessoa através de óleos vegetais era de 40 μg , e que o consumo através de manteiga, margarina e óleos era de 0,6 $\mu\text{g/dia/pessoa}$.

STIJVE & HISCHENHUBER (1987) determinaram o nível de HPAs em vários produtos, incluindo diversos óleos. Entre 12 tipos analisados, os teores de HPAs variaram entre quantidades muito pequenas até valores alarmantes, de até 170 $\mu\text{g/Kg}$ para uma amostra

de óleo de amendoim. Níveis elevados de B(a)P também foram detectados em óleo de coco (0,9-27,4 µg/Kg).

Na Alemanha, SAGREDOS et alii (1988) investigaram a presença de HPAs em vários óleos brutos (coco, soja, colza, palmiste, palma, algodão e peixe). À exceção do óleo de coco, que apresentou 2264 µg/Kg de HPAs leves e 79 µg/Kg de HPAs pesados, os demais óleos analisados mostraram baixos níveis de contaminação. Segundo os autores, o elevado teor de hidrocarbonetos presentes no óleo de coco se deve ao processo de secagem da "copra", que utiliza gases de combustão, enquanto que a contaminação dos demais óleos pode se dar via poluição atmosférica, solvente de extração (hexana), contaminação via solo e a secagem de sementes com gases de combustão. Neste caso, a utilização de carvão ativo no processamento também reduz o teor final de HPAs, como observado em óleo de coco bruto, que teve seu teor de HPAs reduzido de 1940,7 µg/Kg para 9,6 µg/Kg após o processo de desodorização/clarificação utilizando 0,4% de carvão ativo.

SPEER & MONTAG (1988) determinaram 18 HPAs em diferentes óleos vegetais, através de CG acoplado a um espectrômetro com detector de massa. Dentre os óleos analisados (colza, girassol, milho, gergelim, linhaça, trigo e azeite de oliva), o azeite de oliva e o óleo de trigo foram os que apresentaram maiores níveis de HPAs totais (110,8 e 124,2 µg/Kg), ao passo que uma amostra de óleo de colza apresentou o menor teor total (0,9 µg/Kg). Somente em amostras de óleo de linhaça e de colza o B(a)P não foi detectado.

SPEER et alii (1990) investigaram a presença de HPAs em óleos vegetais nativos na Alemanha. Os teores médios de HPAs obtidos em óleo de cártamo, girassol, milho, gergelim, linhaça, trigo e azeite de oliva foram, respectivamente: 5,4; 16,6; 15,5; 21,5; 76,3; 124,2 e 78,2 µg/Kg.

DENNIS et alii (1991) analisaram os teores de HPAs em diversos produtos, entre eles óleos vegetais. O valor médio de

B(a)P encontrado em 18 amostras de vários tipos de óleos foi de 1,29 µg/Kg.

MENICHINI et alii (1991a) analisaram por cromatografia em fase gasosa amostras de azeites de oliva provenientes do mercado italiano. Nenhuma das amostras analisadas apresentou B(a)P, a um nível de sensibilidade de 3 µg/Kg. Foram também detectados fluoreno, fenantreno, fluoranteno, antraceno, benzo(a)fluoranteno, criseno e trifenileno. Os autores calcularam uma média de 0,54 a 0,58 mg como ingestão anual dos 8 HPAs determinados.

A tabela 5 mostra uma breve compilação da literatura sobre teores de B(a)P em óleos vegetais.

2.7- INFLUÊNCIA DO PROCESSAMENTO NA CONTAMINAÇÃO DE ÓLEOS POR HPAs.

Devido à presença de níveis elevados de HPAs, principalmente em óleo de coco, vários pesquisadores têm procurado descobrir as principais fontes de contaminação, para então propor processos para a sua remoção.

BIERNOTH & ROST (1967) propuseram um processo de refino, empregando carvão ativado na etapa de clarificação para a remoção de HPAs. Os resultados mostraram que o carvão, juntamente com o processo de desodorização, removia a maioria dos HPAs presentes no óleo de coco, chegando a reduzir de 1923 para 13 µg/Kg os teores de HPAs na amostra.

Em 1976, ROST analisou amostras de óleo de palma de diversas origens, para verificar a influência do branqueamento a altas temperaturas sobre a possível conversão de carotenóides em HPAs. Os resultados mostraram que os processos de clarificação / desodorização térmica (270°C) não aumentavam o teor inicial de HPAs. Os teores encontrados foram de 27, 11 e 6 µg/Kg,

Tabela 5. Teor de BaP ($\mu\text{g/Kg}$) em vários tipos de óleos.

Referência	Óleo														Técnica	
	açafrão	amen- doim	canola	canola/ soja	coco	girassol	gergelim	linhaça	milho	oliva	palma	palmiste	soja	trigo	semente de uva	
GRIMMER & HILDEBRANDT, 1967	-	-	2,8	-	-	10,6	-	1,4	-	-	1,2	4,1	1,7	-	-	UV
SWALLOW, 1976	5	9	-	-	7	8	-	-	2	2	-	-	<0,5	-	-	CG
JOE et alii, 1979	-	n.d.	-	-	-	-	-	-	n.d.	n.d.	-	-	-	-	-	CCD
KOLAROVIC & TRAITLER, 1982	-	10,69 a 105,74	2,14	-	-	1,51	-	-	-	-	-	-	28,45	-	0,60	CG
LAWRENCE & WEBER, 1984 b	-	-	-	t	-	-	-	-	0,3	-	-	-	0,2	-	-	CLAE
WELLING & KAANDORP, 1986	-	-	-	-	-	0,3 a 1,9	-	-	0,5 a 26,1	-	-	-	-	-	-	CLAE
STIJE & HISCENHUBER, 1987	-	1,2 a 170	-	13,4	0,9 a 27,4	0,1 a 1,3	-	-	0,4 a 12,7	2,2	0,2 a 4,3	-	0,5 a 1,3	-	3,6	CLAE/ CCD
LARSSON et alii, 1987	-	-	0,3 a 1,3	-	<0,1 a 0,3	-	-	-	-	-	-	-	0,3 a 0,8	-	-	CG
SPEER & MONTAG, 1988	-	-	<0,1a 4,1	-	-	<0,1 a 0,8	n.d.	0,9	0,5 a 2,3	0,2 a 1,2	-	-	-	1,3	-	CG
SPEER et alii, 1990	0,3	-	-	-	-	0,7	n.d.	0,9	1,3	0,7	-	-	-	1,3	-	CG
HOPIA et alii, 1986	-	-	-	-	0,2	n.d.	-	-	0,02	n.d.	-	-	0,74 1,3	-	-	CG
DENNIS et alii, 1991	-	-	0,32 a 68,6	-	-	-	-	-	1,51 a 5,18	-	-	-	0,98 5,39	-	-	CLAE

- : não analisado; t : traços; n.d. : não detectado; UV: espectroscopia de ultravioleta; CG: cromatografia gasosa; CCD: cromatografia em camada delgada; CLAE: cromatografia líquida de alta eficiência.

respectivamente, para o óleo bruto, neutralizado e branqueado/desodorizado. Resultados similares foram obtidos para outras 2 amostras, nas quais o teor final de HPAs também foi reduzido quando comparado com o do óleo bruto.

Para verificar a influência do processo de refino no teor de HPAs, LARSSON et alii (1987) analisaram diversas amostras de óleo antes e após o processo de desodorização. Os óleos crus de soja, coco e colza apresentaram elevados teores de HPAs (33 a 3700 µg/Kg), sendo que após o processo de clarificação e desodorização, estes valores foram reduzidos para cerca de 2 a 59 µg/Kg. Concluiu-se ainda que o processo de desodorização tem pouco efeito sobre os HPAs de 4 ou mais anéis, também chamados de HPAs pesados.

Trabalho semelhante foi realizado por DENNIS et alii, 1991, analisando amostras de óleos brutos e refinados de colza, soja, peixe e milho. Através da determinação de HPAs nas amostras, foi concluído que o processo de refino reduzia o teor dos hidrocarbonetos fluoranteno, pireno, benzo(a)antraceno e criseno. Por outro lado, não foram observadas mudanças significativas nos níveis de hidrocarbonetos de maior peso molecular. Os autores destacaram o uso de carvão ativado na remoção dos HPAs pesados.

2.8- MÉTODOS DE ANÁLISE DE HPAs

Vários trabalhos têm sido conduzidos com o objetivo de se tentar padronizar uma metodologia analítica para a análise de hidrocarbonetos poliaromáticos. Em 1965, dois procedimentos foram descritos para a determinação de HPAs em alimentos defumados (peixe e presunto). Um deles descrevia um método geral para a determinação de compostos policíclicos (HOWARD et alii, 1966a), e o outro era específico para a determinação de B(a)P (HOWARD et alii, 1966b). Os dois métodos descritos apresentavam uma sensibilidade de 2 µg/Kg e foram recomendados como oficiais. Neste mesmo ano, HOWARD et alii, 1966c, descreveram um método para a determinação de HPAs em óleos vegetais. Após extração com solvente (dimetilsulfóxido), os

hidrocarbonetos eram submetidos a um processo de limpeza em coluna de alumina e posterior separação em CCD e análise por espectrofluorimetria. Dois anos mais tarde, HOWARD et alii, 1968b, publicaram um estudo colaborativo para a validação de uma metodologia para a determinação de B(a)P em amostras de presunto e peixe defumado. Os resultados obtidos com fortificações de 4 e 10 µg/Kg de B(a)P mostraram boa concordância e o método foi adotado como oficial em 1968.

HOWARD et alii, 1968c, desenvolveram um método geral para a detecção simultânea de vários hidrocarbonetos, e uma metodologia específica para o benzo(a)pireno, aplicando-a para alimentos como: carne, peixe, aves, óleos, gorduras, bebidas, margarinas, maionese e vários tipos de raízes de vegetais. Pireno e fluoranteno foram detectados em todas as amostras, bem como traços de benzo(a)pireno, benzo(b)fluoranteno e benzo(k)fluoranteno. A detecção foi feita utilizando-se espectrofotometria.

Em 1972, GRIMMER & HILDEBRANDT descreveram uma metodologia para a determinação de 14 HPAs em diversos alimentos com alto teor de proteínas, em óleos e em gorduras. O grupo de alimentos protéicos foi inicialmente submetido a uma digestão metanólica com hidróxido de potássio, seguida de extração. Já nos alimentos gordurosos, a extração foi realizada diretamente com o solvente de extração (dimetilformamida:ciclohexano:água, 9:1:10). A limpeza da amostra foi realizada em Sephadex LH20; sílica gel (15% água) e óxido de alumínio (5,4% água). A validação da metodologia foi testada utilizando-se fortificações de HPAs em níveis inferiores a 2 µg/Kg, e detecção por espectrofotometria.

Em 1975, foi proposta por GRIMMER & BÖHNKE uma metodologia para a determinação de HPAs em alimentos com alto teor de proteínas, em óleos e em gorduras. Esta metodologia é a base de muitos trabalhos publicados atualmente e consta das seguintes etapas: saponificação em KOH metanólico para os produtos com alto teor de proteína, extração dos HPAs com dimetilformamida:água

(9:1), e reextração com ciclohexano. A etapa de saponificação é omitida para as amostras de óleos e gorduras. A limpeza da amostra é feita utilizando-se coluna de sílica gel (15% água) e Sephadex LH20, sendo a detecção realizada por cromatografia gasosa e a confirmação com detector de massa.

GRIMMER & JACOB, 1987, avaliaram uma metodologia recomendada pela União Internacional para a Química Pura e Aplicada (IUPAC) para a análise de HPAs em alimentos defumados, utilizando cromatografia gasosa a um nível de detecção de 0,3 ng. Os hidrocarbonetos determinados foram: benzo(a)antraceno, criseno, benzofluorantenos(b+j+k), benzo(e)pireno, benzo(a)pireno e indeno(1,2,3-cd)pireno. Segundo os autores, devido ao elevado valor do coeficiente de variação obtido, especialmente para o indeno(1,2,3-cd)pireno, a determinação dos HPAs pela metodologia descrita não foi satisfatória.

VAESSEN et alii (1988) publicaram um estudo cooperativo entre 14 laboratórios europeus para a determinação de 5 HPAs (pireno, benzo(a)pireno, benzo(e)pireno, indeno(1,2,3-cd)pireno, benzo(g,h,i)perileno) em óleo de coco e em couve. As técnicas utilizadas foram cromatografia gasosa com coluna capilar, detector de ionização de chama ou massa e cromatografia líquida de alta eficiência com detector de ultra-violeta. Os dados mostraram que não havia boa concordância entre os resultados obtidos, devido à baixa reprodutibilidade, especialmente para o óleo de coco. A média dos teores obtidos de HPAS variou em pelo menos o dobro.

Esses mesmos autores, em 1990, propuseram um segundo estudo colaborativo entre 14 laboratórios europeus para a determinação dos mesmos 5 hidrocarbonetos em matriz de óleo de coco. A técnica de cromatografia líquida foi utilizada por 10 laboratórios. Os níveis dos hidrocarbonetos variaram entre 7 a 19 µg/Kg, com exceção do pireno, detectado em nível de 112 µg/Kg. Através deste trabalho, foram obtidos consideráveis progressos na exatidão e precisão da metodologia proposta. Segundo os autores,

esta melhora se deve ao fato de que neste trabalho o óleo de coco foi contaminado artificialmente, ao passo que no primeiro a contaminação era natural.

VREULS et alii (1991) descreveram uma nova metodologia para a determinação de HPAs sem a utilização de métodos convencionais de extração líquido-líquido. A metodologia consistiu no acoplamento "on-line" de um cromatógrafo líquido, um cromatógrafo gasoso acoplado a um detector de massa. O sistema de cromatografia líquida é utilizado para um pré-tratamento da amostra de óleo, e a fração que contém os HPAs é transferida para o cromatógrafo gasoso, onde ocorre a separação dos HPAs, com posterior detecção e identificação no detector de massa. Através do uso da técnica do monitoramento seletivo de íons, foi determinado um limite de detecção de 1 pg. Em 2 amostras de óleo de girassol e uma amostra de azeite de oliva, os teores de B(a)P variaram entre 19 e 40 µg/Kg. Os autores ressaltaram que os altos teores de B(a)P e de outros 9 HPAs detectados nas amostras de óleo estavam muito acima daqueles citados pela literatura.

Um estudo colaborativo entre 10 países europeus avaliou uma metodologia publicada pela IUPAC para a determinação de B(a)P em óleos e gorduras (HENDRIKSE & DIEFFENBACHER, 1991). Também neste trabalho a extração líquido-líquido foi substituída por uma coluna de alumina, onde o óleo é adsorvido e os HPAs são posteriormente eluídos com éter de petróleo. Para a quantificação do B(a)P foi utilizado um sistema de cromatografia líquida e detector de fluorescência, com um limite de detecção de 0,1 µg/Kg. Com base na repetibilidade e reprodutibilidade dos resultados obtidos neste estudo colaborativo, este método foi adotado para a determinação de traços de B(a)P em óleos comestíveis e gorduras.

MENICHINI et alii, 1991b, publicaram uma metodologia para a determinação de HPAs em azeites de oliva. O método consiste na extração com dimetilsulfóxido, filtração em coluna de sílica gel, limpeza em placa de CCD e a detecção por CG-capilar. Segundo os

autores, a metodologia proposta, que utiliza menores quantidades de solventes, pode ser utilizada para a determinação de HPAs em azeites de oliva com uma boa precisão (C.V.= 7%).

Mais recentemente, uma metodologia para a determinação de HPAs em alimentos marinhos, usando CLAE e detector de fluorescência, foi descrita por PERFETTI et alii (1992), que substituiu as extrações líquido-líquido por extrações líquido-sólido, usando colunas pré-empacotadas com alumina e sílica.

2.8.1- LIMPEZA DAS AMOSTRAS

Para a limpeza das amostra de óleos e gorduras alguns autores simplesmente utilizam a sílica diretamente do frasco (SWALLOW, 1976; GRIMMER & BÖHNKE, 1975; STIJVE & HISCHENHUBER, 1987; SPEER et alii, 1990) e outros a aquecem a 150°C ou 550 °C (SPEER & MONTAG, 1988; VAN HEDDEGHEM et alii, 1990). Também têm sido citado o uso de alumina (HENDRIKSE & DIEFFENBACHER, 1991; JUNG & MORAND, 1962, 1963 e 1964), florisil (LAWRENCE & WEBER, 1984a e LAWRENCE & WEBER, 1984b), complexação com cafeína (SAGREDOS et alii, 1988), adsorção em silicato de cálcio sintético conhecido como Calflo E (STIJVE & DISERENS, 1987), ou resina XAD-2 (WELLING & KAANDORP, 1986) para a limpeza das amostras de óleos e gorduras.

2.8.2- DETECÇÃO DE HPAs

Na década de 60, as análises de um número limitado de HPAs eram conduzidas utilizando-se as técnicas de espectroscopia de UV-VIS e fluorescência (JUNG & MORAND, 1962, 1963, 1964; HOWARD et alii, 1966a, 1966b e 1966c; BIERNOTH & ROST, 1967; GRIMMER & HILDEBRANDT, 1967; HOWARD et alii, 1968a, 1968b e 1968c).

Nos anos seguintes, outros métodos de análise, incluindo CG com detector de ionização de chama (DIC) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detector de fluorescência, passaram a

ser utilizados na determinação simultânea de vários HPAs (GRIMMER & BOHNKE , 1975; WHEALS, 1975; SWALLOW, 1976), embora alguns autores ainda utilizassem técnicas de CCD (CIUSA et alii, 1970; GRIMMER & HILDEBRANDT, 1972; ROST, 1976; JOE et alii, 1979).

A maioria dos trabalhos envolvendo a técnica de CLAE foi desenvolvida nos anos 80, utilizando o detector de fluorescência na determinação de HPAs (VAN HEDDEGHEM, 1980; DENNIS et alii, 1983; LAWRENCE & WEBER, 1984b; WELLING & KAANDORP, 1986; STIJVE & HISCHENHUBER, 1987; BERTHOD et alii, 1987).

Neste mesmo período, a CG com coluna capilar e detector de ionização de chama ou detector de massa também passou a ser utilizada (KOLARAVIC & TRAITLER, 1982; LAWRENCE & WEBER, 1984a; HOPIA et alii, 1986; LARSSON et alii, 1987).

Mais recentemente, a literatura tem publicado trabalhos que envolvem as técnicas de CLAE-fluorescência, CG-detector de ionização de chama, CG-detector de massa, e ainda CCD (SPEER & MONTAG, 1988; SAGREDOS et alii, 1988; VAESSEN et alii, 1990; MENICHINI et alii, 1991a; MENICHINI et alii 1991b; HENDRIKSE & DIEFFENBACHER, 1991; VREULS et alii, 1991; PERFETTI et alii, 1992).

Segundo os autores PERFETTI et alii, (1992), a cromatografia gasosa com coluna capilar quando acoplada ao detector de massa tem a vantagem da alta seletividade e poder de resolução, podendo ser usada para determinar um número grande de HPAs em uma única análise.

A cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa, com detector de fluorescência, é também uma técnica de alta sensibilidade e seletividade, mas não tem a alta resolução das colunas capilares. Entretanto, a CLAE possui em geral uma maior sensibilidade, particularmente para HPAs de alto peso molecular (KAGI et alii, 1985, citado por PERFETTI et alii, 1992).

DENNIS et alii (1984) compararam a metodologia de CLAE e GC na determinação de HPAs em alimentos, e concluíram que não existe diferença entre as duas técnicas.

2.8.3- CONFIRMAÇÃO DA IDENTIDADE DE HPAs

Já na década de 60, JUNG & MORAND (1962, 1963 e 1964) e HOWARD et alii (1966a, 1966b, 1966c) utilizavam a técnica de sobreposição de espectros de fluorescência para a confirmação da identidade do hidrocarboneto obtido. Em 1975, GRIMMER & BOHNKE utilizaram as técnicas de comparação do tempo de retenção e cromatografia gasosa acoplada ao detector de massa para a determinação e confirmação da identidade dos HPAs. Mais recentemente, HOPIA et alii (1986); LARSSON et alii (1987); SPEER & MONTAG (1988); SPEER et alii (1990) e MENECHINI et alii (1991a) utilizaram a técnica de cromatografia gasosa acoplada ao detector de massa para a determinação e confirmação da identidade dos HPAs.

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) quando acoplada ao detector de varredura de foto-diodos ("photodiode-array detector") registra uma faixa espectral inteira durante uma única análise, coletando os dados de absorbância de 190 nm a 800 nm. Este tipo de detector armazena uma quantidade enorme de dados, tornando possível a identificação de todos os componentes que absorvem dentro da faixa de comprimento selecionada (PICKERING, 1990). Segundo o mesmo autor, este detector simplifica duas importantes funções: identificação positiva e análise da pureza do pico, que são essenciais para pesquisa, controle de qualidade e desenvolvimento de métodos.

Em termos de sensibilidade, o detector de ultravioleta - varredura de foto-diodos, quando comparado com o detector de fluorescência, é bem menos sensível, sendo que a sensibilidade do primeiro está na faixa de nanograma e do segundo na faixa de picograma. Já o detector de massa apresenta sensibilidade semelhante à do fluorescência.

Até o presente momento, não há dados disponíveis na literatura sobre a utilização de CLAE acoplado ao detector de varredura de foto-díodos para a confirmação de HPAs em óleos vegetais ou outro alimento.

2.9- LEGISLAÇÃO

De acordo com países como Alemanha, Áustria e Polônia, o teor máximo de B(a)P permitido em carnes defumadas é de 1 µg/Kg (LARSSON et alii, 1987).

A Finlândia, por outro lado, se utiliza de um controle indireto do limite máximo de B(a)P nos alimentos defumados. O uso de fumaça como aditivo é restrito a 30 µg/Kg e após a aplicação, o resíduo de B(a)P deve ser no máximo de 0,5 µg/Kg (WALKER, 1977).

A legislação da Austrália diz que aromatizantes de fumaça deverão ser isentos de qualquer HPA (WALKER, 1977).

Com relação a óleos vegetais, não existe na legislação brasileira limite máximo para B(a)P, ou de outro hidrocarboneto poliaromático.

Também, não se tem conhecimento de legislação específica para óleos e gorduras em outros países.

A única exceção é a indústria de alimentos da Alemanha, que recomenda seus próprios limites para óleos e gorduras. A soma dos resíduos de fenantreno, antraceno, benzo(a)antraceno, criseno, benzo(a)pireno, perileno, benzo(ghi)perileno, dibenzo(a,h)antraceno e coroneno, não devem exceder a 25 µg/Kg, enquanto que a soma dos HPAs pesados deve permanecer abaixo de 5 µg/Kg (SPEER, et alii, 1990).

2.10- AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA DO B(A)P

O benzo(a)pireno, assim como outros HPAs, já foi submetido a estudos toxicológicos pelo IARC (International Agency Research on Cancer), existindo suficiente evidência de que se trata de um carcinógeno para animais de laboratório, representando, portanto, um risco à saúde humana (IARC, 1983).

Em 1991, em sua 37ª Reunião, o JECFA (Joint Expert Committee on Food Additives and Contaminants) conduziu uma avaliação toxicológica do B(a)P, tendo sido analisados resultados de estudos crônicos conduzidos em ratos expostos ao B(a)P por via oral. Diferentes efeitos tóxicos foram evidenciados, tendo-se concluído que o efeito toxicológico mais significante era a atividade carcinogênica. Também este Comitê sugeriu um série de medidas no sentido de se minimizar o máximo possível a contaminação de B(a)P e outros HPAs em alimentos (WHO, 1991), medida esta recomendada também por outros autores (VAN HEDDEGHEM, 1980; WALKER, 1977; WHO, 1991).

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1- AMOSTRAS

Foram analisados os seguintes óleos vegetais disponíveis no comércio:

- óleo de alho
- óleo de arroz
- óleo de canola
- óleo de girassol
- óleo de milho
- óleo de palma (azeite de dendê)
- óleo de soja
- azeite de oliva

A amostragem variou para cada tipo de óleo e dentro do tipo de óleo, para cada marca. As amostras foram adquiridas em diferentes supermercados em diferentes épocas do ano. Em geral, dependendo da maior ou menor facilidade de se encontrar determinada marca de óleo, foram tomadas amostras em triplicatas, e as amostras foram analisadas em duplicatas.

Amostras de óleo de soja e milho (bruto, degomado, clarificado e desodorizado) e de solvente (hexana nova e reprocessada) foram coletadas durante o processo de refino. Foram ainda analisados óleos usados em frituras, obtidos em restaurante e pastelaria.

As amostras de grãos de soja e de milho (secos e não-secos) foram trituradas em um liquidificador à prova de explosão, com a adição de gelo seco moído. Os grãos moídos foram peneirados e armazenados em freezer, para posterior análise.

3.2- EQUIPAMENTOS

bomba de cromatografia líquida Waters 6000A

injetor com loop de 10 μ l Valco AH 60
forno para coluna Waters 1122
detector de varredura de foto-diodos Waters 991
detector de fluorescência Varian Fluorichrom II
lâmpada deutério
filtro de excitação: 220 I
filtro de emissão : 4-76
integrador Waters 746 Data Module
balança analítica Metler H31 AR
balança técnica Metler PC 400
chapa de aquecimento Nuova II
agitador rotativo Scientific Manufacturing Industries

3.3- MATERIAL DE CONSUMO

coluna de CLAE C18 (ODS) 25cm x 4,6 mm d.i., 5 μ m,
Applied Biosystems (Brownlee columns). Part number
0712-0019.
pré-coluna para CLAE C18 (ODS), 4cm x 8mm d.i.
acetonitrila grau CLAE (art 14291 Merck)
água grau CLAE, Barsted nanopure system
ciclohexano (art 9666 Merck) destilado em coluna de vidro
benzo(a)pireno (art B 1760 Sigma) 98%
dimetilformamida (art 21501 Merck) destilada em
coluna de vidro
sílica gel 70-230 mesh (art 7734 Merck)
sulfato de sódio anidro (art 6649 Merck)

3.4- VIDRARIA

balão fundo redondo, junta 24/40, cap. 250 e 500 mL
becker de 50, 250, 500, 1000 e 2000 mL
coluna de vidro com torneira de teflon, 21 x 1.1cm
d.i. com reservatório de 8 x 3.1cm d.i.
condensador tipo dedo frio
destilador com coluna tipo vigreux

funil de separação tipo bola cap. 250 e 500 mL
microseringa Kloehe 100 µL
pipeta pasteur
provetas de 10, 100, 500 e 1000 mL

3.5- CURVA DE CALIBRAÇÃO

Foram pesados cerca de 10,0 mg de B(a)P e dissolvidos para 100 mL com tolueno em balão volumétrico. Essa solução estoque foi diluída com acetonitrila, obtendo-se as seguintes concentrações de B(a)P : 0,105; 0,063 ; 0,021 ; 0,0105 ; 0,0021; 0,0011 µg/mL. Todas as soluções foram mantidas sob refrigeração.

A curva de calibração foi obtida injetando-se 10 µL de B(a)P nas concentrações acima especificadas no sistema cromatográfico devidamente estabilizado, que consistia de um fluxo de 0,7 mL/min da mistura acetonitrila : H₂O (8 : 2, v/v) em coluna C18, 25 cm x 4,6 mm d.i., pré-coluna C18 4cm x 8mm d.i., a uma temperatura de 32°C.

3.6- AVALIAÇÃO DA METODOLOGIA E CONTROLE DE QUALIDADE ANALÍTICA

Para se avaliar a metodologia, foram realizados três níveis de fortificação, a saber: 5,2 ; 10,5 e 21,0 µg/Kg de B(a)P.

Para o controle de qualidade analítica da metodologia empregada foram realizadas várias fortificações durante a análise das amostras. De maneira geral, a fortificação foi feita em uma entre 5 amostras analisadas.

3.7- SENSIBILIDADE E REPETIBILIDADE DA METODOLOGIA

Para se estimar a sensibilidade do método foram realizadas fortificações a níveis de 1,0 e 0,5 µg/Kg. Procurou-se trabalhar com uma sensibilidade do detector e com um volume final

da amostra (no caso 2 mL) que proporcionassem boa estabilidade de linha de base e baixo ruído.

A repetibilidade da metodologia foi testada em uma amostra de óleo de milho analisada em quadruplicata.

3.8- RECUPERAÇÃO

Foram realizados testes de fortificação em todos os óleos analisados, adicionando-se quantidades conhecidas de B(a)P variando entre 0,5 a 10,5 µg/Kg.

Com base nas diversas fortificações realizadas, as recuperações foram calculadas da seguinte forma:

$$\% \text{ recuperação} = \frac{\mu\text{g/Kg encontrado}}{\mu\text{g/Kg adicionado}} \times 100$$

OBS: nas amostras contaminadas com B(a)P, o teor determinado foi descontado para o cálculo da % de recuperação.

3.9- METODOLOGIA

O procedimento de extração utilizado no presente trabalho foi basicamente aquele proposto por SPEER et alii (1990), que modificaram o método de GRIMMER & BOHNKE (1975), utilizando menores quantidades de amostra e, conseqüentemente, de solventes. As etapas utilizadas estão descritas a seguir.

3.9.1- EXTRAÇÃO

3.9.1.1- ÓLEOS VEGETAIS

Pesar 10,0 g de óleo vegetal em um becker de 250 mL. Adicionar 50 mL de ciclohexano e transferir o material para um

funil de separação de 250 mL. Lavar o beker novamente com 50 mL de ciclohexano e transferir para o funil de separação (as fortificações devem ser feitas neste ponto).

Extrair os HPAs com 3 porções de 50, 25 e 25 mL de dimetilformamida:H₂O (9:1, v/v), e diluir o extrato com 100 mL de sulfato de sódio 1%. Reextrair com porções de 50, 35 e 35 mL de ciclohexano. Lavar a fase de ciclohexano duas vezes com 40 mL de H₂O. Secar com sulfato de sódio anidro (cerca de 5 g) e concentrar para um volume final de 2 mL em evaporador rotativo, em banho à temperatura de 40 °C.

3.9.1.2- HEXANA

Medir 20,0 mL de hexana e evaporar em evaporador rotativo à 40°C até quase a secura.

3.9.1.3- GRÃOS DE SOJA E MILHO

Pesar 20,0 g do grão moído e transferir para erlenmeyer de 250 mL. Adicionar 50 mL de ciclohexano e agitar em agitador recíproco por 30 minutos. Filtrar em funil de placa porosa com papel de filtro e repetir a operação com mais 50 mL de ciclohexano. Juntar as duas frações e concentrar para um volume final de 2 mL em evaporador rotativo à vácuo, em banho à temperatura de 40°C.

3.10- LIMPEZA EM COLUNA DE SÍLICA GEL

3.10.1- DESATIVAÇÃO DA SÍLICA GEL

Pesar 87 g de sílica gel fresca e adicionar 13 mL de H₂O. Deixar repousar por uma noite em frasco fechado antes do uso.

3.10.2- PREPARAÇÃO DA COLUNA DE SÍLICA GEL E LIMPEZA

Transferir 5 g de sílica gel desativada (13% água) para uma coluna de vidro com as seguintes dimensões: 21 x 1,1 cm d.i. com torneira de teflon e reservatório de 8 x 3,1 cm d.i. Eluir o extrato (2 mL) com 85 mL de ciclohexano em um balão de 250 mL, descartando-se os primeiros 10 mL. Concentrar a fração de 10-85 mL em evaporador rotativo a uma temperatura de 40°C até quase a secura. O resíduo é seco sob pequeno fluxo de nitrogênio. Adicionar ao balão 2 mL de acetonitrila, e transferir para um frasco de 2 mL. Armazenar em freezer.

3.11- DETERMINAÇÃO CROMATOGRAFICA

Injetar 10 µL do extrato final (2 mL) e dos padrões no sistema cromatográfico previamente estabilizado, como descrito anteriormente (item 3.5).

A concentração de B(a)P foi calculada através da seguinte equação, utilizando-se uma curva de calibração para a obtenção da reta (padronização externa):

$$B(a)P \text{ (}\mu\text{g/Kg)} = \frac{C \times V}{M} \times 1000$$

onde: C é a concentração de B(a)P obtida através da curva de regressão linear

V é o volume final

M é a massa da amostra em gramas

Os esquemas de extração e limpeza das amostras são apresentados, respectivamente, nas figuras 4 e 5.

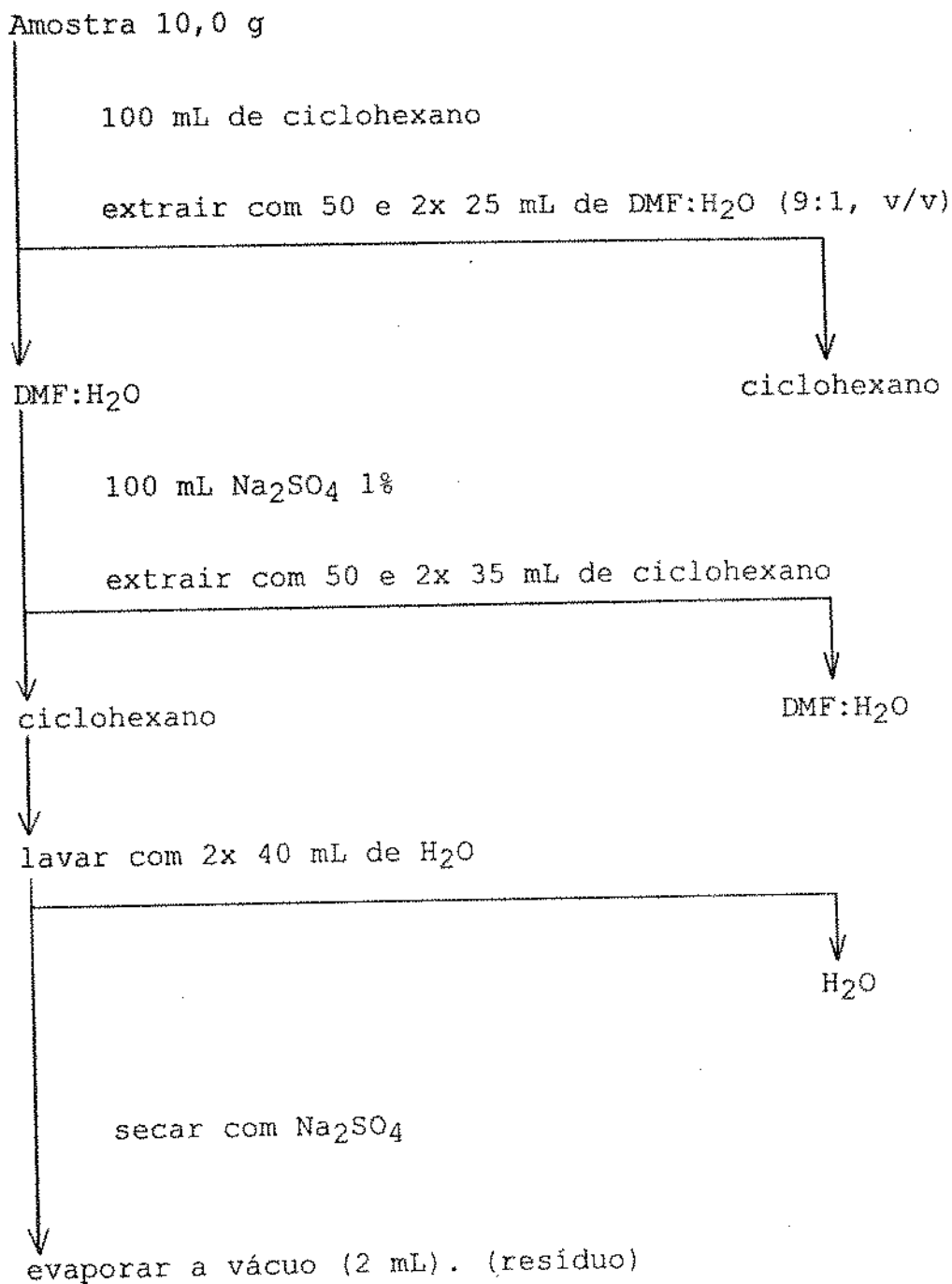


Figura 4. Fluxograma de extração de HPAs para óleos vegetais (SPEER et alii, 1990).

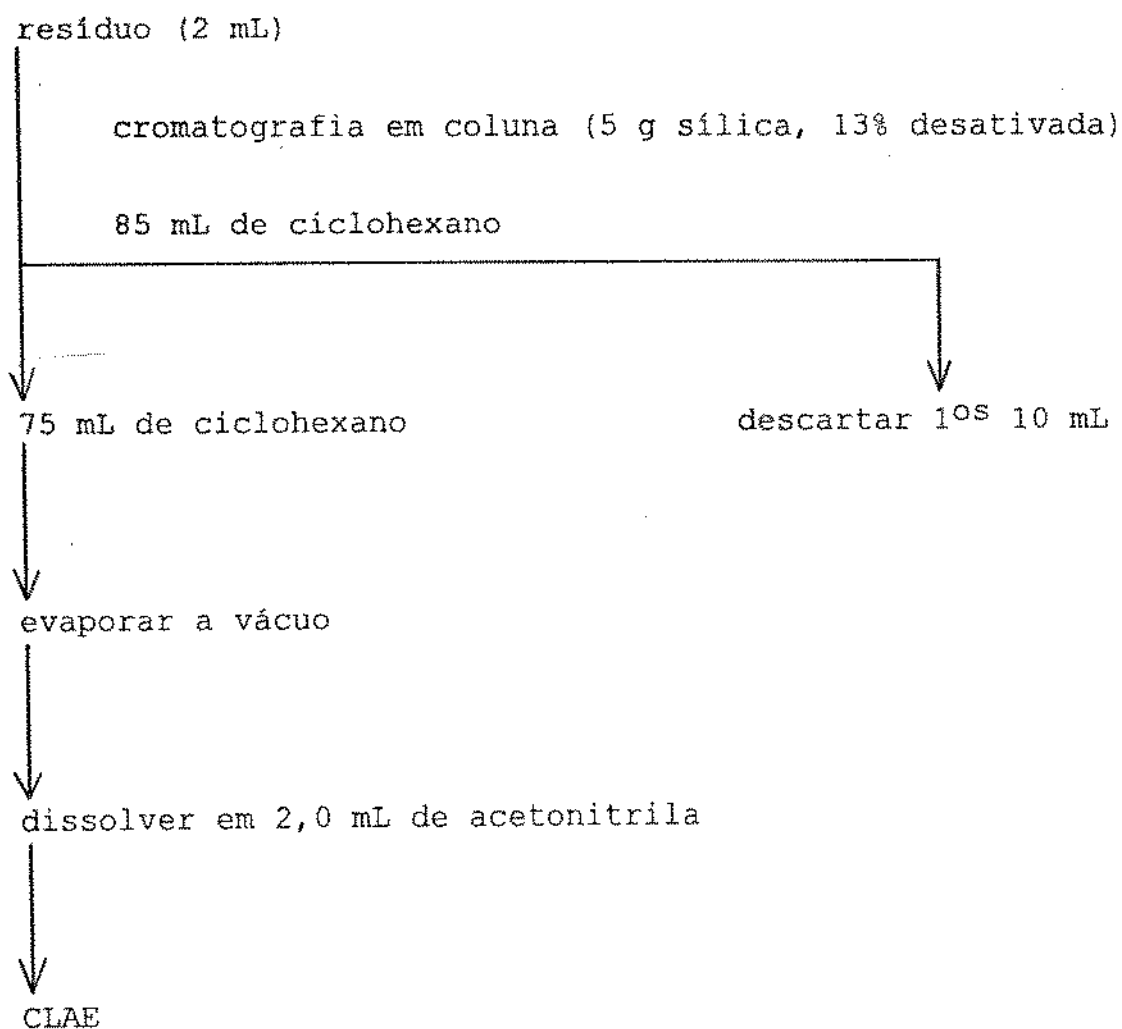


Figura 5. Fluxograma de limpeza da amostra de óleo vegetal (SPEER et alii, 1990).

3.12- CUSTOS DOS REAGENTES POR ANÁLISE

A fim de se ter uma idéia do custo real por análise, foi realizado um levantamento do preço dos reagentes utilizados. Os valores apresentados estão em dólar americano (US\$). O consumo de cada reagente foi estimado segundo a metodologia utilizada para um total de 10 amostras analisadas simultaneamente.

4- RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1- AVALIAÇÃO DO "BRANCO"

Antes de se iniciar o trabalho com as amostras de óleo, foram feitas análises do "branco" (sem a presença do óleo vegetal) para verificar a presença de impurezas, provenientes dos solventes de extração, ciclohexano e dimetilformamida, que pudessem interferir na determinação do B(a)P.

Com relação a estes solventes, foi constatada a presença de impurezas com tempos de retenção próximos ao do B(a)P. Este problema foi eliminado com a destilação dos solventes, e um novo "branco" foi avaliado, não tendo sido detectado o aparecimento de picos no tempo de retenção do B(a)P (ver figura 6). Mesmo assim, foram observados picos na parte inicial do cromatograma, que não interferiram na quantificação do B(a)P nas amostras de óleo.

4.2- MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO

O método utilizado para a quantificação do B(a)P foi o da padronização externa. A curva de calibração obtida (Figura 7) mostrou-se linear dentro das concentrações de trabalho (0,0011 a 0,105 µg/mL), o que possibilitou a análise das amostras numa faixa de concentração relativamente ampla. Para as amostras que apresentaram concentrações de B(a)P fora da faixa de trabalho, foi necessário se proceder às correspondentes diluições.

4.3- LIMPEZA DAS AMOSTRAS

Dentre as possíveis alternativas citadas na revisão de literatura, optou-se pela utilização da sílica gel, devido a sua disponibilidade no laboratório. Para se determinar a recuperação

analítica da metodologia proposta utilizando-se sílica gel, foram realizados vários testes com sílica ativada a várias temperaturas,

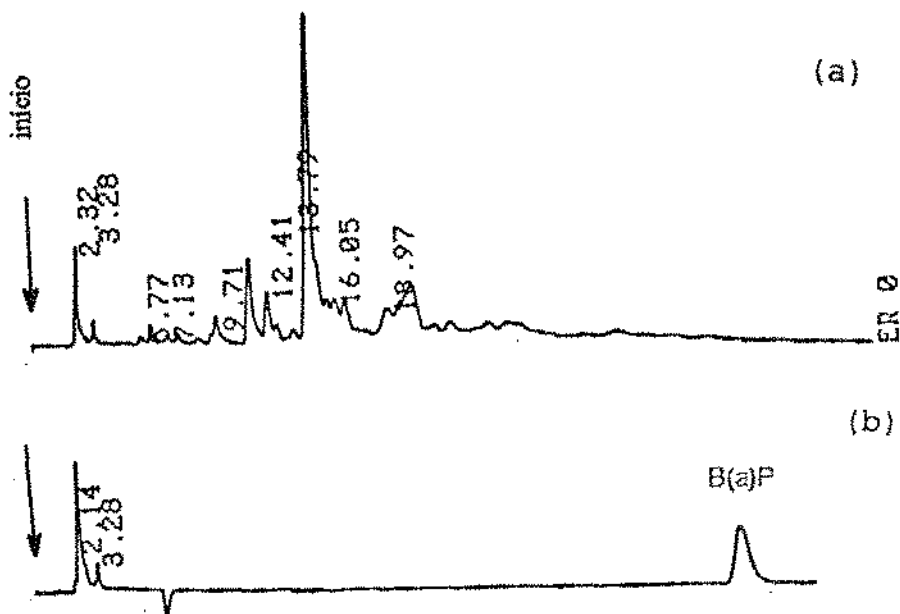


Figura 6. Cromatograma por CLAE com detector de fluorescência (a) "branco" e (b) padrão de B(a)P. Coluna ODS, 25cm x 4,6mm d.i., fase móvel acetonitrila:H₂O (8:2), vazão 0,7 mL/min.

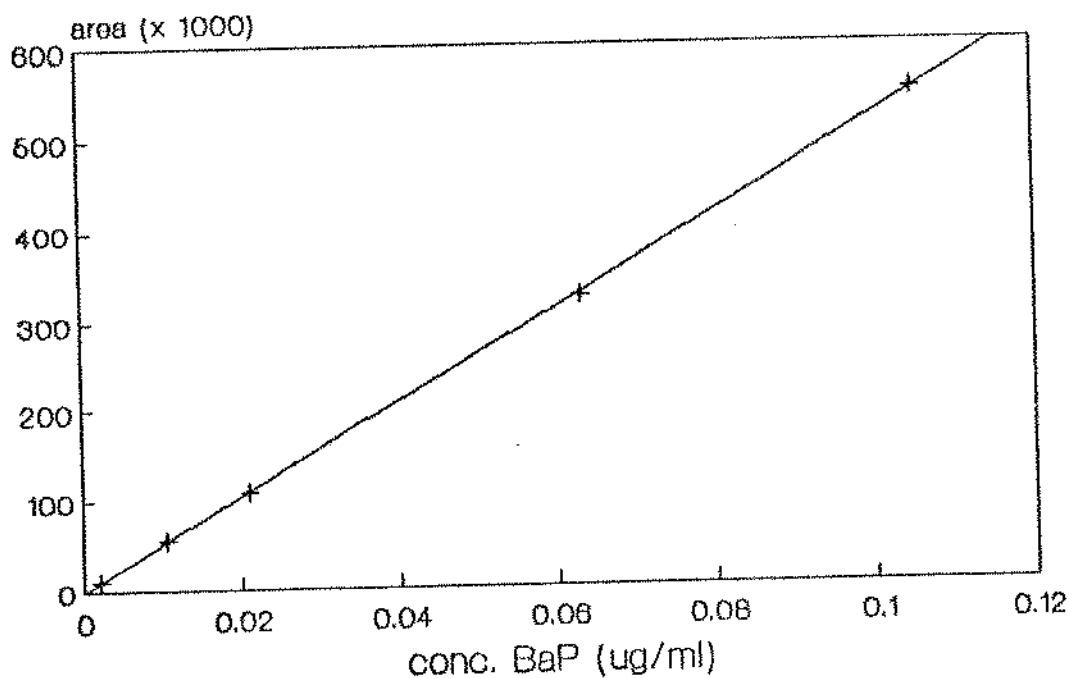


Figura 7. Curva de calibração do B(a)P, utilizando CLAE com detector de fluorescência.

sílica fresca (retirada diretamente do frasco sem qualquer tratamento) e sílica desativada em diferentes graus. Os melhores resultados de recuperação para o B(a)P foram obtidos com a sílica fresca, desativada com 13% H₂O.

4.4- AVALIAÇÃO DA METODOLOGIA E CONTROLE DE QUALIDADE ANALÍTICA

Os resultados obtidos para a validação da metodologia (Tabela 6) mostraram-se bastante satisfatórios, com média de 97,2% de recuperação e coeficiente de variação de 7,6%.

Também durante o transcorrer das análises, os resultados dos testes de recuperação, realizados com diferentes óleos, evidenciaram a confiabilidade da metodologia empregada (Tabela 7).

Tabela 6. Valores de fortificação e recuperação de B(a)P em óleo de milho.

Fortificação B(a)P (µg/Kg)	Recuperação (%)
5,2	105,3
5,2	88,4
10,5	98,9
10,5	106,0
21,0	92,2
21,0	92,4
média ($\bar{X}$)	= 97,2%
desvio padrão (d.p.)	= 7,4%
coeficiente de variação (c.v.)	= 7,6%

Tabela 7. Resultados de testes de recuperação de B(a)P conduzidos com amostras de diferentes óleos.

Fortificação B(a)P (µg/Kg)	Recuperação %	Fortificação B(a)P (µg/Kg)	Recuperação %
10,5	78,5	5,2	123,1
10,5	100,1	5,2	73,1
10,5	70,4	5,2	80,9
10,5	71,2	5,2	91,9
5,2	89,3	5,2	77,6
5,2	93,3	5,2	77,9
5,2	104,7	5,2	97,6
5,2	106,5	5,2	97,5
5,2	113,9	5,2	94,7
5,2	109,5	5,2	91,7
5,2	82,7	5,2	76,1
5,2	76,7	5,2	89,3
5,2	84,4	5,2	84,4
5,2	79,3	3,1	109,8
5,2	103,2	3,1	105,5
5,2	107,6	3,1	98,4
5,2	84,5	3,1	83,2
5,2	87,5	1,0	115,7
5,2	100,2	1,0	114,3
5,2	99,1	1,0	106,8
5,2	92,7	1,0	97,8
5,2	88,9	0,5	77,4
5,2	95,4	0,5	80,3

média ($\bar{X}$) = 92,7%
desvio padrão (d.p.) = 13,3%
coeficiente de variação (c.v.) = 14,3%

4.6- SENSIBILIDADE DO MÉTODO

Nas condições escolhidas, foi estimado um limite de detecção de 0,5 µg/Kg para o B(a)P. Valores inferiores a 0,5 µg/Kg poderiam ser obtidos aumentando-se 5 vezes a sensibilidade do detector, por exemplo, ou ainda diminuindo o volume final para 0,5 ou 1,0 mL. Neste caso, porém, a linha de base era prejudicada, como consequência de um aumento do ruído, dificultando a quantificação do B(a)P. Este valor (0,5 µg/Kg) é bastante razoável, uma vez que nos países onde existe legislação quanto à presença de B(a)P em alimentos, o limite estabelecido é de 1 µg/Kg.

4.7- REPETIBILIDADE DA METODOLOGIA

Os dados relativos à repetibilidade do método podem ser vistos na tabela 8, e indicam que a metodologia empregada apresenta uma precisão muito boa (c.v.= 2,2%).

Tabela 8. Reprodutibilidade da determinação de benzo(a)pireno em óleo de milho.

Amostra	B(a)P (µg/Kg)
1	4,5
2	4,3
3	4,3
4	4,4
média ($\bar{X}$)	= 4,4
desvio padrão (d.p.)	= 0,1
coeficiente de variação (c.v.)	= 2,2%

4.8- ALTERAÇÕES NAS CONDIÇÕES DA ANÁLISE CROMATOGRÁFICA

A maioria das análises foi realizada nas condições citadas em Material e Métodos. Algumas modificações, entretanto, foram feitas, principalmente para os óleos de milho, azeites e para as hexanas. Isto foi necessário devido à presença de picos vizinhos ao do B(a)P. Nestes casos, para uma melhor separação dos picos, o fluxo da fase móvel foi diminuído para 0,6 ou 0,5 mL/min., o que possibilitou uma melhor resolução e, conseqüentemente, a quantificação do B(a)P.

4.9- CONFIRMAÇÃO DA IDENTIDADE DO B(a)P

A confirmação da identidade do pico de B(a)P foi feita utilizando-se um detector de varredura de fotodiodos. As condições de trabalho utilizadas foram as mesmas do sistema com o detector de fluorescência, com exceção do volume de injeção que foi de 100 µL, devido à menor sensibilidade do detector de varredura de fotodiodos. Obtido o pico correspondente ao B(a)P, a varredura do espectro foi feita entre 200 e 400 nm, no início, meio e fim do pico, para a averiguação da possível presença de coeluentes (ver figura 8). Através do cromatograma obtido e comparação com o padrão, foi concluído que o pico em questão correspondia ao B(a)P.

Embora a literatura se refira quase que exclusivamente ao emprego do detector de massa para a confirmação da identidade dos HPAs, no presente estudo deu-se preferência à utilização do detector de varredura de fotodiodos, em função da não necessidade de se alterar as condições de análise já estabelecida. Além disso, o perfil do cromatograma obtido na cromatografia líquida é bastante diferente daquele que se obtém na cromatografia gasosa capilar, o que dificulta a correlação de picos correspondentes ao composto que se quer confirmar.

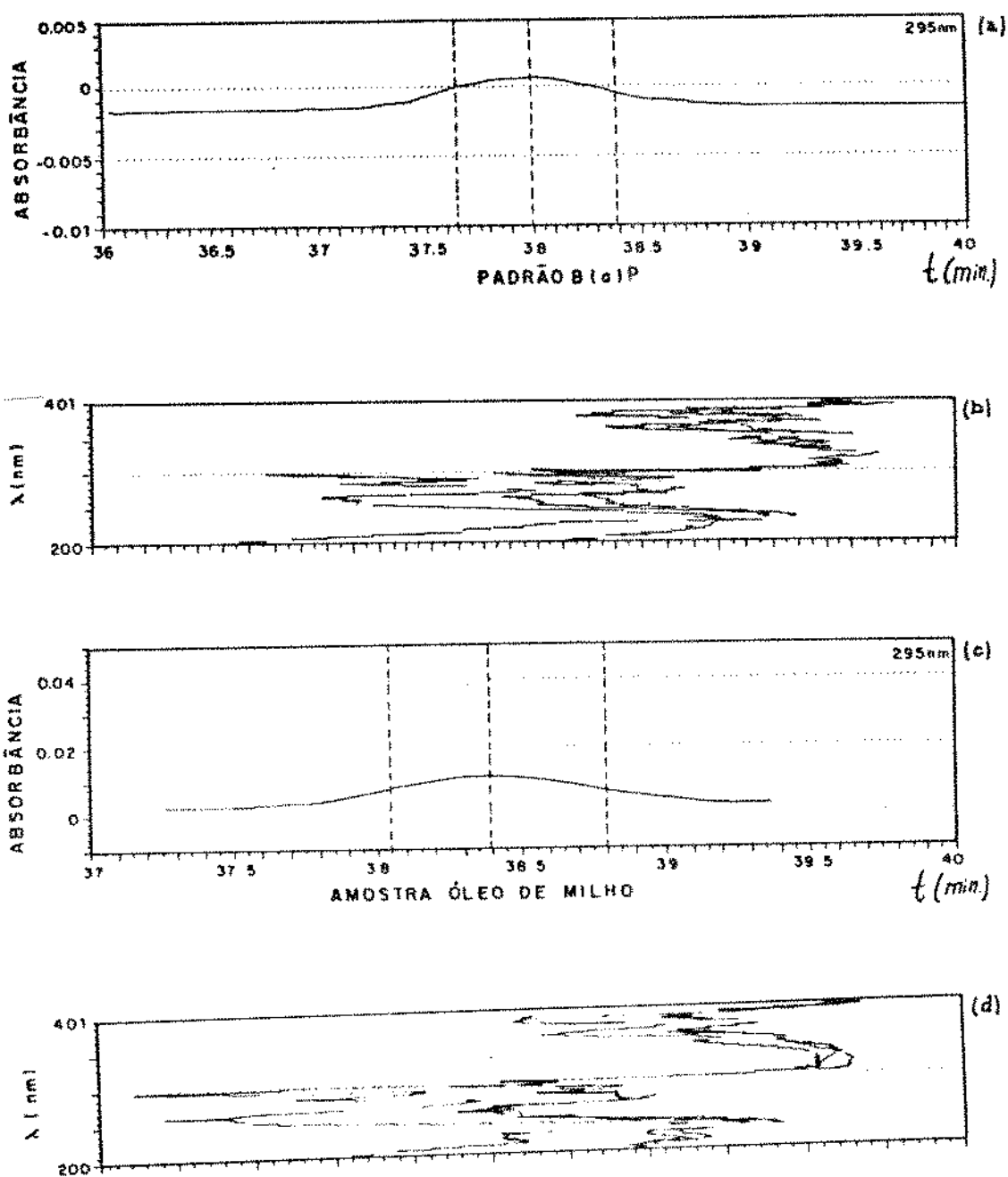


Figura 8. (a) cromatograma por CLAE do padrão de B(a)P com detector UV a 295 nm; (b) varredura do espectro do padrão de B(a)P entre 200 e 400 nm, no início meio e fim do pico; (c) cromatograma de CLAE com detector de UV a 295 nm do pico de B(a)P em amostra de óleo de milho; (d) varredura do espectro do pico do B(a)P entre 200 e 400 nm em amostra de óleo de milho.

Embora a sensibilidade do detector de varredura de fotodiodos seja relativamente menor, a injeção de um volume maior de amostra elimina este problema.

4.9- BENZO(A)PIRENO EM ÓLEOS VEGETAIS

Os vários tipos de óleos analisados apresentaram teores de B(a)P variando entre quantidades não detectáveis ($< 0,5 \mu\text{g/Kg}$) até níveis bastante elevados.

Os resultados da análise de B(a)P nos óleos comerciais estão listados nas tabelas 9 a 11.

Tabela 9. Teores de benzo(a)pireno ($\mu\text{g/Kg}$) em óleos de milho comerciais.

Marca	Amostras*					$\bar{X}$
	a	b	c	d	e	
1	4,4	4,3	2,4	4,4	2,6	3,6
2	58,9	22,5	10,6	27,5	3,7	24,7
3	8,3	7,9	5,0	6,2	4,7	6,4
4	20,0	15,2	12,1	10,2	11,5	13,8
5	12,3	1,6	5,9	5,6	1,6	5,4
						$\bar{X} = 10,8$

* os valores são média de duas repetições.

Tabela 10. Teores de benzo(a)pireno ($\mu\text{g/Kg}$) em óleos de soja refinados.

Marca	Amostras*					$\bar{X}$
	a	b	c	d	e	
1	3,8	2,1	1,3	1,5	1,6	2,1
2	1,6	0,5	n.d.	n.d.	-	0,5
3	3,1	1,0	1,1	-	-	1,7
4	0,8	0,9	1,4	-	-	1,0
5	3,1	1,2	1,1	-	-	1,4
6	1,4	1,3	1,4	-	-	1,4
7	1,2	1,1	1,0	-	-	1,1
8	2,2	1,8	1,9	-	-	2,0
9	1,5	1,5	1,3	-	-	1,4
10	n.d.	n.d.	n.d.	-	-	
11	4,5	-	-	-	-	
12	6,1	-	-	-	-	
13	4,2	-	-	-	-	
14	3,0	-	-	-	-	
15	1,4	-	-	-	-	
16	0,9	-	-	-	-	

$\bar{X} = 2,2$

* os valores são média de 2 repetições

n.d.: não detectado ($< 0,5 \mu\text{g/Kg}$)

- : não disponível

Tabela 11. Teores de benzo(a)pireno ($\mu\text{g/Kg}$) em vários tipos de óleos refinados.

Óleo	Marca	Amostras*				$\bar{X}$
		a	b	c	d	
girassol	1	n.d.	n.d.	n.d.	0,7	0,2
	2	0,6	1,1	n.d.	n.d.	0,4
	3	1,0	2,2	-	-	1,6
	4	n.d.	-	-	-	
arroz	1	1,6	0,9	2,3	3,5	2,1
	2	1,1	0,7	2,2	2,5	1,6
canola	1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
dendê	1	n.d.	n.d.	-	-	
	2	6,2	-	-	-	
alho	1	n.d.	-	-	-	

* os valores são média de duas repetições

n.d.: não detectado ($< 0,5 \mu\text{g/Kg}$)

- : não disponível

Os teores de B(a)P em óleo de milho variaram entre 1,6 e 58,9 µg/Kg. Entre as 5 marcas analisadas, duas se mostraram bastante contaminadas, com valores médios de 24,7 e 13,8 µg/Kg, e as demais também apresentaram níveis de contaminação relativamente altos.

Comparando-se com dados da literatura, os óleos de milho apresentaram, em geral, teores de B(a)P superiores aos detectados em outros países (0,02 a 26,1 µg/Kg, tabela 5).

Entre as marcas e os diversos lotes analisados de óleo de milho, observaram-se variações grandes quanto ao nível de B(a)P. Este fato pode estar associado à origem do óleo bruto, já que algumas fábricas apenas refinam o óleo, adquirindo-o de diferentes fornecedores, inclusive do exterior.

Os níveis de B(a)P encontrados em óleos de soja foram inferiores aos observados em óleos de milho, variando entre não detectado (n.d.) e 6,1 µg/Kg. Pode-se observar pela tabela 11 que a maioria das amostras apresentou teores de B(a)P entre 1 e 2 µg/Kg, sendo que as amostras 11, 12 e 13 foram as que apresentaram maiores níveis de contaminação.

Comparando-se os níveis obtidos para óleo de soja com dados disponíveis na literatura para o mesmo óleo, verifica-se que os teores de B(a)P nos óleos de soja nacionais (0,5 a 6,1 µg/Kg) estão dentro da faixa de contaminação normalmente descrita na literatura (0,2 a 5,39 µg/Kg) .

Entretanto, eventuais níveis elevados tem sido citados pela literatura. KOLAROVIC & TRAITLER (1982) detectaram nível de 28,45 µg/Kg de B(a)P em óleo de soja, atribuindo esta elevada contaminação à influência do processo industrial, armazenamento e meio ambiente.

O óleo de girassol apresentou teores de B(a)P que variaram entre n.d. e 2,2 µg/Kg. Considerando-se os valores citados por diversos autores para óleo de girassol (n.d. a 10,6 µg/Kg), os teores encontrados nos óleos analisados evidenciam uma contaminação relativamente mais baixa para este tipo de óleo no Brasil.

Níveis entre 0,7 e 3,5 µg/Kg de B(a)P foram detectados em óleo de arroz, com valor médio de 1,9 µg/Kg (Tabela 10). Como não se encontrou dados na literatura sobre a contaminação de óleo de arroz por HPAs, não foi possível se fazer uma comparação com os valores encontrados no presente trabalho.

Em óleo de canola (Tabela 10) não foi detectada a presença de B(a)P (< 0,5 µg/Kg). O baixo nível de contaminação deste óleo poderia ser justificado face ao fato do mesmo ser importado de um país mais desenvolvido, no caso o Canadá, onde existe um maior controle de qualidade durante o processamento de alimentos. No caso da refinação de óleos vegetais, por exemplo, é bem provável que as indústrias canadenses utilizem carvão ativado durante a etapa de clarificação. O emprego desta técnica, embora reduza o nível de contaminação por HPAs, eleva substancialmente o custo do produto final, o que poderia ser um dos motivos do alto preço deste tipo de óleo no mercado nacional. Dados da literatura indicam, em geral, níveis de contaminação mais elevado para este tipo de óleo (tabela 5).

Uma das amostras de azeite de dendê (óleo de palma) não apresentou B(a)P, enquanto que a outra, representada por azeite de dendê misto com 50% de óleo de soja, apresentou um teor de B(a)P de 6,2 µg/Kg. Este nível relativamente maior de B(a)P na amostra mista de azeite de dendê com óleo de soja sugere a contaminação do óleo de soja por HPAs. A literatura sobre a contaminação deste tipo de óleo é bastante escassa, e não especifica se se trata de óleo puro ou não.

Em uma amostra de óleo de alho, composto com 50% de óleo de girassol, não foi detectada a presença de B(a)P. Neste caso, devido à pouca disponibilidade deste óleo no comércio, analisou-se apenas uma amostra.

Como os óleos vegetais são em geral usados para fritura, investigou-se paralelamente a contaminação de óleos já processados, principalmente aqueles utilizados para frituras em pastelarias e restaurantes.

Os teores de B(a)P encontrados em amostras de óleo de soja previamente usados em frituras estão apresentados na tabela 12. As amostras A e B são provenientes de um restaurantes enquanto que a amostra "C" é proveniente de uma pastelaria. A amostra "A" se refere a um óleo com apenas 2 dias de uso na fritadeira, e a amostra "B", um óleo com um tempo de uso muito longo (aproximadamente 6 meses). A amostra "C" foi coletada após o final de uma feira, onde este óleo foi aquecido por pelo menos 6 horas para a fritura de pastel e outros salgadinhos.

Tabela 12. Teores de benzo(a)pireno em óleos de soja usados.

Amostras	Concentração de B(a)P* (µg/Kg)
A	2,5
B	1,7
C	0,7

* os valores são média de duas repetições

A : óleo com 2 dias de uso

B : óleo com 6 meses de uso

C : óleo com 6 horas de uso

Considerando-se como teor de B(a)P em óleo de soja não aquecido o valor médio de 2,2 µg/Kg (tabela 11), observa-se que não ocorreu um aumento no teor deste hidrocarboneto após uso contínuo. Na verdade, ocorreu aparentemente uma redução dos níveis, o que pode ser devido ao efeito da luz, já que os HPAs sofrem oxidação nestas condições, ou então pela absorção deste composto pelo alimento.

Dados da literatura confirmam esta redução: BORNEFF & FABIAN (1966), citados por SWALLOW (1976), detectaram um decréscimo de 70% no teor de HPAs em óleos e gorduras vegetais durante aquecimento controlado.

4.10- BENZO(A)PIRENO EM AZEITES

Quanto aos azeites, observou-se uma grande variabilidade no teor de B(a)P. Como pode ser visto na tabela 13, os níveis encontrados variaram entre n.d. e 164,4 µg/Kg.

Esta amplitude de valores pode ser atribuída principalmente à origem desses azeites e a sua composição. Os azeites provenientes da Europa e embalados na origem, como as marcas 1, 7 e 10, apresentaram teores de B(a)P próximos aos citados pela literatura (0,5 a 1,2 µg/Kg). Os azeites importados da Europa, porém embalados no Brasil (marcas 2, 3, 4, 5, 8 e 17), apresentaram teores variáveis (n.d a 9,7 µg/Kg), em geral superiores aos encontrados nos óleos embalados no exterior.

Em azeites mistos, ou seja, aqueles que são misturados com óleo de soja (marcas 14 e 15) e óleo de milho (marca 16), determinaram-se teores de B(a)P variando entre 2,2 e 9,2 µg/Kg. No azeite misto com 30% de azeite de oliva (marca 16) já era esperado um valor elevado de B(a)P, pois o óleo de milho utilizado na sua composição corresponde à marca 2 (Tabela 9), que apresentou elevada contaminação (média de 24,7 µg/Kg).

Tabela 13. Teores de benzo(a)pireno ($\mu\text{g/Kg}$) em azeite de oliva.

Marcas	Amostras*			$\bar{X}$
	a	b	c	
1	0,6	n.d.	n.d.	0,2
2	7,1	1,5	2,7	3,8
3	n.d.	n.d.	n.d.	
4	1,1	0,9	0,9	1,0
5	9,7	3,8	2,3	5,3
6	1,8	164,4	154,7	107,0
7	n.d.	1,2	-	0,6
8	4,3	n.d.	-	2,2
9	18,0	10,3	-	14,2
10	n.d.	n.d.	-	
11	n.q.	n.q.	-	
12	n.d.	0,5	-	0,2
13	n.d.	n.d.	-	
14	2,3	2,4	3,4	2,8
15	2,2	2,3	-	2,3
16	9,2	9,1	-	9,2
17	n.d.	-	-	
				$\bar{X} = 10,9$

* os valores são média de duas repetições

n.d.: não detectado ($< 0,5 \mu\text{g/Kg}$)

n.q.: não quantificado (pico coeluído)

- : não disponível

Com teores de B(a)P entre n.d. e 164,4 µg/Kg, os azeites argentinos também apresentaram níveis variados de contaminação, como pode ser visto pelas amostras 6, 9, 12 e 13, da tabela 13. A amostra 11, também de origem argentina, foi a única que apresentou pico coeluído com o B(a)P e, portanto, não foi possível a sua quantificação, mesmo alterando-se as condições cromatográficas.

A figura 9 apresenta os cromatogramas correspondentes a azeites de oliva de diferentes origens. No início do cromatograma pode-se observar picos correspondentes aos HPAs leves, o que provavelmente se deve ao fato deste tipo de óleo não ser refinado e, portanto, não existir a etapa de desodorização, que normalmente elimina estes HPAs. Altos teores de HPAs leves como fenantreno, antraceno, benzo(a)antraceno, pireno e fluoranteno têm sido detectados em azeites vegetais (CIUSA et alii, 1970; MARIANI & FEDELI, 1984; SPEER et alii, 1990 e MENICHINI et alii, 1991a).

De acordo com a literatura (Tabela 5), a detecção de B(a)P em azeites de oliva tem sido em níveis baixos (n.d. a 2,2 µg/Kg). No entanto, os azeites embalados no Brasil e algumas marcas provenientes da Argentina apresentaram teores bem mais elevados, sugerindo, como discutido anteriormente, a sua contaminação através da adição de outros óleos vegetais, tais como soja.

Nos azeites embalados no Brasil e nos argentinos foram determinadas concentrações de B(a)P que variaram entre n.d. e 164,4 µg/Kg. Embora declarado no rótulo que se trata de azeite puro, acredita-se que estes azeites estejam sendo adulterados com óleo de soja ou milho contaminados por HPAs. Adulterações de azeite de oliva com óleos de soja, babaçú e coco já foram relatados por SOARES & AMAYA (1981) no Brasil.

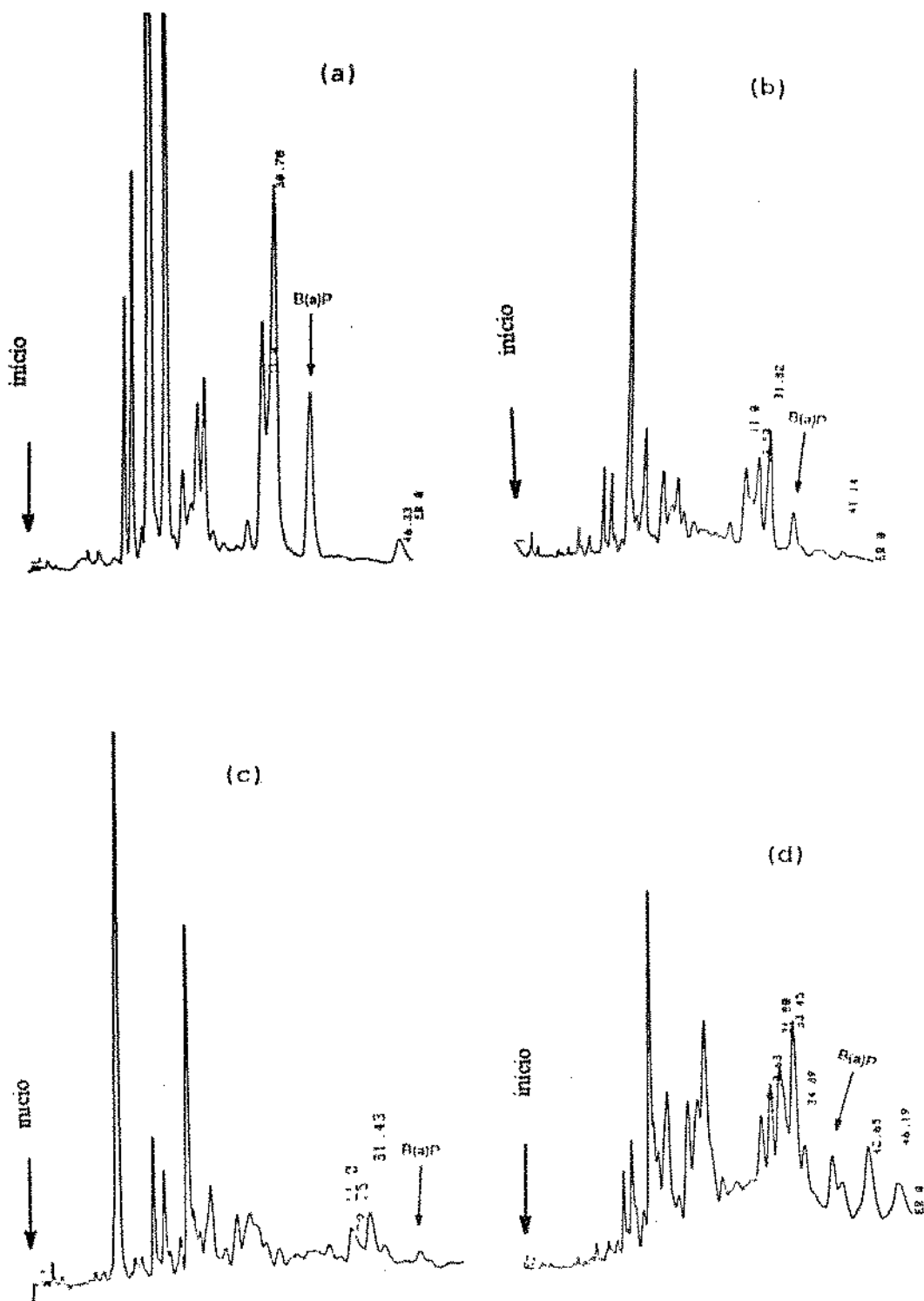


Figura 9. Cromatogramas por CLAE com detector de fluorescência de azeites de oliva de diversas origens: (a) argentino; (b) misto; (c) europeu embalado na origem; (d) europeu embalado no Brasil. Coluna ODS, 25cm x 4,6 mm d.i.; fase móvel acetonitrila:H₂O (8:2); vazão 0,7 mL/min.

Uma melhor comparação entre os níveis de contaminação de azeites procedentes da Europa, embalado na origem, Europa, embalado no Brasil, Argentina e nacional misto, podem ser visualizados na tabela 14 e figura 10. Também para efeitos comparativos, a tabela 15 e a figura 11 apresentam um resumo dos resultados obtidos com relação aos óleos comerciais analisados.

4.11- FONTES DE CONTAMINAÇÃO POR HPAs

Como já mencionado, existem várias fontes de contaminação de óleos vegetais por HPAs. Entre elas destacam-se a poluição ambiental, solos contaminados, a secagem de grãos com gases de combustão e o solvente hexana, usado na extração do óleo. No Brasil, conforme informações obtidas junto a especialistas da área de óleos, os processos de refinação atualmente em uso não utilizam carvão ativado, considerado por alguns autores (LARSSON et alii 1987; DENNIS et alii, 1991) responsável pela redução da contaminação de alguns óleos. Aparentemente, a não utilização de carvão ativado na refinação dos óleos está associada ao alto custo desta etapa.

Para se verificar que etapas do processo de refinação de óleos vegetais estariam envolvidas na redução dos níveis de HPAs ou na contaminação do óleo, analisaram-se amostras durante diferentes etapas do seu processamento.

Foram analisadas amostras de grãos de soja e milho antes e após o processo de secagem, não tendo sido detectada a presença de B(a)P nas duas amostras. De acordo com informações das próprias fábricas de óleos vegetais, para a secagem dos grãos de milho e soja utilizam-se gases de combustão da queima da madeira, que entram em contato direto com o grão, podendo resultar, de acordo com dados da literatura, no incremento do teor final de HPAs.

Tabela 14. Teores de benzo(a)pireno ($\mu\text{g/Kg}$) em azeites de oliva de diversas origens.

Tipo	n	valor mín.	mediana	valor máx.
Europeu, embalado na origem	7	0,6	0,6	1,2
Europeu, embalado no Brasil	15	0,9	2,3	9,7
Argentino	9	0,5	10,3	164,4
Mistos	7	2,2	2,3	9,2

n= número de amostras

Tabela 15. Teores de benzo(a)pireno ($\mu\text{g/Kg}$) em vários tipos de óleo.

Tipo	n	valor mín.	mediana	valor máx.
milho	25	1,6	6,2	58,9
soja	39	0,5	1,4	6,1
oliva	38	0,5	2,4	164,4
girassol	11	0,6	1,0	2,2
arroz	8	0,7	1,9	3,5
canola ^a	4	--	--	--
palma ^b (dendê)	3	--	--	6,2

n = número de amostras

a = não foi detectado a presença de B(a)P em todas as amostras analisadas

b = somente uma amostra mostrou-se contaminada por B(a)P

-- = não aplicado

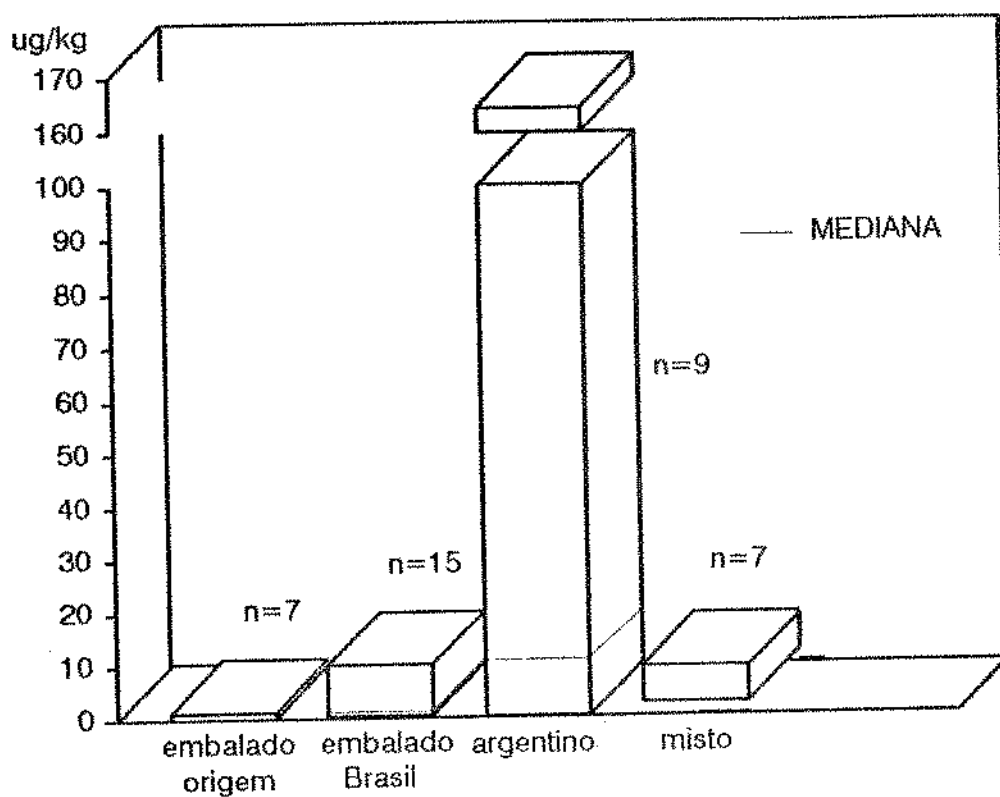


Figura 10. Faixas de concentração de B(a)P em azeites de oliva de diversas procedências.

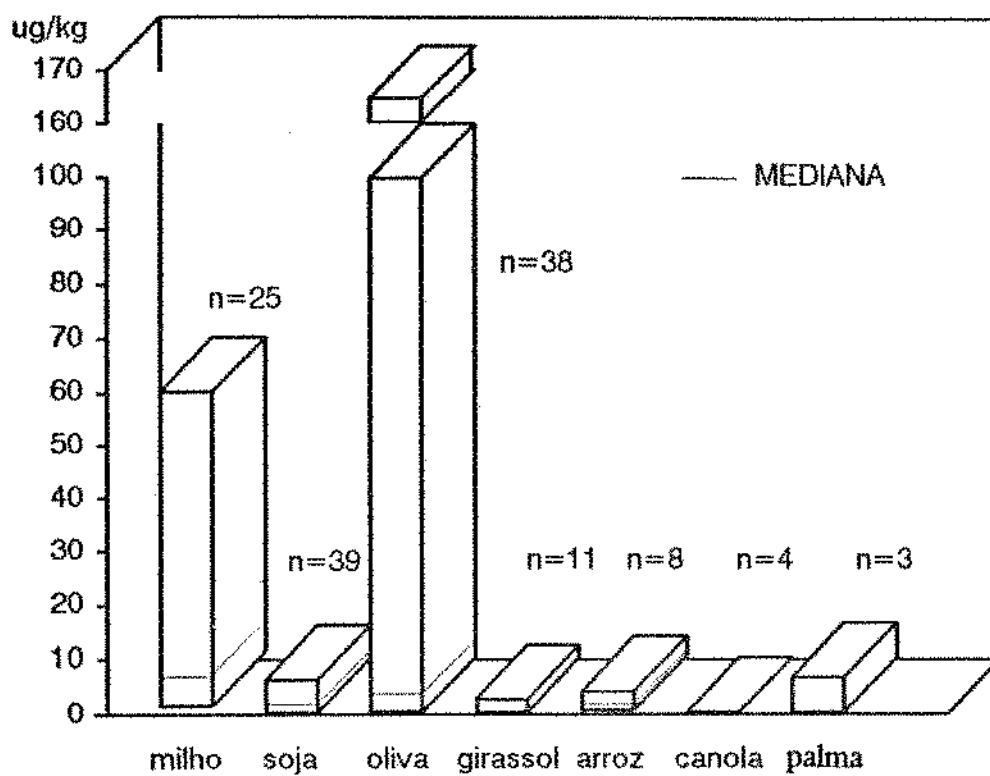


Figura 11. Faixas de concentração de B(a)P em óleos e azeites comerciais.

Nas nossas amostras, entretanto, não foi evidenciado um aumento da concentração de HPAs pesados, como pode ser observado através da figura 12. Por outro lado, houve um aumento no teor de HPAs leves, cujos picos correspondentes podem ser observados no início do cromatograma.

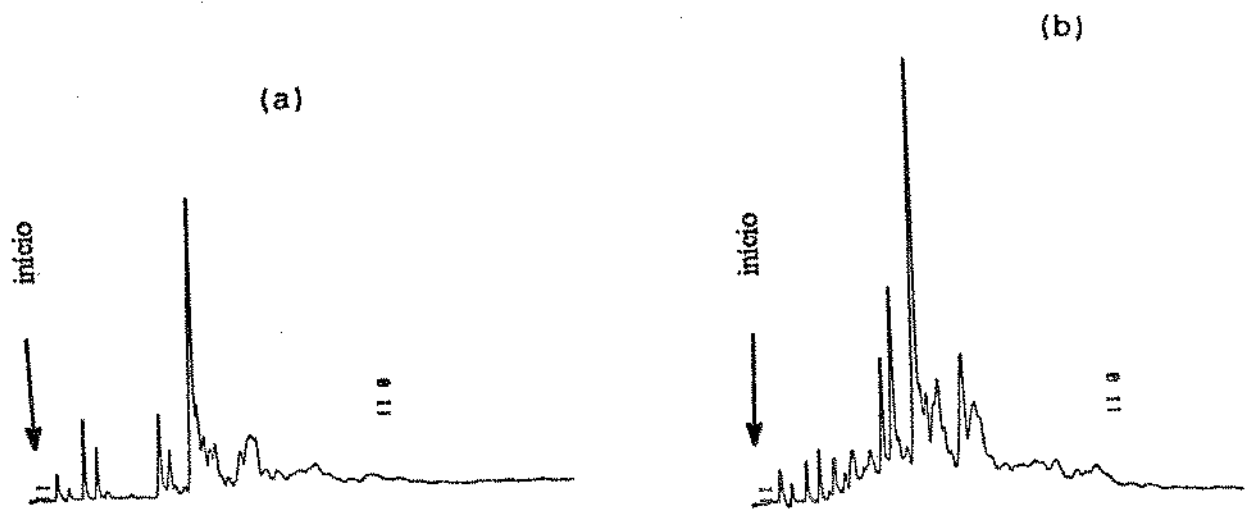
Resultados semelhantes foram obtidos por DENNIS et alii (1991), que analisaram diversos lotes de sementes de colza secas em diferentes tipos de secadores. Os resultados mostraram que ocorreu aumento significativo nos teores de fluoranteno, pireno e criseno, mas não de HPAs com mais de 4 anéis, como o B(a)P, por exemplo.

Para uma melhor avaliação da participação da etapa de secagem na contaminação de óleos vegetais por HPAs, seria necessária a análise de um número maior de amostras, o que não foi possível devido a dificuldades em se conseguir novas amostras junto às indústrias. Seria também conveniente que se amostrassem plantações de soja e milho próximas e distantes de rodovias e áreas industriais, para se avaliar o efeito da poluição sobre a contaminação dos grãos.

As tabelas 16 e 17 mostram os teores de B(a)P em diferentes etapas do processamento de óleo de milho e soja. As amostras foram obtidas junto a indústrias de refinação de óleo de soja e milho.

Em óleo de milho bruto foram detectados 3,7 µg/Kg de B(a)P, ao passo que no óleo de soja bruto foi obtido um valor médio de 0,8 µg/Kg. De acordo com estes resultados, o teor de benzo(a)pireno em óleo de milho foi aproximadamente 4,5 vezes superior àquele encontrado no óleo de soja. Provavelmente, esta maior contaminação do óleo de milho bruto seja a responsável pelos teores relativamente maiores de B(a)P determinados em óleo de milho refinado (Tabela 9).

1.



2.

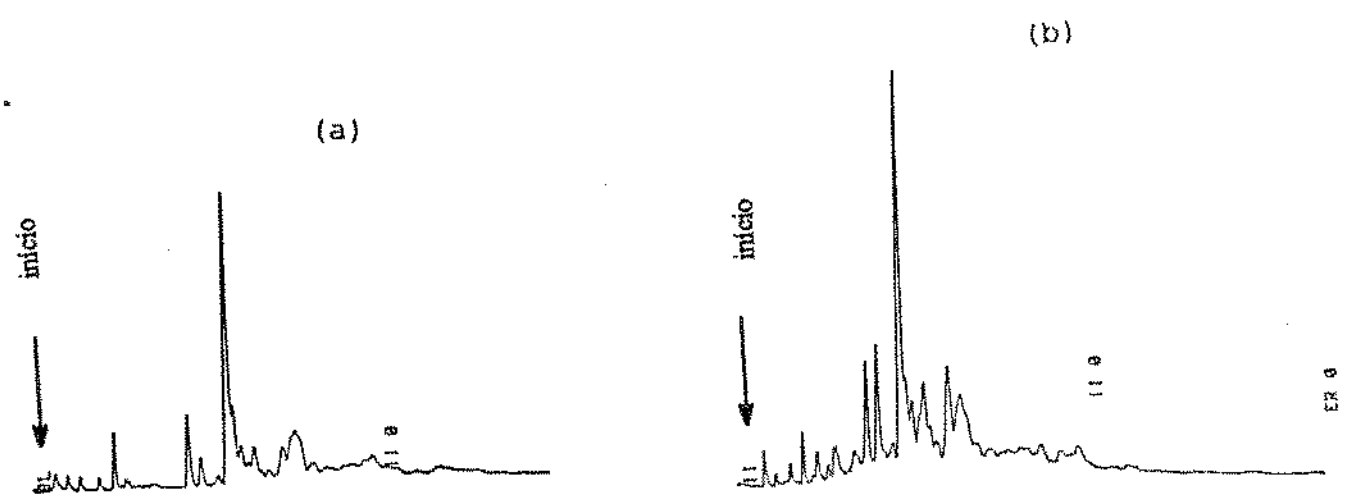


Figura 12. Cromatogramas por CLAE com detector de fluorescência de amostras de grão de milho e soja. 1. grão de milho (a) antes da secagem; (b) após a secagem. 2. grão de soja (a) antes da secagem; (b) após a secagem. Coluna ODS, 25cm x 4,6 mm d.i.; fase móvel acetonitrila:H₂O (8:2); vazão 0,7 mL/min.

Tabela 16. Teores de benzo(a)pireno em diversas etapas de refinação do óleo de milho.

Óleo	B(a)P* (µg/Kg)
bruto ^a	3,7
clarificado ^a	7,0
desodorizado ^a	4,4

* os valores são média de duas repetições
a: lotes diferentes

Tabela 17. Teores de benzo(a)pireno (µg/Kg) em óleo de soja em diferentes etapas do processo de refino.

Óleo	Amostras*				$\bar{X}$
	a ¹	b ²	c ²	d ²	
bruto	1,5	0,6	0,6	0,6	0,8
degomado	2,1	0,6	0,6	0,6	1,0
clarificado	n.d.	-	-	-	
desodorizado	n.d.	-	-	-	

* os valores são média de duas repetições

n.d.: não detectado (< 0,5 µg/Kg)

- : não disponível

1 : lote diferente

2 : lotes iguais

Os dados da tabela 16 sugerem ainda que durante o processo de refino do óleo de milho (clarificação e desodorização) ocorreu um aumento do teor de B(a)P relativamente ao óleo bruto. Esta avaliação, no entanto, é bastante limitada, uma vez que devido a dificuldades em se conseguir amostras de óleo de milho com os fabricantes, a amostragem foi pequena (apenas 1 amostra em cada etapa). Também existe a possibilidade de que as amostras fornecidas, embora sequenciais, não sejam do mesmo lote, o que poderia resultar em valores aparentemente contraditórios.

Para o óleo de soja, observou-se um comportamento diferente. Observando-se as amostras b, c e d (Tabela 17), que representam um mesmo lote de óleo bruto e degomado, verifica-se a pequena influência da degomagem na eliminação do B(a)P. Convém ressaltar que também neste caso houve dificuldades em se conseguir um número mais expressivo de amostras, devido a que algumas indústrias só processam o óleo até a etapa de degomagem, sendo este em seguida enviado a outras fábricas para a obtenção do óleo refinado. Uma mesma origem do óleo bruto de soja poderia justificar a similaridade no teor de B(a)P determinado nas diversas marcas de óleos analisados (Tabela 11).

A amostra "a", entretanto, apresentou um aumento no teor de B(a)P do óleo bruto para o degomado. Como discutido anteriormente para o óleo de milho, provavelmente esta amostra de óleo de soja degomado não foi coletada imediatamente após a amostragem do óleo bruto.

Segundo informações de especialistas da área de óleos, quando grãos de soja são colhidos ainda verdes, utiliza-se no processo de clarificação carvão ativado para a remoção dos pigmentos. Este procedimento resulta na eliminação da maioria dos HPAs, o que poderia contribuir para o baixo teor de B(a)P encontrado em alguns óleos de soja nacionais.

Alguns dados da literatura indicam níveis de contaminação de B(a)P para óleo bruto de milho e de soja entre 0,73 e 4,50 µg/Kg (DENNIS et alii, 1991) e de 0,4 a 5,39 µg/Kg (DENNIS et alii, 1991 e LARSSON et alii, 1987), respectivamente.

Segundo os autores DENNIS et alii (1991), durante o processo de refino de óleos vegetais, sem a utilização de carvão ativado, ocorrem somente reduções significativas nos teores de fluoranteno, pireno, benzo(a)antraceno e criseno. Conclusões semelhantes foram obtidas por THOMAS (1982), LARSSON et alii (1987) e SAGREDOS et alii (1988).

Para uma melhor comparação da eficiência do processo de desodorização em relação à eliminação dos HPAs leves, a figura 13 mostra os cromatogramas das amostras de óleo bruto e desodorizado de milho e de soja, evidenciando a diminuição de picos no início do cromatograma, para ambos os óleos. Quanto ao B(a)P, observou-se após a desodorização uma redução da contaminação apenas para o óleo de soja.

Entretanto, como o estudo foi limitado em termos de amostragem, haveria necessidade de se conseguir um número maior de amostras originárias de diversas fábricas para se obter resultados mais conclusivos. Neste caso, parece ser indispensável que a coleta do material nas diferentes etapas do processo do refino seja feita pelos próprios pesquisadores, de forma a garantir que a amostragem seja de um mesmo lote. Recomenda-se, portanto, que os resultados referentes às amostras enviadas pela indústria sejam interpretados com uma certa cautela.

Uma outra possível fonte de contaminação de óleos vegetais por HPAs é a hexana, solvente comumente utilizado na indústria de óleos. Após sua utilização, este solvente sofre um processo de destilação, sendo posteriormente reutilizado no processo (hexana "usada" ou "reprocessada").

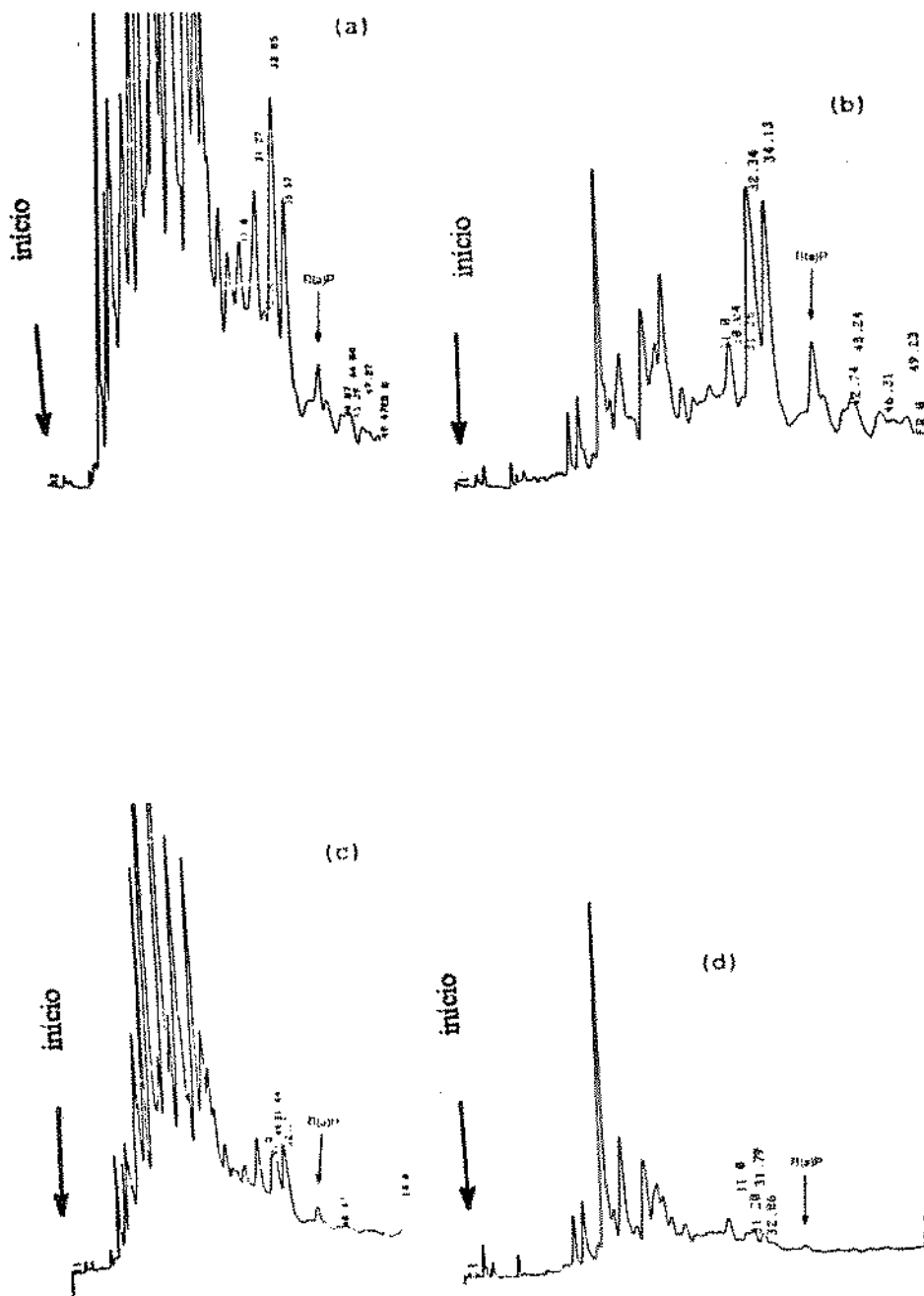


Figura 13. Cromatogramas por CLAE com detector de fluorescência de amostras de óleo de milho e soja: (a) óleo de milho bruto; (b) óleo de milho desodorizado; (c) óleo de soja bruto; (d) óleo de soja desodorizado. Coluna ODS, 25cm x 4,6 mm d.i.; fase móvel acetonitrila:H₂O (8:2); vazão 0,7 mL/min.

No presente estudo, a análise do perfil cromatográfico de amostras de hexana obtidas junto a fornecedores deste solvente sugere sua contaminação por uma ampla variedade de HPAs (Figura 14). Entretanto, foi feita a identificação e quantificação apenas do B(a)P, estando os resultados apresentados na tabela 18.

Como pode ser observado, os teores de B(a)P variaram entre 2,0 e 6,6 µg/Kg para a hexana "nova". Também a hexana "reprocessada" mostrou-se contaminada por B(a)P (1,0 a 3,3 µg/Kg) e outros HPAs embora, de maneira geral, em níveis inferiores aos encontrados na hexana não processada. Isto pode significar que parte dos hidrocarbonetos presentes se transferiu para o óleo, aumentando ainda mais a sua contaminação.

A contaminação de hexana por B(a)P, evidenciada no presente estudo, não foi observada por outros pesquisadores (RYDER & SULIVAN, 1962; HOWARD et alii, 1966c; GRIMMER & HILDEBRANDT, 1967; HOWARD et alii, 1968a) tendo sido encontrado na literatura apenas um registro da presença de HPAs carcinogênicos neste solvente (LIJINSKY & RAHA, 1961, citados por HAENNI, 1968).

Uma sugestão para os fabricantes de hexana técnica seria seguir as especificações H-16-56 e D 1836-64 da AOCS e da ASTM (1966), respectivamente. Esta hexana comercial, segundo dados da literatura, não apresenta resíduos de hidrocarbonetos poliaromáticos carcinogênicos na sua composição (RYDER & SULIVAN, 1962 e HOWARD et alii, 1966c).

4.12- ESTIMATIVA DE INGESTÃO DE BENZO(A)PIRENO ATRAVÉS DE ÓLEOS VEGETAIS

Devido ao alto consumo de óleos e gorduras, esses alimentos são uma importante fonte de ingestão de HPAs na dieta (DENNIS, et alii, 1983; HOPIA et alii, 1986; DE VOS et alii, 1991).

Tabela 18. Teores de benzo(a)pireno ($\mu\text{g/Kg}$) em hexana "nova" e "reprocessada".

Tipo	amostras*				$\bar{X}$
	a	b	c	d	
"nova"	2,7	5,1	2,0	6,6	4,1
"reprocessada"	1,0	3,3	n.q.	n.q.	2,2

* os valores são média de duas repetições

n.q: não quantificado (pico coeluído)

De acordo com HOPIA et alii, 1986, o consumo anual per capita de óleos e gorduras na Finlândia, em 1982, era de 7,2 Kg de margarinas, 11,3 Kg de manteiga, 0,8 Kg da mistura de manteiga e óleos vegetais, 1,8 Kg de óleos vegetais e 1,3 Kg de banha. Com base nos níveis de HPAs determinados nestes alimentos, o consumo anual desses compostos foi calculado em 230 μg (0,6 μg dia/pessoa), sendo que a manteiga, margarina, óleos vegetais e a mistura manteiga-óleo vegetal contribuem com respectivamente: 27, 160, 40 e 3 μg (HOPIA et alii, 1986).

No Brasil não existem dados relativos à ingestão diária de óleos e azeites. Entretanto, com base em dados de consumo interno desses produtos, pode-se fazer uma estimativa da ingestão diária de B(a)P.

Segundo dados da Associação Brasileira das Indústrias de Óleos Vegetais (ABIOVE) (comunicação pessoal), o consumo interno de óleo de soja é de 2.120.000 toneladas (previsão 91/92) e para

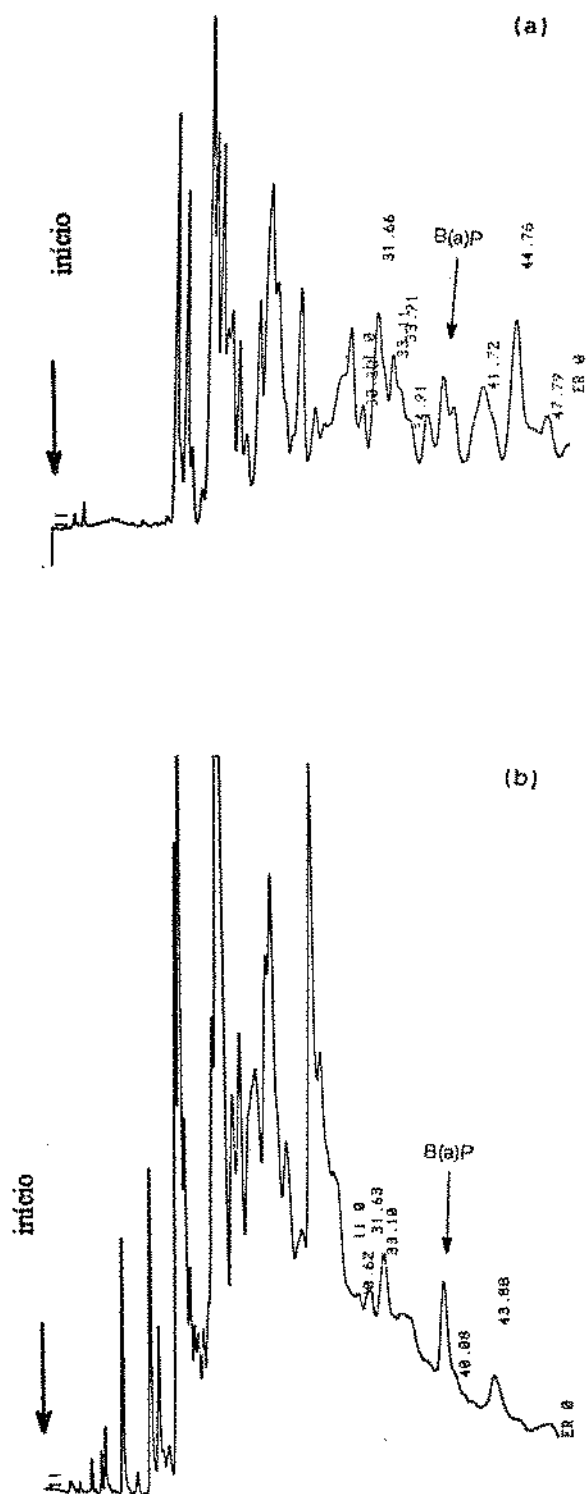


Figura 14. Cromatogramas por CLAE com detector de fluorescência de hexana: (a) "nova"; (b) "reprocessada". Coluna ODS, 25cm x 4,6 mm d.i.; fase móvel acetonitrila:H₂O (8:2); vazão 0,7 mL/min.

azeites de oliva, o consumo anual *per capita* é de 100 mL (GERLACH, 1992). Com bases nestes dados e, considerando o teor médio de B(a)P no óleo de soja como sendo de 2,2 µg/Kg, a ingestão diária e a ingestão anual de benzo(a)pireno por pessoa seriam equivalentes a 0,09 e 31,1 µg, respectivamente. Para este cálculo, estimou-se uma população de 150 milhões de habitantes no Brasil, considerando-se ainda que o óleo, incluindo aquele que é utilizado para frituras, é consumido como tal.

Se supusermos que o consumo individual de óleo de milho seja o mesmo que o de soja e, assumindo-se o valor de 10,8 µg/Kg como teor médio de B(a)P, os valores de ingestões diária e anual por pessoa seriam, respectivamente, 0,4 e 152,6 µg.

No Brasil, como descrito anteriormente, o consumo anual *per capita* de azeite de oliva é muito baixo (100 mL), devido principalmente ao elevado preço deste produto. Isto nos leva a supor que uma pequena parcela da população consome quase que a totalidade do azeite, implicando em um consumo individual bem mais elevado. Na Itália, por exemplo, o consumo anual *per capita* para azeites é de 9,4 Kg (ASSITOL, 1989, citado por MENICHINI et alii, 1991a).

Com base nestas considerações, pode-se fazer duas aproximações: a primeira, utilizando o consumo oficial *per capita*, e a segunda, baseada na estimativa do consumo de uma lata de 500 mL (~ 450 g) a cada três meses por uma pessoa que utiliza azeite regularmente nas refeições. Assim, o consumo oficial e o consumo estimado de B(a)P, diário e anual, através deste alimento, corresponderiam, respectivamente, a 0,003 e 1,1 µg e a 0,05 e 19,9 µg. Neste caso, foi considerado um teor médio de 10,9 µg/Kg de B(a)P em azeite de oliva.

Comparando-se com dados da literatura de ingestão diária de B(a)P para dietas totais (0,08 a 0,25 µg/Kg de B(a)P), pode-se

observar que os óleos nacionais contribuem com uma proporção relativamente alta de B(a)P na dieta, especialmente o óleo de milho.

Devido ao menor consumo dos demais óleos, e também pelo fato de que o nível de contaminação nestes óleos não ter sido elevado, o cálculo da ingestão diária não foi realizado para os mesmos.

4.13- CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em relação às fontes de contaminação estudadas, pode-se observar que diferentes etapas do processamento de óleo vegetal podem contribuir para a sua contaminação por HPAs. A maior dificuldade reside em se identificar qual etapa é a principal responsável pela contaminação.

Aparentemente, a secagem dos grãos aumenta pouco o teor de HPAs, e estes podem ser removidos no processo de desodorização. Por outro lado, a hexana, por se mostrar contaminada, nos leva a supor que se trata de uma das principais fontes de contaminação de óleos vegetais por HPAs.

Como no Brasil não se utiliza carvão ativado no processo de branqueamento, sugere-se às indústrias de óleo que controlem a qualidade da hexana que é utilizada no processo, de modo a evitar níveis elevados de HPAs em óleos vegetais nacionais.

Aos órgãos responsáveis pela Saúde Pública, recomenda-se que seja estudado, junto às indústrias de óleos, um programa de orientação, alertando-as para a necessidade do controle do processamento. Também é conveniente que seja mantido um monitoramento dos óleos e azeites disponíveis no mercado, de modo a evitar que o consumidor esteja exposto a produtos altamente contaminados com HPAs.

Para se verificar a viabilidade deste tipo de análise por órgãos públicos, estimou-se os custos dos reagentes utilizados no presente trabalho.

Os custos da análise estão apresentados na tabela 19. O valor por amostra está na faixa de aproximadamente US\$ 16. Este valor não leva em consideração os custos da coluna e pré-coluna bem como dos equipamentos usados (bomba, injetor, forno, detector e integrador) e da sua manutenção. Os custos apresentados foram feitos através de um levantamento de preços no mercado interno. Uma redução substancial nos custos poderia ser obtida importando-se os reagentes utilizados, caso haja isenção das taxas para a importação, como ocorre na Unicamp.

Tabela 19. Quantidade e custos dos reagentes utilizados para a análise de 10 amostras.

Reagente	quantidade usada	Preço (US\$)
acetonitrila	360 mL	23.50
ciclohexano	3100 mL	91.50
dimetilformamida	900 mL	26.10
silica gel	44 g	14.30
sulfato de sódio	50 g	1.50
		Total= 156.90

5- CONCLUSÕES

- A maioria (65,6%) dos óleos comerciais e azeites de oliva analisados, disponíveis no comércio, encontram-se contaminados com B(a)P, em níveis superiores ao limite referencial de 1 µg/Kg.
- Entre os óleos analisados, o óleo refinado de milho é o que apresenta a maior contaminação por B(a)P, com nível médio de 10,8 µg/Kg, correspondente a 5 vezes o valor encontrado em óleo de soja.
- A maior contaminação de óleos por B(a)P é encontrada em azeites de oliva de origem argentina.
- Azeites de oliva provenientes da Europa e embalados na origem encontram-se menos contaminados por B(a)P que os azeites de oliva de origem européia embalados no Brasil, os quais apresentam níveis de contaminação semelhante àqueles encontrados em azeites de oliva misto.
- A hexana comercial, solvente comumente utilizado no processo de extração de óleos vegetais, apresenta-se contaminada com níveis relativamente altos de B(a)P, sugerindo sua participação na contaminação dos óleos.
- Os óleos vegetais de soja e de milho contribuem em média com 0,09 e 0,4 µg de B(a)P na dieta total diária do consumidor brasileiro, respectivamente.
- Em vista da contaminação por B(a)P detectada nos óleos e azeites analisados, recomenda-se aos órgãos responsáveis pela saúde pública que seja iniciado um programa de fiscalização, de forma a reduzir a exposição do consumidor brasileiro a hidrocarbonetos poliaromáticos.

6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABIA. Compêndio da legislação de alimentos: atos do Ministério da Saúde. São Paulo, 1989. v.1. (Res. 20/72).
- BADGER, G.M.; BUTTERY, R.G.; KIMBER, R.W.L.; LEWIS, G.E.; MORITZ, A.G.; NAPIER, I.M. The formation of aromatic hydrocarbon at high temperatures. *J. Chem. Soc.* 498: 2449-2463, 1958.
- 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.
- BERTHAD, A.; LI, K.P.; YU, T.; WINEFORDNER, J.D. Low volume fluorescence detector for high performance liquid chromatography. *Anal. Chem.* 59: 1485-1488, 1987.
- BIERNOTH, G. & ROST, H.E. The occurrence of polycyclic aromatic hydrocarbons in coconut oil and their removal. *Chem. Ind.* (25): 2002-2003, 1967.
- CHRISTIAN, G.D. Spectrometry. In: CHRISTIAN, G.D. *Analytical Chemistry*. 4.ed. New York, John Wiley, 1986. p. 357-392.
- CIUSA, W.; D'ARRIGO, V.; MARCHESINI, G. Indagini sul contenuto in idrocarburi policiclici aromatici degli oli di oliva. *Riv. Ital. Sostanze Grasse* 47(3): 114-119, 1970.
- COOK, J.W.; HEWETT, C.L.; HIEGER, I. Isolation of a cancer-producing hydrocarbon from coal tar. parts I, II and III. *J. Chem. Soc.*, 395-405, 1933.

- COONEY, A.H. Induction of microsomal enzymes by foreign chemicals and carcinogenesis by polycyclic aromatic hydrocarbons: G.H.A. Clowes Memorial Lecture. *Cancer Res.* 42: 4875- 4917, 1982.
- CROSBY, N.T.; HUNT, D.C.; PHILP, L.A.; PATEL, I. Determination of polynuclear aromatic hydrocarbons in food, water and smoke using high-performance liquid chromatography. *Analyst* 106: 135-145, 1981.
- DENNIS, M.J.; MASSEY, R.C.; CRIPPS, G.; VENN, I.; HORWANTH, N.; LEE, G. Factors affecting the polycyclic aromatic hydrocarbon content of cereal, fats and other food products. *Food. Addit. Contam.* 8(4): 517-530, 1991.
- 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; 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. Chromatogr.* 285: 127-133, 1984.
- DE VOS, R.H.; VAN DOKKUM, W.; SCHOUTEN, A.; DE JONG-BERKHOUT, P. Polycyclic aromatic hydrocarbons in dutch total diet samples (1984-1986). *Food Chem. Toxicol.* 28(4): 263-268, 1990.
- 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(13): 2027-2031, 1980.
- GERLACH, F. ed. GERLACH, F. Oliva. *Óleos & Grãos.* p. 9, 1992.

- GRIMMER, G. & BÖHNKE, H. Polycyclic aromatic hydrocarbon profile of high-protein foods, oils and fats by gas chromatography. *J.A.O.A.C.* 58(4): 725-733, 1975.
- GRIMMER, G. & JACOB, J. Recommended method for the gas chromatographic profile analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked food. *Pure Appl. Chem.* 59(12): 1729-1734, 1987.
- GRIMMER, G. & HILDENBRANDT, A. Content of polycyclic hydrocarbons in crude vegetable oils. *Chem. Ind.* 25: 2000-2002, 1967.
- GRIMMER, G. & HILDEBRANDT, A. Concentration and estimation of 14 polycyclic aromatic hydrocarbons at low levels in high-protein foods, oils and fats. *J.A.O.A.C.* 55(3): 631-635, 1972.
- GUNTHER, F.A. & BUZZETTI, F. Occurrence, isolation and identification of polynuclear hydrocarbons as residues. *Res. Rev.* 9: 90-113, 1965.
- GUNTHER, F.A.; BUZZETTI, F.; WESTLAKE, W.E. Residue behavior of polynuclear hydrocarbons on and in oranges. *Res. Rev.* 17: 81-104, 1967.
- HAENNI, E.O. Analytical control of polycyclic aromatic hydrocarbons in food and food additives. *Res. Rev.* 24: 41-78, 1968.
- HENDRIKSE, P.W. & DIEFFENBACHER, A. Determination of benzo(a)pyrene in oils and fats by reversed phase high performance liquid chromatography. *Pure Appl. Chem.* 63(11): 1659-1666, 1991.
- HOPIA, A.; PYYSALO, H.; WICKSTROM, 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. & FAZIO, T. A review of polycyclic aromatic hydrocarbons in foods. *J. Agric. Food Chem.* 17(3): 527-531, 1969.
- HOWARD, J.W. & FAZIO, T. Review of polycyclic aromatic hydrocarbons in foods. *J.A.O.A.C.* 63(5): 1077-1104, 1980.
- HOWARD, J.W.; FAZIO, T.; WHITE, R.H. Polycyclic aromatic hydrocarbons in solvent used in extraction of edible oils. *J. Agr. Food Chem.* 16(1): 72-76, 1968a.
- HOWARD, J.W.; FAZIO, T.; WHITE, R.H. Colaborative study of a method for benzo(a)pyrene in smoked foods. *J.A.O.A.C.* 51(3): 544-548, 1968b.
- HOWARD, J.W.; FAZIO, T. ; WHITE, R.H.; KLIMECK, B.A. Extraction and estimation of polycyclic aromatic hydrocarbons in total diet composities. *J.A.O.A.C.* 51(1): 122-129, 1968c.
- HOWARD, J.W.; WHITE, R.H.; FRY, B.E.; TURICHI, B.W. Extraction and estimation of polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked foods. I. general method. *J.A.O.A.C.* 49(3): 595-611, 1966a.
- HOWARD, J.W.; WHITE, R.H.; FRY, B.E.; TURICHI, B.W. Extraction and estimation of polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked foods. II. benzo(a)pyrene. *J.A.O.A.C.* 49(3): 611-617, 1966b.
- HOWARD, J.W.; TURICCHI, E.W.; WHITE, K.H.; FAZIO, T. Extraction and estimation of polycyclic aromatic hydrocarbons in vegetable oils. *J.A.O.A.C.* 49(6): 1236-1244, 1966c.
- IARC. International Agency for Research on Cancer. **Polynuclear Aromatics Compounds.** IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans., Part 1, chemical, environmental and experimental data. Volume 32, December, 1983, Lyon, France.

IZMEROV, E.A. ed. Benzo(a)pyrene. Moscow, Centre of International Projects (Scientific Reviews of Soviet Literature on Toxicity and Hazards of Chemicals, 43) 1983 32p.

JOE Jr, F.L.; EMMA, L.R.; FAZIO, T. Survey of some market basket commodities for polynuclear aromatic hydrocarbons Content. J.A.O.A.C. 62(3): 615-620, 1979.

JOE Jr, F.L.; SALEMME, J.; FAZIO, T. High performance liquid chromatography with fluorescence and ultraviolet detection of polynuclear hydrocarbons in barley malt. J.A.O.A.C. 65(6): 1395-1402, 1982.

JUNG, L. & MORAND, P. Présence dans différents huiles végétales d'une substance donnant le spectre de fluorescence du benzo-3.4 pyrène. Compt. Rend. Acad. Sci. 254: 1489-1491, 1962.

JUNG, L. & MORAND, P. Présence de pyrène et de benzo-3.4 pyrène dans différents huiles végétales. Compt. Rend. Acad. Sci. 257: 1638-1640, 1963.

JUNG, L. & MORAND, P. Interpretation des spectres de fluorescence des huiles végétales. Ann. Fals. Exp. Chim. 57: 17-25, 1964.

KOLAROVIC, L. & TRAITLER, H. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in vegetable oils by caffeine complexation and glass capillary gas chromatography. J. Chromatogr. 237(2): 263-272, 1982.

LARSEN, J.C. Benzo(a)pyrene. In: Meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on the Food Additives (JECFA), 1991, 37, Geneva. World Health Organization, p. 301-363.

LARSSON, B.K.; ERIKSSON, A.T.; CERVENKA, M. Polycyclic aromatic hydrocarbons in crude and deodorized vegetable oils. J.A.O.C.S. 64(3): 365-370, 1987.

- LAWRENCE, J.F. & WEBER, D.F. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in canadian samples of processed vegetable and dairy products by liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Agric. Food Chem.* 32: 794-797, 1984a.
- LAWRENCE, J.F. & WEBER, D.F. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in some canadian commercial fish, shellfish, and meat products by liquid chromatography with confirmation by capillary gas chromatography-mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 32: 789-794, 1984b.
- LEE, M.L.; NOVOTNY, M.V., BARTLE, K.D. Occurrence. In: LEE, M.L.; NOVOTNY, M.V., BARTLE, K.D. *Analytical Chemistry of Polycyclic Aromatic Compounds*. London, Academic Press. 1981. p. 17-49.
- LO, M.-T. & SANDI, E. Polycyclic aromatic hydrocarbons (polynuclears) in foods. *Res. Rev.* 69: 35-86, 1978.
- MARIANI, C. & FEDELI, E. Idrocarburi policiclici aromatici negli oli vegetali. *Riv. Ital. Sostanze Grasse.* 61: 305-315, 1984.
- MENICHINI, E.; BOCCA, A. ; MERLI, F.; IANNI, D.; MONFREDINI, F. Polycyclic aromatic hydrocarbons in olive oils on the italian market. *Food Addit. Contam.* 8(3): 363-369, 1991a.
- MENICHINI, E.; DI DOMENICO, A.; BONANNI, L.; CORRADETTI, E.; MAZZANTI, L.; ZUCCHETTI, G. Reliability assesment of a gas chromatographic method for polycyclic aromatic hydrocarbons in olive oil. *J. Chromatogr.* 555: 221-220, 1991b.
- MENICHINI, E. & ROSSI, L. *Idrocarburi Policiclici Aromatici: basi scientifiche per la proposta di linee guida*. Rome Institute Superiori di Sanità, 1991. 174p. (Rapporti INSTISAN) 91/27.

- PELKONEN, O.E. & NEBERT, D.W. Metabolism of polycyclic aromatic 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. Int.* 75(5): 872-877, 1992.
- PHILLIPS, D.H. Fifty years of benzo(a)pyrene. *Nature* 309(9): 468-472, 1983.
- PICKERING, M.V. Diode Array: New dimensions in detection for high performance liquid chromatography. *LC.GC. Mag. Sep. Sci.* 8(11): 846-852, 1990.
- ROST, H.E. Influence of thermal treatments of palm oil on the content of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Chem. Ind.* 14: 612-613, 1976.
- RYDER, J.W. & SULLIVAN, G.P. Analysis of nonvolatile material in solvent hexane. *J.A.O.C.S.* 39: 263-266, 1962.
- SAGREDOS, A.N. Zur qualität und kontamination von fischölkaseln. *Fat Sci. Technol.* 94(3): 101-111, 1992.
- SAGREDOS, A.N.; SINHA-ROY, D.; THOMAS, A. Zur bestimmung, zum vorkommen und zur zusammensetzung von polycyclischen aromatischen kohlenwassertoffen in olen und fetten. *Fat. Sci. Technol.* 90(2): 76-81, 1988.
- SALAGOITY, M.-H.; GAYE, J.; TRICARD, C.H.; DESORMEAUX, M.-N.; SUDRAUD, P. Dosage du benzo(a)pyrene dans les aliments par chromatographie liquide haute performance. *Sci. Alim.* 10: 785-796, 1990.

- SCHAAD, R.E. Chromatographie (karzinogener) polyzyklischer aromatischer kohlenwasserstoffe. *Chromatogr. Rev.* 13: 61-82, 1970.
- SOARES, L.V. & AMAYA, D.R. Identificação e quantificação de adulterantes em óleo de oliva por cromatografia gasosa. *Bol. SBCTA, Campinas*, 15(1): 1-17, 1981.
- SPEER, K. & MONTAG, A. Polycyclische aromatische kohlenwassertoffe in nativen pflanzlichen ölen. *Fat Sci Technol.* 90(5): 163-167, 1988.
- 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. High Res. Chromatogr.* 13: 104-111, 1990.
- STIJVE, T. & DISERENS, H. The use of Calflo E Solid Support for extraction of benzo(a)pyrene and other polycyclic aromatic hydrocarbons from large quantities of fats and oils. *Deutsch. Lebensm.-Rundsch.* 83(6): 183-185, 1987.
- STIJVE, T. & HISCHENHUBER, C. Simplified determination of benzo(a)pyrene and other polycyclic aromatic hydrocarbons in various food material by HPLC and TLC. *Deutsch. Lebensm. Rundsch.* 83(9): 276-282, 1987.
- SWALLOW, W.H. Survey of polyaromatic aromatic hydrocarbon in selected foods and food additives available in New Zealand. *N. Z. J. Sci.* 19: 407-412, 1976.
- TAKATSUKI, K.; SUZUKI, S.; SATO, N.; USHIZAWA, I. Liquid chromatographic determination aromatic hydrocarbons in fish and shellfish. *J.A.O.A.C.* 68(5): 945-949, 1985.

- THOMAS, A. Über die Entfernung von schadstoffen bei der dämpfung von speiseölen undfetten. *Fette, Seifen, Anstrichm.* 84: 133-136, 1982.
- VAESSEN, H.A.M.G.; SCHULLER, P.L.; JEKEL, A.A.; WILBERS, A.A.M.M. Polycyclic aromatic hydrocarbons in selected foods; analysis and occurrence. *Toxicol. Environ. Chem.* 7: 297-324, 1984.
- VAESSEN, H.A.M.G.; WAGSTAFFE, P.J.; LINDSEY, A.S. Reference materials for PAHs in foodstuffs: results of a preliminary intercomparison of methods in experienced laboratories. *Fresenius Z. Anal. Chem.* 332: 325-332, 1988.
- VAESSEN, H.A.M.G.; WAGSTAFFE, P.J.; LINDSEY, A.S. Reference materials for PAHs in foodstuffs: II. results of a further intercomparison of methods in experienced laboratories. *Fresenius Z. Anal. Chem.* 336: 503-510, 1990.
- VAN HEDDEGHEM, A.; HUYGHEBAERT, A.; DE MOOR, H. Determination of polycyclic hydrocarbons in fat products by high pressure liquid chromatography. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 171: 9-13, 1980.
- VREULS, J.J.; DE JONG, G.J.; TH. BRINKMAN, U.A. On line coupling of liquid chromatography and mass spectrometry for the determination an identification of polycyclic aromatic hydrocarbon in vegetable oils. *Chromatographia* 31(3/4): 113-118, 1991.
- WALKER, E.A. Some facts and legislation concerning polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked foods. *Pure Appl. Chem* 49: 1673-1686, 1977.
- WELLING, P. & KAANDORP, B. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) in edible vegetable oils by liquid chromatography and programmed fluorescence detection. *Z. Lebensm. Unters Forsch.* 183: 111-115, 1986.

WHEALS, B.B.; VAUGHAN, C.G.; WHITEHOUSE, M.J. Use of chemically modified microparticulate silica and selective fluorimetric detection for the analysis of polynuclear hydrocarbons by high-pressure liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 106: 109-118, 1975.

WHO. Third-Seventh Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Geneva, 1991. (Technical report series, 806).

WILLIAMS, G.M. & WEISBURGER, J.H. Chemical carcinogens. In: DOUL, J.; KLASSEN, C.D.; AMDUR, M.D. ed. CASARETT and DOULL'S *Toxicology. The Basic Science of Poisons*. Macmillan Publishing Company. Second edition. 1980, p. 84-138.