

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

**HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS EM ÓLEO
DE MILHO, MARGARINA, CREME VEGETAL E MAIONESE E
EFEITO DO PROCESSAMENTO NA CONTAMINAÇÃO**

PARECER

Este exemplar corresponde à
redação final da tese defendida
por Maria Sílvia Francisco Ortiz de
Camargo aprovada pela
Comissão Julgadora em 07 de
julho de 1998.

Maria Sílvia F. Ortiz de Camargo

Campinas, 07 de julho de 1998.

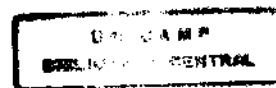
m. cecília f. toledo

Profa. Dra. MARIA CECÍLIA DE
FIGUEIREDO TOLEDO
Presidente da Banca

Prof. Dra. Maria Cecília F. Toledo
orientadora

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

Campinas - SP
1998



UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	
V.	Ex.
TOMBO BIC/	35600
PROC.	395/98
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	27/10/98
N.º CPD	

CM-00117714-1

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

C14h Camargo, Maria Sílvia Francisco Ortiz de
Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em óleo de milho,
margarina, creme vegetal e maionese e efeito do processamento na
contaminação / Maria Sílvia Francisco Ortiz de Carmargo. –
Campinas, SP: [s.n.], 1998.

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

1.Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. 2.Óleo de milho.
3.Cromatografia líquida de alta eficiência. 4.Alimentos –
contaminação. I.Toledo, Maria Cecília de Figueiredo.
II.Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de
Alimentos. III.Título.

BANCA EXAMINADORA

M. Aurora de F. Toledo

Prof^a. Dra. Maria Cecília F. Toledo
(orientadora)

Isa B. Noll

Prof^a. Dra. Isa Beatriz Noll
(membro)

Heloisa M. Cecchi

Prof^a/Dra. Heloisa Máscia Cecchi
(membro)

Prof^a. Dra. Lireny Aparecida Guaraldo Gonçalves
(membro suplente)

AGRADECIMENTOS

A prof^a Maria Cecília F. Toledo, pela compreensão, paciência e oportunidade de desenvolver um espírito crítico e científico.

Ao meu esposo pelo companheirismo, incentivo e carinho nas horas mais difíceis.

A todos os amigos do laboratório de Toxicologia, pelas informações trocadas e especialmente ao Fernando, Sílvia Helena e Mônica pela colaboração diária.

À Refinações de Milho Brasil, pelas facilidades proporcionadas e amostras cedidas e, particularmente, ao Dr. Dietrich Quast pela confiança e apoio pessoal à pesquisa.

À Minasa, pelo fornecimento de amostras.

À FAPESP, pelo suporte financeiro do projeto e à CAPES pela bolsa de estudos.

Ao pessoal da Secretaria de Ciências de Alimentos, em particular ao Marquinhos, pelo suporte na área de informática.

Aos professores Doutores Isa B. Noll, Lirenny G. Guaraldo e Heloisa M. Cecchi pelas correções e sugestões.

A todos aqueles que acreditaram neste trabalho.

*Aos meus pais pelo apoio
e incentivo em meus estudos,*

dedico.

ÍNDICE GERAL

	página
ÍNDICE DE TABELAS.....	viii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
ANEXOS.....	xii
RESUMO.....	xiv
SUMMARY.....	xv
INTRODUÇÃO.....	1
OBJETIVOS.....	3
Capítulo 1 - Revisão Bibliográfica.....	4
1.1. Formação, Estrutura Química e Propriedades Físico-químicas dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos.....	6
1.2. Aspectos Toxicológicos.....	7
1.2.1. Absorção e Distribuição.....	7
1.2.2. Biotransformação.....	8
1.2.3. Carcinogenicidade.....	9
1.2.4. Eliminação.....	12
1.3. Estudos Epidemiológicas.....	13
1.4. Alimentos como Fonte de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos	14
1.5. Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Óleos, Gorduras e Derivados.....	17
1.6. Métodos de Identificação e Quantificação.....	22
1.7. Legislação.....	25
1.8. Referências Bibliográficas.....	25

Capítulo 2 - Benzo(a)pireno em Óleos de Milho Produzidos e Comercializados no Brasil.....	39
Resumo.....	40
Summary.....	41
2.1. Introdução.....	42
2.2. Material e Métodos.....	43
2.2.1. Amostras.....	43
2.2.2. Método de Análise.....	43
2.2.2.1. Extração.....	43
2.2.2.2. Limpeza da Amostra em Coluna de Sílica gel....	44
2.2.3. Desenvolvimento Cromatográfico.....	44
2.2.4. Estudos de Recuperação do Método.....	45
2.3. Resultados	45
2.4. Conclusão.....	50
2.5. Referências Bibliográficas.....	51
Capítulo 3 - Efeito do Processamento na Contaminação de Óleo Refinado de Milho por Benzo(a)pireno.....	56
Resumo.....	57
Abstract.....	58
Introdução.....	59
Material e Métodos.....	61
Preparação das Amostras.....	61
Secagem.....	61
Processo de Refino.....	62
Limpeza.....	62
Moagem Úmida.....	62
Extração.....	62

Grãos de Milho.....	64
Óleos de Milho.....	64
Hexana.....	64
Desenvolvimento Cromatográfico.....	64
Recuperação do Método.....	65
Resultados e Discussão.....	65
Bibliografia.....	79
 Capítulo 4 - Avaliação da Contaminação de Margarinas, Cremes Vegetais e Maioneses por Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos.....	 84
Resumo.....	85
Abstract.....	86
Introdução.....	87
Material e Métodos.....	88
Amostras.....	88
Reagentes.....	88
Estudos de Recuperação do Método.....	89
Extração.....	89
Margarinas e Cremes Vegetais.....	89
Maioneses.....	90
Limpeza das Amostra.....	90
Desenvolvimento Cromatográfico.....	90
Resultados e Discussão.....	91
Bibliografia.....	100
 Conclusão	 103

ÍNDICE DE TABELAS

	página
Capítulo 1	
Tabela 1- Teor de benzo(a)pireno ($\mu\text{g/kg}$) em óleos vegetais.....	20
Capítulo 2	
Tabela 1- Teor de benzo(a)pireno em óleos de milho.....	47
Tabela 2 - Teores de benzo(a)pireno em óleos de milho, reportados na literatura.....	48
Capítulo 3	
Tabela 1 - Recuperação de benzo(a)pireno em grãos e óleos de milho.....	66
Tabela 2- Teor de benzo(a)pireno em grãos de milho submetidos a diferentes processos de secagem.....	66
Tabela 3- Teor de benzo(a)pireno ($\mu\text{g/kg}$) em amostras de milho submetidos à secagem a lenha.....	67
Tabela 4- Teores de benzo(a)pireno ($\mu\text{g/kg}$) em amostras de óleos de milho coletadas em diferentes etapas do processo de refino.....	70
Tabela 5- Teor de benzo(a)pireno ($\mu\text{g/kg}$) em amostras coletadas no processo de moagem úmida e separação do germe de milho.....	76
Tabela 6- Teor de benzo(a)pireno ($\mu\text{g/kg}$) em amostras de óleo de milho submetidas a diferentes tratamentos com carvão ativado.....	77
Capítulo 4	
Tabela 01- Abreviação, limite de detecção e carcinogenicidade dos	

hidrocarbonetos policíclicos aromáticos analisados.....	92
Tabela 02- Recuperação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em margarinas e maioneses.....	93
Tabela 03- Média e faixa de concentração de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em alguns alimentos gordurosos...	95
Tabela 04-Teor de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em margarinas, cremes vegetais, halvarinas e maioneses.....	99

ÍNDICE DE FIGURAS

	página
Capítulo 1	
Figura 1- Estrutura química de alguns hidrocarbonetos policíclicos aromáticos.....	7
Figura 2- Formação dos metabólitos 7,8-diol-9,10-epóxidos do benzo(a)pireno.....	10
Figura 3- “Bay-region” de alguns hidrocarbonetos policíclicos aromáticos	12
 Capítulo 2	
Figura 1 - Cromatograma de uma amostra de óleo de milho por CLAE. Condições: fase móvel acetonitrila : água (75:25, v/v), fluxo 1ml/min., detector de fluorescência, coluna C 18 (ODS), 25 X 4,6 mm d.i., com partículas de 5 µm. B(a)P: benzo(a)pireno.....	49
 Capítulo 3	
Figura 1 - Fluxograma da extração e limpeza de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos.....	63
Figura 2 - Cromatograma por CLAE de grãos de milho submetidos a (a) secagem natural (b) secagem à lenha. Condições: fase móvel acetonitrila : água (7:3, v/v), fluxo 1 ml/min., detector de fluorescência, coluna C18 (ODS), 25 X 4,6 mm d.i., com partículas de 5 µm. B(a)P = benzo(a)-pireno.....	68
Figura 3 - Cromatograma por CLAE de amostras de óleo de milho (a) bruto e (b) refinado. Condições: fase móvel acetonitrila: água (7:3, v/v), fluxo 1 ml/min., detector de fluorescência, coluna C18 (ODS), 25 X 4,6 mm d.i., com partículas de 5 µm. B(a)P= benzo(a)pireno.....	72

Figura 4 - Cromatograma por CLAE de amostras de (a) hexana nova
(b) recuperada. Condições: fase móvel acetonitrila : água
(7:3, v/v), fluxo 1 ml/min., detector de
fluorescência, coluna C 18 (ODS), 25 X 4,6 mm d.i.,
com partículas de 5 µm. B(a)P= benzo(a)-pireno..... 74

Capítulo 4

Figura 1 - Cromatograma por CLAE de uma mistura de padrões de
HPAs. Condições: fase móvel acetonitrila : água (75:25,
v/v), fluxo 1 ml/min., detector de fluorescência, coluna
C18 (ODS), 25 X 4,6 mm d.i., com partículas de 5 µm
Vydac 201 TP-54. Picos: 1=F, 2=P, 3= B(a)A, 4=Cr,
5=B(b)F, 6=B(k)F, 7=B(a)P, 8= B(a,h)A..... 96

Figura 2 - Cromatograma por CLAE de amostras de (a) margarina e
(b) maionese. Condições: fase móvel acetonitrila : água
(7:3, v/v), fluxo 1 ml/min., detector de fluorescência,
coluna C 18 (ODS), 25 X 4,6 mm d.i., com partículas de
5 µm. Os picos estão identificados na Tabela 1..... 97

ANEXOS

página

Anexo 1	Cromatograma de uma mistura de padrões de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos por CLAE e detector UV-VIS.....	104
Anexo 2	Cromatograma de uma mistura de padrões de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos por CLAE e por detector UV-VIS/ varredura de fotodiodos.....	104
Anexo 3	Cromatograma de uma amostra de óleo de milho refinado por CLAE e detector UV-VIS.....	105
Anexo 4	Cromatograma de uma amostra de óleo de milho refinado por CLAE e por detector UV-VIS / varredura de fotodiodos.....	105
Anexo 5	Cromatograma de uma amostra de margarina por CLAE e detector UV-VIS.....	106
Anexo 6	Cromatograma de uma amostra de margarina por CLAE e por detector UV-VIS/ varredura de fotodiodos.....	106
Anexo 7	Cromatograma de um padrão de benzo(a)pireno por CLAE e detector UV-VIS.....	107
Anexo 8	Cromatograma de um padrão de benzo(a)pireno por CLAE e por detector UV-VIS / varredura de fotodiodos.....	107
Anexo 9	Cromatograma por CLAE de uma amostra de óleo de milho neutralizado. Condições: fase móvel acetonitrila: água (7:3), fluxo 1 ml/min, detector de fluorescência, coluna Vydac C18 (ODS), 25 cmX 4,6 mm d.i., partículas de 5 µm. Picos : 1=F, 2=P, 3=B(a)A, 4= Cr, 5 = B(b)F, 6=B(k)F, 7=B(a)P, 8=B(a,h)A	108
Anexo 10	Cromatograma por CLAE de uma amostra de óleo de milho neutralizado tratado com carvão ativado. Condições : fase móvel acetonitrila : água (7:3), fluxo 1	

	ml/min, detector de fluorescência, coluna Vydac C18 (ODS), 25 cmX 4,6 mm d.i., partículas de 5 µm.....	108
Anexo 11	Cromatograma por CLAE de uma amostra de margarina. Condições: fase móvel acetonitrila: água (75:25), fluxo 1 ml/min, detector de fluorescência, coluna Vydac C18 (ODS), 25 cmX 4,6 mm d.i., partículas de 5 µm. Picos: 1=F, 2= P, 3 = B(a)A, 4 = Cr, 5 = B (b)F, 6 = B(k)F, 7=B(a)P, 8=B(a,h)A.....	109
Anexo 12	Cromatograma por CLAE de uma amostra de maionese. Condições: fase móvel acetonitrila: água (75:25), fluxo 1 ml/min, detector de fluorescência, coluna Vydac C18 (ODS), 25 cmX 4,6 mm d.i., partículas de 5 µm. Picos: 1 = F, 2 = P, 3 = B(a)A, 4 = Cr, 5 =B(b)F, 6=B(k)F, 7=B(a)P, 8=B(a,h)A.....	109
Anexo 13	Cromatograma por CLAE de uma amostra de creme vegetal. Condições: fase móvel acetonitrila: água (75:25), fluxo 1 ml/min, detector de fluorescência, coluna Vydac C18 (ODS), 25 cmX 4,6 mm d.i., partículas de 5 µm. Picos: 1 = F, 2 = B(a)A, 3 = B(b)F, 4 = B(k)F, 5 = B(a)P, 6=B(a,h)A.....	110
Anexo 14	Cromatograma por CLAE de uma amostra de halvarina. Condições: fase móvel acetonitrila: água (75:25, fluxo 1 ml/min, detector de fluorescência, coluna Vydac C18 (ODS), 25 cmX 4,6 mm d.i., partículas de 5 µm. Picos: 1 = F, 2 = B(a)A, 3 = Cr, 4 = B(b)F, 5 = B(k)F, 6 = B(a)P, 7=B(a,h)A.....	110
Anexo 15	Cromatograma por CLAE de uma amostra de creme vegetal. Condições: fase móvel acetonitrila: água (75:25), fluxo 1 ml/min, detector de fluorescência, coluna Vydac C18 (ODS), 25 cmX 4,6 mm d.i., partículas de 5 µm. Picos: 1= F, 2 = P, 3 = B(a)A, 4 = Cr, 5 = B(b)F, 6 = B(k)F, 7=B(a)P, 8=B(a,h)A.....	111

RESUMO

No presente estudo foi monitorada a contaminação por benzo(a)pireno (B(a)P) de óleos de milho produzidos e comercializados no Brasil, e estudado o efeito da secagem e moagem do grão e do processamento do óleo bruto na contaminação do óleo refinado. Foram também determinadas as concentrações de 8 hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) em produtos a base de óleo como margarinas, cremes vegetais e maioneses. A metodologia de análise dos HPAs envolveu extração com ciclohexano, partição líquido-líquido com dimetilformamida, limpeza em coluna de sílica gel e determinação por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fluorescência.

O monitoramento de diferentes amostras de óleo de milho revelou a presença de benzo(a)pireno em todas as amostras analisadas, além de uma grande variabilidade nos teores encontrados em diferentes lotes de mesma marca. De 49 amostras analisadas, somente uma apresentou nível de contaminação por B(a)P abaixo do limite referencial de 1 µg/kg. A investigação da origem da contaminação e variação nos níveis de B(a)P encontrados mostrou que a secagem dos grãos de milho em secadores a lenha é uma das fontes de contaminação enquanto que a moagem úmida contribui para reduzir a contaminação do óleo final. O uso de carvão ativado a 0,2% como agente clarificante revelou-se eficiente para remoção dos HPAs, reduzindo o teor de B(a)P de cerca de 30 µg/kg para níveis não detectáveis.

Os níveis de HPAs totais (fluoranteno, pireno, benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno e dibenzo(a,h)-antraceno) determinados em margarinas e cremes vegetais variaram na faixa de 1,11 a 7,06 µg/kg, enquanto que as maioneses apresentaram valores na faixa de 1,03 a 21,73 µg/kg, possivelmente refletindo a grande variabilidade de contaminação dos óleos vegetais empregados em sua formulação.

SUMMARY

In the present study, the contamination by benzo(a)pyrene B(a)P of corn oils produced and marketed in Brazil was monitored. The effect of the drying and grinding processes of the corn, and the refining process of the crude oil on the contamination of the refined oil was also studied. Besides, eight polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) were determined in oil-based products such as margarine, vegetable creams and mayonnaise. The methodology involved extraction with cyclohexane, liquid-liquid partition with dimethylformamide, cleaning in silica-gel column and determination by high performance liquid chromatography with fluorescence detection.

The analysis of different commercial samples corn oils revealed the presence of benzo(a)pyrene in all samples and a high degree of variability in the amount found in different batches of the same brand. Of 49 samples analyzed, only one showed B(a)P level below the reference limit of 1 µg/kg. The investigation of the contamination's origin and variation in the B(a)P levels demonstrated that the drying of corn grains in firewood dryers is one of the sources of contamination, while the humid grinding process contributes to reduce the oil contamination. The use of activated charcoal as a clarificant agent has shown to be effective in removing the PAHs from contaminated oils, reducing the B(a)P concentration from about 30 µg/kg to non-detectable levels.

Total PAHs levels (fluoranthene, pyrene, benzo(a)anthracene, crysene, benzo(b)fluoranthene, benzo(k)fluoranthene, benzo(a)pyrene and benzo(a,h)anthracene) determined in margarines and vegetable creams ranged from 1.11 to 7.06 µg/kg, while mayonnaise showed values ranging from 1.03 to 21.73 mg/kg, possibly reflecting the high variability in the contamination of the used vegetable oils.

INTRODUÇÃO

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) são uma classe de substâncias conhecidas por seu potencial carcinogênico, encontrando-se amplamente distribuídos no meio ambiente. Estas substâncias químicas, formadas por 2 ou mais anéis benzênicos ligados entre si, são produtos da degradação de matérias orgânicas que sofreram reações de combustão, pirólise ou pirossíntese. As principais fontes de formação de HPAs envolvem atividade vulcânica e queima de combustíveis fósseis. Os solos, a vegetação, os alimentos e as águas próximas às áreas vulcânicas encontram-se, em geral, bastante contaminados. Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos podem ainda ser encontrados na fumaça do cigarro, no ambiente de casas com aquecedores a lenha, no ambiente industrial, em rios, na água do mar, em organismos aquáticos tais como as algas, em óleos minerais e em produtos refinados do petróleo.

No início deste século, pesquisas de toxicidade realizadas com animais de laboratório comprovaram as fortes evidências de que algumas substâncias contidas no alcatrão da hulha, na fuligem e no óleo de xisto causavam câncer. Posteriormente, estas substâncias foram identificadas como sendo os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, dos quais o benzo(a)pireno (B(a)P) é o mais estudado, apresentando comprovada ação carcinogênica em animais de experimentação.

A ocorrência destes compostos em alimentos tem sido relacionada à deposição de fuligem nas plantas, à poluição atmosférica e ao processamento de alimentos, como por exemplo, o processo de defumação de carnes e peixes. Os HPAs estão presentes em carnes e peixes defumados e em café torrado, assim como em produtos do mar, vegetais, óleos, grãos, frutas, cereais e uísque.

Estudos conduzidos com o objetivo de verificar a ocorrência e os níveis destes contaminantes naturais no ambiente têm demonstrado que a cadeia alimentar é responsável por aproximadamente 97% da exposição humana diária ao benzo(a)pireno (B(a)P). Outras pesquisas revelaram ainda que o grupo de alimentos que mais contribui para a ingestão de HPAs na Inglaterra é representado pelos cereais, cuja incidência na dieta diária da população é alta, seguido pela classe de óleos e gorduras, por apresentarem níveis de contaminação relativamente mais elevados, além de serem utilizados na formulação de outros alimentos.

Pesquisas conduzidas em outros países têm identificado o grupo dos óleos e gorduras como importante fonte de ingestão de HPAs. Estudos recentes realizados no Brasil evidenciaram que os óleos vegetais disponíveis no comércio, em particular óleos de milho, encontravam-se contaminados com níveis relativamente elevados de B(a)P, não existindo informações sobre as possíveis fontes de contaminação. Dados sobre a contaminação de outros alimentos gordurosos não se encontram disponíveis.

OBJETIVOS

Em vista do potencial carcinogênico dos HPAs e do risco à saúde humana por exposição a estes compostos na dieta, os objetivos do presente estudo foram:

- a) monitorar a contaminação por B(a)P em amostras de óleo de milho produzidos e comercializados no Brasil no período de 1993 a 1995;
- b) estudar a influência do processo de secagem do grão de milho e do processo de refino na contaminação do óleo de milho por B(a)P, identificando as possíveis fontes de contaminação;
- c) estimar a contaminação, por alguns hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, de margarinas, cremes vegetais, halvarinas e maioneses produzidos e comercializados no Brasil.

Capítulo 1

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Há muito tempo o homem vem observando uma alta incidência de câncer em trabalhadores de diversas atividades. Em 1775, inúmeros casos de câncer em limpadores de chaminé levaram o médico inglês PERCIVAL POTT a atribuir à atividade ocupacional a principal causa de câncer de escroto nestes trabalhadores (SCHAAD, 1970; WALKER, 1977; WEISBURGER & WILLIAMS, 1980; VAESSEN et alii, 1984; DIPPLE, et alii, 1984).

Embora se suspeitasse que o contato com determinadas substâncias estivesse intimamente ligado ao aparecimento de doenças, o potencial carcinogênico do alcatrão da hulha só foi comprovado com o trabalho conduzido por YAMAGIWA & YCHIGAWA em 1912, citado por WALKER (1977), os quais, após a aplicação de alcatrão em orelhas de coelhos, observaram o aparecimento de tumores no local.

Entretanto, só na década seguinte foi isolado do alcatrão o principal e mais estudado representante da classe dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), o benzo(a)pireno (B(a)P) (COOK et alii, 1933). Outros HPAs identificados foram o perileno, o benzo(a)antraceno e o benzo(e)pireno, os quais posteriormente demonstraram propriedades carcinogênicas e mutagênicas (BINGHAM & FALK, 1969; SCHAAD, 1970; IARC, 1983; PHILLIPS, 1983; VAESSEN et alii, 1984).

O potencial carcinogênico comprovado de alguns HPAs (IARC, 1983) tem despertado o interesse de pesquisadores na identificação e quantificação das prováveis fontes de exposição humana a esses compostos altamente estáveis, que se encontram amplamente distribuídos no meio ambiente em baixas concentrações (WELLING & KAANDORP, 1986; LARSON et alii, 1987; SPEER et alii, 1990).

Embora os alimentos sejam responsáveis por grande parte da exposição humana aos HPAs, a ocorrência destes contaminantes não se limita somente aos alimentos. Outras pesquisas têm demonstrado sua presença em rios, mares e algas, em solos e sedimentos, no cigarro e sua fumaça, no ar e sedimentos de

lavas vulcânicas (GRIMMER & HILDEBRANDT, 1965; HOWARD & FAZIO, 1980; PERERA, F., 1996; WELLING & KAANDORP, 1986; SPEER et alii, 1990).

1.1. Formação, Estrutura Química e Propriedades Físico-químicas dos HPAs

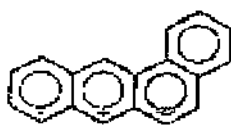
Em geral, os HPAs são formados em processos de combustão incompleta como subprodutos do processamento de matérias orgânicas, envolvendo reações de pirólise, com a formação de estruturas menores, normalmente radicais livres, e pirossíntese, quando os compostos formados na pirólise se recombina formando estruturas relativamente estáveis. A carbonização de madeiras e a queima de combustíveis fósseis, envolvendo reações semelhantes, também podem resultar na formação de HPAs (DUNN & ARMOUR 1980; IARC, 1983; IZMEROV eds., 1983; VAESSEN et alii, 1988). Estes compostos orgânicos são formados pela fusão de 2 ou mais anéis benzênicos, podendo ou não ter grupos substituintes ligados (Figura 1) (LO & SANDI, 1978).

Os HPAs são substâncias com elevada afinidade por solventes orgânicos e baixa solubilidade em água, sendo que a presença de detergentes aniônicos e outros compostos orgânicos podem aumentar sua solubilidade em água, facilitando sua distribuição para o meio ambiente e cadeia alimentar (ANDELMAN & SUESS, 1970).

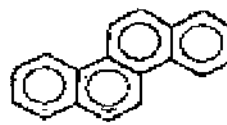
Apesar dos HPAs serem bastante sensíveis à luz e ao oxigênio, são encontrados em grandes quantidades contaminando o ar, a água e os alimentos, principalmente em regiões poluídas e próximas de grandes centros urbanos. A degradação destes contaminantes é diretamente proporcional à quantidade de luz e à concentração de oxigênio presente no ambiente (ANDELMAN & SUESS, 1970; LOW et alii, 1987).



pireno



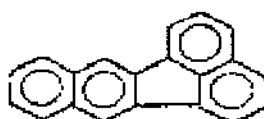
benzo(a)antraceno



criseno



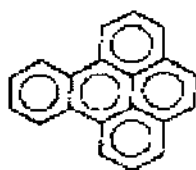
benzo(b)fluoranteno



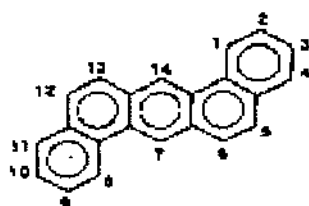
benzo(k)fluoranteno



benzo(a)pireno



benzo(e)pireno



dibenzo(a,h)antraceno

Figura 1 - Estrutura química de alguns hidrocarbonetos policíclicos aromáticos.

1.2. Aspectos Toxicológicos

1.2.1. Absorção e Distribuição

Os seres vivos estão expostos aos HPAs principalmente pela ingestão de alimentos e água contaminada, embora a inalação de aerossóis e a absorção por contato direto com estas substâncias também sejam vias potenciais de entrada no organismo (IARC, 1983).

Os efeitos biológicos de xenobióticos são determinados tanto pela dinâmica de absorção, distribuição, metabolização e excreção, como pelas suas propriedades químicas intrínsecas. A toxicidade dos HPAs está diretamente relacionada aos seus metabólitos intermediários, após sua biotransformação por sistemas enzimáticos específicos (JERINA et alii, 1978; HERNDON, 1981; COONEY, 1982; DIPPLE et alii, 1984). Embora muitos HPAs sejam reconhecidos como poluentes do meio ambiente e potentes carcinógenos, sua absorção, distribuição e excreção ainda não estão bem estabelecidas.

Os hidrocarbonetos são substâncias apolares, o que possibilita uma rápida passagem através das membranas de constituição lipoprotéica. Assim, após a ingestão de alimentos contaminados, os HPAs são absorvidos através da mucosa intestinal por difusão passiva, obedecendo a uma cinética de primeira ordem em sua distribuição. A passagem destas substâncias do sangue para os tecidos e órgãos é bastante rápida : após dez minutos de uma injeção intra-venosa, o benzo(a)pireno não é mais detectado no sangue. Ao mesmo tempo que os níveis sanguíneos de B(a)P decrescem, os níveis biliares de seus metabólitos aumentam rapidamente (KOTIN et alii, 1959).

Estudos realizados por HEILDERBERGER & WEISS (1951) indicaram que os hidrocarbonetos detectados no sangue podem ser encontrados na maioria dos órgãos até horas depois da administração. Os autores constataram que os principais locais de depósito são as células mamárias e outros tecidos adiposos, onde são encontrados em quantidades relativamente altas, resultante provavelmente de uma lenta metabolização.

1.2.2. Biotransformação

O metabolismo de HPAs têm sido objeto de vários estudos (MARNETT & REED, 1977; THAKKER et alii, 1977; MARNETT & REED, 1979; JERINA et alii, 1980; COONEY, 1982; SIMS, 1982; LEVIN et alii, 1982).

Os HPAs, assim como muitos pró-carcinógenos ambientais são substâncias quimicamente não reativas e seus efeitos adversos são mediados por metabólitos eletrofílicos capazes de interagirem covalentemente com macromoléculas tais como o DNA (WEISBURGER & WILLIAMS, 1980; PHILLIPS, 1983). Em geral, o benzo(a)pireno tem sido utilizado como modelo no entendimento deste processo (JERINA et alii, 1980).

A ação tóxica dos hidrocarbonetos só ocorre após biotransformação por sistemas enzimáticos específicos, do qual participam principalmente as oxidases de função mista do citocromo P450 (JERINA et alii, 1978; IARC, 1983). Na presença de NaDH e NADPH e oxigênio molecular, estes compostos são transformados em substâncias mais polares pela introdução de um radical epoxi ou hidroxil, sendo então metabolizados estereoespecificamente pelas epóxido-hidrolases, gerando intermediários que são biotransformados estereoseletivamente pelo citocromo P450 no metabólico ativo (JERINA et alii, 1978; DIPPLE et alii, 1984).

Um dos fatores que tornam ainda mais complexo o estudo do metabolismo dos hidrocarbonetos é a possibilidade de formação de metabólitos opticamente ativos. O B(a)P, por exemplo, pode dar origem aos metabólitos 7,8-diol-9,10-epóxidos (Figura 2) (THAKKER et alii, 1977). O dihidrodiol predominante é metabolizado inicialmente ao isômero epóxido diol, (+)-BP 7,8-diol-9,10-epóxido, único metabólito com alta atividade tumoral, encontrado predominantemente ligado covalentemente ao DNA em uma variedade de células de mamíferos e outros organismos expostos ao benzo(a)pireno.

1.2.3. Carcinogenicidade

Segundo a IARC (1983), existem evidências suficientes de carcinogenicidade em animais experimentais para benzo(a)antraceno (B(a)A), benzo(b)fluoranteno (B(b)F), benzo(a)pireno B(a)P, dibenzo(a,h)antraceno

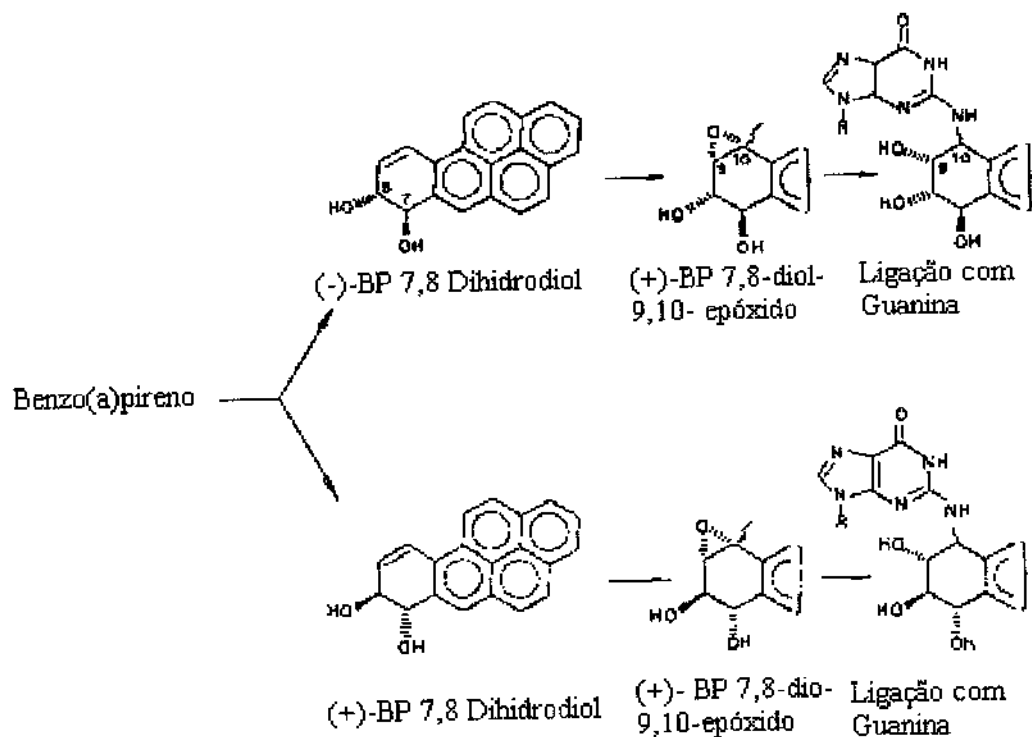


Figura 2 - Formação dos metabólitos 7,8-diol-9,10-epóxidos do benzo(a)pireno (THAKKER et alii, 1977).

(D(a,h)A), benzo(k)fluoranteno (B(k)F), enquanto que para outros HPAs, como o criseno, existem evidências limitadas de carcinogenicidade.

O benzo(a)pireno têm sido utilizado como modelo dos HPAs nos estudos do mecanismo de carcinogenicidade em tecidos humanos, e a utilização de seus metabólitos sintéticos também têm permitido estudos do metabolismo, de mutagenicidade e de carcinogenicidade *"in vitro"* e *"in vivo"*.

Testes de embriotoxicidade e teratogenicidade do B(a)P foram positivos em ratos, revelando também redução na fertilidade de machos e fêmeas. O B(a)P também demonstrou ser ativo em testes de reparação do DNA de bactérias, mutação bacteriana e na indução bacteriofágica, enquanto que os testes *in vivo* em mamíferos resultaram na troca de cromátides irmãs incluindo

ligação ao DNA, aberrações cromossômicas, anormalidades nos espermatozoides e focos de especificidade somática (IARC, 1983).

Estudos *in vitro* sobre a toxicidade reprodutiva e teratogênese não foram conclusivos para o benzo(a)antraceno, embora tenha sido demonstrada sua mutagenicidade para *Drosophila melanogaster* e para *Salmonella typhimurium* na presença de sistema metabólico exógeno. Embora não exista na literatura dados de teratogênese para os hidrocarbonetos benzo(b)fluoranteno e benzo(k)fluoranteno, estes compostos revelaram-se carcinogênicos em animais de laboratório, enquanto que o criseno mostrou atividade como iniciador, promotor de tumores em animais de laboratório e mutagênico em ensaios com a *Salmonella typhimurium* (IARC, 1983).

A atividade carcinogênica dos HPAs, segundo alguns autores, está intimamente relacionada com um local comum em sua estrutura, denominado de "bay region" (Figura 3) (JERINA et alii, 1978; HERNDON, 1981; COONEY, 1982). A região angular formada entre o anel benzênico e a parte linear da cadeia propicia a formação do íon carbônio, ativando a molécula. Diversos trabalhos têm demonstrado a importância desta região na formação do íon carbônio. Segundo os autores, a abertura do anel benzênico para formação do íon carbônio ocorre com maior facilidade quando os dihidrodiol-epóxidos são formados em anéis benzênicos saturados adjacentes a uma "bay region". A interação dos diol-epóxidos do B(a)P com o DNA e polinucleotídeos ocorre principalmente entre o C-10 do B(a)P e o grupo exocíclico 2-amino da guanina (COONEY, 1982; PHILLIPS, 1983; DIPPLE et alii, 1984).

A hipótese da "bay region" no mecanismo de formação do diol-epóxido não é a única via de biotransformação proposta para os HPAs. Outra possibilidade de toxificação é a oxidação do benzo(a)pireno no C-6, uma vez que as quinonas que podem se formar por esta via exercem sua atividade nos ciclos de oxi-redução, sendo as responsáveis por danos celulares (PELKONEN & NEBERT, 1982).

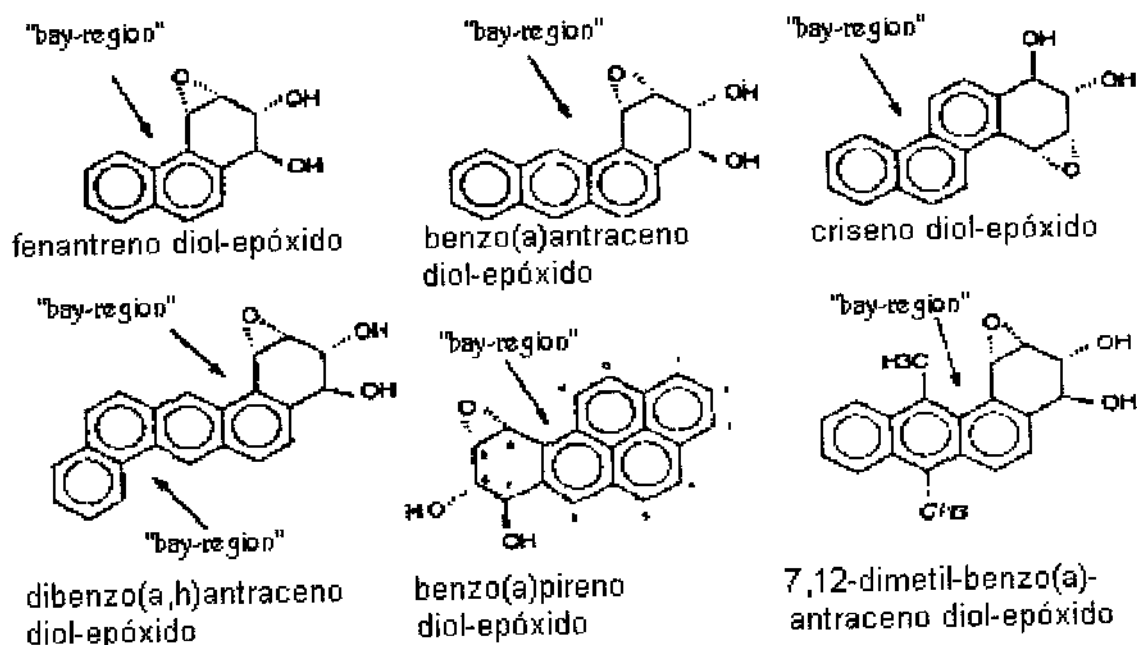


Figura 3 - "Bay region" de alguns hidrocarbonetos policíclicos aromáticos.

Na presença de glutathione-S-transferases, os metabólitos hidroxilados podem sofrer conjugação com o ácido glucurônico, transformando-se em moléculas mais hidrossólúveis e facilmente eliminadas (PHILLIPS, 1983; DIPPLE et alii, 1984).

1.2.4. Eliminação

Após a metabolização, os HPAs são removidos do organismo principalmente por excreção hepatobiliar e eliminação pelas fezes, indiferentemente da rota inicial de administração. Após a biotransformação dos hidrocarbonetos, 70 a 75% dos metabólitos são excretados por via hepatobiliar,

enquanto que apenas 4 a 12 % são eliminados pela urina. Estudos revelaram também que:

- a) não há evidências de que o benzo(a)pireno seja eliminado pelo ar expirado;
- b) menos que 1% do benzo(a)pireno recuperado na bile não é metabolizado;
- c) a média de excreção biliar de benzo(a)pireno torna-se saturada na dose intravenosa de 750 µg/kg;
- d) a canulação do ducto biliar reduz pela metade a excreção urinária de metabólitos de benzo(a)pireno, sugerindo a possibilidade de circulação enterohepática (KOTIN, 1959; LARSEN, 1991). Neste ciclo, antes de atingirem a circulação sistêmica, os metabólitos absorvidos do trato gastrointestinal entram no fígado via circulação portal.

A importância da metabolização e excreção hepatobiliar para a eliminação dos HPAs sugere que a administração oral de hidrocarbonetos poderia resultar no aumento das médias de excreção e menores níveis tissulares, em relação às rotas de administração nas quais o hidrocarboneto atinge a circulação sistêmica sem a primeira passagem através do fígado (KOTIN, 1959).

Estudos conduzidos por ALTIO (1974) revelaram que 82% de uma dose administrada oralmente de 3-metil-cloro-antraceno foram excretados em 24 horas, enquanto que somente 30% de uma dose administrada intraperitonalmente foram excretados em 72 horas. O autor também observou, em estudos conduzidos em camundongos, que após a administração intragástrica de 3-metil-cloro-antraceno ocorria uma rápida indução do sistema das monooxigenases de função mista na mucosa intestinal, bem como no fígado.

1.3. Estudos Epidemiológicos

Vários estudos tem procurado estabelecer uma relação entre câncer e dietas específicas. DUNGAL (1961) foi pioneiro em tentar correlacionar a dieta básica da Islândia, que consiste em grande parte de peixes e carnes defumadas, com uma alta incidência de câncer de estômago na população. Embora os habitantes daquele país se alimentassem diariamente de grandes quantidades de alimentos defumados, que continham níveis elevados de HPAs carcinogênicos, como B(a)P, os resultados dos estudos não foram conclusivos, apesar das fortes evidências de que seriam os HPAs o agente causal. Pesquisas conduzidas por outros autores (HAENNI, 1968; THORSTEINSSON & THORDARSON, 1968; ENGST & FRITZ, 1975) também não puderam comprovar qual ou quais substâncias eram responsáveis pela carcinogenicidade, já que outros compostos carcinogênicos, como as N-nitrosaminas, estão também presentes em pequenas quantidades em produtos defumados.

Estudos semelhantes foram realizados por MASUDA et alii (1966) em relação à incidência de câncer de estômago na população japonesa e o hábito de se alimentarem com peixes defumados, e por IZMEROV (1983) na Rússia. Em ambos os casos, as evidências de carcinogenicidade não foram conclusivas.

A determinação da causa de câncer em humanos é extremamente difícil, pois o homem está exposto diariamente às mais variadas substâncias com potencial tóxico. O câncer é uma doença que se manifesta principalmente depois da meia-idade e está particularmente ligado à exposição crônica a pequenas quantidades de carcinógenos químicos (WALTENBERG, 1978). Além disso, é muito difícil estabelecer a dose de determinada substância que é cancerígena em humanos a partir de uma extrapolação de dados de estudos realizados em animais de laboratório. Segundo a IARC (1983), os compostos para os quais existem evidências ou suspeitas de carcinogenicidade em animais devem ser controlados, uma vez que representam um risco potencial para humanos.

1.4. Alimentos como Fontes de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos

A presença de HPAs em alimentos parece estar relacionada principalmente com a poluição ambiental, podendo ter origem natural ou não. Entre as fontes naturais, incluem-se incêndios em florestas e a conversão da biomassa do petróleo e do carvão (GUNTHER et alii, 1967; LARSSON, 1986). Entre as fontes não naturais, estão os aquecedores à gás ou madeira, utilizados tanto em residências como em indústrias, os gases provenientes dos escapamentos dos carros, alguns processos industriais aos quais os alimentos são submetidos, tais como a defumação, a secagem direta, a torrefação e alguns tipos de cozimento (TIEFENBACHER et alii, 1982; LARSSON, 1982). HOPIA et alii (1986) sugeriram que o processo de secagem dos grãos poderia estar contribuindo para o aumento dos teores de HPAs em produtos como os óleos vegetais e as margarinas.

Alimentos como peixes, algas e ostras são expostos aos HPAs através dos efluentes industriais (VASSILAROS, et alii, 1982), enquanto que as frutas e verduras são contaminadas devido ao cultivo em regiões industrializadas ou próximas de estradas (LARSSON, 1982).

Segundo HATTERMER-FREY & TRAVIS (1991), a cadeia alimentar é responsável por aproximadamente 97% da exposição humana diária total ao benzo(a)pireno e parece contribuir com os níveis mais altos. Os níveis de HPAs totais encontrados nos alimentos podem variar desde $< 0,1 \mu\text{g/kg}$ até $3700 \mu\text{g/kg}$, como determinado por LARSSON et alii (1987) em óleo bruto de coco.

SANTODONATO et alii (1980) também ressaltaram a importância dos alimentos como fonte de exposição aos HPAs. Segundo os autores, a ingestão diária de B(a)P nos EUA varia entre 0,16 e $1,6 \mu\text{g/dia}$, enquanto que na Holanda a ingestão diária estimada é de 1,1 a $22,5 \mu\text{g}$ / pessoa (VAESSEN et alii, 1984).

A diversidade de hábitos alimentares têm estimulado a quantificação destes carcinógenos em diferentes alimentos típicos de cada país ou região (LODOVICI et alii, 1995). Alimentos como carnes e peixes defumados, e também

o churrasco, podem estar contaminados por grandes quantidades de HPAs, como demonstrado nos estudos conduzidos por BAILEY & DUNGAL (1958); THORSTEINSSON & THORDARSON (1968); LIJINSKI & SHUBIK (1964); TIENFENBACHER et alii (1982); NOLL & TOLEDO (1997).

Pesquisas desenvolvidas na Islândia por BAILEY & DUNGAL (1958) revelaram a presença de 2,1 e 1,3 $\mu\text{g/kg}$ de B(a)P em trutas e carne de carneiro defumados e de 0,5 a 0,3 $\mu\text{g/kg}$ em bacalhau e peixe vermelho, respectivamente.

A maior contribuição de HPAs na dieta, segundo estudo conduzido por DENNIS et alii (1983) e de VOS et alii (1990), parece vir dos óleos e gorduras e dos cereais. Segundo DENNIS et alii (1983), os cereais, embora apresentem níveis de HPAs relativamente mais baixos que os óleos e gorduras, representam a principal fonte de exposição devido a seu fator de contribuição na dieta total inglesa, seguidos pelos óleos e gorduras que, embora consumidos em menor quantidade, contêm altos níveis de HPAs.

Os diferentes hábitos alimentares na Itália em relação a outros países da Europa também levaram LODOVICI et alii (1995) a analisar os alimentos mais consumidos naquele país quanto ao teor de HPAs e a avaliar a contribuição da dieta básica daquela população, composta principalmente de leite, iogurte e pães, para a ingestão de HPAs. Os resultados indicaram níveis de HPAs totais de 3,12 $\mu\text{g/kg}$ em leite e iogurtes e de 1,65 $\mu\text{g/kg}$ para pães. Em frutas e vegetais, os níveis médios encontrados foram 0,64 $\mu\text{g/kg}$ e 14,0 $\mu\text{g/kg}$, respectivamente. Embora a maior contaminação tenha sido encontrada em carne assada como churrasco (42,11 $\mu\text{g/kg}$), sua contribuição para a ingestão de HPAs totais, estimada em 3 $\mu\text{g/dia}$ para uma dieta típica italiana, foi considerada pequena, devido a seu baixo consumo pela população.

No Brasil, NOLL & TOLEDO (1995) avaliaram a contaminação por HPAs de carnes, frangos e linguiças assadas em churrasqueiras caseiras e sua contribuição para a ingestão diária desses compostos. Segundo os autores, considerando-se que um adulto consome em média 3 asinhas de frango (85 g de

carne), 200g de picanha e 100g de linguiça em um churrasco típico, o consumo de B(a)P nesta refeição seria em média 1,35 µg/kg, ou 5,40 µg/kg, somando-se os cinco hidrocarbonetos carcinogênicos analisados.

1.5. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em Óleos, Gorduras e Derivados

Os primeiros trabalhos relatando a contaminação de alimentos gordurosos por HPAs foram realizados por JUNG & MORAND (1962, 1963 e 1964) em azeites de oliva, utilizando a técnica de espectroscopia de fluorescência. Nestes trabalhos, os HPAs foram apenas identificados, não tendo sido realizada sua quantificação. Em um trabalho publicado em 1965, CIUSA et alii, que também analisaram azeites de oliva, detectaram por método semi-quantitativo a presença de vários HPAs, exceto B(a)P.

BORNEFF & FABIAN (1966), utilizando a técnica de espectroscopia de UV-VIS, encontraram níveis de até 1 µg/kg de benzo(a)pireno em óleos e gorduras, enquanto que SWALLOW (1976), empregando a cromatografia gasosa no estudo da contaminação de azeites de oliva, amendoim, soja, milho e coco, encontraram níveis de B(a)P de até 9 µg/kg.

Os estudos de HOWARD et alii (1966) revelaram níveis de contaminação em óleos vegetais mais altos do que os valores reportados por BORNEFF & FABIAN (1966). Os autores analisaram óleo de amendoim, óleo de milho, azeites e margarinas, e os níveis de HPAs totais encontrados foram de 7,3; 9,5; 5,6; 8,2 e 8,7 µg/kg, respectivamente. O resultado deste trabalho possibilitou o desenvolvimento de um método de análise quantitativa oficial para determinação de HPAs em óleos vegetais processados nos Estados Unidos (método da AOAC).

JOE et alii (1979) analisaram posteriormente os mesmos óleos estudados por HOWARD et alii (1966), encontrando teores de HPAs totais maiores do que aqueles determinados no primeiro estudo. As amostras analisadas revelaram níveis de 23,4; 2,6 e 21,4 μg HPAs totais /kg para os óleos de amendoim, milho e azeites, respectivamente.

VAN HEDDEGHEM et alii (1980) encontraram teor médio de B(a)P de 0,74 $\mu\text{g}/\text{kg}$ em óleos e gorduras. Os autores consideraram que, embora a quantidade de HPAs nos alimentos em geral fosse pequena, a alta incidência dos óleos e gorduras na composição de vários alimentos poderia contribuir para o aumento do seu teor total de HPAs.

LAWRENCE & WEBER (1984) analisaram amostras de alimentos de origem vegetal, cuja contaminação por HPAs têm sido atribuída à poluição ambiental e à secagem direta dos grãos. Entre as amostras de óleos vegetais analisadas neste trabalho, os óleos de canola continham níveis mínimos de HPAs carcinogênicos (0,1 $\mu\text{g}/\text{kg}$), enquanto que os óleos de soja e de milho apresentaram níveis significativamente maiores, de 2,4 e 4,6 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectivamente.

Segundo DENNIS et alii (1991) cerca de 80% da ingestão diária de HPAs vem do grupo de alimentos formados pelos cereais, como pão, biscoitos e bolos, e do grupo dos óleos e gorduras, que por sua vez é constituído por diversos alimentos (70% são margarinas, 11% óleos e 9% banhas). Estes autores detectaram nível médio de B(a)P igual a 1,29 $\mu\text{g}/\text{kg}$ em óleos vegetais e de 2,2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ em produtos derivados de cereais com alto teor de óleos vegetais, sugerindo que os óleos comestíveis podem contribuir para o incremento do teor de HPAs nestes produtos. As amostras de óleos vegetais analisadas neste estudo mostraram variações nos níveis de contaminação de até 20 vezes.

Os altos níveis de HPAs em óleos brutos também levaram LARSSON et alii (1987) a verificar a influência do processo de refino na contaminação de óleos vegetais. A pesquisa verificou que algumas amostras de óleos brutos de soja,

canola e coco estavam contaminados com altos teores de hidrocarbonetos (34 a 3700 µg/kg), os quais foram reduzidos para 2 a 59 µg/kg após etapas de clarificação e desodorização. Estas etapas do processo de refino não demonstraram ser eficientes na eliminação dos hidrocarbonetos de pesos moleculares mais altos, contendo 4 ou mais anéis. Os resultados obtidos por estes pesquisadores estão de acordo com os estudos conduzidos por DENNIS et alii (1991) que, após analisarem amostras de óleos de canola, soja, peixe e milho, concluíram que o processo de refino reduzia o teor dos hidrocarbonetos fluoranteno, pireno, benzo(a)antraceno e criseno. Entretanto, os níveis de HPAs de maior peso molecular mantiveram-se muito próximos daqueles determinados antes do processo de refino. As quantidades de B(a)P e HPAs totais no óleo de coco bruto variaram de 20 a 34 µg/kg e de 2600 a 3700 µg/kg, respectivamente, enquanto que nos óleos desodorizados correspondentes variaram de <0,1 a 0,3 µg/kg e de 2 a 59 µg/kg, respectivamente.

A remoção de HPAs de óleos vegetais foi inicialmente proposta por BIERNORTH & ROST (1967), que analisaram 13 HPAs em amostras de óleos vegetais em várias fases do processo de refino. Os autores concluíram que a adição de carvão ativado na etapa de clarificação, combinado com o processo de desodorização, eram particularmente eficazes na remoção de HPAs de alto peso molecular. A redução na quantidade total de HPAs presentes no óleo de coco, observada pelos autores foi, de 1923 µg/kg para 13 µg/kg. Alguns modelos similares de remoção de HPAs durante o refino tem sido relatados por outros autores (THOMAS, 1982; LARSSON et alii, 1987; SAGREDOS et alii, 1988)

As quantidades de HPAs encontradas em alguns óleos vegetais têm incentivado diversos pesquisadores a monitorarem os óleos mais consumidos em seus países, e os estudos desenvolvidos têm revelado uma grande variação nos níveis encontrados nos óleos de mesma origem vegetal, amostrados em épocas distintas (Tabela 1).

Os óleos vegetais holandeses revelaram valores entre 0,3 e 26,1 µg/kg de benzo(a)pireno (WELLING & KAANDORP, 1986), enquanto que SPEER &

Tabela 01- Teor de B(a)P ($\mu\text{g/kg}$) em óleos vegetais

ÓLEOS VEGETAIS							Referências Bibliográficas
Soja	Milho	Algodão	Coco	Amendoim	Oliva	Girassol	
1,7	-	-	-	-	-	10,6	GRIMMER & HILDEBRANDT, 1967
1,2 - 1,5	0,4 - 1,0	0,4 - 0,4	-	-	0,4 - 0,5	-	HOWARD & FAZIO, 1969
<0,5	2,0	-	7,0	9,0	2,0	8,0	SWALLOW, 1976
-	n.d.	-	-	n.d.	n.d.	-	JOE et alii, 1979
28,45	-	-	-	10,69 - 105,74	-	1,51	KOLAROVIC & TRAITLER, 1982
0,2	-	0,3	-	-	-	-	LAWRENCE & WEBER, 1984
0,74 - 1,3	0,02	-	0,2	-	n.d.	n.d.	HOPIA et alii, 1986
-	0,5 - 26,1	-	-	-	0,8	0,3 - 1,9	WELLING & KAANDORF, 1986
0,5 - 1,3	0,4 - 12,7	0,2	0,9 - 27,4	1,2 - 170	2,2	0,1 - 1,3	STIJVE & HISCHENHUBER, 1987
0,3 - 1,1	-	-	<0,1 - 0,3	0,3 - 1,3	-	-	LARSSON et alii, 1987
-	0,5 - 2,3	-	-	-	0,2 - 1,2	<0,1 - 0,8	SPEER & MONTAG, 1988
-	0,5 - 2,3	-	-	-	0,2 - 1,2	<0,1 - 0,8	SPEER et alii, 1990
0,98 - 5,39	1,51 - 5,18	-	-	-	-	-	DENNIS et alii, 1991
-	-	-	-	-	n.d. - 164,4	-	PUPIN & TOLEDO, 1996a
n.d. - 4,5	1,6 - 58,9	-	-	-	-	n.d. - 2,2	PUPIN & TOLEDO, 1996b

n.d. - não detectado

(-) não disponível

MONTAG (1988) encontram níveis < 0,1 a 4,1 µg/kg para amostras de óleo comestível da Alemanha.

Os maiores teores de HPAs encontrados em óleos vegetais foram relatados por STIJVE & HISCHENHUNBER (1987). As quantidades de B(a)P encontradas por estes pesquisadores foram de até 170 µg/kg, em uma amostra de óleo de amendoim.

A contaminação de margarinas, manteigas e óleos vegetais por HPAs de origem Finlandesa foi estudada por HOPIA et alii (1986), que encontraram níveis de B(a)P na faixa de 0,02 a 2,2 µg/kg em margarinas e gorduras vegetais, enquanto que os estudos de DENNIS et alii (1991) revelaram concentrações de B(a)P de 0,19 a 6,0 µg/kg em 19 amostras de margarinas e cremes vegetais analisados.

Até o presente, não existem dados sobre a contribuição da dieta típica brasileira para a exposição humana a HPAs e poucos estudos foram realizados para avaliar a contaminação de alimentos brasileiros por estes compostos (NOLL & TOLEDO, 1995; NOLL & TOLEDO, 1997; PUPIN & TOLEDO, 1996a, PUPIN & TOLEDO 1996b).

Com base no consumo brasileiro interno de óleos vegetais, PUPIN & TOLEDO (1996b), estimaram que óleos de soja e milho contribuem, respectivamente, com 2,2 µg/kg e 10,8 µg/kg para a ingestão diária de B(a)P. O estudo revelou ainda que os óleos vegetais disponíveis no comércio estavam contaminados com níveis de B(a)P na faixa de não detectado (< 0,5 µg/kg) até 58,9 µg/kg, determinados em óleos de milho.

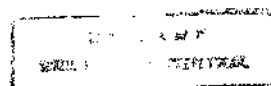
A contaminação encontrada por estes pesquisadores nos óleos analisados e, em particular no óleo de milho, foi superior àquelas reportadas em outras pesquisas, revelando também grande variação entre diferentes lotes da mesma marca.

1.6. Métodos de Identificação e Quantificação

Desde a descoberta do potencial carcinogênico dos HPAs, vários pesquisadores têm dedicado seus estudos ao desenvolvimento de métodos de extração e quantificação, adaptando-os aos diferentes alimentos. As metodologias mais empregadas para a análise de HPAs são, na verdade, um conjunto de técnicas que têm por objetivo extrair estes contaminantes de matrizes complexas, como é o caso dos alimentos, purificar os extratos obtidos de possíveis interferentes, tais como proteínas, gorduras e carotenóides e, finalmente, quantificá-los. (JOE et alii, 1984).

Os métodos que têm sido utilizados na extração destes contaminantes empregam diferentes solventes, podendo incluir ou não uma etapa de saponificação (GRIMMER & BÖHNKE, 1975; LARSSON, 1982; LAWRENCE & WEBER, 1984; SAGREDOS et alii, 1981). A saponificação, segundo GRIMMER & BÖHNKE (1975), pode aumentar em até 60% a recuperação de HPAs, sendo usada principalmente para alimentos ricos em proteínas. Os autores que utilizaram a etapa de saponificação metanólica concluíram que os HPAs poderiam se ligar adsortivamente a estruturas moleculares não destrutivas, como os lipídeos e as proteínas, caso o processo de extração não incluísse a etapa de saponificação. Outros autores, como HOWARD et alii, 1966; STIJVE & HISCHENHUNBER, 1987; de VOS et alii, 1990, que também fizeram uso da técnica de saponificação, utilizaram uma solução etanólica de hidróxido de sódio.

Alguns métodos de extração podem não incluir a etapa de saponificação, sendo a amostra colocada diretamente em contato com o solvente orgânico (LIJINSKI & SHUBIK, 1964). Os solventes orgânicos mais utilizados na extração de HPAs são o ciclohexano (BAILEY & DUNGAL, 1958; GRIMMER & BOHNKE, 1975; LAWRENCE & WEBER, 1984; SAGREDOS et alii, 1981), o isooctano (HOWARD et alii, 1966; DENNIS et alii, 1983), o hexano (LIJINSKI & SHUBIK, 1964; SAITO et alii, 1978) e o triclorofluoroetano (GRIMMER & JACOB, 1987).



Após a extração dos hidrocarbonetos, é necessária a purificação para retirada de interferentes, já que os alimentos são matrizes complexas e outros compostos podem estar dissolvidos no extrato obtido (JOE et alii, 1984). O procedimento utilizado na purificação das amostras envolve em geral uma etapa de partição, possibilitando a separação dos HPAs da gordura, por afinidade com solventes como a dimetilformamida (DMF) (GRIMMER & BÖHNKE, 1975; LARSSON, 1982) ou o dimetilsulfóxido (DMSO) (HOWARD et alii, 1966; DENNIS et alii, 1983; LAWRENCE & WEBER, 1984).

A maioria dos métodos propostos na literatura para extração de alimentos gordurosos como óleos e gorduras não utiliza processos prévios de saponificação, dissolvendo-os diretamente em solventes como o ciclohexano. A limpeza das amostras pode ser realizada com coluna de sílica gel (15% água) e Sephadex LH20, e a detecção por cromatografia gasosa com detector de massa (BORIES, 1980).

Em geral, os métodos que têm sido empregados no estudo de HPAs são:

- 1) cromatografia de camada delgada (CCD) (GRIMMER & HILDEBRANDT, 1972);
- 2) separação por (CCD) e quantificação por espectrofluorimetria (HOWARD et alii, 1966);
- 3) cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (VAN HEDDEGHEM et alii, 1980; DENNIS et alii, 1984; LAWRENCE & WEBER, 1984);
- 4) cromatografia gasosa (CG) (GRIMMER & BÖHNKE, 1975; HOPIA et alii, 1986; VREULS et alii, 1991; PERFETTI et alii, 1992).

As técnicas de separação e quantificação dos HPAs mais empregadas atualmente são a cromatografia líquida de alta eficiência e a cromatografia gasosa, embora alguns autores também utilizem a cromatografia em camada delgada de sílica, celulose acetinada ou alumina para separação e quantificação desses hidrocarbonetos (BORIES, 1980; HOWARD et alii, 1966; GRIMMER & JACOB, 1987).

A técnica de cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fluorescência começou a ser utilizada na determinação de HPAs após o desenvolvimento das fases estacionárias quimicamente ligadas (LARSSON, 1986).

A separação e quantificação de HPAs por cromatografia gasosa ficou, por sua vez, mais sensível com o emprego de coluna capilar e detector de ionização de chama acoplado ao detector de massa (LAWRENCE & WEBER, 1984; HOPIA et alii, 1986; LARSSON et alii, 1987).

A cromatografia gasosa com coluna capilar acoplada ao detector de massa, embora exija uma etapa de limpeza mais eficiente da amostra, é uma técnica bastante seletiva com grande poder de resolução, identificando e quantificando um grande número de hidrocarbonetos (PERFETTI et alii, 1992). Por outro lado, a cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fluorescência, embora não possua a alta resolução das colunas capilares, apresenta maior sensibilidade em relação aos HPAs de alto peso molecular e boa seletividade (KAGI et alii, 1985, citado por PERFETTI et alii, 1992).

DENNIS et alii (1984) comparando a cromatografia gasosa e a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) não encontraram diferença de sensibilidade entre estas técnicas quando utilizadas na determinação de HPAs em alimentos.

A confirmação dos picos de HPAs, quando sua separação e quantificação são realizadas por cromatografia gasosa, é em geral feita utilizando-se detector de massa (GRIMMER & BÖHNKE, 1975; HOPIA et alii, 1986; LARSSON et alii, 1987; SPEER & MONTAG, 1988; SPEER et alii, 1990; MENECHINI et alii, 1991). Quando se utiliza a cromatografia líquida de alta eficiência, a técnica mais recentemente adotada para confirmação do pico é a varredura de fotodiodos, capaz de identificar e analisar a pureza do pico. Este detector registra uma faixa espectral inteira durante uma única análise, coleta os dados de absorbância na faixa de 190 nm a 800 nm, armazena inúmeros dados, tornando assim possível a

identificação de todos os componentes que absorvem dentro da faixa de comprimento de onda selecionado (PICKERING, 1990).

1.7. Legislação

Poucos países apresentam legislação nacional limitando a presença de HPAs em alimentos. Na Alemanha, Áustria e Polônia por exemplo, o limite máximo de B(a)P é de 1 µg/kg para carnes defumadas, e este valor tem sido usado como limite referencial para avaliar a contaminação de outros alimentos (LARSSON et alii, 1987).

Na Austrália, não é permitida a presença de HPAs em aromatizantes de fumaça, enquanto que na Finlândia, o uso da fumaça como aditivo só é permitido se a mesma contiver no máximo 30 µg/kg de B(a)P e com teores residuais máximos de 0,5 µg/kg de alimento (WALKER, 1977).

Indústrias de óleos na Alemanha, por sua própria iniciativa, recomendam que a soma dos resíduos de fenantreno, antraceno, benzo(a)antraceno, criseno, benzo(a)pireno, perileno, benzo(g,h,i)perileno, dibenzo(a,h)antraceno, não ultrapasse 25 µg/kg, e a soma dos HPAs pesados (5 ou mais anéis benzênicos) deve permanecer abaixo de 5 µg/kg (SPEER, et alii, 1990).

No Brasil, a legislação não estabelece limites máximos de HPAs em alimentos. Existe apenas restrição à presença de benzo(a)pireno em aroma de fumaça (0,1 µg/kg) (Resolução nº20/72 da CNNPA), sendo que a quantidade de aroma de fumaça a ser utilizado em produtos cárneos deve ser no máximo 90 mg/kg (ABIA, 1989).

1.8. Referências Bibliográficas

1. ABIA. Compêndio da Legislação de Alimentos: Atos do Ministério da Saúde. São Paulo, 1989. v. 1. (Res. 20/72).
2. AITIO, A. Different elimination and effect on mixed function oxidase of 20-methylcholanthrene after intragastric and intraperitoneal administration. **Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology**. 9: 701-710, 1974.
3. ANDELMAN, J.B. & SUESS, M.J. Polynuclear aromatic hydrocarbons in the water environment. **Bulletin World Health Organization**. 43: 479-508, 1970.
4. BAILEY, E.J. & DUNGAL, N. Polycyclic hydrocarbons in icelandic smoked food. **British Journal of Cancer**. 12: 348-350, 1958.
5. BIERNOTH, G. & ROST, H.E. The occurrence of polycyclic aromatic hydrocarbon in coconut oil and their removal. **Chemistry and Industry**. (25): 2002-2003, 1967.
6. BINGHAM, E. & FALK, H.L. Environmental carcinogens. The modifying effect of co-carcinogens on the threshold response. **Archives of Environmental Health**. 19: 779, 1969.
7. BORNEFF, J. & FABIAN, B. Kanzerogene Substanzen in Speisefett und öl. Note I, II e III. **Archiv. Hyg. Bakteriologie**. 15(6): 485- 512, 1966.
8. BORIES, G. Problèmes analytiques posés par la dosage des hydrocarbures aromatiques polycycliques dans les denrées alimentaires. **Annales des Falsifications et the L' Expertise Chimique**. 73 (789): 477-486, 1980.

9. CIUSA, W.; NEBBIA, G.; BUCCELI, A.; VOLPONES, E. Research on polycyclic aromatic hydrocarbon present in olive oil. **Rivista Italiana Delle Sostanze Grasse**. 42: 175-179, 1965.
10. COOK, J.W.; HEWETT, C.L.; HIEGER, I. Isolation of a cancer-producing hydrocarbon from coal tar. parts I, II and III. **Journal of Chemical Society**. 395-405, 1933.
11. COONEY, A.H. Induction of microsomal enzymes by foreign chemicals and carcinogenesis by polycyclic aromatic hydrocarbons: G.H.A. Clowes Memorial Lecture. **Cancer Research**. 42: 4875-4917, 1982.
12. DENNIS, M.J.; MASSEY, R.C.; CRIPPS, G.; VENN, I.; HOWARNTH, N.; LEE, G. Factors affecting the polycyclic aromatic hydrocarbon content of cereal, fats and other food products. **Food Additives and Contaminants**. 8 (4): 517-530, 1991.
13. DENNIS, M.J.; MASSEY, R.C.; McWEENY, D.J.; KNOWLES, M.E.; WATSON, D. Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in UK total diets. **Food and Chemical Toxicology**. 21 (5): 569-574, 1983.
14. DENNIS, M.J.; MASSEY, R.C.; McWEENY, D.J.; LARSSON, B.; ERIKSSON, A.; SAHLBERG, G. Comparison of a capillary gas chromatography and a high-performance liquid chromatography method of analysis for polycyclic aromatic hydrocarbons in food. **Journal of Chromatography**. 285: 127-133, 1984.
15. DIPPLE, A.; MOSCHEL, R.C.; BIGGER, C.A.H. Polynuclear Aromatic Carcinogens. In. Chemical Carcinogens. SEARLE, C.E. ed. American Chemical Society, Washington. vol. 1, pp. 41-163, 1984.

16. DUNGAL, N. The special problem of stomach cancer in Iceland. **Journal of the American Medical Association**. 178 (8): 789-798, 1961.
17. DUNN, B.P.; ARMOUR, R.J. Sample extration and purification for determination of polycyclic aromatic hydrocarbons by reversed phase chromatography. **Analytical Chemistry**. 52(13): 2027-2031, 1980.
18. ENGST, R. & FRITZ, W. Contamination food with carcinogenic hydrocarbons of environmental origin. **Rocz. Panst. Zakl. Hig.** 26: 113-118, 1975.
19. GRIMMER, G.; BÖHNKE, H. Polycyclic aromatic hydrocarbon profile of high-protein foods, oils and fats by gas chromatography. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**. 58(4): 725-733, 1975.
20. GRIMMER, G.; JACOB, J. Recommended method for gas chromatographic profile analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked food. **Pure and Applied Chemistry**. 59(12): 1729-1734, 1987.
21. GRIMMER, G. & HILDEBRANDT, A. Hydrocarbon in the human environment. V. The content of polycyclic hydrocarbons in bread-grains from various localities. **Zeitschrift fuer Krebsforschung**. 67: 272-277, 1965.
22. GRIMMER, G.; HILDEBRANDT, A. Content of polycyclic hydrocarbons in crude vegetable oils. **Chemistry and Industry**. 25: 2000-2002, 1967.
23. GRIMMER, G.; HILDEBRANDT, A. Concentration and estimation of 14 polycyclic aromatic hydrocarbons at low levels in high-protein foods, oils and fats. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**. 55(3): 631-635, 1972.

24. GUNTHER, F.A.; BUZZETTI, F.; WESTLAKE, W.E. Residue behavior of polynuclear hydrocarbons on and in oranges. **Residue Reviews**. 17: 81-104, 1967.
25. HAENNI, E.O. Analytical control of polycyclic aromatic hydrocarbon in food and food additives. **Residue Reviews**. 24: 41-78, 1968.
26. HATTERMER-FREY, H.A. & TRAVIS, C.C. Benzo(a)pyrene environmental partitioning and human exposure. **Toxicology Industry and Health**. 7, 141-157, 1991.
27. HEILDERBERGER, C. & WEISS, S.M. The distribution of radioactivity in mice following administration of 3,4-benzo(a)pyrene-5C¹⁴ and 1,2,5,6-dibenzanthracene-9,10- C¹⁴. **Cancer Research**. 11:885-891, 1951.
28. HERNDON, W.C. Model calculations for reactivities of polycyclic aromatic hydrocarbons metabolites. **Tetrahedron Letters**. 22: 983-986, 1981.
29. HOPIA, A.; PYYSALO, H.; WICKSTRÖM, K. Margarines, butter and vegetable oils as sources of polycyclic aromatic hydrocarbons. **Journal of Oil Chemists Society**. 63(7): 889-893, 1986.
30. HOWARD, J.W. & FAZIO, T. A Review of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Foods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 17(3): 527-531, 1969.
31. HOWARD, J.W. & FAZIO, T. Review of polycyclic aromatic hydrocarbons in foods. Analytical methodology and reported findings of polycyclic aromatic hydrocarbon in foods. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**. 63(5): 1077-1104, 1980.

32. HOWARD, J.W.; TURICCHI, E.W.; WHITE, R.H.; FAZIO, T. Extration and estimation of polycyclic aromatic hydrocarbons in vegetable oils. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**. 49(6): 1236-1244, 1966.
33. IARC. International Agency for Research on Cancer. **Polynuclear Aromatic 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.
34. IZMEROV, N.F. ed. **Benzo(a)pyrene**. Moscow, Centre of International Projects (Scientific Reviews of Soviet Literature on Toxicity and Hazards of Chemicals). 43, 1-32., 1983.
35. JERINA, D.M.; THAKKER, D.R.; YAGI, H. Carcinogenicity of benzo(a)pyrene derivatives: the bay region theory. **Pure & Applied Chemistry**. 50: 1033-1044, 1978.
36. JERINA, D.M.; SAYER, J.M. THAKKER, D.R.; YAGI, H., LEVIN, W.; WOOD, A.W.; COONEY, AH. **Carcinogenicity of polycyclic aromatic hydrocarbons: the bay-region theory**. In: Pullman, B. Ts'O, P.O.P. & Gelboin, H., eds, **Carcinogenesis: Fundamental Mechanisms and Environmental Effects**, Hingham, M.A., D. Reidel Publishing Co., pp. 1-2, 1980.
37. JOE Jr., F.L.; EMMA, L.R.; FAZIO, T. Survey of some market basket commodities for polynuclear aromatic hydrocarbon content. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**. 62(3): 615-620, 1979.
38. JOE, J.R.; SALEMME, J.; FAZIO, T. Liquid chromatographic determination of trace residues of polynuclear aromatic hydrocarbons in smoked foods.

Journal of the Association of Official Analytical Chemists. 67: 1076-1082, 1984.

39. JUNG, L. & MORAND, P. Présence dans différents huiles végétales d'une substance donnant le spectre de fluorescence du benzo-3,4 pyrène. **Comptes Rendus de L'Academie Science.** 254: 1489-1491, 1962.
40. JUNG, L. & MORAND, P . Présence dans différents huiles végétales d'une substance donnant le spectre de fluorescence du benzo-3.4 pyrène dans différents huiles végétales. **Comptes Rendus de L'Academie Science.** 257(9): 1638-1640, 1963.
41. JUNG, L. & MORAND, P. Interpretation des spectes de fluorescence des huiles végétales. **Annales des Falsifications et the L' Expertice Chimique.** 57: 17-25, 1964.
42. KOLAROVIC, L. & TRAITLER, H. J. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in vegetable oils by caffeine complexation and glass capillary gas chromatography. **Journal of Chromatography.** 237(2): 263-272, 1982.
43. KOTIN, P.; FLAK, H.L.; BUSSE, R. Distribution, retention and elimination of C¹⁴-3,4-benzopyrene after administration to mice and rats. **Journal of National Cancer Institute.** 23, 541-555, 1959.
44. 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, 1991.
45. LARSSON, B.K. Polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked fish. **Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und- Forschung.** 174: 101-104, 1982

46. LARSSON, B. Polycyclic aromatic hydrocarbons in swedish food aspects on analysis, occurrence and intake. **Doctoral thesis**. Swedish University of Agricultural Science, Upsala, 1986.
47. LARSSON, B.K.; ERIKSON, A.T.; CERVENKA, M. Polycyclic aromatic hydrocarbon in crude and deodorized vegetable oils. **Journal of the American Oil Chemists Society**. 64(3), 365-370.
48. 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. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 32: 794-797, 1984.
49. LEVIN, W.; WOOD, A; CHANG, R.L.; RYAN, D.; THOMAS, P.E.; YAGI, H.; THAKKER, D.R.; BOYD, C.; CHU, S.-Y.; COONEY, A.H.; JERINA, D.M. Oxidative metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons to ultimate carcinogens. **Drug Metabolism Reviews**. 13: 555-580, 1982.
50. LIJINSKY, W. & SHUBIK, P. Benzo(a)pyrene and other polycyclic hydrocarbons in charcoal-broiled meat. **Science** 145: 53-55, 1964.
51. LO, M.-T. & SANDI, E. Polycyclic aromatic hydrocarbons (polynuclears) in foods. **Residue Reviews**. 69: 35-86, 1978.
52. LODOVICI, M.; DOLARA, P.; CASALINI, C.; CIAPPELLANO, S.; TESTOLIN, G. Polycyclic aromatic hydrocarbon contamination in the Italian diet. **Food Additives and Contaminants**. 12(5): 703-713, 1995.
53. LOW, G.K.-C.; BATLEY, G.E.; BRONCKBANK, C.I. Solvent- induced photodegradation as a source of error in the analysis of polycyclic

aromatic hydrocarbons. **Journal of Chromatography**. 392: 199-210, 1987.

54. MARNET, L.J.; REED, G.A.; JOHNSON, J.T. Prostaglandin synthetase dependent benzo(a)pyrene oxidation: Products of the oxidation and inhibition of their formation by antioxidants. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. 79: 569-576, 1977.
55. MARNET, L.J. & REED, G.A. Peroxidatic oxidation of benzo(a)pyrene and prostaglandin biosynthesis. **Biochemistry** 18: 2923-2929, 1979.
56. MASUDA, Y; MORI, K.; KURATSUNE, M. Polycyclic aromatic hydrocarbons in common Japanese foods, I. Broiled fish, roasted barley, shoyo and caramel. **Gann** 57: 133-142, 1966.
57. MENECHINI, E.; BOCCA, A.; MERLI, F.; IANNI, D.; MONFREDINI, F. Polycyclic aromatic hydrocarbons in olive oils on the italian market. **Food Additives and Contaminants**. 8(3), 363- 369, 1991.
58. NOLL, I. B. & TOLEDO, M. C. F. Polycyclic aromatic hydrocarbon in charcoal-broiled meat in Brazil. **Revista Española de Tecnología de Alimentos**. 35(2), 209-216, 1995.
59. NOLL, I. B. & TOLEDO, M. C. F. Benzo(a)pireno em carnes defumadas pelos processos caseiro e industrial. **Revista Brasileira de Toxicologia**. 10(1), 19-23, 1997.
60. PELKONEN, O & NEBERT, D.W. Metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: Etiologic role in carcinogeneses, **Pharmacology Reviews**. 34(2): 189-222, 1982.

61. PERERA, F.P. Uncovering New Clues to Cancer Risk. **Scientific American**. (5): 40-46, 1996.
62. PERFETTI, G.A.; NYMAN, P.J.; FISCHER, S.; JOE, F.L.; DIACHENKO, G.W. Determination of polynuclear aromatic hydrocarbons in seafood by liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**. 75(5): 872-877, 1992.
63. PHILLIPS, D.H. Fifty years of benzo(a)pyrene. **Nature**. 309(9): 468-472, 1983.
64. PICKERING, M.V. Diode Array: New dimensions in detection for high performance liquid chromatography. **LC.GC. Mag. Sep. Sci.** 8(11): 846-852, 1990.
65. PUPIN, A.M. & TOLEDO, M.C.F. (a). Benzo(a)pyrene in olive oils on the Brazilian market. **Food Chemistry**. 55(2), 185-188, 1996a.
66. PUPIN, A.M. & TOLEDO, M.C.F. (b). Benzo(a)pyrene in Brazilian vegetable oils. **Food Additives and Contaminants**. 13(6), 639-646, 1996b.
67. SAGREDOS, A.N., SINHA-ROY, D.; THOMAS, A. The determination, occurrence and composition of polycyclic aromatic hydrocarbons in oils and fats. **Fat Science and Technology**. 90(2): 76-81, 1988.
68. SAGREDOS, A.N., SINHA-ROY, D.; von JAN, E.A. Contribution to the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked foodstuffs via caffeine complexe. **Deutsche Lebensmittel-Rundschau**. 77(1): 33-36, 1981.
69. SANTODONATO, J.; HOWARD, P.H.J.; BASU, D Multimedia human exposure and carcinogenic risk assessment for environmental HPAS. In: Bjorseth, A.

& Dennis, A.J., eds., **Polynuclear Aromatic Hydrocarbons: Chemistry and Biological Effects**, 4th Int. Symposium, Columbus, OH, Battelle Press, pp. 435-454, 1980.

70. SAITO, Y.; SEKITA, H.; UCHIYAMA, M. Determination of benzo(a)pyrene in foods. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**. 61: 129-135, 1978.
71. SCHAAD, R.E. Chromatographie (Karzinogener) Polyzyklischer Aromatischer Kohlenwasserstoffe. **Chromatographic Reviews**. 13: 61-82, 1970.
72. SIMS, P. The metabolic activation of some polycyclic hydrocarbons. The role of dihydrodiols and diol-epoxides. In: Synder, R.; Parke, D.V.; Koesis, J.J.; Jollow, D.I.; Gibson, C.G.; Witmer, C.M., eds., **Biological Reactive Intermediates - II. Chemical Mechanisms and Biological Effects**, Part A. New York, Plenum Press., pp. 487- 500, 1982.
73. SPEER, K. & MONTAG, A. Polycyclische Aromatische Kohlenwassertoffe in nativen Pflanzlichen Ölen. **Fat Science and Technology**. 90(5): 163-167, 1988.
74. 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. **Journal of High Resolution Chromatography**. 13: 104-111, 1990.
75. STIJVE, T. & HISCENHUNBER, C. Simplified determination of benzo(a)pyrene and other polycyclic aromatic hydrocarbons in various food material by HPLC and TLC. **Deutsche Lebensmittel-Rundschau**. 83(9): 276-282, 1987.

76. SWALLOW, W.H. Survey of polycyclic aromatic hydrocarbon in selected foods and food additives available in New Zealand. **New Zealand Journal of Science**. 19: 407-412, 1976.
77. THAKKER, D.R.; YAGI, H. AKAGI, H. KORVEDA, M. LU, A.Y.H., LEVIN, W.; WOOD, A.W., COONEY, A.H.; JERINA, D.M. Metabolism of benzo(a)pyrene. VI. Stereoselective metabolism of benzo(a)pyrene and benzo(a)pyrene 7,8-diiodrodiol to diol epoxides. **Chemistry-bio Interations**. 16: 281 - 300,1977.
78. THOMAS, A. Über die Entfernung von Schadstoffen bei der Dämpfung von Speiseölen und Fetten. **Fette - Seifen - Anstrichmittel**. 84: 133-136, 1982.
79. THORSTEINSSON, T; THORDARSON, G. Polycyclic hydrocarbons in singed food in Iceland. **Cancer** 21: 390-392, 1968.
80. TIEFENBACHER, K.; PFANNHAUSER, W. WOIDICH, H. Investigation of contamination of food by polycyclic aromatic hydrocarbons. In: **Recent Developments in Food Analysis**. Baltes, W.; Czedik-Eysenberg, P.B.; Phannhauser, w. eds.,(European Federation of Chemistry Societies). Verlag Chemie, Federal Republic of Germany, 1982.
81. VAESSEN, H.A.M.G.; JEKEL,A.A.; WILBERS, A.A.M.M. Dietary intake of polycyclic aromatic hydrocarbons. **Toxicology and Environmental Chemistry**. 16, 281-294, 1988.
82. 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. **Toxicology and Environmental Chemistry**. 7: 297-324, 1984.

83. VAN HEDDEGHEM, A.; HUYGHEBAERT, A.; DE MOOR, H. Determination of polycyclic hydrocarbon in fat products by high pressure liquid chromatography. **Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung**. 171: 9-13, 1980.
84. VASSILAROS, D.L.; STOKER, P.W.; BOOTH, G.M.; LEE, M.L. Capillary gas chromatographic determination of polycyclic aromatic compounds in vertebrate fish tissue. **Analytical Chemistry**. 54(1): 106-112, 1982.
85. de VOS, R.H.; van DOKKUM, W.; SCHOUTEN, A.; DE JONG-BERKHOUT, P. Polycyclic aromatic hydrocarbons in Dutch total diet samples (1984-1986). **Food and Chemical Toxicology**. 28(4): 263-268, 1990.
86. VREULS, J.J.; de JONG, G.J.; Th. BRINKMAN, U.A. On line coupling of liquid chromatography and mass spectrometry for the determination and identification of polycyclic aromatic hydrocarbon in vegetable oils. **Chromatographia**. 31(3/4): 113-118, 1991.
87. WALKER, E.A. Some facts and legislation concerning polycyclic aromatic hydrocarbons in smoke foods. **Pure & Applied Chemistry**. 49: 1673-1686, 1977.
88. WALTENBERG, L.W. Inhibitors of chemical carcinogenesis. **Advanced Cancer Research**. 26: 197-226, 1978.
89. WEISBURGER, J.H. & WILLIAMS, G.M. In: Toxicology. The basic science of poisons. Edited by Klaasen, C.D.; Amdur, M.D. & Doule, J. Macmillan Publishing Company. Second Edition. 84-85, 1980.

90. WELLING, P. & KAANDORP, B. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAHs) in edible vegetable oils by liquid chromatography and programmed fluorescence detection. **Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung**. 183: 111-115, 1986.

Capítulo 2

BENZO(A)PIRENO EM ÓLEOS DE MILHO PRODUZIDOS E COMERCIALIZADOS NO BRASIL

trabalho aceito para publicação na revista:
Ciência e Tecnologia de Alimentos.

RESUMO

Óleos de milho de diferentes marcas, produzidos e comercializados no Brasil, foram analisados quanto à presença de benzo(a)pireno (B(a)P). A metodologia utilizada envolveu extração com ciclohexano, purificação em coluna de sílica gel e determinação por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fluorescência. Todas amostras analisadas mostraram-se contaminadas por B(a)P e os níveis determinados variaram entre as diferentes marcas analisadas e entre diferentes lotes de mesma marca, dentro da faixa de 0,85 a 25,17 µg/kg. Entre 49 amostras analisadas no período de dois anos, apenas uma apresentou nível de contaminação por B(a)P abaixo do limite referencial de 1 µg/kg.

Palavras- chave : benzo(a)pireno, óleo de milho, hidrocarboneto aromático policíclico.

SUMMARY

BENZO(A)PYRENE IN CORN OILS PRODUCED AND COMMERCIALIZED IN BRAZIL. Corn oils from different brands produced and commercialized in Brazil, were analysed for B(a)P. The methodology involved extraction with cyclohexane, clean-up on silica gel and determination by high performance liquid chromatography with a fluorescence detector. All samples analysed were contaminated by B(a)P and the levels found varied among brands and within different batches of the same brand, in the range of 0.85 to 25.17 µg/kg. One out 49 samples analysed in the period of 2 years presented an amount of B(a)P below the referencial limit of 1 µg/kg.

Key words : benzo(a)pyrene, corn oil, polycyclic aromatic hydrocarbon.

2.1 - INTRODUÇÃO

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) são substâncias amplamente distribuídas no meio ambiente, cuja importância se deve ao elevado potencial carcinogênico de muitas delas, comprovado em estudos com animais de laboratório e bastante documentado na literatura (9,28). A mais conhecida e também estudada destas substâncias é o benzo(a)pireno (B(a)P), potente carcinógeno que tem sido utilizado por pesquisadores como LO & SANDI (17) como indicador da presença de HPAs em alimentos.

Várias são as vias de contaminação dos alimentos por HPAs. No caso específico de óleos vegetais, destacam-se a poluição do ar com conseqüente deposição de partículas sobre plantas oleaginosas (5,16,25); absorção por plantas a partir de solos contaminados (17,24,27) e, segundo de VOS *et al.* (5), a secagem direta de grãos por meio de fumaça aquecida pela queima de madeiras.

A análise de HPA(s) em óleos vegetais iniciou-se com JUNG e MORAND (11,12), que detectaram a presença de pireno, benzo(e)pireno e benzo(a)pireno nestes alimentos. Posteriormente, CIUSA *et al.* (2), encontraram fenantreno, pireno, fluoranteno, benzo(a)antraceno, criseno e perileno em óleos refinados de oliva. HOWARD *et al.* (8), analisando amostras de óleos de milho, entre outros, encontraram benzo(a)pireno em sete das oito amostras analisadas. Outros pesquisadores, dedicando-se à determinação de B(a)P em óleos vegetais, têm obtido níveis de 0,02 µg/kg até 170 µg/kg (3,4,14,16,18,19,20,24,27).

Estudos realizados no Brasil por PUPIN & TOLEDO (20, 21) evidenciaram diferentes graus de contaminação de óleos vegetais nacionais por B(a)P. Os teores médios de B(a)P relatados para óleos de girassol, arroz, soja, palma, milho e oliva foram, respectivamente, 0,2, 1,8, 2,2; 2,1, 10,8 e 10,9 µg/kg. Foi destacada pelos autores a elevada contaminação do óleo de milho produzido e comercializado no Brasil no período de 1992 a 1993 (1,6 a 58,9

µg/kg), bastante superior à reportada na literatura para o mesmo tipo de óleo (4, 7, 22, 23, 25).

Segundo LARSSON *et al.* (16), em uma dieta básica sueca o grupo dos óleos e gorduras é a segunda fonte em importância para a ingestão potencial de HPAs através de alimentos. Embora a concentração de HPAs nestes alimentos possa ser considerada relativamente baixa, o seu consumo elevado os torna muito importantes sob o ponto de vista de ingestão diária total destes contaminantes (7).

No presente estudo, a fim de confirmar a elevada e variável contaminação de óleos de milho nacionais por B(a)P, identificada por PUPIN e TOLEDO (20), foi realizado o monitoramento deste contaminante em óleos de milho produzidos e comercializados no Brasil no período de 1993 a 1995.

2.2 - MATERIAIS E MÉTODOS

2.2.1 - Amostras

Foram analisadas amostras de diferentes lotes de sete marcas de óleo de milho disponíveis no comércio da cidade de Campinas, SP, adquiridas durante os anos de 1993 a 1995, num total de 49 amostras. As análises foram conduzidas em duplicata.

2.2.2- Método de Análise

2.2.2.1 - Extração

Foi utilizado o método de extração sugerido por SPEER *et al.* (23), que modificaram o método inicialmente proposto por GRIMMER & BÖHNKE (6), conforme descrito a seguir.

Amostras de 10,0 g de óleo de milho foram pesadas em béquer de 50 mL e transferidas com 100 mL de ciclohexano, divididos em três porções, para um funil de separação de 250 mL. Em seguida, os HPAs foram extraídos sucessivamente com porções de 50, 25 e 25 ml de dimetilformamida: água (9:1, v/v). As fases inferiores (dimetilformamida) foram reunidas em outro funil de separação e a elas foram adicionados 100ml de sulfato de sódio 1% em solução aquosa. A seguir, procedeu-se a nova extração com porções sucessivas de 50, 35 e 35 mL de ciclohexano. As porções de ciclohexano foram ajuntadas e lavadas com 2 porções de 40 mL de água. O extrato foi seco com sulfato de sódio anidro (cerca de 5g) e concentrado para um volume final de cerca de 2 mL, em evaporador rotativo à vácuo, com banho à temperatura de 40°C.

2.2.2.2 - Limpeza das Amostras em Coluna de Sílica gel:

As amostras foram limpas por passagem através de uma coluna cromatográfica de vidro (21 X 1,1 cm d.i.) contendo 5 g de sílica gel (Merck) desativada com água (12 %).

O extrato foi diluído com 2 mL de ciclohexano, adicionado no topo da coluna, e eluído com 85 mL de ciclohexano. Os primeiros 10 mL foram descartados e o restante foi recolhido em um balão de 250 mL. A fração coletada foi concentrada até quase seca em evaporador rotativo à vácuo e o balão foi levado à seca total por fluxo de nitrogênio. O resíduo foi diluído com 2mL de acetonitrila em um frasco de vidro.

2.3 - Desenvolvimento Cromatográfico

Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fluorescência foi a técnica utilizada na determinação do teor de B(a)P em óleos de milho refinados.

O sistema cromatográfico foi constituído de bomba quaternária Waters 600, injetor automático Waters 717 com loop de capacidade de 20 µl e detector de fluorescência Waters 474, com excitação a 290λ e emissão a 430λ. O integrador foi o Spectraphysics, modelo SP4400. A coluna cromatográfica empregada foi a Vydac 210 -TP 54, C18 (ODS), 25 cm X 4,6 mm d.i., com partículas de 5µm. Quanto à fase móvel, utilizou-se uma mistura de acetonitrila: água (75:25), com fluxo de 1,0 mL/min. Após prévia estabilização do sistema, foram injetados 20µl dos 2 mL do extrato final das amostras analisadas.

O pico de benzo(a)pireno foi identificado por comparação de seu tempo de retenção com o do respectivo padrão (Sigma) e quantificado por padronização externa. A confirmação do pico foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência, com detector de varredura de fotodiodos (Shimatzu). As condições de trabalho utilizadas foram as mesmas do sistema com detector de fluorescência. A varredura do espectro foi realizada entre 290 e 500 nm.

2.2.4 - Estudos de Recuperação do Método

Análises de controle sobre os reagentes (análise do branco) foram realizadas durante os ensaios. Para avaliação da metodologia, foram realizados testes de recuperação adicionando-se às amostras, durante a etapa de extração, quantidades conhecidas do padrão em 3 níveis diferentes, a saber: 4,55 , 11,37 e 25,01 µg/kg.

2.3 - RESULTADOS

Nenhum pico interferente ou de B(a)P foi detectado nos reagentes analisados. A recuperação média do método foi 97,8%, o que comprova a eficiência da etapa de extração seguida. Nas condições de trabalho utilizadas, obteve-se um limite de quantificação de 0,01 µg/kg.

Todos os óleos de milho analisados nesta pesquisa encontravam-se contaminados com benzo(a)pireno, em níveis variando entre 0,85 a 25,17 µg/kg. Os resultados das análises estão apresentados na *Tabela 1*. A *Figura 1* apresenta um cromatograma típico dos óleos de milho analisados.

Uma grande variação nos teores de B(a)P pode ser observada entre as marcas analisadas e entre diferentes lotes da mesma marca. Alguns óleos apresentaram-se relativamente menos contaminados, como os de marca D e F, porém a concentração de B(a)P determinada, na faixa de 0,85 a 7,61 e 2,22 a 7,26 µg/kg, respectivamente, ainda é superior aos valores reportados na literatura para este tipo de óleo (*Tabela 2*). Outras marcas de óleos analisados neste trabalho apresentaram lotes com contaminação mais elevada, de até 25,17 µg/kg, embora outros lotes da mesma marca revelassem níveis mais baixos de B(a)P, na faixa de 2 a 4 µg/kg.

A variação da contaminação dos óleos de milho por B(a)P, observada em lotes diferentes de uma mesma marca de óleo, pode ser devido à origem do óleo bruto utilizado nos processos de refino. No Brasil, a maioria das indústrias refinadoras de óleos de milho não extrai o óleo bruto mas sim processa misturas de óleos brutos de diferentes origens, que podem apresentar diferentes graus de contaminação. Acredita-se, ainda, que o grau de contaminação do óleo bruto esteja diretamente associado à secagem dos grãos de milho. O processo de secagem mais empregado em nosso país utiliza o calor gerado pela queima de madeiras e lenhas, processo conhecido como formador de hidrocarbonetos aromáticos. Já na Suécia, por exemplo, a secagem dos grãos de milho é feita com a queima de óleos combustíveis (16), o que resulta em uma diminuição da contaminação por HPAs. Sabe-se também que as

TABELA 1 - Teor de benzo(a)pireno em óleos de milho*

Marca	Lote								Média ± SD
	1	2	3	4	5	6	7	8	
	B(a)P (µg/kg)								
A	13,51	1,72	1,15	2,56	3,34	5,12	-	-	4,57 ± 4,60
B	14,00	12,22	15,52	4,50	9,58	11,77	16,35	19,82	12,97 ± 4,65
C	6,08	6,34	5,54	8,04	7,61	7,45	-	-	6,84 ± 0,99
D	7,02	4,71	0,85	1,55	1,94	7,61	7,45	2,22	4,17 ± 2,87
E	25,17	17,30	3,39	2,37	4,77	7,61	5,56	4,53	8,84 ± 8,08
F	5,90	2,22	5,97	7,26	6,33	7,08	5,61	4,82	5,65 ± 1,59
G	13,22	7,82	12,16	8,25	11,82	-	-	-	10,65 ± 2,45

*Os valores são média de duas determinações

- não disponível

TABELA 2. Teores de benzo(a)pireno em óleos de milho, reportados na literatura

Referência	B(a)P (µg/kg)	Técnica
SWALLOW (25)	2	CG
JOE <i>et al.</i> (10)	n.d.	CCD
LAWRENCE & WEBER (13)	0,3	CLAE
WELLING & KAANDORF (29)	0,5 a 26,1	CLAE
STIVJE & HISCHENHUNBER (24)	0,4 a 12,7	CLAE/CCD
SPEER & MONTAG (22)	0,5a 2,3	CG
HOPIA <i>et al.</i> (7)	0,02	CG
SPEER <i>et al.</i> (23)	1,3	CG
DENNIS <i>et al.</i> (4)	1,51 a 5,18	CLAE

CLAE =cromatografia líquida de alta eficiência ,CCD = cromatografia em camada delgada,CG= cromatografia gasosa

n.d. = não detectado

indústrias de refinação de óleo brasileiras não utilizam carvão ativo no processamento do óleo, o que reduziria bastante a contaminação, já que este adsorvente é altamente eficiente para a remoção de HPAs (1). A desodorização a vapor utilizada pela indústrias brasileiras na refinação de óleos vegetais remove principalmente HPAs leves (2-3 anéis), enquanto que os HPAs pesados (4-5 anéis) permanecem no óleo (5,16,26). Acredita-se, portanto, que diferenças no processamento do grão de milho, incluindo a secagem e refino, possam estar diretamente associadas à grande variabilidade nos níveis de B(a)P detectados nas diferentes marcas de óleo analisadas. No momento, encontram-se em fase de conclusão estudos conduzidos junto a refinadoras de óleo de milho com o



FIGURA 1. Cromatograma de uma amostra de óleo de milho por CLAE. Condições: fase móvel acetonitrila:água (75:25 v/v), fluxo 1 ml/min., detector de fluorescência, coluna C18 (ODS), 25 cm X 4,6 mm d.i., com partículas de 5µm. B(a)P: benzo(a)pireno.

objetivo de avaliar a influência destes processos na contaminação do óleo de milho por HPAs.

A legislação brasileira vigente não estabelece limite máximo para B(a)P em óleos vegetais ou em outros grupos de alimentos, nem tampouco há dados sobre a contaminação da maioria dos alimentos por este grupo de substâncias. Na Alemanha, Áustria e Polônia, o teor máximo permitido de B(a)P em carnes defumadas é 1 µg/kg e este valor tem sido usado como limite referencial para avaliar a contaminação de outros alimentos (15). Já para óleos e gorduras, as indústrias alemãs recomendam seus próprios limites: a soma dos resíduos dos HPAs leves não deve exceder a 25 µg /kg, enquanto que a soma dos HPAs pesados, que inclui o benzo(a)pireno, deve permanecer abaixo de 5 µg /kg (23).

No presente estudo, considerando-se o limite de 1 µg/kg como referencial máximo de contaminação de óleos vegetais por B(a)P, apenas um lote de uma marca de óleo de milho nacional seria aceitável.

2.4 - CONCLUSÃO

Em vista dos resultados apresentados, as indústrias refinadoras deveriam ser alertadas quanto à necessidade e importância de se estabelecer a origem da contaminação dos óleos de milho, identificando-se as etapas do processamento do grão e do óleo bruto que estariam envolvidas na contaminação. Aos organismos responsáveis pela saúde pública, recomenda-se o monitoramento da presença de B(a)P em óleos de milho e, caso a contaminação persista sem que se adotem medidas para sua redução, o estabelecimento de limites para a presença deste contaminante em óleos vegetais.

2.5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) BIERNOTH, G & ROST, H. E. The occurrence of polycyclic aromatic hydrocarbons in coconut oil and their removal. **Chemistry and Industry**, 25, 2002-2003, 1967.
- (2) CIUSA, W.; D'ARRIGO, V.; MARCHESINI, G. Indagini sul contenuto in idrocarburi policiclici aromatici degli oli di oliva. **Revista Italiana Delle Sostanze Grasse**, 47(3) 114-119, 1970.
- (3) DENNIS, M.J.; MASSEY, R.C.; MACWEENY, D.J.; KNOWLES, M.E.; WATSON, D. Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbon in UK total diets. **Food and Chemical Toxicology**, 21(5): 569-574, 1983.
- (4) DENNIS, M.J.; MASSEY, R.C.; MACWEENY, D.J.; KNOWLES, M.E.; WATSON, D. Factors affecting the polycyclic aromatic hydrocarbon content of cereal, fats and other food products. **Food Additives and Contaminants**, 8(4), 517-530, 1991.
- (5) DE VOS, R.H.; VAN DOKKUN, W.; SCHOUTEN A.; DE JONG- BERKHOUT, P. Polycyclic aromatic hydrocarbons in dutch total diet samples (1984-1986). **Food and Chemical Toxicology**, 28(4): 263-268, 1990.
- (6) GRIMMER, G. & BÖHNKE, H. Polycyclic aromatic hydrocarbons profile of high-protein foods, oils and fats by gas chromatography. **Journal of the Association of Official Analytical Chemistry**, 58(4): 725-733, 1975.
- (7) HOPIA, A.; PSYYSALO, H.; WICKSTROM, K. Margarines, butter and vegetable oils as sources of polycyclic aromatic hydrocarbon. **Journal of American Oil Chemical Society**, 63 (7): 889-893, 1986.

- (8) HOWARD, J.W.; TURICCHI, E.W.; WHITE, K.H.; FAZIO, T. Extraction and estimation of polycyclic aromatic hydrocarbon in vegetable oils. **Journal of the Association of Official Analytical Chemistry**, 49(6): 1236-1244, 1966.
- (9) IARC. Polycyclic aromatic hydrocarbons. Part 1. Chemical environmental and experimental data. Working group on the evaluation of the carcinogenic risk of chemical to humans. (Lyon, France: **International Agency for Research on Cancer**). V. 32, 1983.
- (10) JOE Jr., F.L.; EMMA, L.R.; FAZIO, T. Survey of some market basket commodities for polynuclear aromatic hydrocarbon content **Journal of the Association of Official Analytical Chemistry**, 62(3); 615-620, 1979.
- (11) JUNG, L. & MORAND, P. Présence dans huiles végétales d'une substance donnant le spectre de fluorescence du benzo-3,4 pyrène. **Comptes Rendus de L'Academie Science**, 254: 1489- 1491, 1962.
- (12) JUNG, L. & MORAND, P. Présence de pyrène et de benzo-3,4 pyrène dans différents huiles végétales. **Comptes Rendus de L'Academie Science**, 257: 1638- 1640, 1963.
- (13) LAWRENCE, J.F. & WEBER, D.F. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbon in some Canadian commercial fish, shellfish and meat products by liquid chromatography with confirmation by capillary gas chromatography - mass spectrometry. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, 32: 789-794, 1984.
- (14) LAWRENCE, B.K.; ERIKSON, A.T.; CERVENKA, M. Polycyclic aromatic hydrocarbon in foods by HPLC with fluorescence detection.

International Journal of Environmental and Analytical Chemistry,
24: 113-131, 1986.

- (15) LARSSON, B. Polycyclic aromatic hydrocarbons in Swedish foods. Aspects on analysis, occurrence and intake. Doctoral Thesis. 1986.
- (16) LARSSON, B.K.; ERIKSSON, A.T.; CERVENKA, M. Polycyclic aromatic hydrocarbons in crude and deodorized vegetable oils **Journal of American Oil Chemical Society**, **64**(3): 365-370, 1987.
- (17) LO, M.-T. & SANDI, E. Polycyclic aromatic hydrocarbons (polynuclears) in foods. **Residue Reviews**, **69**: 35-86, 1978.
- (18) MARIANI, C. & FIDELI, E. Idrocarburi policiclici aromatici negli oli vegetali. **Rivista Italiana Delle Sostanze Grasse**, **61**(5): 305-315, 1984.
- (19) MENICHINI, E.; BOCCA, A.; MERLI, F.; IANNI, D.; MONFREDINI, F. Polycyclic aromatic hydrocarbon in olive oils on the Italian market. **Food Additives and Contaminants**, **8**(3): 363-369, 1991.
- (20) PUPIN, A.M. & TOLEDO, M.C.F. Benzo(a)pyrene in Brazilian vegetable oils. **Food Additives and Contaminants**, **13**(6), 639-646, 1996.
- (21) PUPIN, A.M. & TOLEDO, M.C.F. Benzo(a)pyrene in olive oils on the Brazilian market. **Food Chemistry**, **55**(2), 185-188, 1996.
- (22) SPEER, K. & MONTAG, A. Polycyclic aromatic hydrocarbons in native plant oils. **Fat Science and Technology**, **90**(5), 163-167, 1988.
- (23) SPEER, K.; STEEG, E.; HORSTMANN, P. KUHN, T.; MONTAG, A. Determination and distribution of polycyclic aromatic hydrocarbon in native vegetable oils, smoked fish products, mussels and oysters, and

breem from the river elbe. **Journal of High Resolution Chromatography**, **13**: 104-111, 1990.

- (24) STIVJE, T. & HISCHENHUBER, C. Simplified determination of benzo(a)pyrene and other polycyclic aromatic hydrocarbon in various food material by HPLC and TLC. **Deutsch Lebensmittel Rundsch**, **83**(9): 276-282, 1987.
- (25) SWALLOW, W.H. Survey of polycyclic aromatic hydrocarbon in selected foods and food additives available in New Zealand. **New Zealand Journal of Science**, **19**: 407-412, 1976.
- (26) THOMAS, A. Über die Entfernung von Schadstoffen bei der Dämpfung von Speiseölen und Fetten. **Fette Seifen Anstrichmittel**, **84**, 133-136, 1982
- (27) VAN HEDDEGHEM, A.; HUYGHEBAERT, A.; DE MOOR, H. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbon in fat products by high pressure liquid chromatography. **Zeitung Lebensmittel Untersucht Forschung**, **171**, 9-13, 1980.
- (28) WEISBURGER, J.H. & WILLIAMS, G.M. In: Toxicology. The basic science of poisons. Edited by Klaasen, C.D.; Amdur, M.D. & Doule, J. Macmillan Publishing Company. Second Edition. 84-85, 1980.
- (29) WELLING, P. & KAANDORP, B. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) in edible vegetable oils by liquid chromatography and programmed fluorescence detection. **Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung**. **183**: 111-115, 1986.

AGRADECIMENTOS

À FAPESP, pela concessão de auxílio financeiro à pesquisa, Processo 94.3374-6.

Capítulo 3

EFEITO DO PROCESSAMENTO NA CONTAMINAÇÃO DE ÓLEO REFINADO DE MILHO POR BENZO(A)PIRENO

trabalho a ser enviado para publicação na revista:
Food Additives and Contaminants.

RESUMO

Benzo(a)pireno (B(a)P), o mais conhecido e estudado hidrocarboneto aromático policíclico (HPA) com potencial carcinogênico, tem sido encontrado em níveis relativamente altos e variados em óleos de milho produzidos no Brasil. No presente estudo foi investigado o efeito da secagem e moagem do grão de milho e do processo de refino do óleo bruto na contaminação do óleo refinado por B(a)P. Foi também avaliada, em amostras artificialmente contaminadas, a eficiência do carvão ativado na remoção do B(a)P. O estudo foi conduzido com a colaboração de duas empresas refinadoras de óleo de milho, tendo sido determinado o teor de benzo(a)pireno em amostras coletadas em diferente etapas do processamento. A metodologia de análise foi a cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fluorescência. Os resultados obtidos indicaram que o processo de refino não é responsável pela contaminação do óleo. A presença de B(a)P no óleo refinado está diretamente associada à contaminação do óleo bruto, que varia conforme o processo de secagem e de moagem do grão de milho. Dos 3 processos de secagem avaliados (secador à lenha, a óleo diesel e natural) a secagem à lenha foi a que resultou nos maiores níveis de benzo(a)pireno, enquanto que a moagem úmida parece reduzir a contaminação. Embora a desodorização reduza o teor de B(a)P no óleo final, seu efeito é marginal, sendo indispensável um maior controle da contaminação do óleo bruto ou, alternativamente, o uso de carvão ativado, cuja eficiência na remoção de HPAs foi comprovada no presente estudo.

Palavras chaves- hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, benzo(a)pireno, HPA, óleo de milho.

ABSTRACT

Benzo(a)pyrene (B(a)P), the best known and studied carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH), has been found at variable and relatively high concentrations in Brazilian corn oils. In the present study, the effect of the drying and grinding process of the corn grains, and of the refining of crude corn oil on the contamination by B(a)P was investigated. The efficiency of activated charcoal on the removal of B(a)P from artificially contaminated samples was also evaluated. The study was conducted with the collaboration of two corn oil refining industries. Samples taken during different steps of the processing were analysed for B(a)P using HPLC with fluorescence detection. The results obtained indicated that the refining process is not responsible for the oil contamination. The presence of B(a)P in the refined oil is directly associated to the contamination of the crude oil, which varies according to the drying and grinding processes. Of the three drying processes evaluated (firewood, diesel and sun drying), the firewood drying was the one which produced the highest levels of benzo(a)pyrene, while the humid drying process seems to decrease the contamination. Although deodorization may reduce the amount of B(a)P in the refined oil, its effect is marginal, enhancing the need of a better control of the crude oil contamination or, as an alternative, the use of activated charcoal, whose efficiency in removing PAHs was confirmed in this study.

Keywords: polycyclic aromatic hydrocarbons, benzo(a)pyrene, PAH, corn oil

Introdução

Benzo(a)pireno, (B(a)P, hidrocarboneto aromático policíclico (HPA) amplamente distribuído na natureza, têm sido encontrado como contaminante em solos, água, ar e alimentos em concentrações variáveis (Van Heddegehem *et al.* 1980, Larsson *et al.* 1987, De Vos *et al.* 1990).

A contaminação de alimentos por HPAs pode ter origem tanto na poluição ambiental, como acontece com frutas e verduras cultivadas em regiões industriais (Larsson 1986), como no processamento, destacando-se neste caso a defumação de carnes (De Vos *et al.* 1990, Howard e Fazzio 1969, Lawrence e Weber 1984, Speer *et al.* 1990, Larsson 1986, Yabiku *et al.* 1993, Noll & Toledo 1995 e 1997).

No caso específico de óleos vegetais, diferentes vias de contaminação têm sido sugeridas, entre elas:

- poluição do ar e deposição de partículas sobre os alimentos (De Vos *et al.* 1990, Van Heddegehem *et al.* 1980, Larsson *et al.* 1987),
- absorção do solo pelas plantas (Swallow, W.H. 1976, Lo, M.-T & Sandi, E., 1978).
- secagem direta das sementes com gases de combustão (Hopia *et al.* 1986, Welling e Kaandorp 1986, Larsson *et al.* 1987).
- absorção a partir de solventes a base de petróleo, usados no processo de extração do óleo (De Vos *et al.* 1990).

Em vista da importância dos óleos e gorduras vegetais como fonte de HPAs na dieta (Larsson *et al.* 1986, Dennis *et al.* 1991, Hoppia *et al.* 1986), várias pesquisas têm sido dirigidas à determinação deste contaminante nesses alimentos. Os níveis relatados por diferentes autores variam amplamente, tanto em função do tipo do óleo como para óleos de mesma origem. Em trabalho

realizado por Dennis *et al.* (1983), os níveis de B(a)P em amostras de óleos vegetais e gorduras variaram de 0,19 a 3,74 µg/kg, enquanto que outros pesquisadores, analisando óleos de soja, milho, girassol e palma, encontraram desde níveis não detectáveis até 68,6 µg/kg (Howard *et al.* 1966, 1968, Grimmer e Hildebrandt 1967, Swallow *et al.* 1976, Joe *et al.* 1979, Kolarovic e Traitler 1982, Lawrence e Weber 1984, Stivje e Hischenhuber 1987, Speer e Montag 1988, Speer *et al.* 1990, Dennis *et al.* 1991, Gertz e Kogelheide 1994).

Níveis particularmente altos de HPAs tem sido encontrados em óleo bruto de coco (Biernoth e Rost, 1967, Stijve e Hischenhuber, 1987, De Vos *et al.* 1990) em função da copra, da qual o óleo é extraído, ser em geral seca diretamente com gases de combustão. Para reduzir a contaminação, Biernoth e Rost, 1967, propuseram a inclusão, no processo de refino, de uma etapa de limpeza que envolve a passagem do óleo de coco por uma coluna contendo carvão ativado. Este procedimento foi adotado rotineiramente no processo de refino de óleo de coco em algumas refinarias, especialmente na Suécia, onde a pesquisa foi realizada. Larsson *et al.* 1987, avaliaram e comprovaram a eficiência do uso de carvão ativado no processo de refino do óleo de coco. Enquanto as amostras de óleo bruto analisadas revelaram teores de B(a)P e de HPAs totais na faixa de 20 a 34 µg/kg e de 2600 a 3700 µg/kg, respectivamente, os óleos desodorizados correspondentes apresentaram teores de <0,1 a 0,3 µg/kg e de 2 a 59 µg/kg. Neste mesmo estudo, os autores analisaram amostras de óleo de soja cujo processo de refino não adotava o sistema de limpeza com carvão ativado e encontraram valores na faixa de 0,4-1,2 µg/kg para B(a)P e de 33-56 µg/kg para HPAs totais.

No Brasil, estudos conduzidos por Pupin e Toledo, 1996, indicaram graus variados de contaminação de óleos vegetais nacionais por B(a)P, destacando-se o óleo de milho como o mais contaminado, com níveis relativamente elevados, na faixa de 1,6 a 58,9 µg/kg. Em pesquisa subsequente, Camargo e Toledo, 1997 (trabalho enviado para publicação) monitoraram por dois anos a presença de B(a)P em óleos de milho produzidos e comercializados no Brasil, e os

resultados obtidos confirmaram uma elevada e variável contaminação desses alimentos (0,85 a 25,17 µg/kg).

Uma vez que em ambos estudos a presença de B(a)P foi identificada em todas as amostras de óleo refinado de milho analisadas, em concentrações relativamente superiores às aquelas encontradas em outros óleos vegetais, procurou-se, no presente estudo, avaliar as possíveis fontes de contaminação destes alimentos através da investigação dos processos envolvidos na sua obtenção.

Após entendimentos com representantes de duas refinadoras de óleo de milho nacionais, decidiu-se investigar inicialmente os diferentes processos utilizados para a secagem do grão de milho. Numa segunda etapa, foram avaliados os processos de moagem úmida e de moagem seca do grão. Foram também conduzidos, em laboratório, testes para verificar a eficiência da clarificação com carvão ativado na remoção de B(a)P em óleos artificialmente contaminados.

Material e métodos

Preparação das amostras

Secagem

Amostras de grãos de milho submetidos à secagem natural (secos ao sol) e amostras de grãos secos em secadores à lenha e em secadores a óleo combustível foram fornecidas por uma das empresas. As amostras eram procedentes de várias cooperativas localizadas no Estado do Paraná e São Paulo. Foram também analisadas amostras de milho imediatamente antes e após a secagem à lenha.

Processo de refino

Amostras de óleo bruto e dos correspondentes óleos branqueados, clarificados, neutralizados e desodorizados foram fornecidas pelas refinadoras de óleo de milho. As amostras foram coletadas *on line*, em duplicatas, em cada fase do processo de refino, em duas épocas distintas. Em uma das refinadoras, a amostragem foi repetida uma vez mais. Foram também analisadas amostras de hexana nova e reprocessada.

Limpeza

Amostras de óleo de milho neutralizado foram contaminadas com 27 µg/kg de B(a)P e submetidas a tratamento com 0,1 e 0,2 % de carvão ativado. Foram também testadas diferentes resinas de troca iônica quanto à eficiência na remoção do contaminante. Todos os ensaios foram conduzidos por uma das refinadoras, sendo que as análises de B(a)P foram feitas em nosso laboratório.

Moagem úmida

Amostras de milho seco, água de maceração, milho macerado e germe de milho foram fornecidas pela refinadora A. As amostras foram coletadas em duplicata, em duas épocas distintas.

Extração

Todas amostras foram analisadas em duplicata. A metodologia utilizou ciclohexano como solvente de extração e envolveu basicamente partição líquido-líquido com dimetilformamida : água (9:1), seguida por uma etapa de limpeza realizada em coluna de sílica gel, conforme esquematizado na Figuras 1.

Amostra (10,0 g para óleos e 20,0 g para grãos de milho)

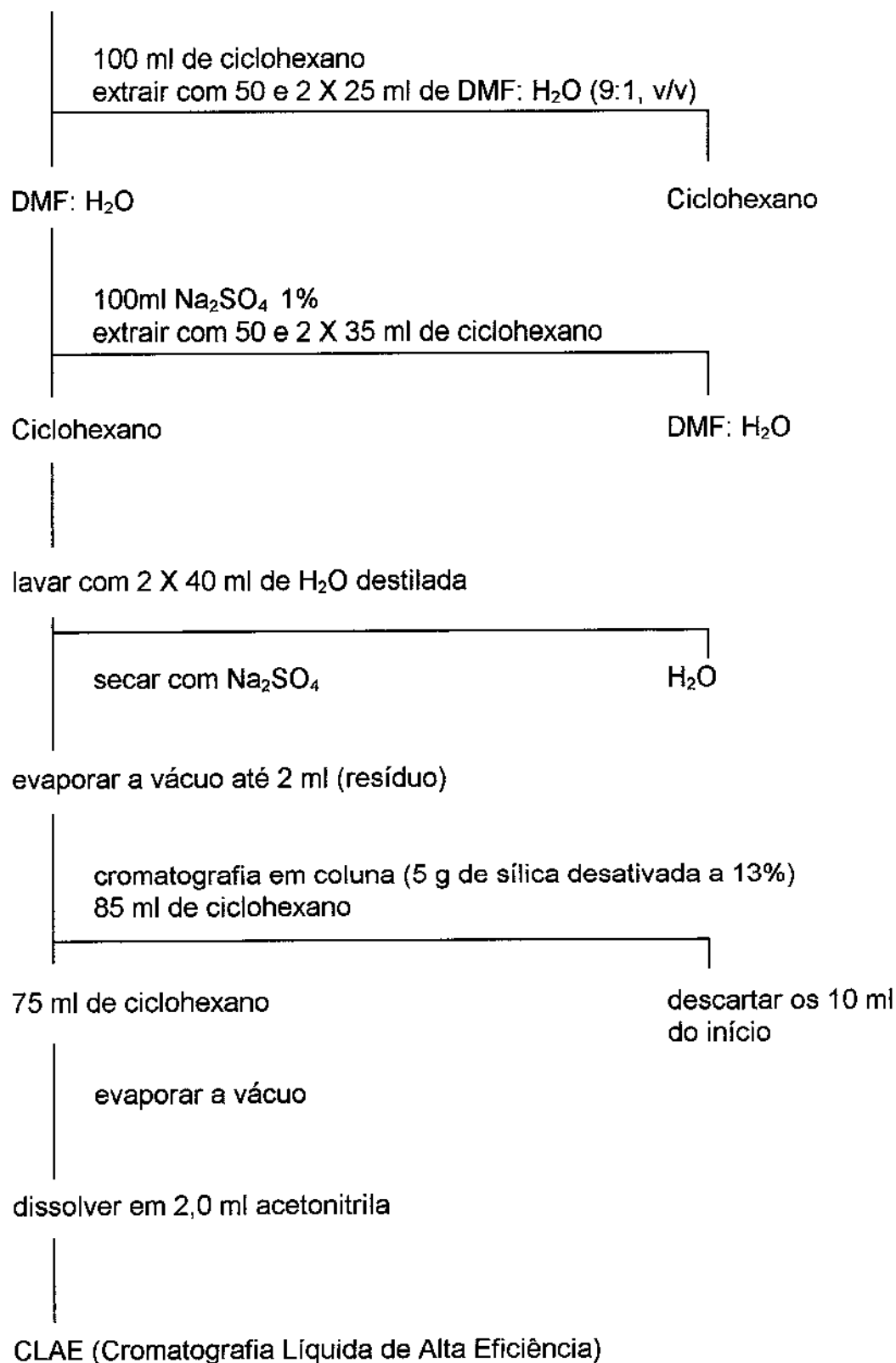


Figura 1. Fluxograma da extração e limpeza de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (Speer *et al.*1990).

Antes da extração, as diferentes amostras analisadas foram preparadas como descrito a seguir.

Grão de Milho:

Amostras de aproximadamente 20 g de grãos de milho foram trituradas em moinho de facas refrigerado a água, colocadas em um erlenmyer com 50 ml de ciclohexano e deixadas 30 minutos sob agitação recíproca. A mistura foi filtrada em papel de filtro diretamente em um funil de separação (as fortificações foram feitas neste ponto). Este procedimento foi repetido adicionando-se 50 ml de ciclohexano ao resíduo da filtração, sendo o filtrado recolhido no mesmo funil de separação.

Óleo de Milho

Amostras de 10 g do óleo (ou 5,0 g para algumas amostras de óleo bruto) foram pesadas em um béquer de 50 ml e transferidas para um funil de separação com 100 ml de ciclohexano, divididos em três porções.

Hexana

Um volume de 20,0 ml de hexana foi transferido para um erlenmeyer e evaporado em evaporador rotativo a 40°C, até quase secura.

Desenvolvimento Cromatográfico

Utilizou-se como técnica a cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fluorescência. As condições de trabalho foram essencialmente as descritas por Pupin e Toledo, 1996. O equipamento utilizado para análise foi

constituído de uma bomba isocrática Waters 6000 A, injetor Waters modelo U6K e detector de fluorescência Varian Fluorichrom II, com filtro de excitação a 220 nm (290nm) e filtro de emissão 4-76 (450 nm). O integrador foi o Spectraphysics, modelo SP4400. A coluna cromatográfica empregada foi a Vydac C18 (ODS), 25 cm X 4,6 mm d.i., com partículas de 5 µm, e a fase móvel utilizada foi acetonitrila : água (7:3). Após prévia estabilização do sistema, foram injetados 20 µl dos 2 ml do extrato final. Para amostras mais contaminadas, como foi o caso dos óleos brutos, foram injetados 10 ou 5 µl. O pico de B(a)P foi identificado por comparação com os tempos de retenção do padrão (Sigma, PNB 1760) e quantificado por padronização externa.

Recuperação do Método

Para cada tipo de amostra analisada, foram feitas fortificações em pelo 3 níveis de contaminação.

Resultados e discussão

Os resultados dos ensaios de recuperação para as diferentes amostras estão apresentados na Tabela 1. Os valores encontrados se situaram na faixa de 73,8 a 99%, dentro dos limites aceitos para análise de contaminantes em níveis de µg/kg. Nas condições cromatográficas empregadas, o limite de detecção do aparelho foi de 0,002 µg/kg e o limite de quantificação do método foi 0,5 µg/kg, inferior ao valor de 1 µg/kg, estabelecido pela legislação de alguns países europeus como tolerância para a presença de B(a)P em carnes (Larsson *et al.* 1987).

Tabela 1. Recuperação de benzo(a)pireno em grãos e óleos de milho

AMOSTRA	FORTIFICAÇÃO ($\mu\text{g/kg}$)	RECUPERAÇÃO MÉDIA(%) ^a
Grão de milho		
	0,45	80,0 $\pm$ 0,09
	2,27	77,6 $\pm$ 0,34
	9,32	88,2 $\pm$ 0,23
Óleo bruto		
	9,09	75,0 $\pm$ 0,65
	25,01	99,0 $\pm$ 0,45
	47,74	92,6 $\pm$ 0,24
Óleo refinado		
	4,55	79,6 $\pm$ 0,32
	11,37	73,8 $\pm$ 0,21
	25,01	81,8 $\pm$ 0,13

a. Os valores são média de duas determinações

A Tabela 2 apresenta os níveis de B(a)P em amostras de grãos de milho submetidos a diferentes processos de secagem e a Tabela 3, dados relativos a amostras coletadas durante o processo de secagem à lenha. A Figura 2 mostra cromatogramas de milhos secos.

Tabela 2 - Teor de benzo(a)pireno em grãos de milho submetidos a diferentes processos de secagem

SECAGEM	B(a)P ($\mu\text{g/kg}$) ^a
Natural (n=8)	n.d.
Secador à lenha (n=8)	2,16(0,61-7,15)
Secador a óleo combustível (n=3)	0,53(n.d.-1,23)

a: Valores médios e, entre parênteses, valores mínimo e máximo

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

A não detecção de B(A)P nos grãos secos ao sol (Tabela 2) e nos grãos úmidos, antes da secagem (Tabela 3), sugere que no Brasil a poluição atmosférica não é uma fonte importante de contaminação dos grãos de milho, provavelmente pelo fato da maioria das plantações de milho se localizar em regiões pouco industrializadas e ou distantes do tráfego.

Tabela 3 - Teor de benzo(a)pireno ($\mu\text{g/kg}$) em amostras de milho submetidos à secagem a lenha ^a

AMOSTRA	COLETA	
	1	2
Milho Úmido ^b	n.d.	n.d.
Milho Seco ^c	6,00	2,82
Resíduo de milho ^d	1,9	1,88
Pele ^e	28,25	12,12

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

a- os valores são média de duas determinações e são expressos em relação à fase oleosa do milho, b- milho antes da secagem, umidade ao redor de 18%, c- milho seco, umidade ao redor de 12%, d - milho seco quebrado ($\phi < 5 \text{ mm}$), e - película em suspensão no secador, retida em filtros.

Os dados da Tabela 3 confirmam a contaminação dos grãos durante a secagem, evidenciando uma maior concentração dos HPAs na superfície do grão, refletida nos níveis elevados de B(a)P determinados na película que se solta do grão durante a secagem. Esta película, que se desprende do grão durante a passagem da corrente de ar quente, é retida nas paredes do secador e posteriormente descartada.

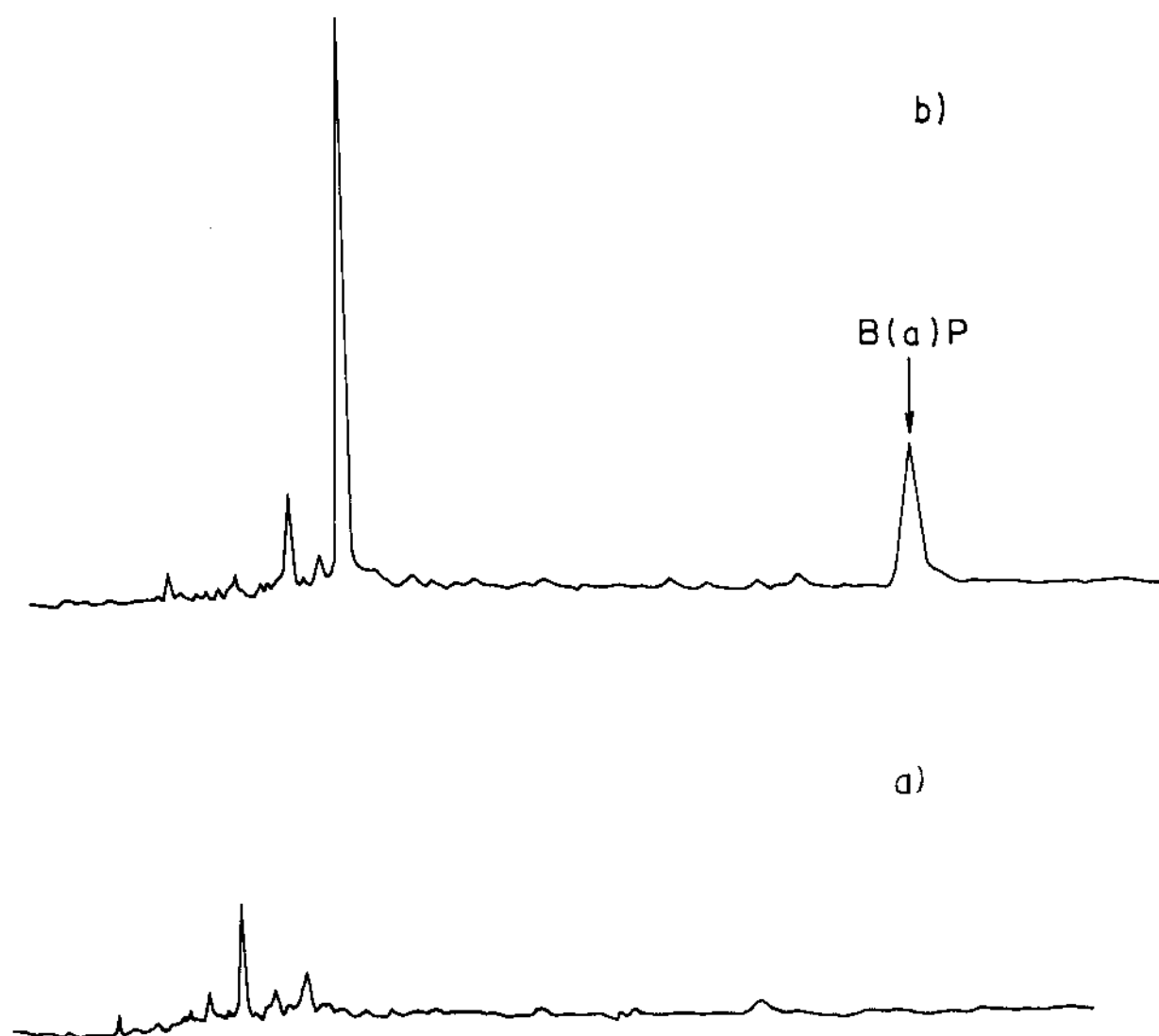


FIGURA 2. Cromatograma por CLAE de grãos de milho submetidos a (a) secagem natural (b) secagem à lenha. Condições: fase móvel acetonitrila : água (7:3 v/v), fluxo 1 ml/min., detector de fluorescência, coluna C18 (ODS), 25 cm X 4,6 mm d.i., com partículas de 5 μ m. B(a)P = benzo(a)pireno.

A concentração de B(a)P no milho seco e na pele foram relativamente maiores na 1^a amostragem, embora ambas coletas tivessem sido feitas no mesmo secador. Segundo o responsável pela secagem, por ocasião da primeira coleta, a lenha que foi utilizada para queima estava verde, enquanto que na coleta seguinte, a madeira estava seca. Como madeira verde produz mais fumaça que a seca, é maior a chance da fumaça entrar em contato com os grãos de milho e, conseqüentemente, maior a probabilidade de contaminação dos grãos com HPAs.

O resíduo de milho seco, representado principalmente por grãos quebrados, apresentou uma contaminação relativamente menor. Este resíduo, resultado da quebra do grão durante a própria colheita e durante a secagem, é obtido por passagem dos grãos secos em peneira de 5 mm de diâmetro e é utilizado como compostagem, não sendo destinado à extração do óleo.

A Tabela 4 apresenta os resultados relativos à contaminação dos óleos em diferentes fases do processo de refino.

Analizando-se inicialmente os óleos fornecidos pela refinadora A, observa-se que em todas as etapas do processo a contaminação foi relativamente menor que a do óleo produzido pela refinadora B, obtendo-se, após a etapa de desodorização, níveis não detectáveis do contaminante nos óleos correspondentes a óleos brutos com concentração de B(a)P ao redor de 1 µg/kg.

Com relação aos óleos fornecidos pela refinadora B, as quantidades de B(a)P no óleo bruto foram bem mais elevadas, variando entre 6,35 a 99,88 µg/kg, sendo bastante conflitantes os resultados encontrados. Por exemplo, se consideramos a coleta 3, verifica-se que o óleo desodorizado apresentou uma contaminação maior que o neutralizado, e que na coleta 1, o óleo bruto estava cerca de 7 vezes menos contaminado que o óleo branqueado correspondente.

Tabela 4 - Teores de benzo(a)pireno ($\mu\text{g/kg}$) em amostras de óleos de milho coletadas em diferentes etapas do processo de refino ^a.

AMOSTRA						
ÓLEO	1	2	3	4	5	Média ^b
REFINADORA A Extração do germe pelo processo de moagem úmida						
Bruto	3,44	2,41	1,23	0,88	-	$1,99 \pm 1,2$
Branqueado	4,15	4,49	1,08	1,07	-	$2,69 \pm 1,9$
Degomado	4,76	4,23	2,42	n.d.	-	$2,85 \pm 2,1$
Neutralizado	2,20	2,01	1,02	n.d.	-	$1,31 \pm 1,0$
Desodorizado	0,61	0,84	n.d.	n.d.	-	$0,36 \pm 0,4$
REFINADORA B Extração do germe pelo processo de moagem seca						
Bruto	7,14	6,35	26,94	99,88	16,36	$31,33 \pm 39,2$
Branqueado	52,13	23,15	49,79	30,06	10,41	$33,11 \pm 17,8$
Degomado	10,16	22,13	28,59	2,36	-	$15,81 \pm 11,8$
Neutralizado	21,55	8,72	13,31	23,66	8,61	$15,17 \pm 7,1$
Desodorizado	12,27	32,18	22,07	4,50	11,77	$16,56 \pm 10,7$

a. Os resultados representam a média de duas determinações

b. Média das coletas $\pm$ desvio padrão

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

Cabe ressaltar que a amostragem dos óleos foi feita pela própria indústria, à qual se solicitou que cada coleta fosse realizada em intervalos de pelo menos 24 h e que os óleos fossem amostrados seqüencialmente, de forma a que o óleo desodorizado da coleta 1 correspondesse ao óleo bruto da mesma coleta.

Aparentemente, este procedimento foi seguido pela refinadora A, estando os resultados das análises de acordo com dados da literatura. Segundo Larsson *et al.* 1987, óleos brutos de soja, coco e canola com elevados teores de HPAs tiveram sua contaminação bastante reduzida após o processo de clarificação e desodorização.

Pesquisa semelhante realizada por Dennis *et al.*, 1991, indicou que o processo de refino reduzia o teor dos hidrocarbonetos fluoranteno, pireno, benzo(a)antraceno e criseno em óleos brutos de canola, soja, milho e peixe. Ambos os autores consideraram que o efeito da etapa de desodorização sobre os HPAs pesados (4 ou mais anéis) era menor.

Quanto à refinadora B, os resultados obtidos sugeriram que o procedimento recomendado para a coleta dos óleos não foi seguido e, portanto, solicitou-se à mesma uma nova coleta, alertando-a sobre a importância das amostras serem tomadas seqüencialmente. Os resultados relativos a esta coleta (coleta 5) evidenciaram o efeito do refino na redução do nível de B(a)P presente no óleo bruto e confirmaram uma maior contaminação dos óleos processados por esta refinadora (Figura 3). De acordo com Camargo e Toledo, 1998, os níveis de B(A)P nos óleos de milho refinados e comercializados pela refinadora B encontram-se na faixa de 4,5 a 19,9 µg/kg, enquanto que aqueles processados pela refinadora A apresentam quantidades mais baixas, na faixa de 0,85 a 7,61 µg/kg.

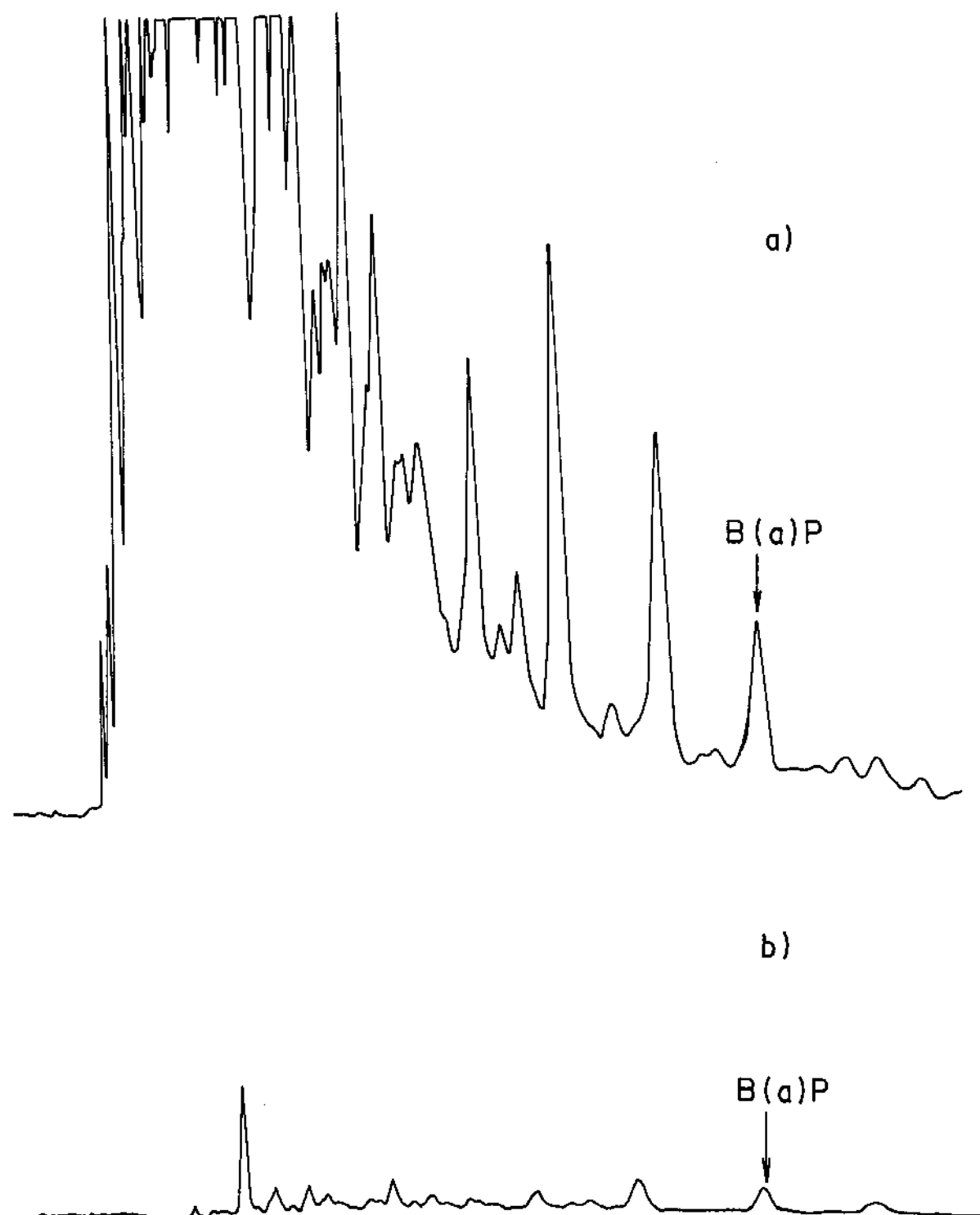


FIGURA 3. Cromatogramas por CLAE de amostras de óleo de milho (a) bruto e (b) refinado. Condições: fase móvel acetonitrila : água (7:3 v/v), fluxo 1 ml/min., detector de fluorescência, coluna C18 (ODS), 25 cm X 4,6 mm d.i., com partículas de 5 μm . B(a)P = benzo(a)pireno.

Inicialmente, considerou-se que a causa da maior contaminação dos óleos refinados pela indústria B estaria associada ao milho seco utilizado, que apresentaria níveis mais elevados de B(a)P. Entretanto, esta hipótese foi descartada, já que as indústrias extratoras processam grãos de diferentes procedências, provavelmente das mesmas cooperativas. Enquanto a Refinadora A extrai o óleo bruto que processa, a Refinadora B refina óleos brutos fornecidos por diferentes indústrias extratoras, não tendo controle sobre o óleo que recebe. Com base nestas informações, procurou-se investigar se o processo de moagem teria alguma influência na contaminação do óleo.

A Refinadora A, por comercializar também o amido de milho, utiliza a moagem úmida, que além de possibilitar a extração do amido, resulta em uma melhor separação do germe e da casca. Como consequência, a transferência de HPAs do exterior do grão para o germe deve ser menor. As demais indústrias extratoras de óleo, que fornecem óleos brutos para várias indústrias refinadoras, utilizam, em sua maioria, o processo de moagem seca. Neste processo, a casca se mistura com o germe e desta mistura se extrai o óleo. Considerando-se que o germe representa cerca de 15% do grão, os HPAs presentes no grão seco seriam concentrados no óleo bruto, como realmente parece ocorrer. De acordo com os dados da Tabela 4, os níveis de B(a)P determinados nos óleos brutos processados pela Refinadora B (6,35 a 99,88 µg/kg) foram bastante superiores aos originalmente presentes nos grãos secos (Tabela 2).

Uma outra possível fonte de contaminação de óleos vegetais durante o refino é a hexana, solvente comumente utilizado pelas refinadoras. Após sua utilização, este solvente é submetido a um processo de destilação, sendo posteriormente reutilizado no processo (hexana usada ou recuperada). No presente estudo, as amostras de hexana nova e recuperada não apresentaram níveis detectáveis de B(a)P (<0,5 µg/kg), não havendo indicação de que as mesmas contribuam para a contaminação do óleo. Entretanto, a análise do perfil cromatográfico das amostras do solvente evidenciam sua contaminação por HPAs de baixo peso molecular, eluídos no início do cromatograma (Figura 4).

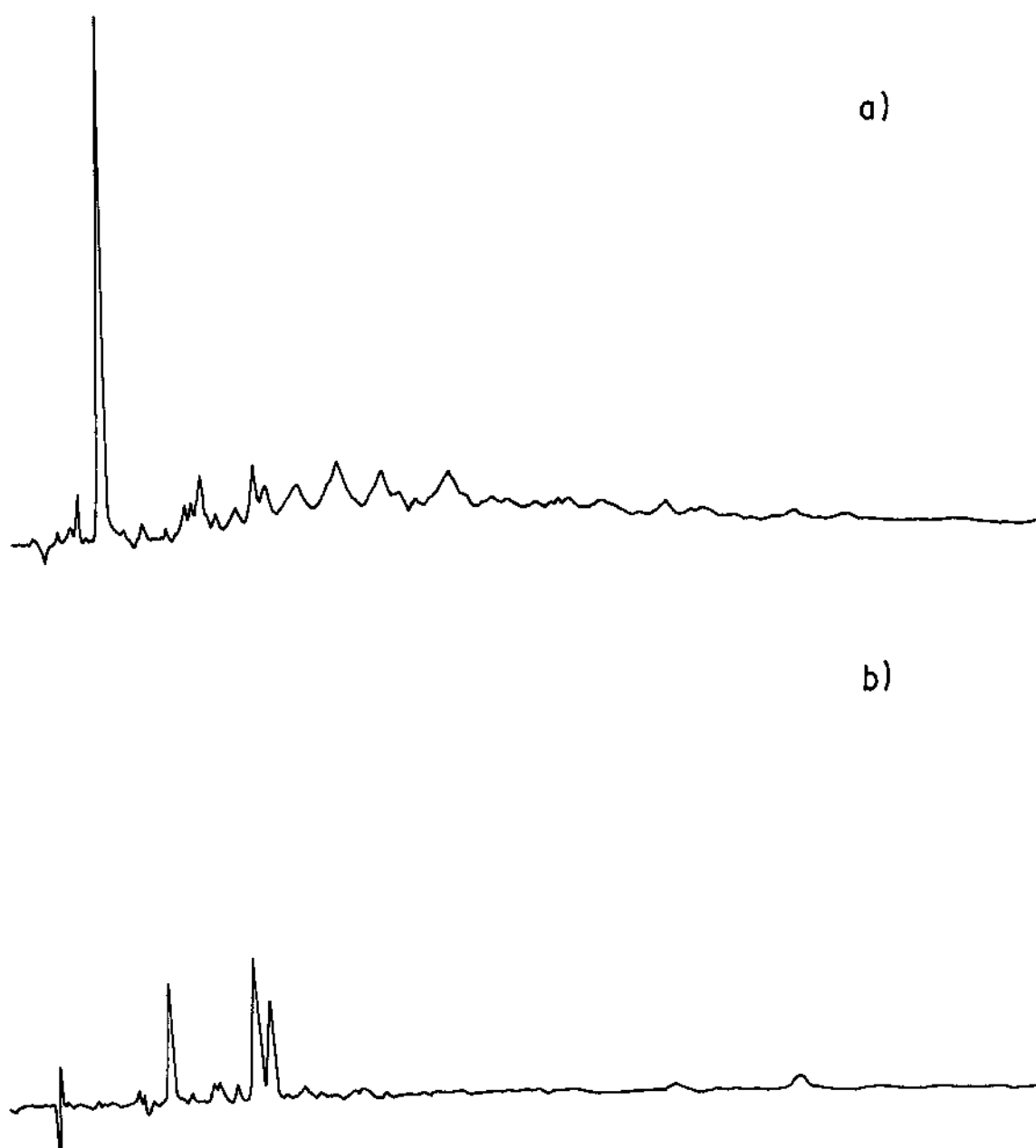


FIGURA 4. Cromatogramas por CLAE de amostras de hexana (a) nova e (b) recuperada. Condições: fase móvel acetonitrila:água (7:3 v/v), fluxo 1 ml/min., detector de fluorescência, coluna C18 (ODS), 25 cm X 4,6 mm d.i., com partículas de 5 μ m. B(a)P = benzo(a)pireno.

A ausência de contaminação por B(a)P observada nas hexanas analisadas também foi evidenciada por outros pesquisadores (Ryder e Sullivan, 1962, Howard *et al.* 1998, Grimmer e Hildebrandt, 1967, Howard *et al.* 1968), tendo sido encontrado na literatura apenas um registro da presença de HPAs carcinogênicos neste solvente (Lijinsky e Raha, 1961, citados por Haenni, 1968).

Como os resultados obtidos até então indicaram que o B(a)P não era introduzido no óleo de milho por solventes usados no processo de extração ou pelo processo de refinação, estando já presente no óleo bruto, decidiu-se pela investigação do processo de moagem. Infelizmente, só foi possível acompanhar o processo de moagem úmida, conduzido pela refinadora A, e os resultados estão apresentados na Tabela 5.

Com exceção do germe de milho seco e da água de maceração, não foi detectada a presença de B(a)P nas demais amostras analisadas. Aparentemente, os HPAs presentes na superfície do grão seco são em parte transferidos para a água de maceração, não tendo sido possível detectar sua presença no grão macerado e tampouco no germe úmido. A casca, provavelmente devido às inúmeras lavagens às quais o grão macerado é submetido durante a extração do amido, também não apresentou contaminação detectável. Entretanto, no germe seco, obtido após passagem do germe úmido em secador rotativo a óleo combustível, foi possível detectar a presença de B(a)P. De acordo com informações da indústria, durante este processo de secagem não há contato direto dos gases de combustão com o germe, não sendo aparentemente esta a origem da contaminação. Infelizmente, devido ao número limitado de amostras analisadas e das inúmeras variáveis envolvidas em todo o processo, não é possível determinar se a contaminação ocorreu durante a secagem ou se já estava presente no germe úmido. De qualquer forma, conforme os dados da Tabela 4, o contaminante está presente no óleo bruto extraído por esta Refinadora em níveis entre 0,88 a 3,44 µg/kg, o que confirma a sua presença no germe seco.

Tabela 5. Teor de benzo(a)pireno ($\mu\text{g/kg}$) em amostras coletadas no processo de moagem úmida e separação do germe de milho.

AMOSTRA	COLETA	
	1	2
Milho Macerado ^a	n.d.	n.d.
Água leve ^b (procedente da maceração do milho)	2,0	n.d.
Germe de Milho Úmido ^a	n.d.	n.d.
Casca de Milho ^a	n.d.	n.d.
Germe de Milho Seco ^a	1,5	1,3

a- valores expressos em relação à fase oleosa,

b - amostras coletadas após 34,5 h do início da maceração dos grãos ,

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

A Tabela 6 apresenta resultados de ensaios conduzidos com o intuito de verificar a eficiência do carvão ativado na remoção de B(a)P de amostras de óleo artificialmente contaminadas. Como pode ser observado, o tratamento do óleo neutralizado com 0,2% de carvão ativado foi suficiente para redução da contaminação a níveis não detectáveis, sendo os três tipos de carvão testados igualmente eficientes. Para uma concentração de carvão A 50% inferior, a concentração de B(a)P foi reduzida em cerca de 85%. Vários tratamentos com resinas de troca iônica também foram conduzidos, resultando em não mais que 20% de remoção do B(a)P.

Tabela 6. Teor de benzo(a)pireno ($\mu\text{g/kg}$) em amostras de óleo de milho submetidas a diferentes tratamentos com carvão ativado

ÓLEO DE MILHO	AMOSTRA	
	1	2
neutralizado ^a	30,8	30,2
branqueado	30,1	-
branqueado + 0,2% carvão A	n.d.	n.d.
branqueado + 0,2% carvão B	n.d.	-
branqueado + 0,2% carvão C	-	n.d.
branqueado + 0,1% carvão A	-	4,4

a - óleo neutralizado e artificialmente contaminado com 27 $\mu\text{g/kg}$ de B(a)P .

(-) não disponível

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

Diferenças no processamento do grão de milho, incluindo a secagem e moagem, parecem estar diretamente associadas à grande variabilidade nos níveis de B(a)P detectados nas diferentes marcas nacionais de óleos de milho refinados.

Embora os níveis de B(a)P nos óleos desodorizados analisados tenham sido consideravelmente menores que os brutos correspondentes, a desodorização tem apenas um efeito pouco significativo na remoção dos HPAs

de alto peso molecular e não é suficiente para resultar em um óleo apropriado para o consumo humano, caso os óleos brutos estejam muito contaminados.

Infelizmente, no Brasil, por problemas econômicos, não se utiliza carvão ativado no processo de refino de óleos vegetais, apesar da comprovada eficiência da clarificação com uso de carvão ativado na remoção de HPAs. Desta forma, para se produzir óleo refinado de milho com baixo teor de HPAs sem a utilização de carvão ativado, é indispensável que o óleo bruto a ser refinado esteja com baixa contaminação.

Os resultados da presente investigação indicam que a grande variação nos níveis de B(a)P em diferentes lotes de óleos de mesma procedência podem ser atribuídas a diferenças de contaminação de alguns lotes de óleo bruto. O conteúdo de HPAs no óleo bruto, por sua vez, depende do processamento anterior do grão de milho, desde a secagem até a retirada do germe.

O controle da secagem pela indústria parece ser uma tarefa difícil, já que inúmeras variáveis estão envolvidas na maior ou menor formação de HPAs, desde o tipo de madeira usada para queima como a granulometria dos grãos e a presença de resíduos. A moagem, por outro lado, pode resultar em uma maior passagem de HPAs para o germe e em sua concentração no óleo bruto, sendo também uma etapa de difícil controle para as refinadoras que apenas processam o óleo bruto.

É, portanto, recomendável o controle da presença de B(a)P no óleo bruto recebido de indústrias extratoras, e sua rejeição, caso o nível de contaminação esteja acima de valores que possam ser reduzidos a níveis aceitáveis pelo processo tradicional de refino. Alternativamente, o óleo com altos teores de B(a)P poderia ser submetido a uma etapa de limpeza com carvão ativado.

Agradecimentos

À FAPESP, pela concessão de auxílio financeiro à pesquisa, Processo 94.3374-6.

Bibliografia

BIERNOTH, G. and ROST, H., 1967, The occurrence of polycyclic aromatic hydrocarbons in coconut oil and their removal. *Chemistry and Industry*, **25**, 2002- 2003.

CAMARGO, M.S.F.O. and TOLEDO, M.C.F., 1998, in press: *Revista Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos*.

DENNIS, M.J., MASSEY, R.C., MCWEENY, D.J., KNOWLES, M.E. and WATSON, D., 1983, Analysis of polycyclic hydrocarbons in UK total diets. *Food and Chemical Toxicology*, **21**(5), 569-574.

DENNIS, M.J., MASSEY, R.C., CRIPPS, G., VEM, I. HOWART, N. and LEE, G., 1991, Factors affecting the polycyclic aromatic hydrocarbon content of cereal, fats and other food products. *Food Additives and Contaminants*, **8**(4), 517-530.

DE VOS, R.H., VAN DOKKUN, W., SCHOUTEN A. and DE JONG- BERKHOUT, P., 1990, Polycyclic aromatic hydrocarbons in Dutch total diet samples (1984-1986). *Food and Chemical Toxicology*, **28**(4), 263-268.

GERTZ, C. H. and KOGELHEIDE. H., 1994. Untersunhung und Beurtilung von PAK in Speisefetten und-ölen, *Fat Science and Technology*, **96**(5), 175-180.

- GRIMMER, G. and HILDEBRANDT, A., 1967, Content of polycyclic hydrocarbons in crude vegetable oils. *Chemistry and Industry*, **25**, 2002- 2003.
- HAENNI, E. O., 1968, Analytical control of polycyclic aromatic hydrocarbons in food and food additives. *Residue Reviews*, **24**, 41-78.
- HOPIA, A., PSYYSALO, H. and WICKSTROM, K., 1986, Margarines, butter and vegetable oils as sources of polycyclic aromatic hydrocarbon. *Journal of the American Oil Chemists Society*, **63** (7), 889-893.
- HOWARD, J.W., TURICCHI, E.W., WHITE, K.H. and FAZIO, T., 1966, Extraction and estimation of polycyclic aromatic hydrocarbon in vegetable oils. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, **49**(6), 1236-1244.
- HOWARD, J.W., TURICCHI, E. W., WHITE, K.H. and FAZIO, T., 1968, Polycyclic aromatic hydrocarbon in solvent used in extraction of edible oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **16**(1), 72-76.
- HOWARD, J.W. and FAZIO,T., 1969, A review of polycyclic aromatic hydrocarbons in food. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **17**(3), 527-531.
- JOE JR., F.L., EMMA, L.R. and FAZIO, T., 1979, Survey of some market basket commodities for polynuclear aromatic hydrocarbon content. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, **62**(3), 615-620.
- KOLAROVIC, L. and TRAITLER, H., 1982, Determination of polycyclic aromatic hydrocarbon in vegetable oils by caffeine complexation and glass capillary gas chromatography. *Journal of Chromatography*, **237**(2), 263-272.

- LARSSON, B.K., 1986, Polycyclic aromatic hydrocarbons in Swedish foods. Aspects on analysis, occurrence and intake. Doctoral Thesis, Swedish University of Agricultural Science. Sweden.
- LARSSON, B.K., ERIKSSON, A.T. and CERVENKA, M., 1987, Polycyclic aromatic hydrocarbons in crude and deodorized vegetable oils. *Journal of the American Oil Chemists Society*, **64**(3), 365-370.
- LAWRENCE, J.F. and WEBER, D.F., 1984, Determination of polycyclic aromatic hydrocarbon in some Canadian commercial fish, shellfish and meat products by liquid chromatography with confirmation by capillary gas chromatography - mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **32**, 789-794.
- LO, M.-T and SANDI, E., 1978, Polycyclic aromatic hydrocarbons (polynuclears) in foods. *Residues Reviews*, **69**, 35-86.
- NOLL, I. B. and TOLEDO, M. C. F. Polycyclic aromatic hydrocarbon in charcoal-broiled meat in Brazil. *Revista Espanõla de Tecnología de Alimentos*, **35**(2), 209-216, 1995.
- NOLL, I. B. and TOLEDO, M. C. F. Benzo(a)pireno em carnes defumadas pelos processos caseiro e industrial, *Revista Brasileira de Toxicologia*, **10**(1), 19-23, 1997.
- PUPIN, A.M. and TOLEDO, M.C.F., 1996, Benzo(a)pyrene in Brazilian vegetable oils. *Food Additives and Contaminants*, **13** (6), 639-646.
- RYDER, J.W. and SULLIVAN, G.P., 1962, Analysis of nonvolatile material in solvent hexane. *Journal of the American Oil Chemists Society*, **39**: 263-266.

- SPEER, K. and MONTAG, A. (1988), Polycyclic aromatic hydrocarbons in natural vegetable oils. *Fat Science and Technology*, **90**(5), 163-167.
- SPEER, K., STEEG, E., HORSTMANN, P., KUHN, T. and MONTAG, A., 1990, Determination and distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in native vegetable oils, smoked fish products, mussels and oysters, and bream from the river Elbe. *Journal of High Resolution Chromatography*, **13**, 104-111.
- STIVJE, T. and HISCENHUBER, C., 1987, Simplified determination of benzo(a)pyrene and other polycyclic aromatic hydrocarbons in various food material by HPLC and TLC. *Deutsche Lebensmittel Rundschau*, **83**(9), 276-282.
- SWALLOW, W.H., 1976, Survey of polycyclic aromatic hydrocarbons in selected foods and food additives available in New Zealand. *New Zealand Journal of Science*, **19**, 407-412.
- VAN HEDDEGHEM, A., HUYGHEBAERT, A. and DE MOOR, H., 1980, Determination of polycyclic hydrocarbons in fat products by high pressure liquid chromatography. *Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung*, **183**, 111-115.
- YABIKU, H.Y., MARTINS, M.S. and TAKAHASHI, M.Y., 1993, Levels of benzo(a)pyrene and other polycyclic aromatic hydrocarbons in liquid smoke flavour and some smoked foods. *Food Additives and Contaminants*, **10**(4), 399-405.
- WELLING, P. and KAANDORP, B., 1986, Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in edible vegetable oils by liquid chromatography and

programmed fluorescence detection. *Zeitschrift für Lebensmittel
Untersuchung und Forschung*, **183**, 111- 115.

Capítulo 4

AVALIAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO DE MARGARINAS, CREMES VEGETAIS E MAIONESES POR HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS

trabalho a ser enviado para publicação na revista:

Food Chemistry

Resumo

Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) são um grupo de compostos que têm sido objeto de muitas pesquisas devido a seu potencial tóxico. Margarinas, cremes vegetais e maioneses disponíveis no mercado brasileiro foram analisadas neste estudo quanto ao teor de pireno, fluoranteno, benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno e dibenzo(a,h)antraceno. A metodologia analítica envolveu extração líquido-líquido, limpeza em coluna de sílica gel e determinação por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fluorescência. Níveis variáveis de contaminação foram encontrados em marcas diferentes do mesmo produto e em lotes diferentes da mesma marca. O teor de HPAs totais encontrados foi na faixa de 4,1 a 7,1 µg/kg em cremes vegetais, 1,7 a 3,9 µg/kg em margarinas e 1,0 a 21,7 µg/kg em maioneses. Em geral, os produtos que continham óleo de milho em sua formulação mostraram os maiores níveis de contaminação. Com base nestes resultados e na importância de gorduras, óleos e produtos derivados como fonte de ingestão de HPAs, recomenda-se aos produtores de margarinas, cremes vegetais e maioneses que iniciem o controle da contaminação dos óleos vegetais utilizados na elaboração destes produtos, de forma a reduzir a exposição do consumidor a quantidades excessivas de compostos potencialmente carcinogênicos.

Abstract

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are a group of compounds that have been the subject of much concern due to their toxic potential. In this study, margarines, vegetable cream and mayonnaise available on the Brazilian market were analyzed for pyrene, chrysene, benzo(a)pyrene, benzo(b)fluoranthene and dibenzo(a,h)anthracene. The analytical methodology involved liquid-liquid extraction, clean-up on silica gel column and determination by high performance liquid chromatography using fluorescence detector. Variable levels of contamination were found within different brands of the same product and within different batches of the same brand. The total PAH content was in the range of 4.1 to 7.1 $\mu\text{g/kg}$ in vegetable cream, 1.7 to 3.9 $\mu\text{g/kg}$ in margarine and 1.0 to 21.7 $\mu\text{g/kg}$ in mayonnaise. In general the products that contained added corn oil showed the highest levels of contamination. Based on these results and on the importance of fat, oils and derived products for the intake of PAHs, it is recommended that producers of margarine, vegetable creams and mayonnaise start to control the contamination of the vegetable oils used in the elaboration of these products, in order to reduce the exposure of consumers to excessive amounts of potentially carcinogenic compounds.

INTRODUÇÃO

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) são uma classe de substâncias amplamente distribuídas no ambiente, muitas das quais com potencial tóxico testado e comprovado em animais de laboratório (IARC, 1983). Os HPAs são formados principalmente em processos de combustão incompleta de matérias orgânicas e encontram-se na natureza como contaminantes de solos, ar e alimentos (Swallow, 1976; Walker, 1977; Lo & Sandi, 1978; Howard & Fazio, 1980; Welling & Kaandorp, 1986).

O potencial carcinogênico apresentado por alguns HPAs, entre eles o benzo(a)pireno (B(a)P) (IARC, 1983), têm estimulado o desenvolvimento de pesquisas no sentido de identificar e quantificar as prováveis fontes de exposição humana a estes compostos.

Em estudo conduzido por Hattermer- Frey & Travis (1991), estimou-se que a cadeia alimentar contribui com aproximadamente 97% do total da exposição diária ao B(a)P. Segundo Larsson *et al.*, 1987, os óleos e gorduras são considerados a segunda fonte de importância para a ingestão de HPAs, embora outros autores tenham registrado os mais altos níveis individuais (Dennis *et al.*, 1983). Neste grupo de alimentos, verificou-se que a maior contribuição de B(a)P vem das margarinas (70%), 11% dos óleos vegetais, 9% da banha, 3% da manteiga e 2% dos queijos (Dennis *et al.*, 1991). As margarinas e cremes vegetais são considerados fontes importantes para a ingestão diária destes contaminantes devido a sua alta incidência na dieta, ainda que os níveis de HPAs presentes estejam bem abaixo daqueles que têm sido encontrados em óleos vegetais.

D'Arrigo, citado por Mariani & Fedeli, 1984, encontrou em margarinas italianas uma contaminação média elevada por B(a)P: 4,0 µg/kg em margarinas vitaminadas, 8,2 µg/kg em margarinas puras, 4,5 µg/kg em margarinas para culinária e 3,3 µg/kg em margarinas de mesa.

Posteriormente, Hopia *et al.*, 1986, encontraram em margarinas e gorduras vegetais níveis de B(a)P na faixa de 0,02 a 2,2 µg/kg, enquanto que Dennis *et al.*, 1991, determinaram em 19 amostras de margarinas e cremes vegetais uma concentração média de B(a)P de 1,68 (0,19 - 6,0) µg/kg.

Considerando-se a não disponibilidade de dados nacionais sobre a contaminação de produtos a base de óleos vegetais por esta classe de substâncias de potencial comprovadamente tóxico e os altos níveis de B(a)P em óleo vegetais brasileiros, reportados por Pupin & Toledo, 1996, o presente estudo foi dirigido à avaliação da contaminação de margarinas, cremes vegetais e maioneses por HPAs.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras

Amostras de margarinas (6 marcas), cremes vegetais (5 marcas), halvarinas (2 marcas), gordura vegetal hidrogenada (1 marca) e maioneses (7 marcas) foram adquiridas no comércio da cidade de Campinas-SP em um intervalo de tempo de 1 ano (julho de 1995 a julho de 1996), em 3 coletas distintas. Todas amostras, num total de 63, foram analisadas quanto à presença de pireno, fluoranteno, benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno e dibenzo(a,h)antraceno. As análises foram conduzidas em duplicata.

Reagentes

Todos reagentes foram da marca Merck. Os solventes acetonitrila e dimetilformamida foram de grau CLAE e o solvente ciclohexano, grau PA, foi destilado em coluna de vidro antes do uso. A água utilizada foi destilada e

purificada em sistema Milli Q (Millipore Ltd). Os padrões analíticos foram obtidos da Sigma e da Aldrich Chemical Co. Ltd.

Estudos de Recuperação e Limite de Detecção do Método

Durante os ensaios foram realizadas análises de controle sobre os reagentes (análise do branco) para verificar a ausência de HPAs e de picos interferentes. Para avaliação da metodologia foram conduzidos testes de fortificação para cada HPA em 3 níveis diferentes, adicionando-se às amostras quantidades conhecidas do padrão correspondente, extraído com as amostras durante o desenvolvimento das análises.

Foi também determinado o limite de detecção do método para cada padrão de HPA analisado.

Extração

O método de extração seguido foi desenvolvido por Grimmer & Bohnke, 1975 e adaptado por Speer *et al.*, 1990, como descrito a seguir.

Margarinas e cremes vegetais

Cerca de 100 g do produto foram pesados e submetidos a banho-maria à 40-50°C até o total derretimento. Amostras de 10g da fase oleosa à temperatura ambiente foram pesadas em um béquer de 50 mL, e transferidas com 100 mL de ciclohexano divididos em três porções para um funil de separação de 250 mL (as fortificações são feitas neste ponto). Os HPAs foram extraídos com 3 porções de 50, 25 e 25 mL de dimetilformamida : água (9:1, v/v) e o extrato diluído com 100 mL de sulfato de sódio a 1% em água. O extrato foi reextraído com porções de 50, 35 e 35 mL de ciclohexano e duas vezes com 40 mL de água, seco com

sulfato de sódio anidro (cerca de 5 g) e concentrado para um volume final de 2 mL em evaporador rotativo a vácuo, com banho à temperatura de 40°C.

Maioneses

Cerca de 200 g de maionese foram colocados em freezer por aproximadamente 24 horas e a seguir deixados à temperatura ambiente até separação das fases. Dez gramas da fase oleosa foram pesados em um béquer de 50 mL, seguindo-se o procedimento de extração descrito para margarinas.

Limpeza das Amostras

As amostras foram limpas por passagem através de uma coluna cromatográfica de vidro (21 X 1,1 cm d.i.) contendo 5 g de sílica gel (Merck) desativada com água (12 %). O extrato foi diluído com 2 mL de ciclohexano, adicionado no topo da coluna e eluído com 85 mL de ciclohexano. Os primeiros 10 mL foram descartados e o restante recolhido em um balão de 250 mL. A fração coletada foi concentrada até quase seca em evaporador rotativo a vácuo, completando-se a secagem com fluxo de nitrogênio. O resíduo foi diluído com 2mL de acetonitrila em um frasco de vidro e armazenado em freezer até análise.

Desenvolvimento Cromatográfico

As amostras foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fluorescência, utilizando-se pré-coluna e coluna Vydac C18 (ODS), 25 cm X 4,6 mm d.i., com partículas de 5µm.

O sistema cromatográfico utilizado foi da marca Waters, constituído de bomba quaternária Waters 600, injetor automático Waters 717 com loop de capacidade de 20 µl e detector de fluorescência Waters 474, com excitação a

290nm e emissão a 430nm. O integrador foi o Spectraphysics, modelo SP4400 e a fase móvel uma mistura de acetonitrila : água (75:25), com fluxo de 1,0 mL/min.

Após prévia estabilização do sistema, foram injetados 20µl dos 2 mL do extrato final das amostras.

O pico correspondente a cada HPA foi identificado por comparação de seu tempo de retenção com o do respectivo padrão e quantificado por padronização externa. A confirmação do pico foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência, com detector de varredura de fotodiodos (Shimatzu). As condições de trabalho utilizadas foram as mesmas do sistema com detector de fluorescência. A faixa de varredura do espectro foi realizada entre 290 e 500 nm.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 lista os oito HPAs analisados, especificando as respectivas abreviações a serem utilizadas na apresentação dos resultados, o limite de detecção do método para cada HPA e informações sobre o potencial carcinogênico dos compostos. Estes hidrocarbonetos foram selecionados para análise com base em seu potencial carcinogênico, ocorrência e disponibilidade para aquisição dos padrões.

Os limites de detecção reportados na literatura para HPAs em óleos e gorduras, utilizando-se CLAE como técnica de análise, referem-se ao HPA mais estudado, B(a)P, e variam na faixa de 0,01 a 0,5 µg/kg (Swallow, 1976; Dennis, M.J., *et al.*; Hopia *et al.*, 1986; Speer & Montag, 1988; Speer *et al.*, 1990). Nas nossas condições de análise, obteve-se para o B(a)P um limite relativamente inferior, igual a 0,01 µg/kg, detectado na fase oleosa do produto.

Tabela 1. Abreviação, limite de detecção e carcinogenicidade dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos analisados.

HPA	abreviação	limite de detecção ($\mu\text{g/kg}$)	carcinogenicidade*
Fluoranteno	F	0,03	-
Pireno	P	0,10	-
Benzo(a)antraceno	B(a)A	0,10	+
Criseno	Cr	0,04	$\pm$
Benzo(b)fluoranteno	B(b)F	0,10	+
Benzo(k)fluoranteno	B(k)F	0,06	+
Benzo(a)pireno	B(a)P	0,01	+
Dibenzo(a,h)antraceno	B(a,h)A	0,58	+

* em animais de laboratório; (+) suficiente, ($\pm$) limitada, (-) nenhuma (IARC, 1983)

Na Tabela 2 encontram-se os resultados dos ensaios de recuperação do método empregado. Estudos conduzidos por outros autores revelam diferentes valores de recuperação, variáveis em função do método utilizado. De Vos *et al.*, 1990, relataram os seguintes valores de recuperação: 97% para fluoranteno, 101% para criseno, 87% para benzo(a)antraceno, 86% para benzo(a)pireno, 101% para benzo(b)fluoranteno e 102% para benzo(k)fluoranteno. Van Heddeghem *et al.*, 1980, por sua vez, determinaram em produtos oleosos uma recuperação de 78% para o B(a)P, enquanto que Grimmer & Hildebrandt, 1967, obtiveram um valor de 88%. A recuperação média ($\pm$ SD) do B(a)P neste estudo foi de $97,80 \pm 5,43$, o que indica a precisão da metodologia empregada.

Tabela 2 . Recuperação de hidrocarbonetos aromáticos em margarinas e maioneses.

HPA	nível de fortificação (µg/kg)	recuperação* (%)	recuperação média (%)**
Fluoranteno	0,54	95,01	97,84 ± 2,86
	1,79	97,79	
	1,08	100,73	
Pireno	0,15	85,91	85,13 ± 4,89
	0,59	79,96	
	1,18	89,53	
Benzo(a)antraceno	0,71	79,72	88,03 ± 7,20
	1,71	92,52	
	2,53	91,84	
Criseno	0,54	95,82	98,45 ± 2,68
	1,49	98,37	
	2,24	101,17	
Benzo(b)fluoranteno	0,57	84,46	82,93 ± 2,44
	1,02	84,22	
	1,54	80,12	
Benzo(k)fluoranteno	0,29	94,88	92,23 ± 5,65
	0,58	85,75	
	1,45	96,07	
Benzo(a)pireno	0,51	93,00	97,80 ± 5,43
	1,50	103,70	
	3,72	96,70	
Dibenzo(a,h)antraceno	0,54	95,98	93,77 ± 5,14
	1,08	87,90	
	2,00	97,43	

*A recuperação em cada nível é média de duas determinações.

** Média ± desvio padrão.

A Tabela 3 apresenta a média de contaminação por HPAs calculada para os produtos analisados. Os níveis de HPAs, determinados na fase oleosa do alimento, foram corrigidos em função da porcentagem de óleos vegetais declarados na composição de cada um dos produtos analisados, o que pode resultar em valores abaixo do limite de detecção do HPA. A Figura 1 mostra o cromatograma de uma mistura de padrões e a Figura 2 apresenta cromatogramas obtidos para amostras de margarina e maionese.

As margarinas, rotuladas como tal, apresentam em sua formulação de 80 a 83% de lipídeos, enquanto que os cremes vegetais contêm 60 - 62% e as halvarinas, aproximadamente 40%. Nos três produtos, o óleo mais utilizado é o de soja, provavelmente devido ao seu custo mais baixo em relação aos demais óleos vegetais. Mesmo nos produtos em cujo rótulo é mencionada a presença de outros óleos vegetais, como milho e girassol, a concentração destes óleos é de, no máximo, 15 a 20%, segundo informações do fabricante. A maionese, por sua vez, apresenta em sua composição um teor de lipídeos na faixa de 70 a 80%.

A maioria das amostras analisadas mostrou diferenças quanto à contaminação por HPAs. Amostras individuais da mesma marca de margarina, por exemplo, variaram em seu teor de B(a)P por um fator de até 10.

A variabilidade na extensão da contaminação por HPAs, observada no presente estudo e também documentada por outros autores (Dennis *et al.*, 1991, Hopia *et al.*, 1986), está provavelmente associada à contaminação variável dos óleos vegetais usados como ingredientes na elaboração dos produtos.

O óleo vegetal mais utilizado na fabricação de margarinas no Brasil é o de soja que, conforme relatado por Pupin e Toledo, 1996, encontra-se contaminado por níveis de B(a)P na faixa de <0,5 a 6,1 µg/kg, com média de 2,2 µg/kg. Considerando-se a concentração média de B(a)P nas margarinas brasileiras analisadas (0,58 µg/kg) e expressando-se este valor em base à fase oleosa, que representa cerca de 82% do produto, pode-se estimar que o óleo de soja utilizado na elaboração das margarinas estava contaminado com

Tabela 3. Média e faixa de concentração de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (µg/kg) em alimentos gordurosos

HPA*	margarina (n=18)	creme vegetal (n=15)	halvarina (n=6)	gordura vegetal (n=3)	maionese (n=21)
F	0,39 n.d. - 1,95	0,72 n.d. - 3,19	0,22 0,07 - 0,78	0,02 0,03 - 0,07	0,50 0,11 - 2,76
P	0,05 n.d. - 0,84	0,81 n.d. - 2,36	0,13 n.d. - 0,40	n.d.	0,83 n.d. - 7,03
B(a)A	0,71 0,22 - 1,36	1,28 0,45 - 3,60	0,66 0,14 - 2,14	0,31 0,24 - 0,40	1,32 0,32 - 4,83
Cr	0,16 n.d. - 0,62	0,54 n.d. - 1,61	0,27 n.d. - 0,94	n.d.	0,22 n.d. - 1,37
B(b)F	0,52 0,18 - 1,03	0,69 0,29 - 1,15	0,27 n.d. - 0,68	0,18 0,09 - 0,26	0,64 0,14 - 2,43
B(k)F	0,20 0,07 - 0,34	0,34 0,11 - 0,84	0,12 0,06 - 0,20	0,09 0,08 - 0,12	0,33 0,08 - 1,07
B(a)P	0,58 0,11 - 1,23	0,82 0,32 - 1,39	0,27 0,14 - 0,63	0,15 0,01 - 0,32	1,38 0,12 - 6,99
B(a,h)A	n.d.	0,56 n.d. - 4,37	n.d.	n.d.	1,00 n.d. - 6,76

*P=pireno; F=fluoranteno; B(a)A =benzo(a)antraceno; Cr=criseno; B(b)F=benzo(b)fluoranteno; B(k)F= benzo(k)fluoranteno; B(a)P=benzo(a)pireno; B(a,h)A=dibenzo(a,h)antraceno.

n.d. não detectado (limites de detecção na Tabela 1)

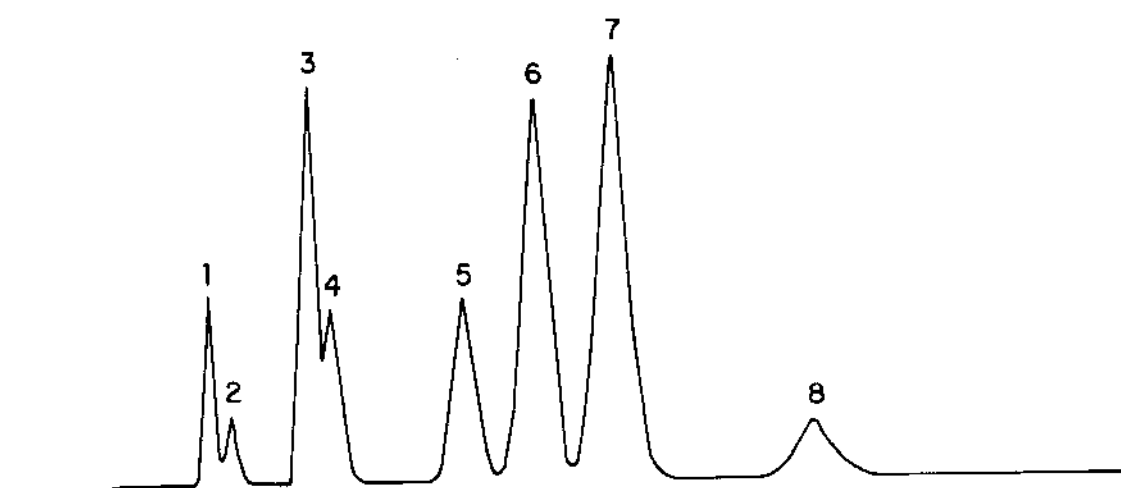


Figura 1. Cromatograma por CLAE de uma mistura de padrões de HPAs. Condições: fase móvel acetonitrila : água (75:25 v/v), fluxo 1 ml/min, detector de fluorescência, coluna C-18 (ODS), 25 cm X 4,6 mm d.i., com partículas de 5 μ m. Picos: 1=F, 2=P, 3 = B(a)A, 4=Cr, 5=B(b)F, 6=B(k)F, 7=B(a)P, 8=B(a,h)A. Os picos estão identificados na Tabela 1.

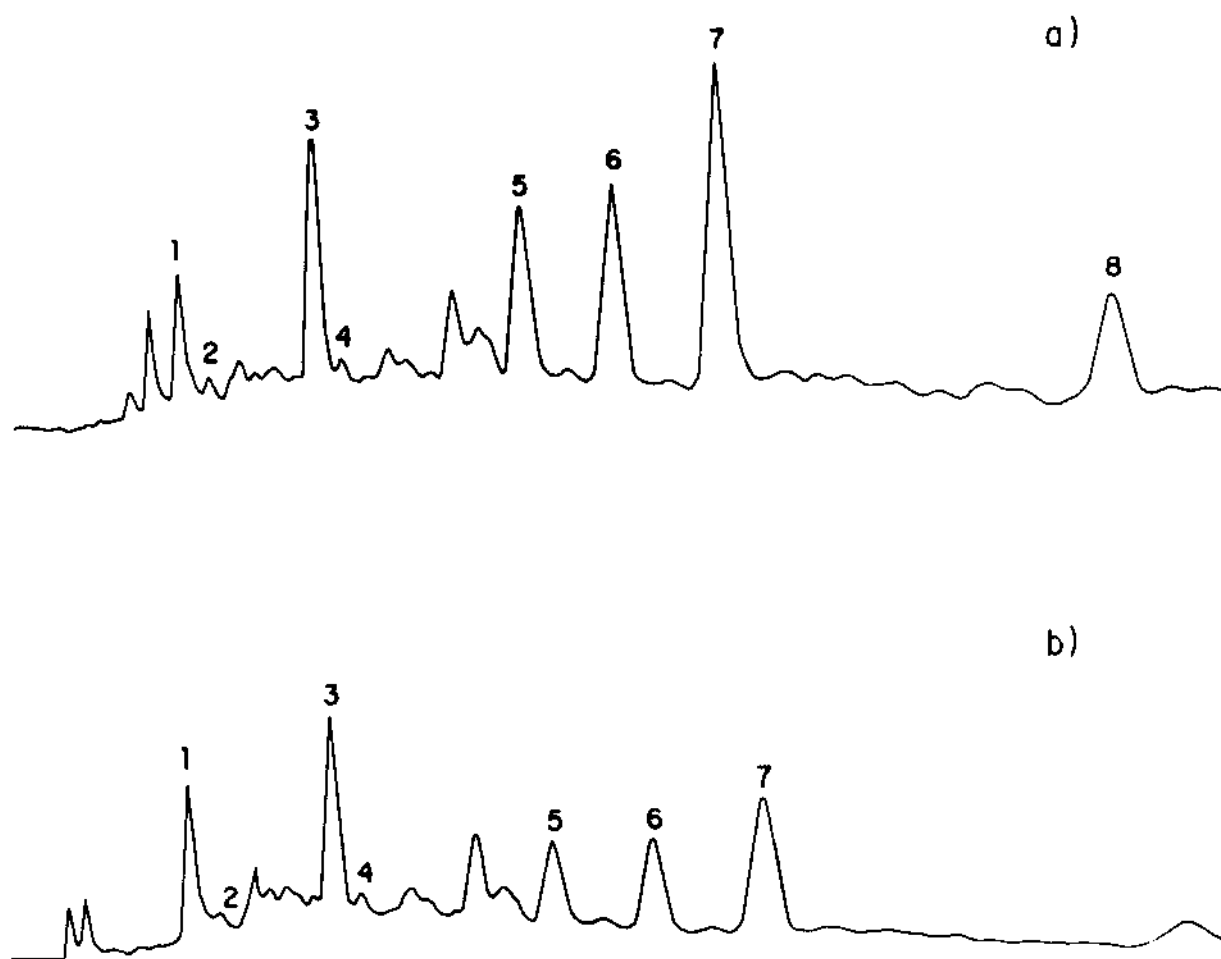


Figura 2. Cromatogramas por CLAE de amostras de (a) margarina e (b) maionese. Condições: fase móvel acetonitrila : água (7:3 v/v), fluxo 1 ml/min, detector de fluorescência, coluna Vydac. Picos: 1=F, 2=P, 3 =B(a)A, 4=Cr, 5=B(b)F, 6=B(k)F, 7=B(a)P, 8=B(a,h)A. Os picos estão identificados na Tabela 1.

níveis médios de 0,71 µg/kg, dentro da faixa encontrada por Pupin e Toledo, 1996. O mesmo raciocínio, feito para os cremes vegetais, indica que o óleo utilizado na sua elaboração estava mais contaminado por B(a)P, com níveis médios de 1,2 µg/kg. Considerando-se que três marcas de creme vegetal analisadas contêm cerca de 15 a 20 % de óleo de milho em sua composição, pode-se supor que a maior contaminação observada nestes produtos se deva à utilização do óleo de milho que, comparativamente ao óleo de soja, apresenta-se mais contaminado por HPAs, com teor médio de B(a)P de 10,8 µg/kg (Pupin & Toledo, 1996).

Na Tabela 4, onde está apresentada a Σ dos HPAs analisados nos diferentes produtos, pode ser observada a contaminação relativamente maior dos cremes vegetais que contêm óleo de milho (marcas H, I e J), embora a marca G, em cujo rótulo não consta a presença de óleo de milho, tenha apresentado a maior contaminação.

De acordo com os resultados obtidos (Tabela 3), o HPA mais estudado e conhecido, o B(a)P, está presente em maioneses em níveis maiores que nos demais produtos, indicando que os óleos utilizados em sua elaboração apresentavam-se relativamente mais contaminados.

A maionese de Marca T, em particular, apresentou níveis de HPAs bastante acima das demais marcas (Tabela 4), comprovando a variabilidade de contaminação dos óleos utilizados na composição de produtos gordurosos analisados.

A legislação brasileira vigente não estabelece tolerância para a presença de HPAs em alimentos. Países como a Alemanha, Áustria e Polônia limitam em 1 µg/kg o teor máximo de B(a)P em carnes defumadas e este valor tem sido utilizado como limite referencial para avaliar a contaminação de outros alimentos (Larsson, 1986). Na Alemanha, embora também não exista uma legislação específica, as indústrias de alimentos recomendam limites para a presença de HPAs em óleos e gorduras refinados. O teor de HPAs leves (fenantreno,

Tabela 4. Teor de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em margarinas, cremes vegetais, halvarinas e maioneses

Produto/marca	Σ HPAs $^*(\mu\text{g/kg})$
Margarina	
A	$3,06 \pm 0,25$
B	$3,99 \pm 0,20$
C	$1,90 \pm 0,20$
D	$3,09 \pm 0,19$
E	$2,01 \pm 0,11$
F	$1,72 \pm 0,25$
Creme vegetal	
G	$7,06 \pm 0,20$
H	$6,25 \pm 0,94$
I	$6,74 \pm 0,27$
J	$4,74 \pm 0,45$
K	$4,04 \pm 0,21$
Halvarina	
L	$2,73 \pm 0,38$
M	$1,11 \pm 0,09$
Maionese	
N	$6,10 \pm 0,46$
O	$2,29 \pm 0,58$
P	$1,50 \pm 0,32$
Q	$3,02 \pm 0,47$
R	$3,72 \pm 0,54$
S	$1,03 \pm 0,13$
T	$21,73 \pm 0,57$

*Os resultados são média de 6 determinações (n=3).

Σ HPAs = pireno + fluoranteno + benzo(a)antraceno + criseno + benzo(b)fluoranteno + benzo(k)fluoranteno + benzo(a)pireno + dibenzo(a,h)antraceno.

antraceno, pireno, benzo(a)antraceno, criseno, trifenileno e fluoranteno) não deve exceder 25 µg/kg e a soma dos HPAs pesados (benzo(a)pireno, benzo(e)pireno, benzo(a)fluoranteno, perileno, indeno(1,2,3-cd)pireno, dibenzo(ah,ac)antraceno, benzo(bjk)fluoranteno, benzo(ghi)perileno) deve ser inferior a 5 µg/kg (Speer *et al.*, 1990).

No presente estudo, o creme vegetal mais contaminado foi o de marca G, cujo teor de HPAs pesados (benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, dibenzo(a,h)antraceno) somou 2,70 µg/kg, correspondentes a 4,5 µg/kg no óleo vegetal refinado utilizado como ingrediente. Considerando-se que apenas metade dos HPAs de alto peso molecular especificados pela indústria alemã foram determinados nesta pesquisa, é provável que o limite de 5,0 µg/kg tenha sido ultrapassado por esta e outras amostras analisadas. Para maioneses a situação é mais crítica, uma vez que a concentração média de HPAs pesados determinados no produto de marca T foi de 12,61 µg/kg, equivalentes a 16,1 µg/kg no óleo vegetal.

Tendo em vista os resultados obtidos e a importância do grupo de óleos e produtos a base de óleos para a ingestão de HPAs, recomenda-se aos produtores de margarinas e maioneses o controle da contaminação dos óleos vegetais empregados na elaboração de seus produtos, visando reduzir a exposição humana a estes contaminantes, muitos dos quais com potencial carcinogênico comprovado.

AGRADECIMENTOS

À FAPESP, pela concessão de auxílio financeiro à pesquisa, Processo 94.3374-6.

BIBLIOGRAFIA

- Dennis, M. J., Massey, R. C., Macweeny, D. J., Knowles, M. E. & Watson, D. (1983) Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbon in UK total diets. *Food and Chem. Toxicol.*, **21**(5), 569-574.
- Dennis, M. J., Massey, R. C.; Cripps, G., Venn, L., Howarth, N. & Lee, G. (1991) Factors affecting the polycyclic aromatic hydrocarbon content of cereal, fats and other food products. *Food Addit. Contam.*, **8**(4), 517-530.
- De Vos, R. H., Van Dokkun, W.; Schouten A. & DE Jong- Berkhout, P. Polycyclic aromatic hydrocarbons in dutch total diet samples (1984-1986). (1990). *Food Chem. Toxicol.*, **28**(4), 263-268.
- Grimmer, G. & Hildebrandt, A. Content of polycyclic hydrocarbons in crude vegetable oils. *Chem. Industry.*, **25**: 2000-2002, 1972.
- Grimmer, G. & Böhnke, H. Polycyclic aromatic hydrocarbons profile of high-protein foods, oils and fats by gas chromatography (1975). *J.A.O.A.C.*, **58**(4), 725-733.
- Howard, J. W. & Fazio, T. A review of polycyclic aromatic hydrocarbons in food (1969). *J. Agric. Food Chem.*, **17**(3), 527-531.
- Howard, J. W. & Fazio, T. Review of polycyclic aromatic hydrocarbon in foods. Analytical methodology and reported findings of polycyclic aromatic hydrocarbons in foods. *J.A.O.A.C.*, **63**(5): 1077-1104, 1980.
- Hattermer- Frey H. A. & Travis C. C. Benzo(a)pyrene environmental partitioning and human exposure (1991). *J. Toxicol. Ind. Health*, **7**, 141-157.
- Hopia, A., Psysalo, H. & Wickstrom, K. Margarine, butter and vegetable oils as sources of polycyclic aromatic hydrocarbon (1986). *J.A.O.C.S.*, **63** (7), 889-893.
- IARC, International Agency for Research on Cancer; Monography on the evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Man. Vol. **32**: Certain aromatic polynuclear and heterocyclic compounds (Lyon, France, 1983).

- Larsson, B.K. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Swedish Foods. Aspects on analysis, occurrence and intake (1986). Doctoral Thesis.
- Larsson, B.K., Eriksson, A.T. & Cervenka, M. Polycyclic aromatic hydrocarbons in crude and deodorized vegetable oils (1987). *J.A.O.C.S.*, **64**(3), 365-370.
- Lo, Mein-Tein & Sandi, E. Polycyclic aromatic hydrocarbon (polynuclears) in foods (1978). *Res. Rev.*, **60**, 35-86.
- Mariani, C. & Fedeli, E. Idrocarburi policiclici aromatici negli oli vegetali (1984) *La Riv. Ital. Sost. Grasse*, **61**(5), 305-315
- Pupin, A. M. & Toledo, M. C. F. Benzo(a)pyrene in Brazilian vegetable oils (1996). *Food Addit. Contam.*, **13**(6), 639-646.
- Speer, K. & Montag, A. Polycyclic Aromatic Kohlenwassertoffe in Nativen Pflanzlichen Ölen (1988). *Fat Sci. Technol.*, **90**(5), 163-167.
- Speer, K., Steeg, E., Horstmann, P. Kuhn, T. & Montag, A. Determination and distribution of polycyclic aromatic hydrocarbon in native vegetable oils, smoked fish products, mussels and oysters, and bream from the river elbe (1990). *J. High Res. Chromatogr.*, **13**, 104-111.
- Swallow, W.H. Survey of polycyclic aromatic hydrocarbon in selected foods and food additives available in New Zealand (1976). *N. Zeal. J. Sci.*, **19**, 407-412.
- Van Heddeghem, A., Huyghebaert, A. & De Moor, H. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbon in fat products by high pressure liquid chromatography (1980). *Z. Lebensm. Unters Forsch.*, **171**, 9-13.
- Walker, E.A. Some facts and legislation concerning polycyclic aromatic hydrocarbon in smoked foods (1977). *Pure & Appl. Chem.*, **49**, 1673-1686.
- Welling, P. & Kaandorp, B. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) in edible vegetable oils by liquid chromatography and programmed fluorescence detection (1986). *Z. Lebensm. Unters Forsch.*, **183**, 111-115.

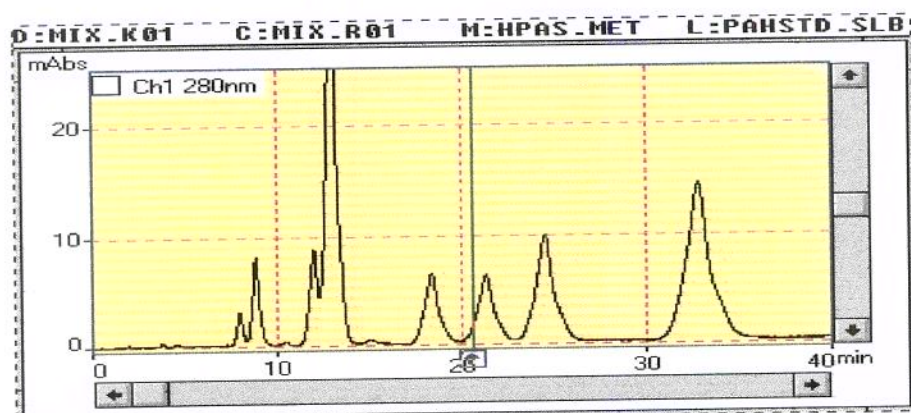
CONCLUSÃO

O monitoramento, durante 2 anos, de óleos de milho comercializados na região de Campinas revelou a presença de benzo(a)pireno B(a)P em todas as amostras analisadas, além de uma grande variabilidade nos níveis encontrados em diferentes marcas e lotes de mesma marca. A investigação da origem da contaminação e da variação nos níveis de B(a)P encontrados mostrou que a secagem dos grãos de milho em secadores à lenha é uma das fontes de contaminação, enquanto que a moagem úmida contribuiu para reduzir a contaminação do óleo final. O uso do carvão ativado a 0,2% na etapa de clarificação confirmou-se como um tratamento eficiente na remoção de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs).

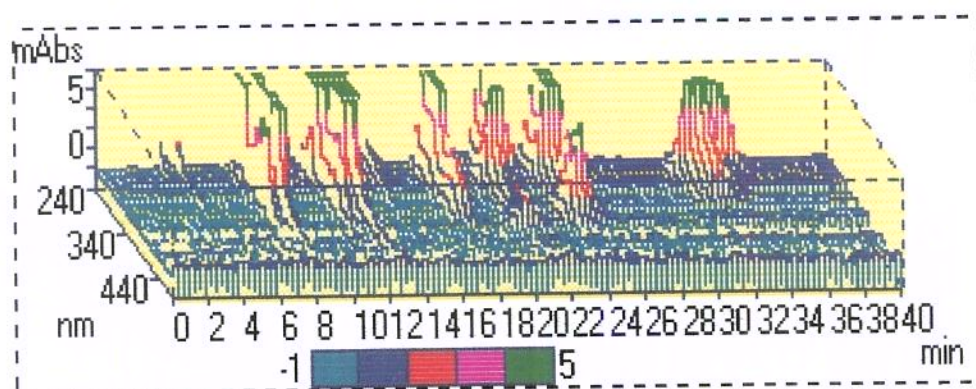
Também foi detectada a contaminação de amostras de margarinas, cremes vegetais, halvarinas e maioneses por HPAs, o que está provavelmente associado à contaminação dos óleos vegetais usados como ingredientes na elaboração dos produtos.

Tendo em vista os resultados obtidos e a importância de se reduzir a exposição humana a HPAs, muitos dos quais com potencial carcinogênico, recomenda-se aos produtores de óleos de milho a implantação de um mecanismo de controle da contaminação destes alimentos por HPAs, particularmente durante a secagem dos grãos e moagem ou, alternativamente, a introdução de uma etapa de clarificação com carvão ativado.

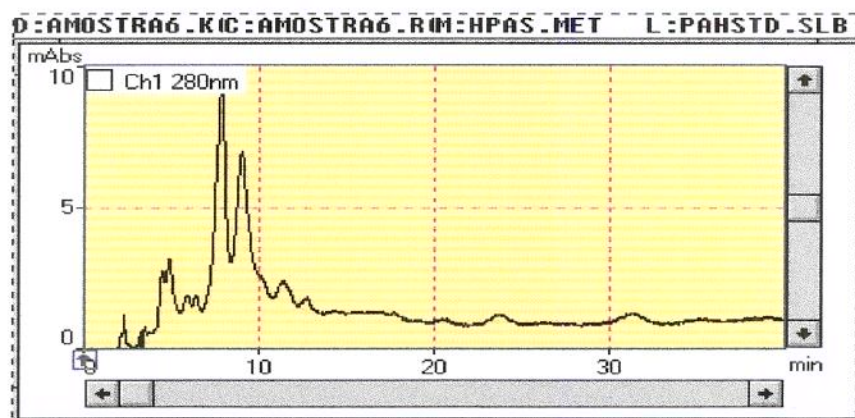
ANEXOS



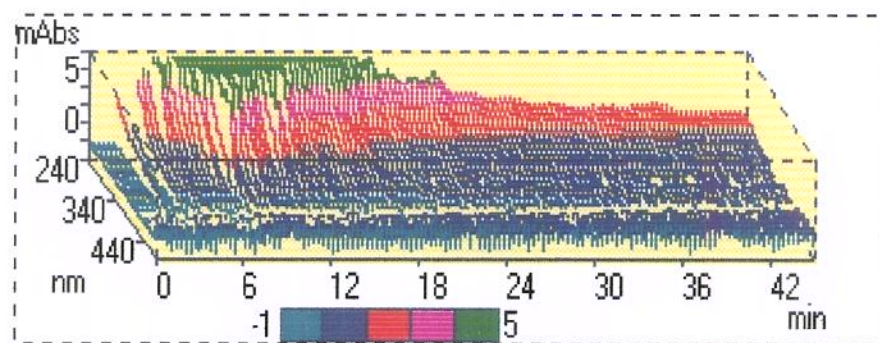
ANEXO 1- Cromatograma de uma mistura de padrões de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos por CLAE e detector UV-VIS.



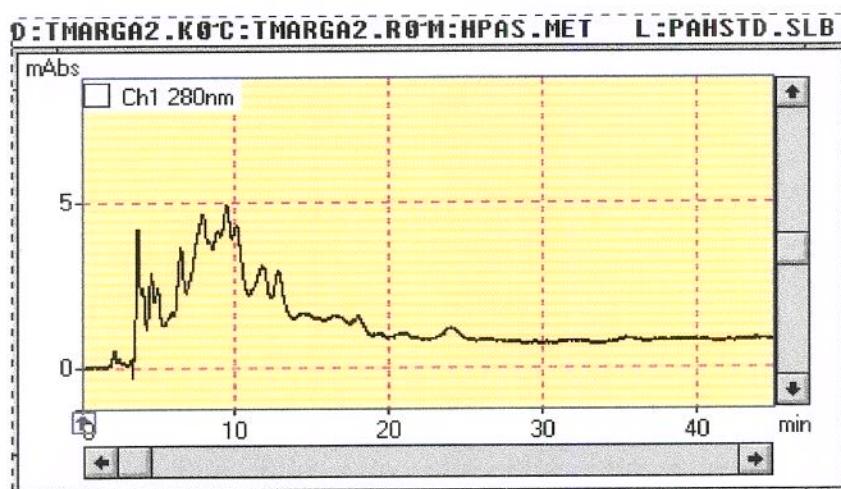
ANEXO 2- Cromatograma de uma mistura de padrões de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos por detector UV-VIS/ varredura de fotodiodos.



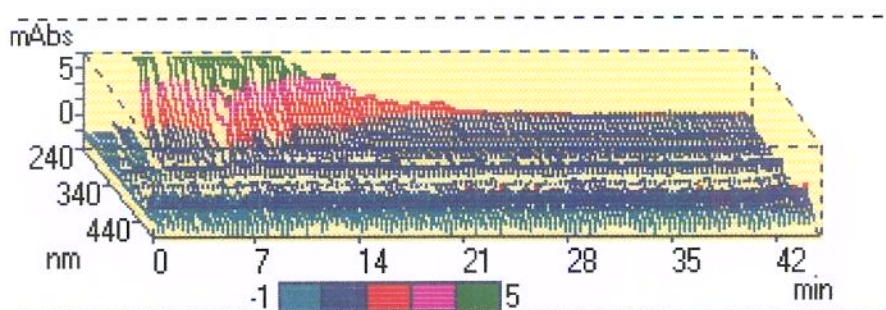
ANEXO 3- Cromatograma de uma amostra de óleo de milho refinado por CLAE e detector UV-VIS.



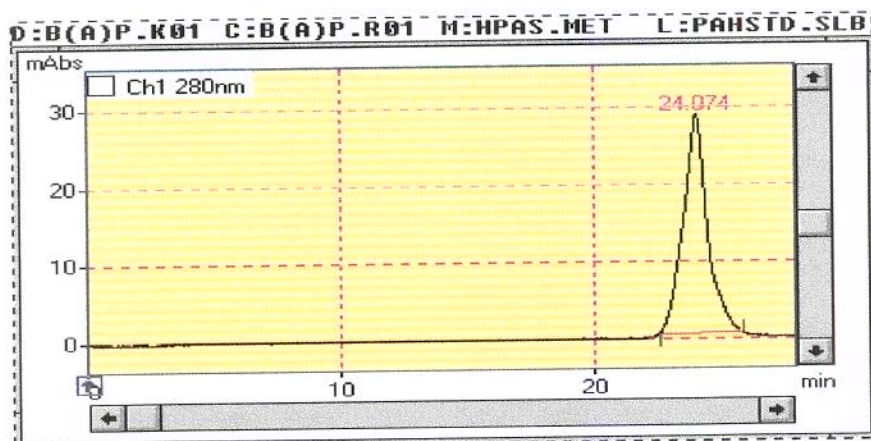
ANEXO 4- Cromatograma de uma amostra de óleo de milho refinado por CLAE e detector UV-VIS/varredura de fotodiodos.



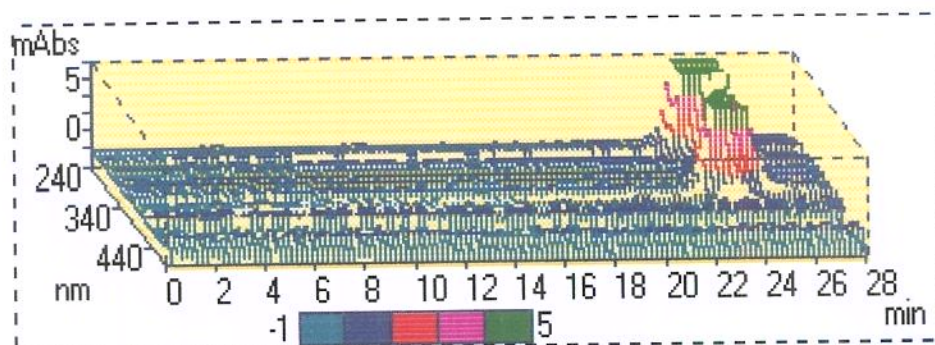
ANEXO 5- Cromatograma de uma amostra de margarina por CLAE e detector UV-VIS.



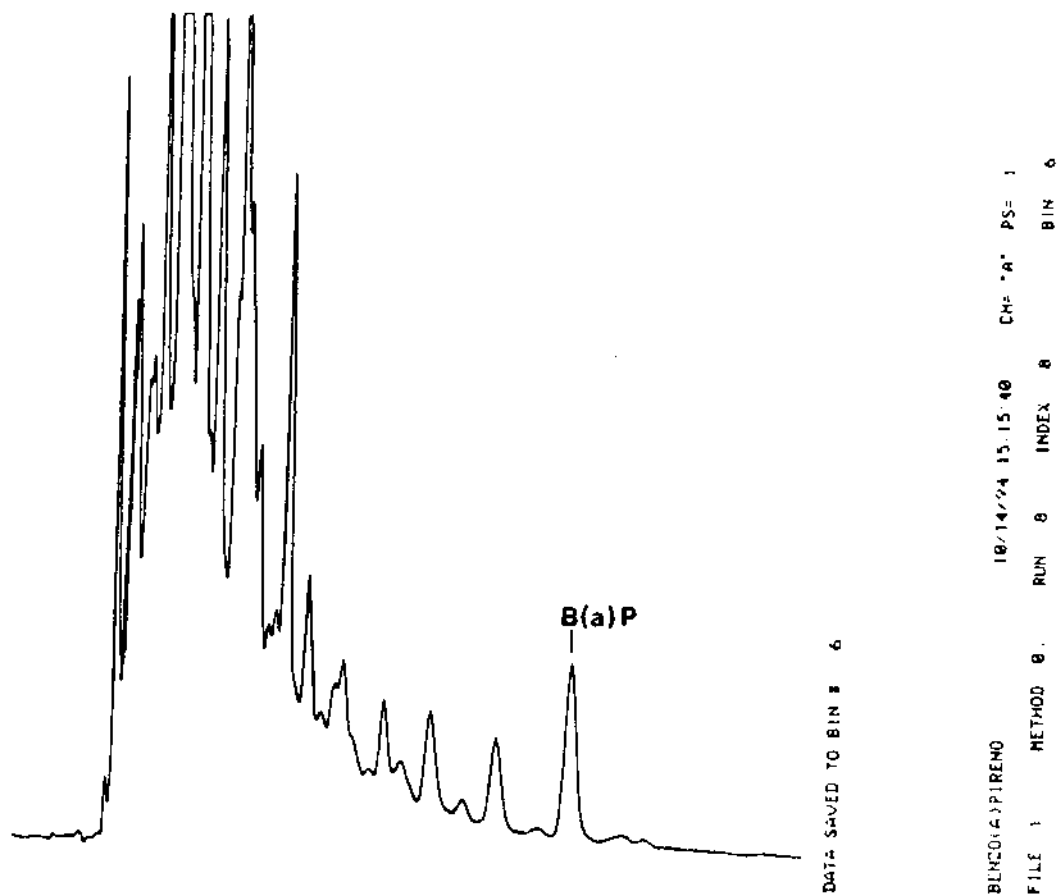
ANEXO 6- Cromatograma de uma amostra de margarina por CLAE e detector UV-VIS/varredura de fotodiodos.



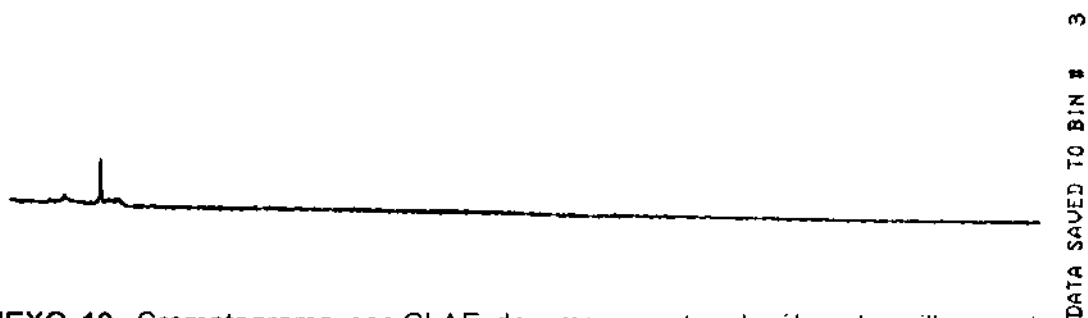
ANEXO 7- Cromatograma de um padrão de benzo(a)pireno por CLAE e detector UV-VIS.



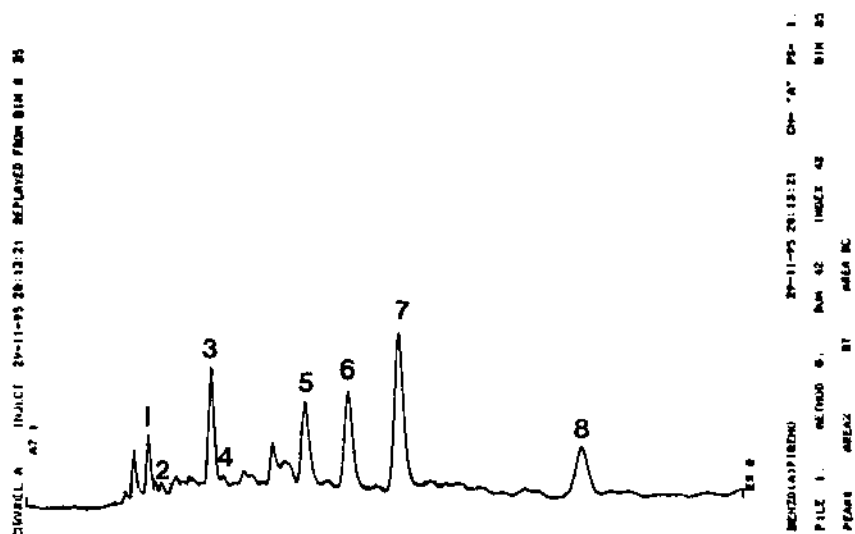
ANEXO 8- Cromatograma de um padrão de benzo(a)pireno por detector UV-VIS/ varredura de fotodiodos.



ANEXO 09- Cromatograma por CLAE de uma amostra de óleo de milho neutralizado. Condições: fase móvel acetonitrila: água (7:3), fluxo 1 ml/ml, detector de fluorescência, coluna C18 (ODS), 25 cm X 4,6 mm d.i., com partículas de 5 µm.



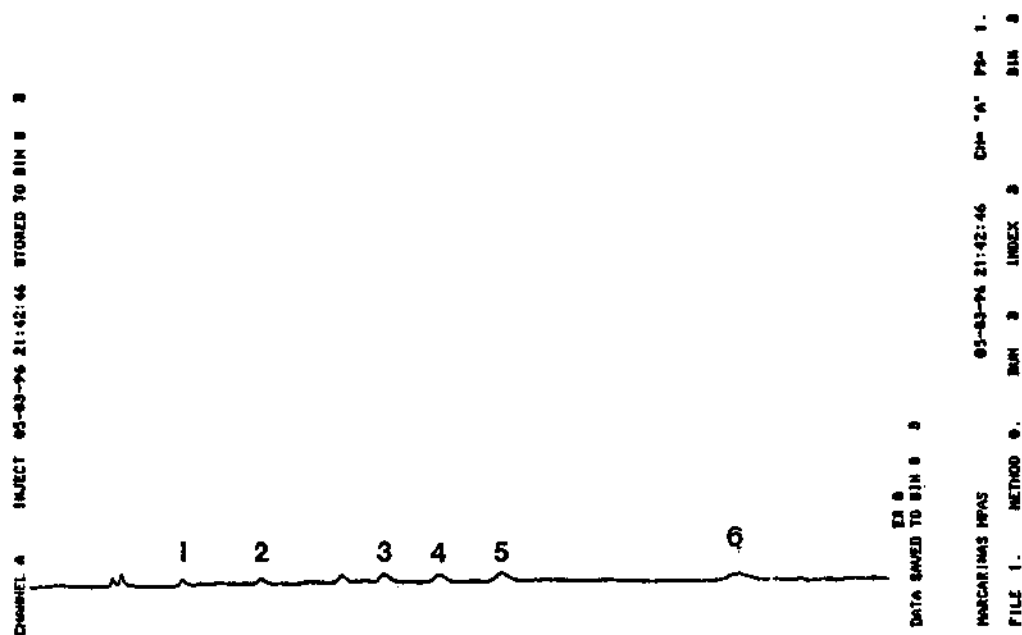
ANEXO 10- Cromatograma por CLAE de uma amostra de óleo de milho neutralizado tratado com carvão ativado. Condições: fase móvel acetonitrila: água (7:3), fluxo 1 ml/ml, detector de fluorescência, coluna C18 (ODS), 25 cm X 4,6 mm d.i., com partículas de 5 µm.



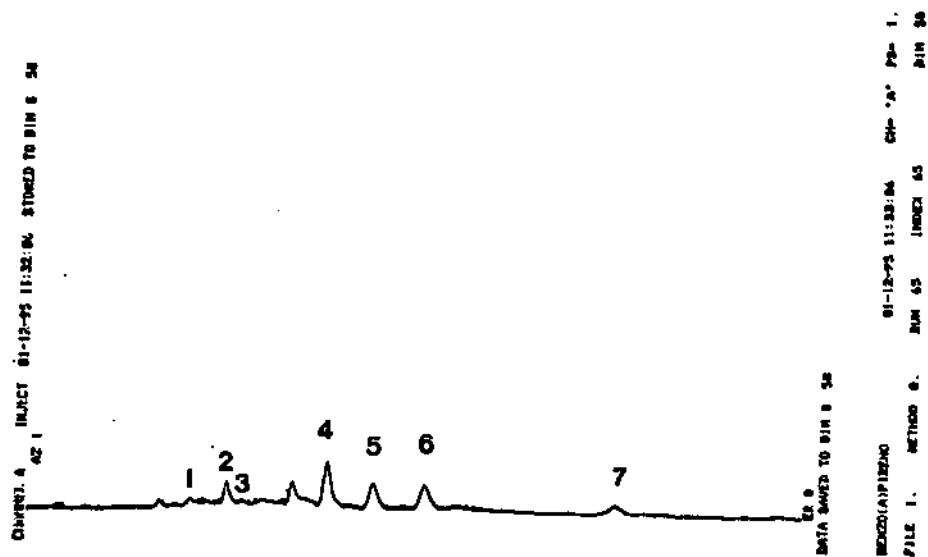
ANEXO 11- Cromatograma por CLAE de uma amostra de margarina. Condições: fase móvel acetonitrila: água (75:25), fluxo 1 ml/ml, detector de fluorescência, coluna C18 (ODS), 25 cm X 4,6 mm d.i., com partículas de 5 µm. Picos: 1=F, 2=P, 3=B(a)P, 4=Cr, 5=B(b)F, 6=B(a)P, 8=B(a,h)A.



ANEXO 12- Cromatograma por CLAE de uma amostra de maionese. Condições: fase móvel acetonitrila: água (75:25), fluxo 1 ml/ml, detector de fluorescência, coluna C18 (ODS), 25 cm X 4,6 mm d.i., com partículas de 5 µm. Picos: 1=F, 2=P, 3=B(a)P, 4=Cr, 5=B(b)F, 6=B(a)P, 8=B(a,h)A.



ANEXO 13- Cromatograma por CLAE de uma amostra de creme vegetal. Condições: fase móvel acetonitrila: água (75:25), fluxo 1 ml/ml, detector de fluorescência, coluna C18 (ODS), 25 cm X 4,6 mm d.i., com partículas de 5 µm. Picos: 1=F, 2=P, 3=B(a)P, 4=Cr, 5=B(b)F, 6=B(a)P, 8=B(a,h)A.



ANEXO 14- Cromatograma por CLAE de uma amostra de halvarina. Condições: fase móvel acetonitrila: água (75:25), fluxo 1 ml/ml, detector de fluorescência, coluna C18 (ODS), 25 cm X 4,6 mm d.i., com partículas de 5 µm. Picos: 1=F, 2=P, 3=B(a)P, 4=Cr, 5=B(b)F, 6=B(a)P, 8=B(a,h)A.



ANEXO 15- Cromatograma por CLAE de uma amostra de gordura vegetal. Condições: fase móvel acetonitrila: água (75:25), fluxo 1 ml/ml, detector de fluorescência, coluna C18 (ODS), 25 cm X 4,6 mm d.i., com partículas de 5 µm. Picos: 1=F, 2=P, 3=B(a)P, 4=Cr, 5=B(b)F, 6=B(a)P, 8=B(a,h)A.