



10º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC2016  
02 a 04 de agosto de 2016 – Campinas, São Paulo  
ISBN 978-85-7029-135-6

## DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DA MIGRAÇÃO ESPECÍFICA DE AMINAS AROMÁTICAS PRIMÁRIAS EM SIMULANTE ÁCIDO

Caroline Kaory Tani **Bueno**<sup>1</sup>; Ananda de Sousa **Ramos**<sup>2</sup>; Mary Ângela Fávaro **Perez**<sup>3</sup>; Marisa **Padula**<sup>4</sup>

Nº 16206

**RESUMO**—*Aminas aromáticas primárias (PAAs) podem estar presentes em embalagens e utensílios plásticos. A migração destas para os alimentos deve ser controlada por serem nocivas à saúde humana. A fim de fiscalizar este risco, o Regulamento Europeu (EU) Nº 10/2011 determina que as embalagens e utensílios plásticos não devem liberar PAAs para os simulantes de alimentos. No Brasil, no entanto, os regulamentos não abordam este assunto. O presente trabalho desenvolveu e validou um método de análise de migração específica de três aminas aromáticas primárias, a benzidina, a 2-naftilamina e a 4-aminobifenil no simulante de alimentos ácidos. Os ensaios foram realizados por UPLC-MS/MS. Na validação, foi verificado que o método é capaz de identificar e distinguir cada um dos analitos, mesmo em baixas concentrações. O limite de detecção encontra-se 10 vezes abaixo do exigido pela legislação, que é de 10 µg/kg. O método apresentou boa linearidade na faixa de 1,0 a 50,0 µg/kg; a precisão (repetitividade) variou de 12 a 23% e a precisão intermediária, de 8 a 20%, sendo que esses valores de precisão encontram-se dentro das faixas esperadas para concentrações próximas a 1,0 µg/kg e concentrações próximas a 10 µg/kg. A exatidão do método variou de 71 a 113%, estando também dentro dos limites estabelecidos. O método foi aplicado à análise de duas amostras de utensílios domésticos de poliamida (concha e espátula), sendo que houve migração das três PAAs estudadas de uma das amostras (concha).*

**Palavras-chaves:** migração, aminas aromáticas primárias, utensílios domésticos

1 Autora, Bolsista CNPq (PIBIC): Graduação em Química Tecnológica, UNICAMP, Campinas-SP; caroltanib@gmail.com.

2 Colaboradora, Bolsista CNPq (PIBIC): Graduação em Química Tecnológica, UNICAMP, Campinas-SP.

3 Coorientadora: Pesquisadora do CETEA (ITAL), Campinas-SP; mary@ital.sp.gov.br.

4 Orientadora: Pesquisadora do CETEA (ITAL), Campinas-SP; mpadula@ital.sp.gov.br.



**ABSTRACT** –Primary aromatic amines (PAAs) could be present in plastic packaging and plastic kitchenware. Their migration to food must be controlled once they are prejudicial to human health. To supervise this risk, the European Regulation (EU) N° 10/2011 determines that plastic packaging and kitchenware mustn't release PAAs to food simulants. Nevertheless, in Brazil, the law doesn't approach the subject. This project developed and tested a specific migration method of three primary aromatic amines, benzidine, 2-naphtylamine and 4-aminobiphenyl to the acid simulant. The tests were made by UPLC-MS/MS. On validation, the method was verified to be able to identify and to differentiate each analyte, even at low concentrations. The detection limit is 10 times lower than the legislation demand, which is 10 µg/kg. The method has a good linearity in the range 1.0 to 5.0 µg/kg; the method's precision varied from 12 to 23% and the intermediate precision, from 8 to 20%. These values are between the established limits for concentrations close to 1.0 µg/kg and concentrations close to 10 µg/kg. The method's accuracy varied from 71 to 113%, also within the limits. The method was applied to analyze two polyamide utensils samples (ladle and spatula). One of them released the three PAAs studied (ladle).

**Keywords:** migration, primary aromatic amines, kitchenware

## 1 INTRODUÇÃO

Na cadeia produtiva, a embalagem é responsável por garantir a qualidade do produto durante sua distribuição, comercialização e consumo. Em embalagens para alimentos, deve ser evitado o fenômeno de migração, no qual as substâncias utilizadas na produção, tais como monômeros e aditivos, são transferidas do material para o alimento (SARANTÓPOULOS et al., 2002). A preocupação se deve ao fato de que estas substâncias podem ser nocivas à saúde humana. Dentre estas substâncias, estão as aminas aromáticas primárias (PAAs). Diversas dessas aminas apresentam efeitos genotóxicos, carcinogênicos e alergênicos (TRIER et al., 2010).

A migração de aminas aromáticas primárias para os alimentos pode ocorrer através de filmes plásticos multicamadas ou de utensílios de cozinha coloridos, feitos de poliamida, como conchas, espátulas e pinças. Nos filmes, quando o tempo de cura do adesivo poliuretano não é respeitado, resíduos de diisocianatos podem reagir com a água, formando PAAs. Além disso, as PAAs são utilizadas como iniciadoras nas formulações de corantes azos, o que torna os utensílios pigmentados uma fonte de migração (LAMBERTINI et al., 2014).



**10º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC2016**  
**02 a 04 de agosto de 2016 – Campinas, São Paulo**  
**ISBN 978-85-7029-135-6**

Devido ao efeito prejudicial das aminas aromáticas primárias à saúde humana, o Regulamento Europeu (UE) nº 10/11 determina que materiais e objetos de plástico para contato com alimentos não devem liberá-las para os simulantes de alimentos, sendo que o limite de detecção da soma das PAAs liberadas deve ser de 10 µg/kg de alimento ou simulante (COMISSÃO DAS COMUNIDADES EUROPEIA, 2011). No Brasil, não há legislação que contemple a migração de aminas aromáticas primárias.

Assim, o objetivo do projeto foi validar um método de ensaio da migração específica de três aminas aromáticas primárias (benzidina, 2-naftilamina e 4-aminobifenil) em simulantes de alimentos ácidos. Na validação do método, foi utilizado o documento orientativo do INMETRO DOQ-CGCRE-008 (orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos) (INMETRO, 2011). Foram avaliados os parâmetros abaixo.

A seletividade indica a capacidade do método de distinguir analitos e contaminantes. A linearidade mede se as respostas produzidas pelo equipamento são proporcionais à concentração do analito. O limite de detecção é a menor concentração detectável do analito, enquanto o limite de quantificação é a menor concentração que pode ser determinada com exatidão. A precisão (repetitividade), por sua vez, avalia a dispersão de resultados entre ensaios repetidos e a precisão intermediária é a repetitividade avaliada variando-se uma ou mais condições. A exatidão, medida pelo ensaio de recuperação, verifica se os valores obtidos pelo método são próximos dos valores esperados (INMETRO, 2011).

Após desenvolver e validar o método, foram feitos ensaios com duas amostras de utensílios domésticos (espátulas e conchas), ambas de poliamida.

## **2 MATERIAIS E MÉTODOS**

O método utilizado baseou-se no método da *European Commission (Technical guidelines on testing the migration of primary aromatic amines from polyamide kitchenware and of formaldehyde from melamine kitchenware)* (SIMONEAU, 2011).

Foram utilizados padrões de benzidina, 2-naftilamina e de 4-aminobifenil, todos com pureza  $\geq 98,0\%$  (Sigma Aldrich). Além disso, utilizou-se metanol grau HPLC (Merck), água ultrapurificada (Milli-Q) e ácido acético glacial p.a, pureza de 100% (Merck).

Os ensaios foram realizados em um cromatógrafo líquido de ultra eficiência com detecção por espectrometria de massa/espectrometria de massa (*UPLC-MS/MS*), ACQUITY UPLC System Xevo TQD, da Waters.



**10º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC2016**  
**02 a 04 de agosto de 2016 – Campinas, São Paulo**  
**ISBN 978-85-7029-135-6**

Utilizou-se a coluna cromatográfica ACQUITY UPLC BEH C18, de 50 mm de comprimento x 2.1 mm de diâmetro interno (partículas de 1.7  $\mu\text{m}$ ), a 30°C. A fase móvel foi de 45% água acidificada com ácido acético (0,1% v/v) / 55% metanol grau HPLC, com fluxo isocrático a 0,15 mL/min.

A fonte de ionização do espectrômetro de massas é o *electrospray*, que foi operado no modo positivo, a 150°C. A voltagem do capilar foi de 2 kV. A temperatura e fluxo do gás de dessolvatação (nitrogênio) eram de 500 °C e 450 L/Hr. O gás de colisão usado foi o argônio (pressão de  $3,18 \times 10^{-3}$  mbar).

Os íons monitorados encontram-se na Tabela 1:

**Tabela 1.** Condições selecionadas para os compostos em SRM (*Selected Reaction Monitoring*).

Composto	Tempo de retenção (min)	Íon precursor (m/z)	Íon produto (m/z)	Dwell time (s)	Cone (V)	Colisão (V)
2-naftilamina	1.8	144.0	77.0	0.250	40	32
			117.0	0.250	40	18
4-aminobifenil	2.7	170.0	96.6	0.250	40	26
			143.0	0.250	40	18
Benzidina	1.0	185.0	92.9	0.250	40	20
			151.1	0.250	40	24

Para a quantificação de cada composto, foram utilizadas as seguintes transições de massas (m/z): 185,0 > 92,9 para a benzidina, 144,0 > 117,0 para a 2-naftilamina e 170,0 > 143,0 para a 4-aminobifenil.

## 2.1 Validação do método

### 2.1.1 Linearidade e seletividade

Na avaliação da linearidade, construiu-se uma curva de calibração de 1,0 a 50,0  $\mu\text{g}/\text{kg}$  das três aminas (benzidina, 2-naftilamina e 4-aminobifenil), em simulante ácido de alimentos (solução aquosa de ácido acético 3% m/v). Verificou-se a equação da reta e o coeficiente de determinação ( $R^2$ ) obtido através da curva de cada composto (INMETRO, 2011).



Para determinar se o método é seletivo, foi analisado o cromatograma de íons totais (TIC) de uma solução contendo os três padrões das aminas aromáticas primárias. Assim, foi verificado se as transições de massas moleculares das aminas se diferiam uma da outra.

### **2.1.2 Limite de Detecção (LD) e de Quantificação (LQ)**

Foram preparadas sete soluções com concentração de 1,1 µg/kg de cada amina em simulante ácido acético 3% m/v, que foram injetadas em duplicata. Suas concentrações foram quantificadas, utilizando-se a curva de calibração. A média (X) e o desvio padrão (DP) das concentrações foram calculados e a partir destes foram determinados os limites de detecção (Equação 1) e de quantificação (Equação 2) (INMETRO, 2011).

A Equação 3 foi necessária para se determinar o número de graus de liberdade do procedimento, para então definir-se o valor de t de *Student* (INMETRO, 2011).

$$LD = t \times DP \quad (1)$$

$$LQ = X + (5 \times DP) \quad (2)$$

$$\text{graus de liberdade} = n - 1 \quad (3)$$

Por utilizar sete replicatas, o grau de liberdade é seis e, conseqüentemente, o valor de t é 3,143.

### **2.1.3 Precisão**

Para avaliar a precisão do método, utilizaram-se três concentrações diferentes, 2,0, 15,0 e 30,0 µg/kg de cada amina, sendo que para cada concentração foram preparadas sete soluções. As vinte e uma soluções foram injetadas em duplicata no UPLC-MS/MS. Para avaliar a precisão intermediária, as soluções acima foram injetadas no equipamento em três dias diferentes (INMETRO, 2011).

Foram calculados as médias e desvios padrões para cada concentração e então a precisão, expressa pelo coeficiente de variação (CV%), foi calculada pela Equação 4 (INMETRO, 2011):

$$CV = \left( \frac{\text{desvio padrão}}{\text{concentração média}} \right) \times 100 \quad (4)$$

Do mesmo modo foi calculada a precisão intermediária, usando a média e o desvio padrão dos três dias de injeção (INMETRO, 2011).



#### **2.1.4 Exatidão**

O ensaio de recuperação foi utilizado para avaliar a exatidão do método. Foram preparadas três soluções de três concentrações diferentes, as mesmas utilizadas na precisão. As nove soluções foram levadas ao acondicionamento em estufa, a 100°C/2 horas. Esta condição de temperatura e tempo reproduz o contato de amostras de utensílios domésticos com o simulante (SIMONEAU, 2011).

A recuperação (%) foi calculada através da Equação 5, comparando as concentrações obtidas após o acondicionamento com as concentrações esperadas (2,0, 15,0 e 30,0 µg/kg) (INMETRO, 2011).

$$Rec = \frac{\text{concentração obtida}}{\text{concentração esperada}} \times 100 \quad (5)$$

#### **2.2 Análise de amostras**

Após a validação do método, foram analisadas duas amostras de utensílios domésticos de poliamida – uma concha preta e uma espátula amarela. Foram analisadas três unidades de cada amostra (triplicata).

Primeiramente, cada corpo de prova foi submerso em simulante ácido acético 3% m/v. Os cabos dos utensílios não foram submergidos, pois não entrariam em contato com os alimentos no uso real. As amostras em contato foram então levadas à estufa, a 100°C / 2 horas. Este contato foi repetido por três dias consecutivos, trocando-se o simulante a cada dia, porém mantendo-se a mesma amostra. O simulante de cada dia foi analisado separadamente.

Este contato foi baseado no *Technical guidelines on testing the migration of primary aromatic amines from polyamide kitchenware and of formaldehyde from melamine kitchenware* e simula o uso repetido dos utensílios domésticos (SIMONEAU, 2011).

### **3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **3.1 Validação do método**

##### **3.1.1 Linearidade**

O parâmetro da linearidade foi avaliado através da curva de calibração. As equações das retas de cada amina aromática primária são mostradas abaixo na Tabela 2.



**Tabela 2.** Equações da reta e  $R^2$  da curva de calibração para cada amina.

Amina	Equação da reta	Coefficiente de determinação ( $R^2$ )
<b>Benzidina</b>	$Y = 246,426 x - 81,0138$	0,997
<b>2-naftilamina</b>	$Y = 995,353 x - 104,838$	0,998
<b>4-aminobifenil</b>	$Y = 469,204 x - 10,0733$	0,999

O coeficiente de determinação ( $R^2$ ) indica a adequação da reta ao modelo matemático, sendo mais adequada quando se aproxima de  $R^2 = 1,000$ . Assim, a linearidade do método foi comprovada, uma vez que o coeficiente de determinação das três aminas é maior que 0,99.

### 3.1.2 Limite de Detecção (LD) e de Quantificação (LQ)

Os valores de LDs e LQs obtidos são mostrados na Tabela 3.

**Tabela 3.** Valores de LD e LQ obtidos para cada amina.

Amina	LD ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	LQ ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
<b>Benzidina</b>	0,33	1,68
<b>2-naftilamina</b>	0,20	1,38
<b>4-aminobifenil</b>	0,28	1,49

Segundo o Regulamento (EU) nº 10/2011 de 14 de janeiro de 2011, o método deve apresentar limite de detecção de 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  da soma das aminas aromáticas primárias. Porém, não há limite de quantificação definido no regulamento (COMISSÃO DAS COMUNIDADES EUROPEIA, 2011).

### 3.1.3 Seletividade

A Figura 1 a seguir apresenta o cromatograma de íons totais (TIC) de uma solução contendo as três aminas aromáticas primárias. (a) e (b) representam as faixas de transição da benzidina, enquanto (c) e (d) representam a 4-aminobifenil e (e) e (f), a 2-naftilamina. O cromatograma das três aminas juntas é mostrado em (g).



5.0 ug/Kg

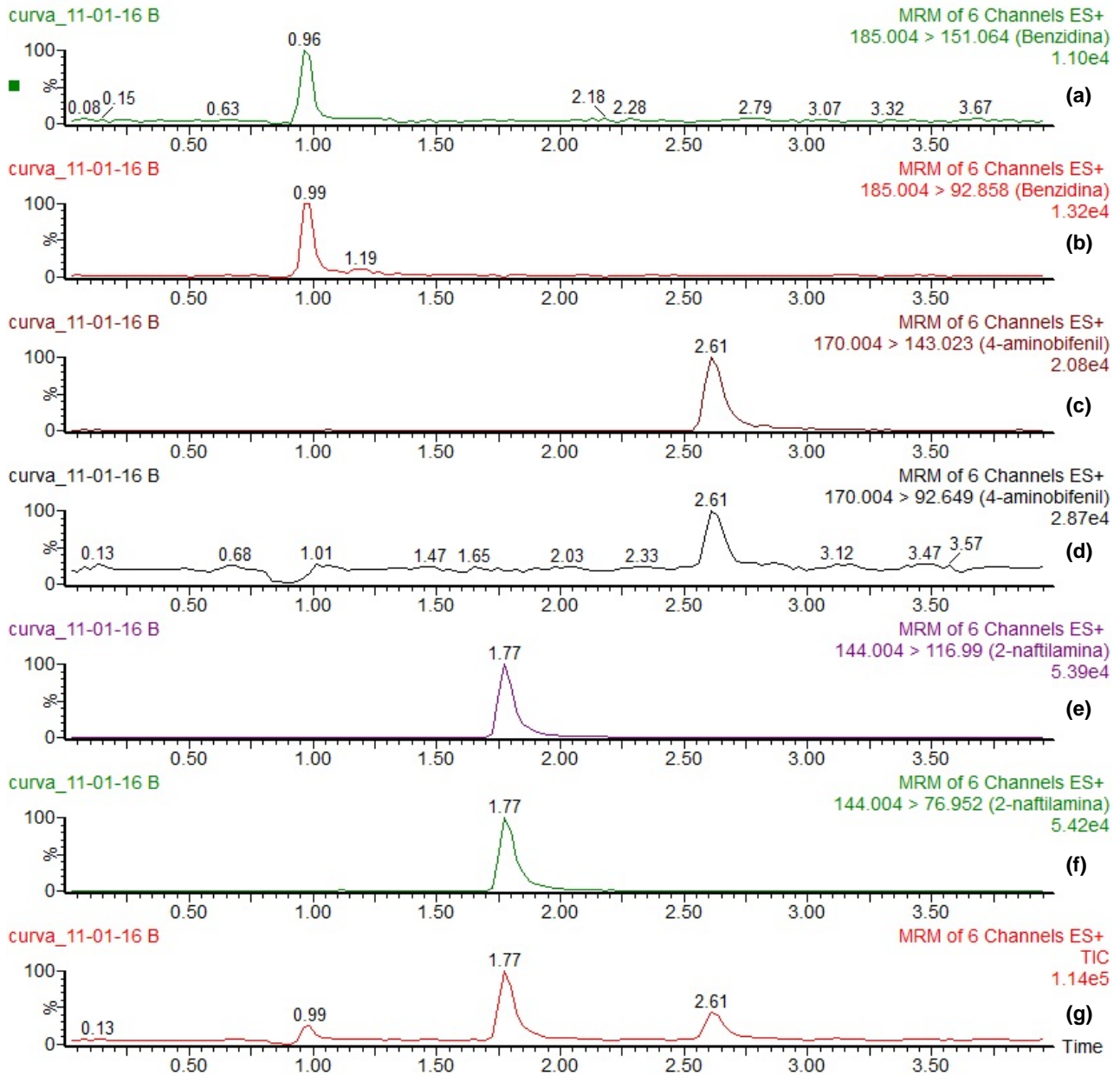


Figura 1. Cromatograma de íons totais.

Analisando o TIC, é possível verificar que cada amina forma um íon precursor com massa molecular diferente das demais e o mesmo acontece com os íons produto. Pode-se notar também que o equipamento é capaz de diferir e identificar cada composto, comprovando-se assim a seletividade do método.





#### **3.1.4 Precisão**

Na realização do ensaio, foram usados como referência os limites estabelecidos por Huber: para concentrações próximas a 1,0 µg/kg, o coeficiente de variação não deve ultrapassar 30% e para concentrações próximas de 10 µg/kg, não deve ser maior que 21% (HUBER, 2016).

Com os dados obtidos no primeiro dia de injeção das soluções, foi calculada a precisão (repetitividade) do método para cada amina. A precisão intermediária foi calculada utilizando-se injeções dos três dias.

Na repetitividade, o maior coeficiente de variação da benzidina foi de 23,0%, da 2-naftilamina foi de 13,5% e da 4-aminobifenil, de 11,6%, todas para a concentração de 2,0 µg/kg. Para as demais concentrações (como 15,0 e 30,0 µg/kg), os valores de coeficiente de variação obtidos também se encontram dentro do limite.

Na precisão intermediária da concentração de 2,0 µg/kg, foram obtidos os coeficientes de variação de: 19,7% para a benzidina, 9,6% para a 2-naftilamina e 7,8% para a 4-aminobifenil. Para 15,0 µg/kg, a benzidina variou em 6,6%, a 2-naftilamina em 2,6% e a 4-aminobifenil, em 3,2%. As soluções de 30,0 µg/kg apresentaram variação de 10,9% para a benzidina, 3,2% para a 2-naftilamina e 3,6% para a 4-aminobifenil.

Portanto, o método mostrou-se preciso, uma vez que as variações nos resultados, tanto na repetitividade quanto na precisão intermediária, mostraram-se dentro dos limites estabelecidos para cada concentração.

#### **3.1.5 Exatidão**

A recuperação de concentrações próximas a 1,0 µg/kg deve estar entre 40% e 120% da concentração nominal, isso se aplica à concentração de 2,0 µg/kg. Em concentrações próximas a 10 µg/kg (como 15,0 e 30,0 µg/kg), o intervalo é de 60% a 115% (HUBER, 2016).

Assim, o método está aprovado no critério da exatidão, pois todos os resultados estiveram dentro dos limites, já que a menor porcentagem obtida foi de 71% (2-naftilamina, 2 µg/kg) e a maior, de 113% (4-aminobifenil, 15 µg/kg).

### **3.2 Ensaio com amostras**

Na análise das espátulas amarelas, não foi detectada migração de nenhuma das três aminas aromáticas primárias analisadas.



As conchas pretas, contudo, liberaram as três aminas para o simulante, em níveis acima do limite de detecção, nos três dias de contato. As Figuras 2a e 2b são exemplos de SRM da 4-aminobifenil e da benzidina, respectivamente, obtidos nos simulantes ácido acético 3% m/v que entraram em contato com a amostra.

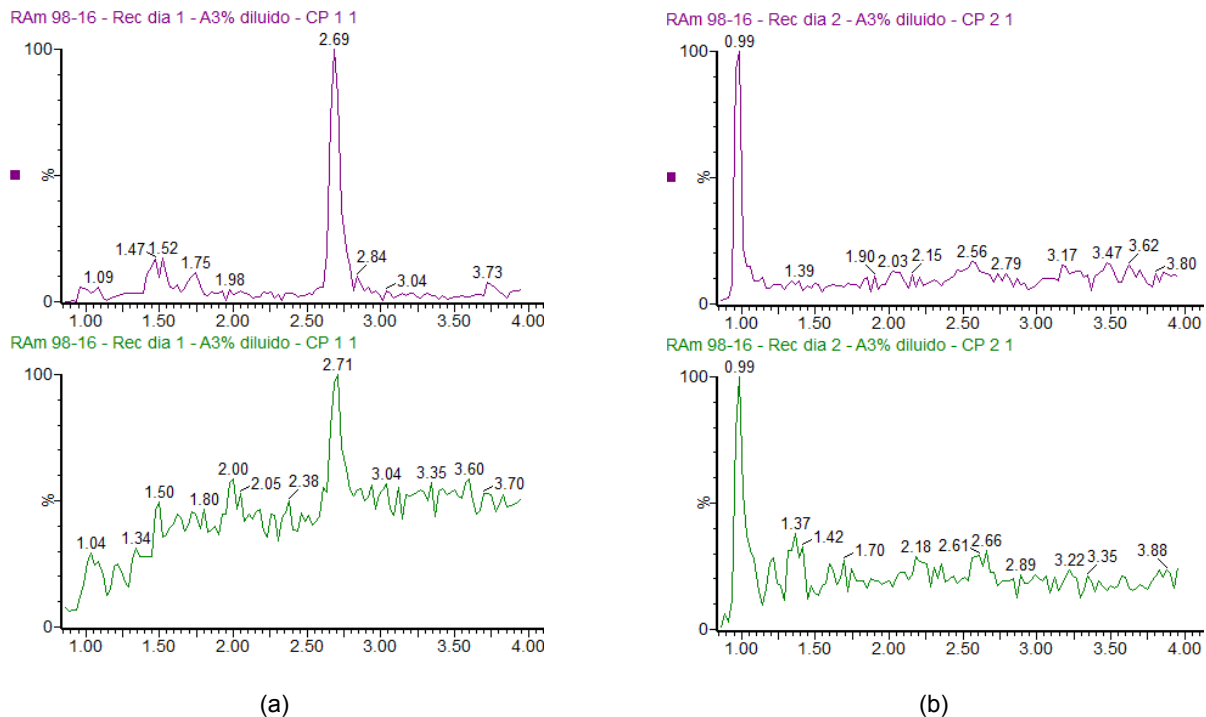


Figura 2. SRM da migração de 4-aminobifenil (a) e de benzidina (b).

A 2-naftilamina foi a substância migrada em menor quantidade. Ela foi detectada nos três dias, porém não foi possível quantificá-la com precisão, pois sua concentração estava abaixo do limite de quantificação do composto (1,38 µg/kg). O mesmo ocorreu com a 4-aminobifenil, cuja concentração estava abaixo do LQ (1,49 µg/kg).

A benzidina estava presente no primeiro dia com concentração de  $2,92 \pm 1,05$  µg/kg. No segundo e no terceiro dia estava abaixo de 1,68 µg/kg (LQ). O valor de migração encontrado para a benzidina encontra-se dentro do limite permitido pelo Regulamento Europeu nº 10/11 que é de 10 µg/kg (limite de detecção para a soma das aminas aromáticas primárias).

Foi percebido que a concentração de aminas migradas para o simulante diminuiu de um dia para o outro. Em geral, as embalagens costumam liberar mais substâncias no primeiro dia de contato.



Além disso, alguns corpos de prova liberaram maior quantidade de PAAs que outros, como por exemplo, a migração da benzidina no primeiro dia de contato. O primeiro corpo de prova liberou 3,3 µg/kg para o simulante, enquanto o segundo liberou 1,51 µg/kg e o terceiro, 3,95 µg/kg. Isso pode ter sido causado por diferenças na fabricação dos utensílios, uma vez que não se sabe se os três corpos de prova eram do mesmo lote ou se a matéria-prima utilizada era proveniente do mesmo fornecedor.

#### **4 CONCLUSÃO**

Na validação foi comprovado que o método é seletivo, por ser capaz de identificar e distinguir as três aminas, benzidina, 2-naftilamina e 4-aminobifenil, através das massas moleculares de seus íons precursores e íons produto. Além disso, apresentou adequada linearidade para todos os analitos, com coeficiente de determinação ( $R^2$ ) de cada curva próximo a 1,0. Os limites de detecção determinados para cada amina estão entre 0,20 e 0,33 µg/kg, atendendo ao requisito do Regulamento (UE) N° 10/2011, de que o LD deve ser de 10 µg/kg para a soma das aminas aromáticas primárias. Os limites de quantificação também foram determinados, estando entre 1,38 µg/kg e 1,68 µg/kg.

A maior variação obtida na repetitividade foi de 23,0% e para a precisão intermediária, 19,7%, ambas para a benzidina em 2,0 µg/kg. Assim, os resultados encontram-se abaixo dos limites utilizados como parâmetro.

A exatidão apresentou resultados entre 71% e 113%, ou seja, dentro do limite de 60% a 115% das concentrações nominais. Portanto, é possível afirmar que não houve perda significativa das aminas aromáticas primárias durante o condicionamento na estufa.

Das amostras analisadas, não houve migração de nenhuma das PAAs das espátulas amarelas para o simulante ácido. As conchas pretas, por sua vez, apresentaram migração das três aminas nos três dias de contato, sendo que a maior migração foi da benzidina e a menor, da 2-naftilamina.

Assim, é possível concluir que o método desenvolvido é adequado ao uso, pois atendeu a todos os requisitos da validação. Além disso, a análise das amostras mostrou que alguns utensílios disponíveis no mercado podem expor a população às PAAs, sendo assim necessário que a legislação brasileira contemple tais substâncias, criando limites de migração para elas.



**10º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC2016**  
**02 a 04 de agosto de 2016 – Campinas, São Paulo**  
**ISBN 978-85-7029-135-6**

## **5 AGRADECIMENTOS**

Agradeço ao CNPq pela bolsa concedida a mim durante a realização do projeto. Agradeço também ao CETEA e ao ITAL pela oportunidade de conhecer a área da pesquisa.

## **6 REFERÊNCIAS**

COMISSÃO DAS COMUNIDADES EUROPEIAS. Regulamento (UE) N° 10/2011, de 14 de Janeiro de 2011. Relativo aos materiais e objetos de matéria plástica destinados a entrar em contacto com os alimentos. **Jornal Oficial da União Europeia**, Bruxelas, L 12, 15 Jan. 2011. 89 p.

HUBER. Ludwig: Validation of analytical methods and procedures. Available in: [http://www.labcompliance.com/tutorial/methods/default.aspx?sm=d\\_d#08\\_paramters](http://www.labcompliance.com/tutorial/methods/default.aspx?sm=d_d#08_paramters). Access in: Jan. 25, 2016.

INMETRO. Coordenação Geral de Acreditação. DOQ-CGCRE-008: orientação sobre validação de métodos analíticos. Rio de Janeiro, jul. 2011. 19 p. Revisão n° 04.

LAMBERTINI, F.; Di LALLO, V.; CATELLANI, D.; MATTAROZZI, M.; CARERI M.; SUMAN, M. Reliable liquid chromatography-mass spectrometry method for investigation of primary aromatic amines migration from food packaging and during industrial curing of multilayer plastic laminates. **Journal Mass Spectrometry**, v. 49, n. 9, p. 870-877, 2014.

SARANTÓPOULOS, C. I. G. L. et al. **Embalagens plásticas flexíveis**: principais polímeros e avaliação de propriedades. Campinas: CETEA/ITAL, 2002. 267 p.

SIMONEAU, C. Technical guidelines on testing the migration of primary aromatic amines from polyamide kitchenware and of formaldehyde from melamine kitchenware. Luxembourg: **European Commission**, 2011. (EUR24815EN).

TRIER, X.; OKHOLM, B.; FOVERSKO, V. A.; BINDERUP, M. L., PETERSEN, J. H. Primary aromatic amines (PAAs) in black nylon and other food-contact materials, 2004 - 2009. **Food Additives and Contaminants - Part A**, v. 27, n. 9, p. 1325–1335, 2010.