



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

AVALIAÇÃO DA OCORRÊNCIA DE HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS EM MARGARINA

Caroline **Abballe**¹; Fernanda M.L. **Gomes**²; Diogo R.D. **Molle**³; Regina P.Z. **Furlani**⁴; Sílvia A.V. **Tfouni**⁵

Nº 16216

RESUMO– Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) são um grupo de compostos considerados contaminantes de alimentos, sendo que 13 desses são considerados carcinogênicos e genotóxicos pelo JECFA. Um dos alimentos onde os HPAs podem estar presentes é a margarina, sendo que a fonte dessa contaminação pode ser a utilização, na composição do produto, de óleo vegetal contaminado com HPAs, uma vez que estudos anteriores já demonstraram o potencial de contaminação desses óleos por esses compostos. Sendo assim, foram avaliados teores de 13 HPAs em amostras de margarinas comumente encontradas no supermercado. A metodologia de análise utilizada envolveu extração líquido-líquido, limpeza em cartucho de extração em fase sólida e determinação por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência. O método se mostrou adequado, com valores médios de recuperação compreendidos entre 53% e 117% e limites de detecção de 0,1 µg/kg a 2,68 µg/kg e limites de quantificação de 0,3 µg/kg a 3,0 µg/kg. Entre as amostras analisadas os níveis encontrados variaram de 2,72 µg/kg a 10,60 µg/kg para a soma dos 13 HPAs, os níveis de HPA4 variaram de 2,41 µg/kg a 9,46 µg/kg e o benzo(a)pireno ficou entre 0,55 µg/kg e 3,02 µg/kg. Duas marcas apresentaram níveis de benzo(a)pireno acima do limite permitido para óleos e gorduras pela Comissão da Comunidade Europeia (2,0 µg/kg). Com base nestes resultados, o controle da presença de HPAs em óleos vegetais é altamente recomendado.

Palavras-chaves: margarina, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, HPLC-FLD.

1 Autor, Bolsista CNPq (PIBIC): Graduação em Engenharia de Alimentos, Faculdade de Jaguariúna - FAJ, Jaguariúna-SP. caroline_abballe@hotmail.com

2 Colaboradora: Técnico de Apoio a Pesquisa, CCQA/ITAL, Campinas-SP.

3 Colaborador: Mestrando, CCQA/ITAL, Campinas-SP.

4 Colaboradora: Pesquisadora, CCQA/ITAL, Campinas-SP.

5 Orientadora: Pesquisadora, CCQA/ITAL, Campinas-SP. tfouni@ital.sp.gov.br



ABSTRACT – *Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are a group of compounds considered as food contaminants and 13 of them are considered carcinogenic and genotoxic by JECFA. One food product where they might be present is margarine, since vegetable oils used in its composition may be contaminated by PAHs as previous studies have shown. Therefore, levels of 13 PAHs were determined in margarine samples collected from the supermarket. Analytical method involved liquid-liquid extraction, clean-up by SPE and detection by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. Method was shown to be adequate, with recovery rates between 53% and 117% and detection limits from 0.1 µg/kg to 2.68 µg/kg and quantification limits from 0.3 µg/kg to 3.0 µg/kg. Among analyzed samples, levels ranged from 2.72 µg/kg to 10.60 µg/kg for the sum of 13 PAHs. For PAH4 and benzo(a)pyrene levels were from 2.41 µg/kg to 9.46 µg/kg and 0.55 µg/kg to 3.02 µg/kg, respectively. Two brands presented benzo(a)pyrene above maximum permitted by European regulation (2.0 µg/kg). In view of these results, the control of PAHs presence in vegetable oils is highly recommended.*

Keywords: margarine, polycyclic aromatic hydrocarbons, HPLC-FLD.

1 INTRODUÇÃO

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos constituem uma ampla classe de compostos com potencial carcinogênico. A formação desses compostos se dá a partir da queima incompleta de material orgânico, podendo ser formados durante o processamento de alimentos em processos envolvendo defumação, torrefação, secagem e alguns tipos de cozimento (WHO, 1998). A contaminação de alimentos por HPAs deve-se principalmente à poluição do ar e da água, à sua presença em solos terrestres e marinhos e à sua formação durante o processamento dos alimentos (CAMARGO *et al.*, 2011a; CAMARGO; TOLEDO, 2003; TFOUNI *et al.*, 2013; VIEIRA *et al.*, 2010).

A importância dos estudos sobre a contaminação de alimentos por HPAs deve-se ao fato destes possuírem um elevado potencial genotóxico (ação nociva que afeta a integridade do material genético) e poderem ser mutagênicos e/ou carcinogênicos, sendo capazes de causar uma mutação genética, alteração da molécula de DNA que não é reparada durante a divisão celular, contribuindo para o desenvolvimento de tumores (RIBEIRO *et al.*, 2003). O Comitê Conjunto FAO/OMS de Peritos em Aditivos Alimentares (JECFA) durante a 64ª reunião do grupo classificou 13 HPAs como carcinogênicos e genotóxicos: benzo(a)antraceno, benzo(b)fluoranteno,



benzo(j)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, criseno, dibenzo(ah)antraceno, dibenzo(ae)pireno, dibenzo(ah)pireno, dibenzo(ai)pireno, dibenzo(al)pireno, indeno (1,2,3 cd-pireno) e 5-metilcriseno (JECFA, 2005).

A Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA), adotou, em 9 de junho de 2008, um posicionamento sobre os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, em que o benzo(a)pireno não é considerado um marcador adequado para a ocorrência de HPAs nos alimentos e que um conjunto de quatro compostos (HPA4: benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno e benzo(a)pireno) representaria a contaminação de forma mais adequada (EFSA, 2008).

A margarina é um alimento que frequentemente faz parte da dieta da população, principalmente empregada no processo industrial, na cozinha e na mesa dos consumidores (GIOIELLI, 1996). Estudos anteriores demonstram o potencial de contaminação dos óleos vegetais por HPAs, sendo que a principal fonte de contaminação foi identificada como sendo a etapa de secagem dos grãos (CAMARGO *et al.*, 2012). Essa contaminação pode resultar na presença desses compostos em margarinas, uma vez que os óleos vegetais são um dos ingredientes utilizados em sua fabricação.

Sendo assim, o objetivo do presente estudo foi validar uma metodologia analítica para determinação de 13 HPAs em margarina, bem como analisar amostras de diferentes marcas e lotes em relação à presença dos mesmos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Amostras

Foram coletadas, em supermercados da região de Campinas-SP, amostras de seis diferentes marcas de margarina, sendo 2 lotes de cada, totalizando 12 amostras, sendo analisadas em duplicata quanto à presença de 13 HPAs: benzo(a)antraceno (BaA), criseno (Chr), 5-metilcriseno (5MChr), benzo(j)fluoranteno (BjF), benzo(b)fluoranteno (BbF), benzo(k)fluoranteno (BkF), benzo(a)pireno (BaP), dibenzo(al)pireno (DalP), dibenzo(ah)antraceno (DahA), indeno(1,2,3-cd)pireno (Indeno), dibenzo(ae)pireno (DaeP), dibenzo(ai)pireno (DaiP), dibenzo(ah)pireno (DahP).

2.2. Extração e limpeza

A metodologia utilizada foi baseada naquela empregada por Camargo *et al.* (2011b) que envolve a dissolução da matriz em hexano, extração com solução de dimetilformamida-água (9:1, v/v) e a limpeza em cartuchos de extração em fase sólida (C18).



2.3. Determinação cromatográfica

A técnica empregada foi a cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência (HPLC-FDL), sendo que para a separação dos compostos foram utilizadas uma coluna C18 e um gradiente de fase móvel composto por acetonitrila-água a um fluxo de 1 mL/min, e volume de injeção de 30 µL. A detecção foi feita através de uma programação de comprimentos de onda de excitação e emissão. Os compostos foram quantificados pelo método de padronização externa.

2.4. Validação da metodologia analítica

A validação da metodologia foi realizada de acordo com as orientações do INMETRO (2011), sendo avaliados os parâmetros: linearidade das curvas analíticas, exatidão, precisão (repetibilidade) e precisão intermediária através de teste de recuperação, limites de detecção e quantificação.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A linearidade foi avaliada pelos coeficientes de correlação linear das curvas analíticas construídas com sete soluções padrão de diferentes concentrações (0,30 µg/L a 20 µg/L), injetadas em triplicata. As curvas de calibração se mostraram lineares, sendo que os coeficientes de correlação linear (r) variaram de 0.9933 a 0.9998.

Os limites de detecção (LOD) foram determinados a partir dos desvios padrão de sete análises independentes de uma amostra de margarina, fortificada com HPAs no nível de 1,0 µg/kg. LODs obtidos variaram de 0,1 µg/kg a 0,3 µg/kg, entretanto, os compostos BjF e Indeno apresentaram valores mais altos de LOD (2,68 µg/kg e 2,27 µg/kg) indicando que o método apresentou baixa sensibilidade para estes compostos. O limite de quantificação (LOQ) foi estabelecido como o menor nível utilizado na curva de calibração, ou seja, 0,3 µg/kg (sendo 3,0 µg/kg para o BjF e Indeno). Os resultados mostram que o método proposto atende aos critérios da União Europeia para análise de BaP, onde o LOD e LOQ devem ser menores que 0,3 µg/kg e 0,9 µg/kg respectivamente (CEC, 2007).

A exatidão, repetibilidade e precisão intermediária da metodologia analítica foram avaliadas através de experimentos de recuperação. Para estes experimentos utilizou-se uma amostra branca de margarina fortificada com soluções padrão de HPAs em níveis de 1,0; 2,0 e 5,0 µg/kg, essas análises foram feitas em cinco replicatas. As recuperações médias ficaram entre 53% e 117%. Deste modo, a metodologia adotada atende aos critérios de desempenho propostos pela União



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

Europeia para análise de BaP em alimentos, onde a recuperação deve estar situada na faixa de 50 a 120% (CEC, 2007). A precisão (repetibilidade) do método foi avaliada pelo coeficiente de variação (CV) associado às medidas de cada HPA durante os testes de recuperação. Os resultados obtidos variaram de 1% a 29%. A precisão intermediária foi avaliada através do coeficiente de variação obtido nos testes de recuperação realizados em dias distintos, tendo variado de 6% a 17%. Esses resultados podem ser considerados satisfatórios para análise de compostos presentes em nível de $\mu\text{g}/\text{kg}$ (HORWITZ, 2006).

A tabela 1 apresenta os resultados obtidos para a análise de 13 HPAs em amostras de margarina. Como pode ser observado, os resultados para a somatória dos 13 HPAs variou de 2,72 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (marca E, lote 2) a 10,60 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (marca F, lote 2), para HPA4 variou de 2,41 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (marca E, lote 1) a 9,46 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (marca F, lote 2) e para o BaP ficou entre 0,55 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (marca D, lote 1) e 3,02 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (marca F, lote 2). Os HPAs BaA, Chr, 5MChr, BbF, BkF, BaP foram detectados em todas as amostras, enquanto o BjF, DalP, DahA, Indeno, DaiP e DahP não se encontraram presentes nas mesmas. Na Comissão da Comunidade Europeia, foram estabelecidos limites para HPAs para a categoria de óleos e gorduras, sendo 2,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para o BaP e 10,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para a soma das concentrações de BaA, Chr, BbF e BaP (4 HPAs) (CEC, 2011). Ao se utilizar esse limite como base de comparação, verifica-se que somente duas marcas (marca D e marca F) apresentaram níveis acima do limite para o BaP, sendo que o limite para HPA4 não foi ultrapassado.

Tabela 1. Níveis da somatória dos 13 HPAs analisados, de HPA4 (benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno e benzo(a)pireno) e de benzo(a)pireno em diferentes marcas e lotes de margarina.

	Lote 1 – Lote 2		
	Σ HPAs ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	HPA4 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	B(a)P ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
Marca A	3,28 – 6,77	3,28 – 5,81	0,73 – 1,46
Marca B	4,64 – 7,26	3,83 – 6,69	0,95 – 1,81
Marca C	5,33 – 5,14	4,84 – 4,64	1,12 – 1,40
Marca D	2,80 – 7,10	2,42 – 6,56	0,55 – 2,20
Marca E	3,70 – 2,72	2,41 – 2,72	0,68 – 0,58
Marca F	9,03 – 10,60	7,84 – 9,46	2,24 – 3,02

Σ HPAs: somatória dos 13 HPAs (benzo(a)antraceno, criseno, 5-metilcriseno, benzo(j)fluoranteno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, dibenzo(al)pireno, dibenzo(ah)antraceno, indeno, dibenzo(ae)pireno, dibenzo(ai)pireno, dibenzo(ah)pireno). HPA 4: soma de 4 HPAs (benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno e benzo(a)pireno). B(a)P: benzo(a)pireno.

As marcas A, B, D e F apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os lotes analisados. Não houve diferença entre os lotes das amostras C e E. Essa variação pode ser



justificada por diferenças no processamento dos óleos e nas suas origens (BALLESTEROS *et al*, 2006; FROMBERG *et al*, 2007; CAMARGO *et al*, 2011c).

4. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos a partir dos testes de recuperação, linearidade e limites de detecção e quantificação indicam que a metodologia analítica é adequada para análise de 13 HPAs em margarina.

Entre as amostras analisadas, 17% apresentaram níveis de BaP acima do máximo estabelecido pela legislação europeia, indicando que esse tipo de produto está sujeito à contaminação por HPAs e que é recomendado o estabelecimento de limites máximos em óleos pela legislação brasileira.

5. AGRADECIMENTOS

Ao CNPq pela bolsa de iniciação científica concedida (PIBIC/CNPq).

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BALLESTEROS, E.; GARCÍA, A.S.; RAMOS, N.M. Simultaneous multi determination of residues of pesticides in olive and olive-pomace oils by gas chromatography/tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1111, p. 89-96, 2006.

CAMARGO, M.C.R.; Toledo, M.C.F. Polycyclic aromatic hydrocarbons in Brazilian vegetables and fruits. **Food Control**, v.14, p. 49-53, 2003.

CAMARGO, M.C.R.; ANTONIOLLI, P.R.; TFOUNI, S.A.V. Polycyclic aromatic hydrocarbons in Brazilian soybean oils and dietary exposure. **Food Additives and Contaminants Part B**, v.4, n. 2, p. 152-159, 2011a.

CAMARGO, M.C.R.; ANTONIOLLI, P.R.; VICENTE, E. HPLC-FLD simultaneous determination of 13 polycyclic aromatic hydrocarbons: validation of analytical procedure for soybean oils. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, n.7, p. 1354-1361, 2011b.

CAMARGO, M.C.R.; ANTONIOLLI, P.R.; VICENTE, E.; TFOUNI, S.A.V. Polycyclic aromatic hydrocarbons in Brazilian soybean oils and dietary exposure. **Food Additives and Contaminants Part B**, London, v. 4, n. 2, p. 152-159, 2011c.

CAMARGO, M.C.R.; ANTONIOLLI, P.R.; VICENTE, E. Evaluation of polycyclic aromatic hydrocarbons content in different stages of soybean oils processing. **Food Chemistry**, v.135, p. 937-942, 2012.

CEC – The Commission of the European Communities. Commission Regulation (EC) No 333/2007 of 28 March 2007. **Official Journal of European Union**, 29.03.2007.

CEC – The Commission of the European Communities. Commission Regulation (EC) No 835/2011 of 19 August 2011. **Official Journal of European Union**, 20.08.2011.



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

EFSA Scientific opinion of the panel on contaminants in the food chain on a request from the European Commission on polycyclic aromatic hydrocarbons in food. **EFSA Journal**, 724, p. 1–114, 2008.

FROMBERG, A.; HOJGARD, A.; DUEDAHL-OLESEN, L. Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in vegetable oils combining gel permeation chromatography with solid-phase extraction clean-up. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 24, n. 7, p. 758-767, 2007.

GIOIELLI, L.A. Margarinas e cremes vegetais: composição e tecnologia. **Óleos Grãos**, v.7, n.33, p. 21-27, 1996.

HORWITZ, W.; ALBERT, R. The Horwitz Ratio (HorRat): A useful Index of Method Performance with Respect to Precision. **Journal of AOAC International**, Rockville, v. 89, n. 4, 2006.

INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. **Orientação sobre validação de métodos analíticos**. DOQ-CGCRE-008. Revisão 04. Julho, 2011.

JECFA. **Joint FAO/WHO Expert Committee on food additives**. Rome, 2005. Disponível em: <www.who.int/ipcs/food/jecf/en/>. Acesso em: 12 junho 2016.

RIBEIRO, L. R. Teste do micronúcleo em medula óssea de roedores in vivo. In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. (Eds.) **Mutagênese Ambiental**. Canoas: Ulbra, p.173-200, 2003.

TFOUNI, S.A.V.; SERRATE, C.S.; LEME, F.M.; CAMARGO, M.C.R.; TELES, C.R.A.; CIPOLLI, K.M.V.A.B.; FURLANI, R.P.Z. Polycyclic aromatic hydrocarbons in coffee brew: influence of roasting and brewing procedures in two Coffee Cultivars. **LWT – Food Science and Technology**, v. 50, p.526-530, 2013.

VIEIRA, M.A.; MARASCHIN, M.; ROVARIS, A.A.; AMBONI, R.D.; PAGLIOSA, C.M.; XAVIER, J.J.; AMANTE, E.R. Occurrence of polycyclic aromatic hydrocarbons throughout the processing stages of erva-mate (*Ilex paraguariensis*). **Food Additives and Contaminants**, v. 27, p. 776-782, 2010.

WHO - World Health Organization. Selected non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons. **Environmental Health Criteria**, Geneva, n.202, 1998.