

## **AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS (HPAs) EM AMOSTRAS DE MEXILHÕES IMPORTADOS DO CHILE**

### **ASSESSMENT OF PRESENCE OF POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS (PAHs) IN SAMPLES OF MUSSELS IMPORTED FROM CHILE**

Cláudio Roberto Ribeiro BOBEDA<sup>1</sup>, Ronoel Luiz de Oliveira GODOY<sup>2</sup>, Sidney PACHECO<sup>2</sup>, Renata Galhardo BORGUINI<sup>2</sup>, Helena de Souza TORQUILHO<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Professor do Ensino Básico, Técnico e Tecnológico – IFRJ/Campus Nilópolis e estudante de doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos – PPGCTA/UFRRJ.

<sup>2</sup>Pesquisador Embrapa Agroindústria de Alimentos – Guaratiba/RJ.

<sup>3</sup>Professor do Ensino Básico, Técnico e Tecnológico – IFRJ/Campus Nilópolis.

Palavras-chave: HPA, contaminantes de alimentos, CLAE.

#### **Introdução**

Devido à crescente busca por uma melhor qualidade de vida e à conscientização dos consumidores quanto ao direito de adquirir produtos seguros à saúde, a segurança alimentar vem sendo um tema de discussão cada vez mais relevante, pois a presença de contaminantes em alimentos pode constituir risco à saúde humana. Tais substâncias biológicas (virus, fungos, bactérias, protozoários ou parasitas) ou químicas (metais pesados, micotoxinas, ficotoxinas, agrotóxicos, fármacos, aditivos alimentícios, pesticidas, e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos) podem ou não ser adicionadas intencionalmente aos gêneros alimentícios e estar presentes como resíduo de sua forma de produção, de seu acondicionamento, de sua forma de transporte e armazenagem ou como resultado de contaminação pelo próprio meio ambiente (BALBANI & BUTUGAN, 2001, SPISSO, 2009).

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) são compostos orgânicos apolares, tóxicos, formados por arranjos de dois ou mais anéis benzênicos agrupados de forma linear ou angular (tabela 1). Constituem um grupo de mais de 100 diferentes substâncias químicas formadas por dois ou mais anéis benzênicos condensados. Apresentam potencial carcinogênico, citotóxico e mutagênico, são gerados por fontes antropogênicas e naturais e podem ser encontrados em uma variedade de alimentos e bebidas (BARRO, 2009, BARBOSA, 2005; SOUZA, 2010).

As principais fontes dessas substâncias são a queima de combustíveis fósseis pelos processos industriais, pelos veículos automotores, pela produção de energia por usinas termelétricas, pelo uso de incineradores de lixo e pelas emissões domésticas. Além disso, HPAs podem também ser liberados para o meio ambiente por fontes termais em ambientes marinhos, por atividade vulcânica e por incêndios florestais (SANTOS, 2002; PANDEY, 2011).

Ao longo dos últimos anos, a constatação da presença de HPAs no meio ambiente e seus efeitos nocivos sobre os organismos que nele vivem motivam o interesse da comunidade científica pelo assunto, sobretudo, quanto à comprovação do potencial carcinogênico, mutagênico e citotóxico de alguns componentes desse grupo. Observa-se, ainda, que a contínua presença desses contaminantes no meio ambiente é consequência direta de sua baixa solubilidade em água e de sua associação à matéria orgânica de solos e sedimentos, fonte alimentar para inúmeros organismos, ocasionando a incorporação dessas substâncias em diversos níveis da cadeia alimentar.



Tabela 1: Fórmulas estruturais, nomenclatura IUPAC e abreviação dos HPAs usados como padrão (EPA610).

Estrutura	Nomenclatura e abreviação	Estrutura	Nomenclatura e abreviação
	Naftaleno (NAP)		Antraceno (ANT)
	Acenaftileno (ACL)		Fluoranteno (FLT)
	Acenafteno (ACN)		Pireno (PYR)
	Fluoreno (FLN)		Benzo[a]Antraceno (BAA)#
	Fenantreno (PHN)		Criseno (CHY)#
	Benzo[b]fluoranteno (BBF)#		Dibenz[a,h]Antraceno (DBA)#
	Benzo[k]fluoranteno (BKF)#		Benzo[g,h,i]perileno (BGP)#
	Benzo[a]pireno (BAP)#		Indeno(1,2,3-cd)pireno (ICP)#

# HPAs com potencial carcinogênico, mutagênico ou citotóxico para o ser humano (STOLYHWO & SIKORSKI, 2005)

HPAs podem ser absorvidos por seres humanos através do consumo de alimentos de origem animal ou vegetal, contaminados através do solo, ar ou da água, ou ainda pela adoção de técnicas de processamento alimentar como secagem, defumação, tostagem e grelhagem. Desta forma, HPAs já foram descritos como contaminantes em vários tipos de alimentos, como carnes preparadas em braseiros, carnes defumadas, óleos e gorduras, hortaliças e frutas secas e cereais e ainda em diversas formas de pescado e frutos do mar, como camarões, ostras, coquiles e mexilhões (PHILLIPS, 1999, PINO, 2000, POSTER, 2006).

Sendo os mexilhões organismos filtradores, há uma maior probabilidade de acumulação de HPAs devido às características fisiológicas de seu metabolismo. A partir dessas observações, o objetivo desse trabalho, desenvolvido no Laboratório de Cromatografia Líquida da Embrapa Agroindústria de Alimentos, situado em Guaratiba, Rio de Janeiro, foi investigar a presença de contaminação por HPAs em mexilhões importados do Chile e processados no Brasil.

## Material e métodos

Duas amostras de mexilhões importadas do Chile foram adquiridas em redes de supermercados da cidade do Rio de Janeiro no decorrer do ano de 2012, observando-se o número do lote de fabricação para a sua diferenciação. As amostras foram liofilizadas a -49 °C sob pressão reduzida de 0,632mmHg em liofilizador LIOTOP modelo 101 (LIOBRAS Ltda). Para as análises de HPAs das amostras e dos padrões, utilizou-se a técnica por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por ultravioleta e fluorescência, em



série (CLAE-UV-FLC), seguindo as metodologias descrita por COTTA (2009) e ZHANG (2010). A extração dos HPAs foi realizada utilizando-se extrator tipo soxhlet em 10g de amostra liofilizada de mexilhões, com 100mL de KOH 0,4molL<sup>-1</sup> em metanol:água (9:1 V/V), aquecida a 65°C por 3 horas. Em seguida, foi efetuada a partição desta solução com 3 porções de 100mL de hexano ultra puro. As frações de hexano foram reunidas e lavadas por 3 vezes com 50mL de água em funil de separação. O extrato hexânico obtido foi seco com 3,00g sulfato de sódio anidro, filtrado através de funil de vidro com fundo sinterizado, sob vácuo, concentrado em evaporador rotatório à pressão reduzida, à temperatura de 40°C para um volume final de 500µL e armazenado para a análise cromatográfica. A análise cromatográfica dos HPAs dos extratos e dos padrões (EPA610 - Sigma-Aldrich Brasil Ltda) foi realizada usando sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), modelo Alliance (*Waters Corporation*), com injetor automático e detectores de ultravioleta com arranjo de diodos (UV-DAD) e fluorescência (FLC) com comprimento de onda variável, modelos 998 e 474, respectivamente (*Waters Corporation*), acoplados em série, nas seguintes condições: coluna cromatográfica BDS HYPERSIL C<sub>18</sub>, 4,6 x 100mm e 2,4µm (Thermo Fisher Scientific Inc.); temperaturas de 30°C e 20°C para a coluna e para o injetor automático, respectivamente; volume de injeção utilizado foi de 10µL; fase móvel composta de água (Solvente A) e acetonitrila (Solvente B) com a programação de fluxo e gradiente de concentração descrita na tabela 2; detetor UV-DAD com varredura na faixa de comprimento de onda de 200 a 400nm e a aquisição dos cromatogramas foi realizada em 220,4nm. A detecção por FLC foi realizada com  $\lambda_{excitação} = 280nm$  e  $\lambda_{emissão} = 430nm$ .

Tabela 2: Programação do fluxo e do gradiente concentração de solventes para a fase móvel utilizada na análise por CLAE-UV-FLC.

Tempo de análise (minutos)	Fluxo de fase móvel (mL/minuto)	Solvente A (%)	Solvente B (%)
inicial	1,30	60,0	40,0
13,50	1,30	50,0	50,0
16,00	1,30	47,0	53,0
20,00	1,50	44,0	56,0
32,00	1,50	35,0	65,0
38,00	1,50	35,0	65,0
39,00	1,50	35,0	65,0
40,00	1,30	60,0	40,0
45,00	1,30	60,0	40,0

## Resultados e Discussão

Na figura 1, observa-se o resultado das análises cromatográficas para a amostra e os padrões de HPAs. Na figura 1(a) é mostrado o perfil cromatográfico obtido para a análise de HPAs nas amostras. Nas figuras 1(b) e 1(c) são mostrados os perfis cromatográficos obtidos para a análise do padrão com detecção por FLC e UV, respectivamente. A utilização de duas formas de detecção, FLC e UV, *in line*, é necessária devido à inexistência de fluorescência molecular para o acenaftileno (ACL) e à baixa intensidade deste fenômeno para as estruturas de HPAs com 2 ou 3 anéis conjugados. Tendo em vista que a intensidade da fluorescência aumenta, proporcionalmente, em relação ao número de anéis e seu grau de condensação, as demais estruturas são detectadas tanto por UV quanto por FLC, sendo





a detecção de fluorescência mais seletiva e mais sensível que a detecção por ultravioleta. Comparando-se os tempos de retenção ( $t_R$ ) obtidos no cromatograma da amostra (a) com os  $t_R$  obtidos dos cromatogramas do padrão (b) e (c), na figura 1, identificou-se 10 estruturas de HPAs: naftaleno(1); fluoreno(4); benzo[b]fluoranteno(6); benzo[a]pireno(8); antraceno(9); fluoranteno(10); pireno(11); benzo[a]antraceno(12); criseno(13); dibenzo[a,h]antraceno(14) e benzo(g,h,i)perileno(15). Considerando-se que atividades vulcânicas caracterizam fonte de produção de HPAs, a contaminação dos mexilhões cultivados no Chile pode ser resultado do recente vulcanismo ocorrido em 2011 no complexo vulcânico no sul deste país, pois segundo dados da AMICHILE (2012), 96% da produção de mexilhões no Chile vêm de fazendas que cultivam esses organismos localizados na região de Los Lagos, próximas ao complexo de vulcões de Puyehue-Cordón Caulle.

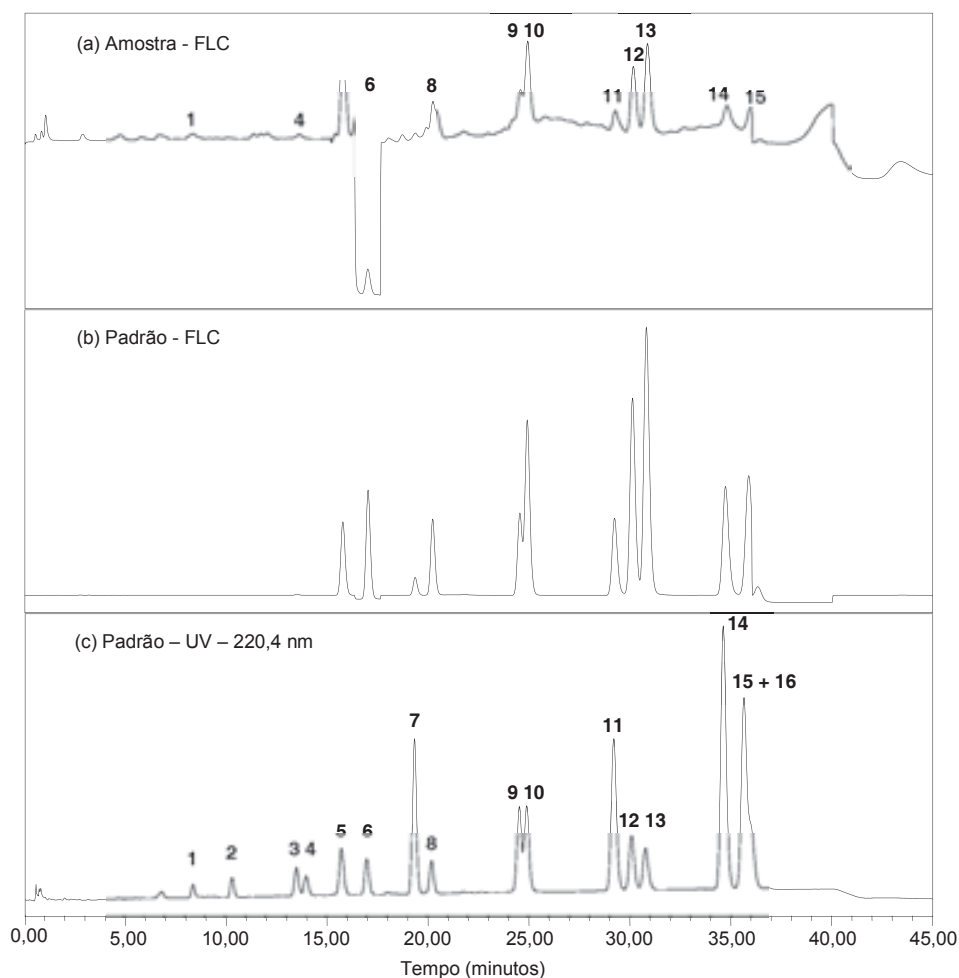


Figura 1. Perfis cromatográficos obtidos por CLAE-UV-FLC da amostra de mexilhão (a) e dos padrões de HPAs (b) e (c). (1)NAF; (2)ACL. (3)ACN; (4)FLN; (5)PHN; (6)BBF; (7)BKF; (8)BAP; (9)ANT; (10)FLT; (11)PYR; (12)BAA; (13)CHY; (14)DBA; (15)BGP e (16)ICP.

## Conclusão

Os HPAs naftaleno, fluoreno, benzo[b]fluoranteno, benzo[a]pireno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo[a]antraceno, criseno, dibenzo[a,h]antraceno, e benzo(g,h,i)perileno foram encontrados em todas as amostras. Dentre estes, BBF, BAP, BAA, CHY, DBA e BGP possuem capacidade carcinogênica, mutagênica ou citotóxica. Apesar das amostras terem sido processadas, verifica-se com estes resultados que o processamento desses organismos não eliminou a presença dos contaminantes, mostrando ser de fundamental importância a disponibilização, para o mercado produtor, de orientações e procedimentos seguros quanto à produção destes alimentos para que seja reduzido ao mínimo o impacto negativo destas substâncias nos diversos tipos de pescado, prevenindo riscos à saúde humana. Além disso, é preciso intensificar a fiscalização e o controle de qualidade da produção e importação de pescado, contribuindo para aumentar a sua garantia de qualidade e expandir o consumo por meio da confiança do consumidor.

## Referências Bibliográficas

- ASOCIACIÓN DE MITICULTORES DE CHILE (AMICHILE), Castro – Chile. Disponível em: <http://www.amichile.com>. Acesso em: 29 de novembro de 2012.
- BALBANI, A. P. S. & BUTUGA, O. Contaminação biológica de alimentos. **Pediatria**, 23(4):320-328, 2001.
- BARBOSA, L. H. C. **O uso da espécie *callinectes sapidus* na avaliação da contaminação da fração biodisponível de hidrocarbonetos poliaromáticos (HPAs)**. 2005. 64p. Dissertação (Mestrado em Oceanografia Física, Química e Geológica) – Fundação Universidade Federal do Rio Grande, 2005.
- BARRO, R. *et al.* Analysis of industrial contaminants in indoor air: Part 1. Volatile organic compounds, carbonyl compounds, polycyclic aromatic hydrocarbons and polychlorinated biphenyls. **Journal of Chromatography A**, 1216:540-566, 2009.
- COTTA, J. A. O. *et al.* Avaliação de solventes de Extração por ultrassom usando-se cromatografia líquida de alta eficiência para a determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em solos contaminados. **Química Nova**, 32(8):2026-2033, 2009.
- PANDEY, S. K. *et al.* A review of techniques for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in air. **Track and Trends in Analytical Chemistry**, 30(11):1716-1719, 2011.
- PHILLIPS, D.H. Polycyclic aromatic hydrocarbon. *Mutation Research*, 443:139-147, 1999.
- PINO, V. *et al.* Determination of polycyclic aromatic hydrocarbon in marine sediments by high-performance liquid chromatography after microwave-assisted extraction with micellar media. **Journal of Chromatography A**, 869:515-522, 2000.
- POSTER, D. L. *et al.* Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons (PHAs) in environmental samples: a critical review of gas chromatographic (GC) methods. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**. 386(4):859-881, 2006
- SANTOS, F. J. & GALCERAN, M. T. V. **The application of gas chromatography to environmental analysis**. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 21, p. 672-685, 2002.
- SOUSA, M.M. & NASCIMENTO, V. L. V. Benzo(a)pireno em alimentos. **Revista ACTA Tecnológica**, 5(1):125-138, 2010.
- SPISSO, B. F. *et al.* Resíduos e contaminantes químicos em alimentos de origem animal no Brasil: histórico, legislação e atuação da vigilância sanitária e demais sistemas regulatórios. **Ciência e Saúde Coletiva**, 14(6):2091-2106, 2009
- STOLYHWO, A. & SIKORSKI, Z. E. Polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked fish – a critical review. **Food Chemistry**, 91:303-311, 2005.
- ZHANG, H *et al.* Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in aquatic products by hplc-fluorescence. **Journal of Food Composition and Analysis**, 23:469-474, 2010.