

ESTUDO SISTEMÁTICO PARA DETERMINAÇÃO DE BENZO(a)PIRENO EM CAFÉ

BADOLATO, E.G.S.¹; ALABURDA, M.J.¹; MARTINS, M.S.¹; AUED-PIMENTEL, S.¹

¹Instituto Adolfo Lutz, Divisão de Bromatologia e Química Av. Dr. Arnaldo, 355 – Cerqueira César – São Paulo/SP
CEP: 01246-000; fone: (0xx11)3068- 2917; <ebadolat@ial.sp.gov.br>

RESUMO: Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos constituem uma família de mais de 100 compostos orgânicos, formados principalmente em processos de combustão incompleta de matérias orgânicas e cuja quantidade formada é uma função da natureza da espécie pirolisada e da temperatura de exposição. Encontram-se na natureza como contaminantes de solos, ar, água e alimentos. Muitos destes compostos são carcinogênicos e mutagênicos, o benzo(a)pireno (BAP) tem sido utilizado como indicador do potencial carcinogênico de alimentos contaminados, uma vez que a cadeia alimentar contribui com cerca de 97% do total de BAP ingerido diariamente pelo homem. São poucos os estudos referentes à contaminação de cafés, de modo que a presente pesquisa visa determinar o teor de BAP neste produto. Dois métodos estão sendo testados para a preparação da amostra: no primeiro, uma pré-extração com solvente orgânico (acetona), saponificação e extração por partição com outro solvente orgânico (cicloexano); no segundo, extração com solvente orgânico (cicloexano) e purificação em coluna cromatográfica de sílica-gel. A análise dos extratos purificados é conduzida por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), com coluna de fase reversa C-18 e detector de fluorescência. Nos estudos realizados, verificou-se que as melhores condições para a realização das análises são a eluição da amostra com uma mistura isocrática de acetonitrila e água (80:20) e detecção por fluorimetria com comprimento de onda de excitação de 365 nm e emissão de 418 nm.

Palavras-chave: benzo(a)pireno, café, torração, BAP.

SYSTEMATIC STUDY FOR THE DETERMINATION OF BENZOPYRENE IN COFFEE

ABSTRACT: Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) constitute a large class of organic compounds, and hundreds of individual substances may be released during the incomplete combustion of organic matter. The amount of PAH released from any process is largely dependent on raw materials and combustion temperatures. They are ubiquitous compounds appearing like contaminants in soils, atmosphere, waters and food. Many of these compounds are known carcinogens and/or mutagens. It has

been estimated that the food chain contributes about 97 % of the total daily intake of benzo(a)pyrene, which serves as toxicological indicator of the carcinogenic potencial of foods. There are a few publications concerned with coffee contaminated by PAHs, and the theme was the principal objective of this work. The coffee samples have been prepared by two experimental methods: (i) pre-extraction with organic solvent (acetone), saponification and partition extraction with another organic solvent (cyclohexane), and (ii) extraction with organic solvent and clean-up using silica-gel chromatography column. Benzo(a)pyrene in the concentrated extracts was analysed by HPLC using isocratic elution and the mobile phase was a mixture of 80 % acetonitrile and 20 % deionized water. The samples were analysed using a C18 column and fluorescence detector with a 365 nm excitation filter and 418 nm emission filter.

Key words: benzo(a)pyrene, coffee, roasting, PAH.

INTRODUÇÃO

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) representam uma família de mais de 100 compostos orgânicos, sendo caracterizados por possuírem dois ou mais anéis aromáticos condensados. São formados, principalmente, em processos de combustão incompleta de matérias orgânicas e encontram-se na natureza como contaminantes de solos, ar, água e alimentos.

Essas substâncias têm ampla distribuição e são encontradas como constituintes de misturas complexas em diferentes setores ambientais. Os HPAs já foram detectados na atmosfera de zonas urbanas, suburbanas, florestais e nas áreas mais distantes do planeta, como a Antártica, porém suas concentrações são maiores em áreas densamente povoadas e zonas industriais (1,2).

A composição e complexidade das misturas de HPAs estão diretamente relacionadas com o tipo de fonte emissora. Geralmente essas misturas são bastante complexas e contêm uma grande variedade desses compostos em diferentes concentrações.

As fontes de contaminação são diversas (3,4,5), podendo ser naturais ou antropogênicas. Dentre as naturais podem-se citar vulcões, queima de biomassa (como florestas) e síntese por plantas e microrganismos. As antropogênicas são: processamento de petróleo e gás natural, produção de alumínio, gaseificação de coque, plantas de incineração de rejeitos, aquecimentos domésticos e industriais, combustão de automóveis, fumaça de cigarro, produção de alimentos, entre outras. A contribuição de

fontes naturais de HPAs é muito limitada, e as fontes antropogênicas representam o principal processo de emissão desses compostos. No Brasil não existe ainda um banco de dados que permita estimar as quantidades e respectivas fontes de HPAs formados e liberados no ambiente, bem como são escassas as informações referentes às contaminações dos alimentos.

A formação dos HPAs envolve processos complexos. Eles são pirossintetizados a partir de produtos de degradação contendo duas ou quatro unidades de carbono, como radicais etileno e butadieno (2). Ainda, a quantidade de produto formado está relacionada com a temperatura e ao tipo de exposição ao aquecimento e da matéria-prima utilizada (4).

Os HPAs estão geralmente associados ao aumento da incidência de diversos tipos de cânceres no ser humano. Vários desses compostos são capazes de reagir diretamente, ou após sofrerem transformações metabólicas, com o DNA, tornando-se potenciais carcinógenos e eficientes mutagênicos (3,8). Dessa forma, essa classe de compostos é uma ameaça potencial à saúde pública, colocando em risco toda a população a ela exposta.

Os HPAs podem penetrar no corpo humano por inalação, através da pele ou por ingestão. A ação exercida pelos HPAs é ativada durante o processo metabólico, que tem a finalidade de promover a excreção urinária. Fatores metabólicos, estereoquímicos e conformacionais, bem como a reatividade biológica dos metabólitos, contribuem para a marcante diferença carcinogênica dos diferentes HPAs.

Dentre os compostos que constituem a classe dos HPAs, o benzo(a)pireno (BaP) é um dos mais estudados, por ter sido um dos primeiros a ser identificado e sintetizado em laboratório, facilitando o estudo de sua toxicidade e mutagenicidade em experimentos laboratoriais, e também por se destacar pelo seu alto potencial carcinogênico/mutagênico. O mecanismo de eliminação do BaP pelo corpo humano envolve a formação de epóxidos e, posteriormente, de compostos poliidroxilados (mais solúveis em água), que são mais facilmente eliminados pela via urinária. Um dos intermediários formados durante este processo pode reagir com a guanina do DNA, formando um aduto que pode forçar a célula a erros de reparação que podem resultar em tumoração (3,8).

Pesquisas revelam que a cadeia alimentar contribui com aproximadamente 97% do total de exposição humana diária ao benzo(a)pireno (9), que tem sido detectado nos mais diferentes tipos de alimentos, como carnes, peixes, frutas, vegetais, entre outros, estando presente inclusive em águas de abastecimento (11,12). Nos Estados Unidos, através da alimentação ingere-se uma quantidade de 0,16-1,6 µg BaP/dia, que está de acordo com o registro do consumo de HPA *per capita* na Holanda. Muitos estudos expressam o conteúdo de HPAs encontrados em alimentos como “conteúdo de benzo(a)pireno”, o qual expressa o potencial carcinogênico da mistura.

Os HPAs não ocorrem, normalmente, em teores elevados em alimentos crus (3), mas podem ser gerados por processamento, diferentes tipos de cozimento, torrefação, ou mesmo durante o processo de armazenagem e estocagem. Os vegetais podem ser contaminados pela deposição de particular provenientes do ar ou pelo cultivo em solos contaminados. Os níveis de HPAs individual em carnes, peixes, produtos matinais, vegetais e frutas, cereais e seus produtos, doces, bebidas, gorduras animal e vegetal e óleos encontram-se na faixa de 0,01-10 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Concentrações acima de 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ foram detectadas em carnes defumadas e acima de 86 $\mu\text{g}/\text{kg}$ em peixe defumado; cereais torrados chegam a conter 160 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Pesquisas de HPAs, e mais especificamente de BaP, em amostras de café são raras, tendo poucas referências bibliográficas para consulta, sendo difícil uma avaliação sobre o risco de exposição a estes compostos através da ingestão desta bebida. A contaminação do café pode ocorrer durante o processo de torrefação, dependendo das temperaturas utilizadas, como pela exposição das sementes ao meio ambiente, ocorrendo contaminação através das partículas do ar durante o seu armazenamento e secagem. Os poucos dados encontrados na literatura relatam a presença de BaP na faixa de 0,3-15,8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ em amostra de café torrado (12,13).

Como o café, na sua cadeia de produção, é passível de contaminação por HPAs e, mais especificamente, por benzo(a)pireno, são de suma importância estudos sistemáticos que comprovem a presença ou ausência destes compostos.

Caso se verifique a não-contaminação, esses resultados serão valiosos como garantia de qualidade do produto, principalmente para as exportações, uma vez que as comunidades européia e americana estão realizando estudos sobre avaliação da ingestão de HPAs em suas dietas, para posteriormente poderem definir parâmetros legais para um controle destes compostos na alimentação.

Por outro lado, se a contaminação for verificada neste estudo prévio, constituirá um dado importante para se iniciarem pesquisas que permitam evitar esta contaminação, a partir de um monitoramento de todas as etapas da cadeia de produção, desde a matéria-prima até o produto final, e mais especificamente da torrefação, que deve ser a etapa mais crítica de todo o processo.

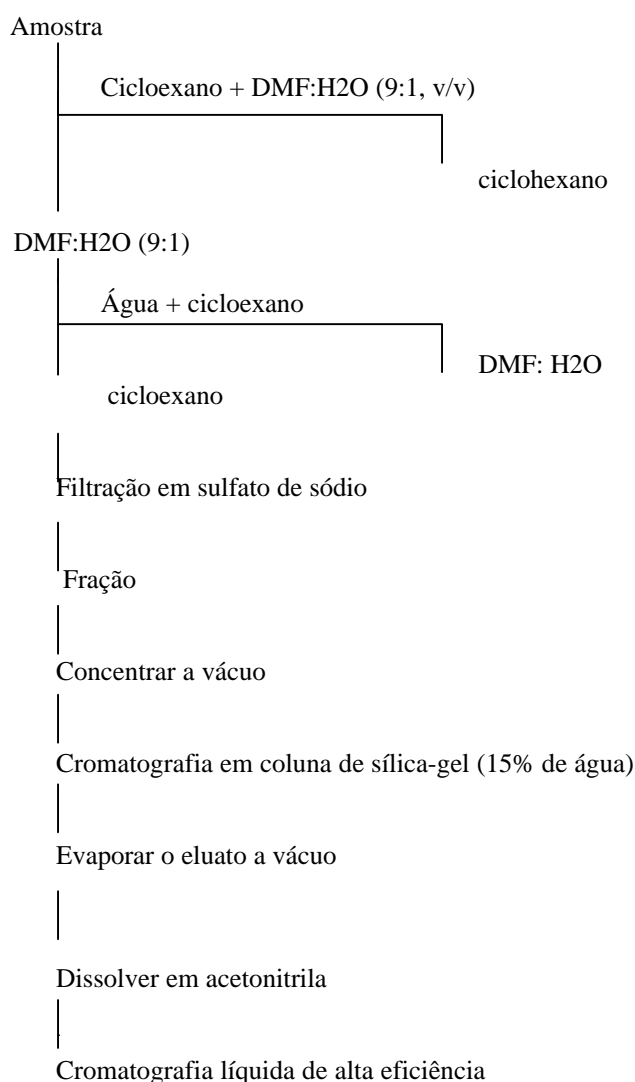
Em suma, no comércio internacional os atributos de qualidade e segurança dos produtos destinados à exportação têm sido fundamentais na aceitação destes em diferentes mercados. Os resultados gerados neste projeto, sobre os níveis de benzo(a)pireno em cafés brasileiros, trarão subsídios para melhor controle deste composto de reconhecido potencial carcinogênico, resultando em um produto de melhor qualidade e garantindo maior competitividade.

MATERIAL E MÉTODOS

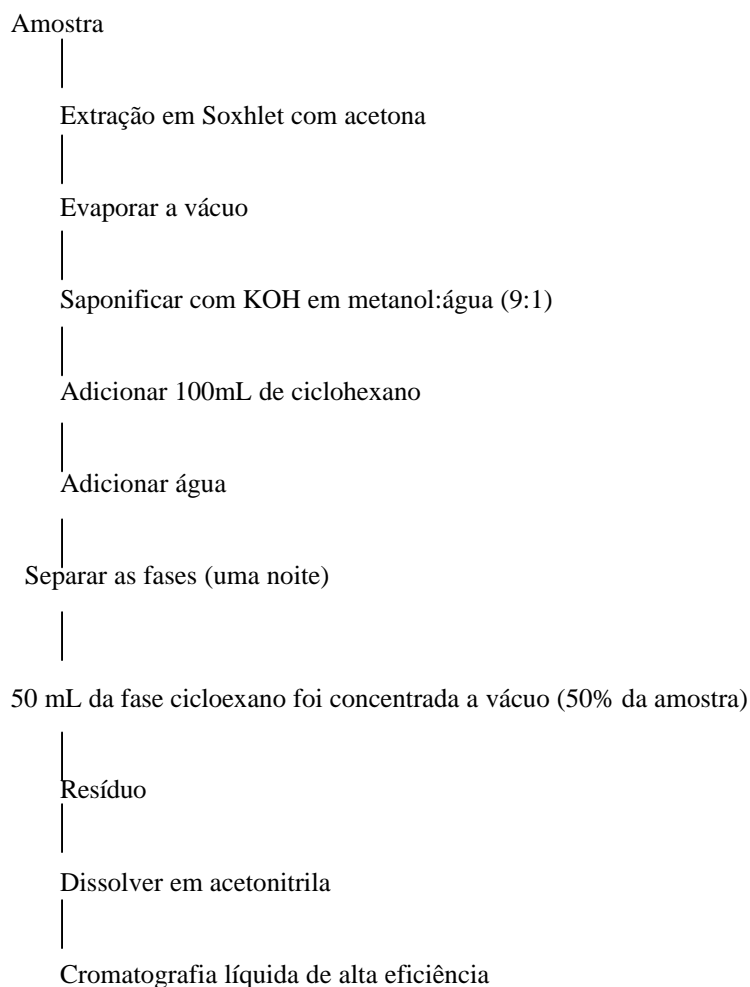
Foram analisadas amostras de café verde, torrado moído e solúvel em duas variedades: arábica e conillon; as amostras foram torrefadas pelos seguintes métodos: americano, convencional menos, convencional, convencional mais e queimado.

Duas metodologias de extração e purificação da amostra foram testadas.

Na primeira, o benzo(a)pireno foi extraído seguindo a técnica de Grimmer & Böhnke (1975), em que é feita uma partição líquido-líquido e posterior limpeza em coluna de sílica-gel.



No segundo método far-se-á uma extração em extrator Soxhlet com acetona, seguido de saponificação e extração com cicloexano. Neste método o uso de solventes e vidraria é limitado, a fim de minimizar a contaminação.



RESULTADOS

As condições cromatográficas para a determinação de benzo(a)pireno foram estudadas, e a que apresentou melhor desempenho com maior rapidez na análise foi a seguinte: eluição isocrática com a mistura acetonitrila:água (80:20), coluna de fase reversa Lichrospher 100 RP-18, fluxo - 1mL/min, temperatura do forno de 35°C, volume de injeção de 20 µL e detector de fluorescência nos seguintes comprimentos de onda: 365 nm para excitação e 418 nm para emissão. Nessas condições, o tempo de retenção para o benzo(a)pireno foi de aproximadamente cinco minutos. Esses parâmetros serão avaliados para amostras de café, para que interferentes da amostra não sejam eluídos e detectados nas mesmas condições.

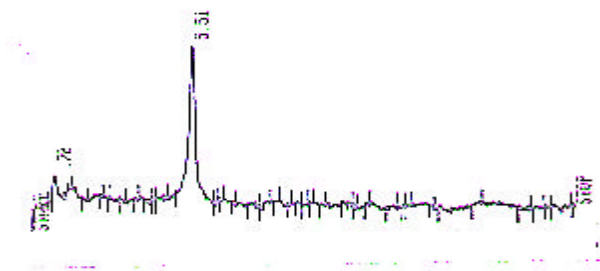


Figura 1 - Cromatograma do benzo(a)pireno
Fase móvel: acetonitrila: água (80:20).

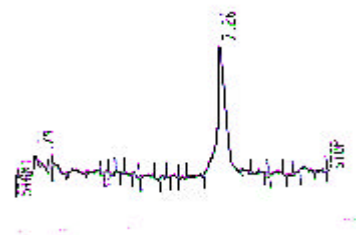


Figura 2 - Cromatograma do benzo(a)pireno.
Fase móvel: acetonitril:água (75:25)

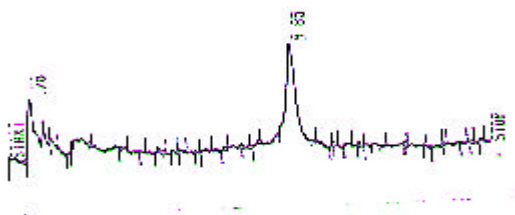


Figura 3 - Cromatograma do benzo(a)pireno.
Fase móvel: acetonitrila:água (70:30).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

PEREIRA NETTO, A. D.; MOREIRA, J.C.; DIAS, A. E.X. O.; ARBILLA, G.; FERREIRA, L.F.V.; OLIVEIRA, A. S.; BAREK, J.- Avaliação da contaminação humana por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) e seus derivados nitrados (NHPAs): uma revisão metodológica, *Quím. Nova*, 23(6): , 2000.

LOPES, W.A.; DE ANDRADE, J.B. – *Química Nova*, 19:497, 1996.

International Programme on Chemical Safety (IPCS):Environmental Health Criteria 202, selected non heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons; World Health Organization, Geneva, 1998.

BJORSETH. A.; RAMDAHL, T. - Handbook of polycyclic aromatic hydrocarbons: emission sources and recent progress in analytical chemistry, v. 2, Marcel Dekker Inc., New York, 1985.

- VO-DINH, T.- Chemical Analysis of polycyclic Aromatic Compounds, v. 101, John Wiley & Sons, New York, 1988.
- GRIMMER, G.; BOHNKE, H. Polycyclic aromatic hydrocarbon profile of high-protein foods, oil and fats by gas chromatography. *J.A.O.A.C.*, 58(4): 724-733, 1975.
- LINTAS, C; MATTHAEIS, M.C.; MERLI, F. – Determination of benzo(a)pyrene in smoked, cooked and toasted food products. *Fd Cosmet. Toxicol.* 17, 325-328, 1979.
- IARC, Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans: Polynuclear Aromatic Compounds, v.32, IARC, Lyon, 1983.
- HATTERMER-FREY H.A, TRAVIS, C.C. - Benzo(a)pyrene: environmental partitioning and human exposure. *Toxicology and Industrial Health*, 7:141-157, 1991.
- STAVRIC, B., KLASSEN, R.- Dietary effects on the uptake of benzo(a)pyrene. *Food Chemical Toxicology*, 32(8):727-734, 1994.
- HOWARD, J.W.; FAZIO, T.A. – A review of polycyclic aromatic hydrocarbons in food. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 17(3): 527-531, 1969.
- KURATSUNE, M.; HUEPER, W.C. – Polycyclic aromatic hydrocarbons in roasted coffee. *Journal of the National Cancer Institute*, 24(2): 463-469, 1960.
- KRUIJF, N; SCHOUTEN, T.; VAN DER STEGEN, G.H.D. – Rapid determination of benzo(a) pyrene in roasted coffee and coffee brew by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection, *Journal of Agriculture Food Chemistry*, 35: 545-549, 1987.