

UNIVERSIDADE do PORTO

FACULDADE de FARMÁCIA

MESTRADO EM CONTROLO DE QUALIDADE

HIDROCARBONETOS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS EM ÓLEOS VEGETAIS



Vitor Hugo da Costa Gomes Moreira Teixeira

PORTO 2002

FACULDADE DE FARMÁCIA DA
UNIVERSIDADE DO PORTO

MESTRADO EM CONTROLO DE QUALIDADE

HIDROCARBONETOS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS
EM ÓLEOS VEGETAIS

FACULDADE DE FARMÁCIA
U. P.
BIBLIOTECA
Data 03/02/77
Req. 1977
Cota

FFM
TEI
1977

Vitor Hugo da Costa Gomes Moreira Teixeira

Porto 2002

Dissertação apresentada à Faculdade de Farmácia da
Universidade do Porto para obtenção do grau de Mestre em
Controlo de Qualidade na área científica Água e Alimentos
(Resolução n.º 8/SC/SG/93, D.R. n.º 126, II Série 31/05/93)

Porto, 2002

**Trabalho realizado no Laboratório de Bromatologia da
Faculdade de Farmácia da
Universidade do Porto**

Sob orientação de:

Professora Doutora Maria Beatriz Prior Pinto Oliveira

Com co-orientação de:

Lic.^a Susana Isabel Pereira Casal Vicente

AGRADECIMENTOS

O meu profundo obrigado a todo um conjunto de pessoas que contribuíram para que o presente trabalho fosse uma realidade.

Agradeço:

À Professora Doutora Maria Beatriz Prior Pinto Oliveira, minha orientadora

À Dr.^a Susana Casal

A todos os elementos do Serviço de Bromatologia da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto

A todos os elementos da Faculdade de Ciências da Nutrição e Alimentação da Universidade do Porto

Ao Dr. Manuel Jorge Resendes Pinto

À Dora Freire

À SOVENA, S.A.

Extravasando o âmbito deste trabalho, existe um conjunto de pessoas que são exemplos, pelo que são e pelo que representam, para a minha vida académica.

Neste contexto, agradeço:

À Professora Doutora Maria Daniel Vaz de Almeida

Ao Professor Doutor Pedro Moreira

Ao Professor Doutor Nuno Borges

E porque os últimos são os primeiros, agradeço à minha família, em especial à Sandra, por compreenderem e apoiarem este tempo de hibernação.

RESUMO

O trabalho de investigação, que seguidamente se descreve, teve como objectivos fundamentais a avaliação da contaminação com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs) de alguns óleos vegetais disponíveis comercialmente em Portugal, bem como o estudo da evolução da sua concentração ao longo da refinação, um processo com reconhecida influência no teor final de PAHs em óleos vegetais.

Este trabalho foi realizado em simultâneo com a participação num estudo interlaboratorial (ISO/TC34/SC11) que tem o fito de avaliar a aplicabilidade e precisão de um método de determinação de PAHs em óleos e gorduras vegetais e animais, que se encontra em processo de normalização (ISO/WD 15753 : 2001).

Nesta conjuntura, a metodologia analítica que se utilizou no presente trabalho derivou daquela técnica; o procedimento extractivo manteve-se praticamente inalterado enquanto as condições de separação cromatográfica foram optimizadas. Como tal, efectuou-se a validação da técnica analítica utilizada na matriz alimentar em causa.

Sumariamente, este método consiste na extracção líquido-líquido (acetonitrilo/acetona) dos PAHs, purificação em fase sólida (C18 e Florisil), seguida por separação cromatográfica por HPLC em fase reversa com detecção fluorimétrica a vários comprimentos de onda de excitação e de emissão.

Foram avaliados os teores de 15 PAHs considerados poluentes prioritários pela Environmental Protection Agency (EPA) em óleos vegetais de distintas marcas comerciais e com origem em diferentes tipos de sementes oleaginosas, num total de 21 exemplares: 5 óleos alimentares, 3 óleos de milho, 3 óleos de soja, 3 óleos de girassol, 3 óleos de amendoim, 2 azeites virgens, 1 óleo de avelã e 1 óleo de sésamo. Determinaram-se, também, os teores de PAHs em amostras de óleos vegetais (soja, girassol e azeite) provenientes de diferentes etapas de refinação: em bruto e após a neutralização, o branqueamento e a desodorização.

As concentrações de PAHs encontradas variaram entre 7,26 e 76,96 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (média: 18,53 $\mu\text{g}/\text{kg}$), valores que se enquadram dentro do que é descrito na literatura científica para este género alimentício. Em termos gerais, o nível de contaminação observado não foi preocupante; todos os óleos vegetais em estudo cumpriam as recomendações relativas a PAHs totais, a PAHs de alto peso molecular e ao benzo[a]pireno estabelecidas pela *German Society for Fat Science* (GSFS), à excepção do óleo de

sésamo e de uma amostra de óleo alimentar que transgrediram o máximo estipulado para PAHs totais (25 µg/kg).

Observou-se uma diminuição acentuada (72-87%) do teor de PAHs no decorrer do processo de refinação, principalmente dos compostos de menor peso molecular. As etapas mais efectivas nesse decréscimo foram a refinação alcalina e, sobretudo, a desodorização.

Com base nos resultados analíticos obtidos e na informação sistematizada na Balança Alimentar da Food and Agriculture Organization (FAO), relativa à disponibilidade de óleos vegetais, estimou-se a quantidade de PAHs disponibilizada anualmente à população portuguesa por estes géneros alimentícios em 334,6 µg, dos quais 3,2 µg correspondiam a benzo[a]pireno.

Na parte introdutória do trabalho apresentam-se breves considerações teóricas relativas à estrutura química, propriedades físico-químicas, formação e ocorrência dos PAHs. Neste preâmbulo destacam-se, ainda, as propriedades toxicológicas, principalmente cancerígenas, dos PAHs, principal motivo de preocupação que a sua presença no ambiente, em geral, e nos alimentos, em particular, suscita. Aludiu-se, também, à ocorrência destes compostos nos alimentos, mais especificamente nos óleos vegetais, e as diversas alternativas analíticas de a mensurar.

ABSTRACT

This research work had as main objectives the evaluation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) contamination of some vegetable oils commercially available in Portugal, as well the study of their concentration evolution throughout refining, a process with recognized influence on PAHs content of these oils.

This work has been performed simultaneously with a participation in a international collaborative trial (ISO/TC34/SC11) that aims to evaluate the applicability and precision of a method for the PAHs determination in animal and vegetable oils and fats, presently under a standardization process (ISO/WD 15753 : 2001).

In this context, the analytical methodology employed in the present work derived from that method; the extraction process was kept almost unchanged, while the chromatographic conditions were optimised. We have validated the analytical method used for the matrix studied.

Briefly, this method involves a liquid-liquid extraction (acetonitrile/acetone), a solid-phase clean-up (C18 and Florisil), followed by a reverse phase HPLC with fluorimetric detection at various excitation and emission wavelengths.

Twenty one samples of oils with different commercial brands and from various kinds of oil seeds, namely 5 vegetable oils, 3 maize oils, 3 soybean oils, 3 sunflower oils, 3 groundnut oils, 2 virgin olive oils, 1 hazelnut oil and 1 sesame oil were evaluated for concentration of 15 PAHs classified as priority pollutants by the Environmental Protection Agency (EPA). It was also assessed the PAHs concentration in samples of soybean, sunflower and olive oil from different steps of the refining process: crude and after alkali-refining, bleaching and deodorization.

We observed PAHs concentrations between 7.26 and 76.96 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (mean: 18.53 $\mu\text{g}/\text{kg}$), values in agreement with what has been described for this foodstuff.

Generally, the contamination level observed did not alarm. All the vegetable oils accomplished the recommendations for total PAHs, heavy PAHs and benzo[a]pyrene established by *German Society for Fat Science* (GSFS), with the exception of sesame oil and one sample of vegetable oil that exceeded the maximum for total PAHs (25 $\mu\text{g}/\text{kg}$).

We observed an evident decrease (72-87%) of PAHs content during refining, mainly the light ones. Alkali-refining and, chiefly, deodorization were the more effective steps to the PAHs decrease.

Based on the analytical results obtained and the information contained in the Food and Agriculture Organization (FAO) Food Balance Sheet, relative to vegetable oils availability, it was estimated that the PAHs amount available by these foodstuffs is about 334,6 μg per year, being 3,2 μg of benzo[a]pyrene.

In the introductory chapter, concise theoretical considerations about PAHs chemical structure, physical and chemical properties and formation and occurrence were made. In the preface the PAHs toxicological characteristics were detached, mainly the carcinogenic ones, the main reason for concern of their presence in the environment and food. It was referred, also, the occurrence of this compounds in foodstuffs, especially in vegetable oils, and the diverse methodological approach to measure them.

LISTA DE ABREVIATURAS

- PAHs - hidrocarbonetos aromáticos policíclicos
- PACs - compostos aromáticos policíclicos
- azo-PAHs - hidrocarbonetos aromáticos policíclicos com um ou mais átomos de carbono substituídos por azoto
- tio-PAHs - hidrocarbonetos aromáticos policíclicos com um ou mais átomos de carbono substituídos por enxofre
- oxo-PAHs - hidrocarbonetos aromáticos policíclicos com um ou mais átomos de carbono substituídos por oxigénio
- EPA - Environmental Protection Agency
- IARC - International Agency for Research on Cancer
- PM – peso molecular
- ADN - ácido desoxirribonucleico
- ARN - ácido ribonucleico
- ER - receptor dos estrogénios
- MFO - mono-oxigenases multifuncionais
- AHH - hidroxilases dos hidrocarbonetos arílicos
- EGF - factor de crescimento epidérmico
- IGF - factor de crescimento semelhante à insulina
- B[a]P - Benzo[a]pireno
- EUA - Estados Unidos da América
- ca. - cerca de
- DMF - dimetilformamida
- DMSO - dimetilsulfóxido
- TLC - cromatografia em camada fina
- GC - cromatografia gasosa
- CV - coeficiente de variância
- SPE - extracção em fase sólida
- p.e. - por exemplo
- SFE - extracção com fluidos supercríticos
- DACC - *donor acceptor complex chromatography*
- LC - cromatografia líquida (LC)
- GPC - cromatografia de permeação em gel
-

SFC - cromatografia com fluidos supercríticos
HPLC - cromatografia líquida de alta eficiência
RIS - *Rapid Immunoassay Screening*
TLC - cromatografia em camada fina
UV - ultravioleta
RF-HPLC - cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa
MS - detector de espectrometria de massa
FID - detector de ionização em chama
ITERG - Institut des Corps Gras
FAO - Food and Agriculture Organization
cc. - centímetros cúbicos
v/v - volume/volume
rpm - rotações por minuto
 $\lambda_{exc.}$ - comprimento de onda de excitação
 $\lambda_{emi.}$ - comprimento de onda de emissão
Máx. - máximo
Min. - mínimo
d.p. - desvio-padrão
n.d. - não detectado
IC - intervalo de confiança
c-PAHs - PAHs carcinogêneos
OH[·] - radical hidroxilo
O₂^{·-} - radical superóxido

ÍNDICE GERAL

I - PARTE TEÓRICA

1. Introdução aos PAHs	1
2. Estrutura química	4
3. Características físico-químicas	5
4. Formação	7
5. Patobiologia dos PAHs	10
6. A alimentação como fonte de exposição a PAHs	16
7. Principais contribuintes alimentares	21
8. Presença de PAHs nos óleos vegetais	25
9. Biodisponibilidade de PAHs	32
10. Métodos analíticos de determinação de PAHs	34

II - PARTE EXPERIMENTAL

1. Objectivos	49
2. Amostras	51
3. Reagentes	53
4. Soluções Padrão	54
5. Material	55
6. Equipamento	56
7. Metodologia analítica	57
7.1 Extracção	58
7.2 Separação cromatográfica	61
7.3 Identificação e quantificação	65
7.4 Validação do método	66
7.5 Comentários ao método	79
8. Avaliação do teor de PAHs em óleos vegetais	81
9. Avaliação do teor de PAHs carcinogéneos em óleos vegetais	106
10. Evolução dos teores de PAHs ao longo das etapas de refinação dos óleos vegetais	109
11. Estimativa da ingestão de PAHs com origem em óleos vegetais	125

12. Conclusões	129
13. Considerações finais	130
14. Bibliografia	131

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1: Representação da estrutura molecular dos 16 PAHs considerados poluentes prioritários pela EPA	2
Figura 2: Tipo de fusão dos PAHs	4
Figura 3: Cromatograma de uma solução padrão de PAHs (50 µg/L)	65
Figura 4a a 4p: Curvas de calibração de cada PAH	66-71
Figura 5: Decréscimo da concentração de PAHs no azeite após refinação (concentração desodorizado/bruto, em %)	111
Figura 6: Evolução do teor de PAHs durante a refinação do azeite	112
Figura 7: Decréscimo da concentração de PAHs no óleo de soja após refinação (concentração desodorizado/bruto, em %)	114
Figura 8: Evolução do teor de PAHs durante a refinação do óleo de soja	115
Figura 9: Decréscimo da concentração de PAHs no óleo de girassol após refinação (concentração desodorizado/bruto, em %)	118
Figura 10: Evolução do teor de PAHs durante a refinação do óleo de girassol	119

ÍNDICE DE QUADROS

	Pág.
Quadro I: PAHs prováveis carcinogêneos humanos e potência relativa estimada	3
Quadro II: Métodos de análise de PAHs em óleos vegetais	47
Quadro III: Gradiente e fluxo utilizados na separação cromatográfica de PAHs em óleos vegetais	61
Quadro IV: Comprimentos de onda de excitação ($\lambda_{exc.}$) e emissão ($\lambda_{emi.}$) utilizados	62
Quadro V: Repetibilidade do método analítico	72
Quadro VI: Reprodutibilidade do óleo de amendoim refinado sem e com adição de PAHs (+ 4,77 $\mu\text{g}/\text{kg}$)	73
Quadro VII: Comparação das reprodutibilidades deste trabalho com as do ISO/TC34/SC11 do óleo de amendoim refinado sem e com adição de PAHs	74
Quadro VIII: Recuperações sem matriz, obtidas no trabalho que se descreve e no ISO/TC34/SC11	76
Quadro IX: Recuperações com matriz, obtidas no trabalho que se descreve e no ISO/TC34/SC11	77
Quadro X – Limites de detecção e quantificação (ng/kg)	78
Quadro XI: Teor de PAHs ($\mu\text{g}/\text{kg}$) em azeites virgens	82
Quadro XII: Teor de PAHs ($\mu\text{g}/\text{kg}$) em óleos de amendoim	89
Quadro XIII: Teor de PAHs ($\mu\text{g}/\text{kg}$) em óleos de girassol	92
Quadro XIV: Teor de PAHs ($\mu\text{g}/\text{kg}$) em óleos de soja	94
Quadro XV: Teor de PAHs ($\mu\text{g}/\text{kg}$) em óleos de milho	97
Quadro XVI: Teor de PAHs ($\mu\text{g}/\text{kg}$) em óleos alimentares	101
Quadro XVII: Teor de PAHs ($\mu\text{g}/\text{kg}$) em óleos de avelã e sésamo	104
Quadro XVIII: Tores de PAHs totais e carcinogêneos e índice de carcinogenicidade dos óleos vegetais estudados	107
Quadro XIX: Teor de PAHs ($\mu\text{g}/\text{kg}$) em azeite ao longo da refinação	110
Quadro XX: Teor de PAHs ($\mu\text{g}/\text{kg}$) em óleo de soja ao longo da refinação	113
Quadro XXI: Teor de PAHs ($\mu\text{g}/\text{kg}$) em óleo de girassol ao longo da refinação	117
Quadro XXII: Disponibilidade de óleos vegetais em Portugal (FAO) (kg/pessoa/ano)	125

PARTE TEÓRICA

1. INTRODUÇÃO AOS PAHs

Os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs) constituem uma numerosa e diversificada família de contaminantes orgânicos lipofílicos amplamente distribuídos, em níveis vestigiais, nos ecossistemas [1]. A importância desta classe de compostos orgânicos reside, principalmente, no carácter carcinogénico de alguns dos seus membros e na sua distribuição ubiqüitária no ambiente, e conseqüentemente nos alimentos, que torna a exposição humana inevitável.

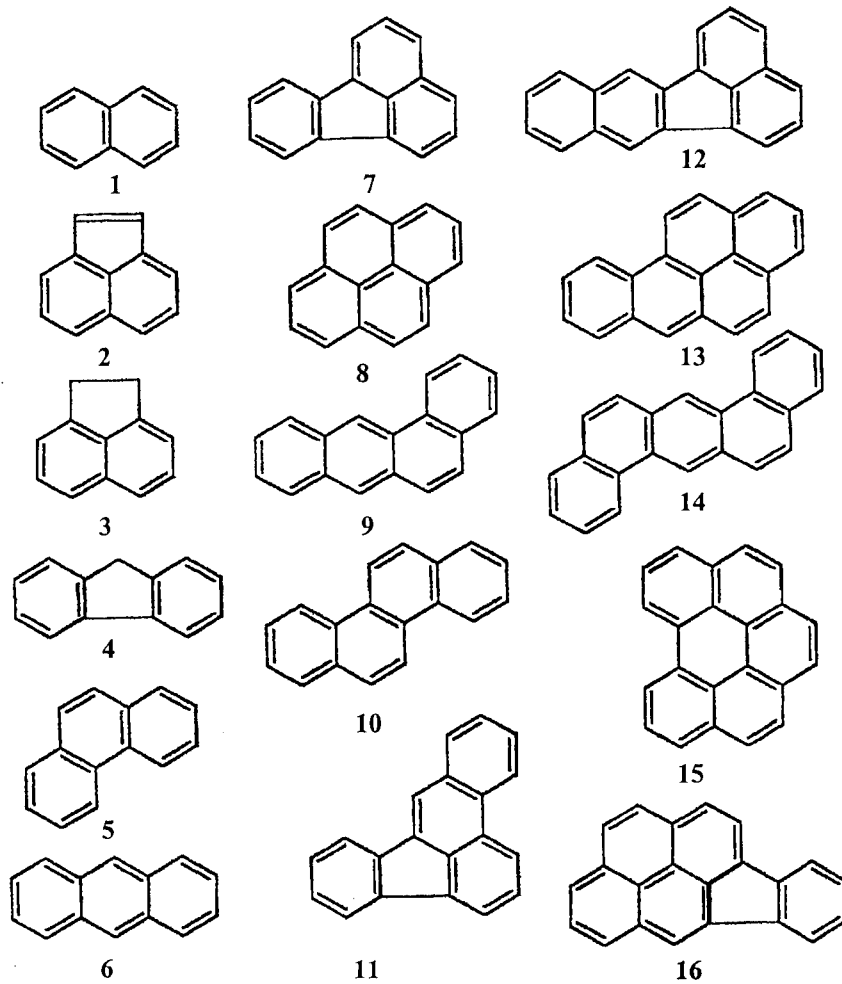
Os PAHs são constituídos pela fusão de três ou mais anéis aromáticos, contendo, por definição, apenas carbono e hidrogénio [2]. Integram um grupo mais lato, os compostos aromáticos policíclicos (PACs), que incluem PAHs contendo grupos hidroxilo, amino, nitro, ciano, carboxi ou cloro ligados aos anéis da unidade estrutural básica [3].

Os átomos de carbono dos anéis benzénicos podem ainda ser substituídos por azoto (azo-PAHs), enxofre (tio-PAHs) e oxigénio (oxo-PAHs). Estes análogos heterocíclicos têm origem símil aos PAHs, ocorrem com estes no ambiente (geralmente em concentrações muito inferiores) [4] e possuem propriedades e comportamento químico semelhantes [5].

Até à data, mais de 100 PAHs foram caracterizados na natureza, 16 dos quais foram classificados pela *Environmental Protection Agency*, EPA, como poluentes prioritários (Figura 1).

No Quadro I apresentam-se os PAHs classificados como “prováveis carcinogénicos humanos”, bem como, quando disponível, a sua estimada potência relativa, de acordo com a EPA [6]. Deste grupo, o benzo[a]pireno e o dibenz[a,h]antraceno são referenciados como os mais carcinogénicos [7].

Figura 1: Representação da estrutura molecular dos 16 PAHs considerados poluentes prioritários pela EPA adaptado de [8]



- 1- naftaleno 2- acenaftileno 3- acenafteno 4- fluoreno 5- fenantreno 6- antraceno
 7- fluoranteno 8- pireno 9- benz[a]antraceno 10- criseno 11- benzo[b]fluoranteno
 12- benzo[k]fluoranteno 13- benzo[a]pireno 14- dibenzo[a,h]antraceno
 15- benzo[g,h,i]perileno 16- indeno[1,2,3-cd]pireno

**Quadro I: PAHs prováveis carcinogêneos humanos
e potência relativa estimada**

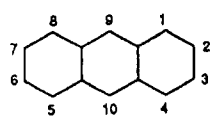
Hidrocarboneto aromático policíclico	Ordem de grandeza da potência relativa
Benzo[a]pireno	1,0
Benz[a]antraceno	0,1
Benzo[b]fluoranteno	0,1
Benzo[j]fluoranteno	
Benzo[k]fluoranteno	0,01
Criseno	0,001
Ciclopenta[cd]pireno	
Dibenz[a,h]antraceno	1,0
Dibenzo[a,e]fluoranteno	
Dibenzo[a,e]pireno	
Dibenzo[a,h]pireno	
Dibenzo[a,i]pireno	
Dibenzo[a,l]pireno	
Indeno[1,2,3-cd]pireno	0,1

Adaptado de [6]

2. ESTRUTURA QUÍMICA

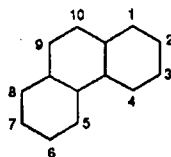
A fusão interanelar pode ser linear (todos os anéis em linha), angular (anéis em escada) ou condensada (pelo menos um anel rodeado em 3 lados) (Figura 2) [2,9]. Os vários tipos de arranjo molecular diferem quanto à estabilidade (por ordem decrescente: angular, condensada e linear) [2].

Figura 2: Tipo de fusão dos PAHs [9]



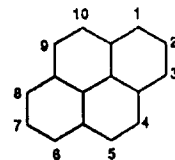
antraceno

fusão linear



fenantreno

fusão angular



pireno

fusão condensada

Os PAHs podem ser classificados, de acordo com a natureza dos seus anéis, em alternantes, quando são constituídos pela fusão de anéis benzênicos a uma molécula de benzeno, e não alternantes, no caso da estrutura conter unidades anelares com diferente número de átomos de carbono [4].

Estes compostos, mesmo os de peso molecular mais baixo, têm um elevado número de isómeros, o qual depende do número de anéis benzênicos [10]. Esta diversidade resulta da peculiaridade das suas ligações, da possibilidade de formação de derivados alquilados e substituídos (grupos alquila, hidroxilo, amino, etc.) [9] e da substituição de um, ou mais, átomos de carbono dos anéis benzênicos por oxigénio, azoto ou enxofre [10]. Esta conjuntura faz com que as misturas de PAHs, resultantes de uma combustão, por exemplo, sejam normalmente muito complexas [9].

3. CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS

Os hidrocarbonetos aromáticos apresentam pesos moleculares (PM) relativamente elevados [10,11], como é o caso do indeno[1,2,3-cd]pireno (PM= 276) e do dibenzo[a,h]pireno (PM= 302) [12,13].

Os PAHs podem apresentar-se na forma sólida cristalina ou líquida e serem incolores ou de cores variadas [2]. À temperatura ambiente são, geralmente, sólidos e têm baixa volatilidade [3]. Podem, no entanto, sublimar ligeiramente, em condições normais [13].

As propriedades físicas, como o ponto de fusão, o ponto de ebulição, a pressão de vapor e a solubilidade em água dependem, entre outros factores, da sua massa molecular, da estrutura e do grau de insaturação [6]. Os PAHs apresentam, de uma forma geral, baixa solubilidade em água (da ordem dos $\mu\text{g}/\text{kg}$) [14], pontos de fusão e de ebulição elevados [15] e baixa pressão de vapor [16]. Devido à sua baixa tensão de vapor, os PAHs estão frequentemente ligados à matéria particulada do ar, nomeadamente às partículas de exaustão de motores [17]. Um aumento da massa molecular (n.º de anéis aromáticos) traduz-se numa diminuição da solubilidade em água e pressão de vapor, e num aumento dos pontos de fusão e ebulição [18].

A hidrofobia é uma peculiaridade destes compostos; são solúveis na maioria dos solventes orgânicos e relativamente insolúveis em água [3]. A natureza hidrofóbica dos PAHs confere-lhes tendência para bioacumulação nos tecidos adiposos dos organismos expostos ao longo da cadeia trófica [6].

A presença de oxigénio, e de outros agentes oxidantes, induz um aumento significativo na velocidade de degradação dos PAHs [19]. A maioria destes hidrocarbonetos pode ser foto-oxidada e degradada a substâncias mais simples [3], sendo a luz ultravioleta mais eficiente [19]. Todavia, a sensibilidade à luz não é uniforme para todos os PAHs; uns são particularmente fotossensíveis, enquanto outros não são afectados. O aumento da intensidade luminosa, da concentração de oxigénio e da temperatura, mas não do pH e da força iónica, aceleram a degradação do benzo[a]pireno (B[a]P) [20].

Devido a este comportamento peculiar dos PAHs face à sensibilidade à degradação, as suas concentrações relativas no ambiente podem não reflectir fielmente as concentrações em que foram formados [19].

O destino ambiental dos poluentes orgânicos, e a possível introdução na cadeia alimentar, depende marcadamente da sua distribuição entre os diferentes

compartimentos ambientais. Assim, o coeficiente de absorção do solo, a solubilidade em água e o coeficiente de partição octanol/água são parâmetros fundamentais na avaliação da extensão e taxa de dissolução dos contaminantes orgânicos, bem como na apreciação do seu destino, persistência e distribuição [6]. A partir da solubilidade em água e da pressão de vapor pode calcular-se o coeficiente de Henry, importante para quantificar o equilíbrio na interface água/ar [16].

4. FORMAÇÃO

Os PAHs têm origem na combustão incompleta e pirólise da matéria orgânica e de combustíveis fósseis [3,21]. A temperaturas elevadas, os compostos orgânicos são parcialmente quebrados em fragmentos instáveis (pirólise), na maioria radicais, que se recombinam para originar PAHs relativamente estáveis (pirossíntese) [22].

Entre as fontes emissoras destes contaminantes encontram-se vários processos que envolvem combustão incompleta de combustíveis fósseis, caso das emissões de centrais térmicas, de fornos de carvão, de indústrias de ferro, alumínio e aço, de incineradoras, da queima de restolho, de motores de combustão e de aparelhos de aquecimento (domésticos ou industriais), do aquecimento central e do fumo do tabaco [3,10]. Estes processos originam, regra geral, misturas de um elevado número de compostos aromáticos policíclicos de grande complexidade química [10,11].

A formação de PAHs é favorecida pela combustão entre 500 e 900°C - particularmente acima de 700°C [9]. A aromatização também pode ocorrer a temperaturas inferiores (100-150°C), como no caso da génese de combustíveis fósseis [23]. A combustão a temperaturas muito elevadas resulta em misturas relativamente simples de PAHs de baixo peso molecular, não alquilados [11,23]. Pelo contrário, processos que envolvam temperaturas mais baixas, originam misturas mais complexas, com predomínio dos derivados alquilsustituídos [11,23]. Neste caso, a formação de grupos aromáticos desenrola-se a uma velocidade menor e a fragmentação dos grupos alquílicos é menos favorecida [2,4].

Outro parâmetro fundamental para o espectro de substâncias obtidas é a razão comburente (oxigénio)/ combustível. Geralmente, a formação de PAHs é favorecida na razão inversa desta relação [11].

A distribuição ubiqüitária no ambiente destes hidrocarbonetos levou à proposição da formação endógena, por plantas e microrganismos, directamente ou por transformação de precursores. No entanto, não há, de todo, uma opinião consensual entre a comunidade científica quanto a esta hipótese teórica [23].

No que respeita à origem, os PAHs podem resultar de processos naturais ou antropogénicos. As principais fontes naturais de PAHs compreendem emissões de vulcões e fogos florestais, processos geotérmicos [11], infiltrações naturais de petróleo e biossíntese, *in situ*, a partir de material biológico em degradação [6]. As fontes antropogénicas mais importantes incluem indústrias de produção/consumo de carvão,

betume, coque, alcatrão e asfalto, fábricas de gaseificação de carvão, casas de fumagem, incineradoras, indústrias de produção de alumínio, fumos de exaustão de veículos motorizados (máquinas de combustão interna), fogos a céu aberto (queima doméstica ou industrial de lixos domésticos e fogos florestais, acidentais ou deliberados), produção de energia eléctrica, aquecimento caseiro e derrames e descargas de petróleo [3,10,23]. O desenvolvimento industrial é responsável pelo grande aumento das emissões antropogénicas [9,13]. Estima-se que, desde a Revolução Industrial, a velocidade de deposição dos PAHs exceda a de degradação e, conseqüentemente, os PAHs se acumulem, de forma significativa, no ambiente [18].

Os PAHs de diferentes fontes apresentam padrões muito característicos, pelo que a análise da composição química das misturas destes compostos permite decifrar, com maior ou menor exactidão, as suas origens [6]. Na posse deste conhecimento, e uma vez que as fontes antropogénicas podem ser monitorizadas e controladas, é possível estabelecer medidas para eliminar ou minimizar essas descargas para o ambiente [23].

À multiplicidade de fontes geradoras de PAHs, de índole natural ou antropogénica, corresponde uma subsequente disseminação em larga escala pelo diversos compartimentos do ambiente (ar, água, solo), o que tem como consequência inevitável a sua transferência ao longo da cadeia trófica até atingir o Homem.

A poluição atmosférica, através da retenção dos PAHs da fase de vapor e da deposição dos PAHs ligados a partículas [24], é a principal responsável pela presença destes nos alimentos não processados [10]. Nos géneros processados, para além da praticamente inevitável contaminação ambiental [10], existem outras potenciais fontes de PAHs, como a contaminação acidental durante o processamento tecnológico e os tratamentos térmicos utilizados na sua preparação e manufactura. Alguns métodos de conservação, como a secagem e a fumagem, parecem contribuir para a contaminação dos alimentos com PAHs. A secagem, por aquecimento directo, dos alimentos pode originar PAHs [25,26]. Da mesma forma, a cura de alimentos pelo fumo está identificada como uma importante fonte geradora de PAHs [27], embora este problema possa, actualmente, ser ultrapassado, em parte, pelo recurso a fumos líquidos [28-30]. Similarmente, materiais de embalagem previamente tratados com óleos minerais [31,32] e aditivos alimentares (lubrificantes, solventes, agentes de envernizamento, etc.) são potenciais fontes destes contaminantes [32]. De forma semelhante, práticas culinárias que envolvam temperaturas elevadas, como assar [8], fritar [33], tostar [34], grelhar na grelha ou no churrasco [8,35] directamente sobre chamas ou carvão, contribuem para

aumentar o teor carcinogénico dos alimentos, de forma proporcional ao tempo de cocção [35], ao teor lipídico dos alimentos e à proximidade da fonte calorífica [11]. Alimentos cozinhados em panela de pressão ou aquecidos em microondas apresentam concentrações insignificantes de PAHs comparativamente às obtidas com os outros métodos de confecção [33].

Em jeito de conclusão, pode referir-se que existe uma multiplicidade de fontes e vias de exposição aos PAHs, pelo que o contacto humano com estes poluentes é, virtualmente, inevitável, suscitando algumas preocupações em termos de saúde pública.

5. PATOBIOLOGIA DOS PAHs

A presença ubiqüitária dos PAHs no ambiente em geral, e nos alimentos em particular, suscita alguma apreensão. Para além da atenção prestada por serem poluentes ambientais, emergem outras preocupações que têm directamente a ver com as suas potenciais propriedades toxicológicas para os humanos. A exposição a estes hidrocarbonetos constitui um problema de saúde pública, particularmente em áreas industrializadas [36]. O principal motivo de inquietação acerca da exposição humana a PAHs é a evidência de carcinogenicidade demonstrada, em experimentação animal, por certos compostos deste grupo [7]. No entanto, têm sido atribuídas outras manifestações toxicológicas específicas a estes compostos, nomeadamente imunossupressão, actividade estrogénica e anticolinesterásica e indução de enzimas microsossomais [3].

Carcinogenicidade

A actividade carcinogénica dos PAHs tem sido um tópico de pesquisa desde a observação original de *Sir Percival Pott*, no século XVIII (1775), relativa ao aumento da incidência de cancro do escroto em limpadores de chaminés, como resultado da exposição à fuligem [11]. Passaram mais de 150 anos até Cook e colaboradores confirmarem finalmente que os agentes cancerígenos presentes na fuligem eram PAHs, mais precisamente o dibenz[a,h]antraceno e o benzo[a]pireno [23].

Desde então, diversas pesquisas epidemiológicas estabeleceram uma relação entre a exposição a PAHs e um risco aumentado de vários tipos de cancro, nomeadamente do pulmão [37,38] e pele [39] (órgãos mais frequentemente implicados) e, possivelmente, também do estômago e esófago [40], da faringe e das vias urinárias [3,33,36].

Nem todos os PAHs exibem actividade biológica pejorativa; alguns pura e simplesmente não manifestam carcinogenicidade [41]. E mesmo quando o fazem, podem-se encontrar, inclusivamente, variações significativas entre isómeros, como, por exemplo, entre o benzo[a]pireno e o benzo[e]pireno [23]. De acordo com a IARC [7], 11 PAHs provaram ser carcinogénicos para roedores. A maior parte dos PAHs de menor peso molecular exibem uma actividade mínima na indução de tumores. Ao invés, os PAHs de maior massa molecular estão envolvidos na formação de tumores e cancro em mamíferos de laboratório e em humanos [42]. Entre os PAHs mais frequentes, foram

identificados como carcinogêneos o benzo[a]pireno, o 3-metilcolantreno, o benz[a]antraceno e o dibenz[a,h]antraceno [11].

A potência carcinogénica dos PAHs parece relacionar-se com a sua capacidade de ligação ao ADN [43]. Aliás, a formação de produtos de reacção com o ADN, os chamados aductos de ADN, é considerada o acontecimento inicial na carcinogénese química [36]. Dependendo da velocidade e eficiência da reparação, alguns aductos podem ainda estar presentes no ADN durante a replicação e, conseqüentemente, surgirem mutações no ADN [36]. No entanto, para se ligarem covalentemente ao ADN, ARN ou proteínas, de forma a expressar o seu potencial biológico como agentes mutagénicos e carcinogêneos, os PAHs precisam ser bioactivados [4].

Os PAHs são quimicamente inertes e requerem transformação metabólica (bioactivação) a metabolitos reactivos tóxicos para exibirem as suas propriedades mutagénicas e carcinogénicas [44]. A bioactivação de PAHs *in vivo* ocorre por acção de uma série de enzimas, principalmente presentes nos tecidos hepáticos, nomeadamente mono-oxigenases e epóxido-hidrolases [9]. Discrepâncias interindividuais nas actividades destas enzimas podem explicar diferentes susceptibilidades aos efeitos cancerígenos dos PAHs [45]. Compreende-se, deste modo, a influência que o polimorfismo genético pode ter na sensibilidade individual a estes carcinogêneos.

As mono-oxigenases multifuncionais (MFO) do citocromo P450, chamadas hidroxilases dos aril hidrocarbonetos (AHH), são as responsáveis pelo passo inicial da activação metabólica dos PAHs [11,46]. As AHH metabolizam os PAHs a epóxidos, pela adição de oxigénio à sua estrutura aromática. Estes podem sofrer rearranjo espontâneo a fenóis ou sofrer transformação metabólica posterior [9,11]. Esta pode envolver a hidratação dos epóxidos, por epóxido hidrolases, a derivados dihidrodiol, que são, depois, oxidados a diol-epóxidos [9,19,11]. Outras reacções possíveis incluem a conjugação dos intermediários oxigenados com compostos hidrofílicos - glutatona ou outros substratos, para formar derivados muito polares (glucoronídeos, glicosídeos e mercapturatos), mais facilmente elimináveis [11].

Foi proposto que as verdadeiras espécies activas sejam os diol-epóxidos com região em baía, uma vez que são os principais aductos de ADN formados *in vivo* e pela sua potência mutagénica em testes com bactérias e células de mamíferos [4,36].

Para além da formação de diol-epóxidos, a activação metabólica dos PAHs também se pode dar após oxidação, com formação de catiões radicalares intermediários. Estes apresentam capacidade para se ligarem directamente aos locais nucleofílicos dos ácidos

nucleicos, formar aductos covalentemente ligados e, desta forma, induzir mutações que poderão levar à formação de tumores [4,47].

Alguns autores [47] consideram que a activação metabólica dos PAHs mais potentes ocorre principalmente pela formação de catiões radicalares e que os outros mecanismos, como a via de diol-epóxido ou a epoxidação de uma dupla ligação reactiva, têm um papel secundário. O potencial de ionização relativamente baixo e a mesma localização da carga no catião radicalar dos PAHs carcinogéneos mais potentes reforçam esta teoria [47].

Existem ainda outros mecanismos envolvidos na formação de aductos de ADN, que envolvem a conversão de metabolitos dihidrodiol, por dehidrogenases, a ortoquinonas que se podem ligar covalentemente ao ácido nucleico ou, na presença de oxigénio, dar origem a espécies reactivas de oxigénio, caso dos radicais hidroxilo (OH \cdot) e aniões superóxido (O $2^{\cdot-}$), que são muito instáveis e têm a capacidade de atacar o ADN [4].

Actividade estrogénica

A semelhança estrutural dos PAHs com os estrogéneos levou à teorização que teriam capacidade de ligação ao receptor dos estrogénios (ER) e, por conseguinte, exerceriam, eventualmente, actividade estrogénica ou antiestrogénica. De facto, em trabalhos recentes [48-51] tem sido sugerido que alguns PAHs com 4 ou 5 anéis podem interagir com as vias de sinalização dos receptores α e β dos estrogénios, interferindo potencialmente com a sinalização estrogénica. A maioria dos PAHs com 2-6 anéis não parecem ser capazes de se ligarem ao ER α , enquanto certos compostos com 4 ou 5 anéis como, por exemplo, o benzo[a]pireno, o benz[a]antraceno, o benzo[b]fluoranteno e o benzo[c]fenantreno parecem exibir interacção agonista com este receptor [51].

O B[a]P também demonstrou uma actividade significativa relativamente ao 17 β -estradiol [52]. A resposta parece ser mediada pelo ER, na medida em que a adição de um antagonista deste receptor (ICI 182,780) inibiu completamente a actividade do B[a]P e do 17 β -estradiol [50]. A adição de α -naftoflavona, um antagonista do receptor Ah e inibidor do citocromo P450, inibiu a resposta estrogénica do B[a]P, pelo que parecem ser os metabolitos deste composto os responsáveis pelo efeito estrogénica antes observado [50]. Aliás, o facto de o ICI, mas não a α -naftoflavona, bloquearem a

resposta dos derivados hidroxilados do B[a]P, é um indicador de que são estes as espécies estrogénicas activas, utilizando o ER como mediador [50].

Em adição à fraca actividade estrogénica, sugere-se também que alguns PAHs possuam actividade anti-estrogénica, como foi demonstrado pela capacidade do B[a]P para diminuir os níveis nucleares do ER em células do cancro da mama [48] e na inibição, por vários PAHs, da actividade induzida pelo 17β -estradiol em leveduras que expressavam ER humanos [49].

Uma vez que a grande maioria destes estudos ocorre *in vitro*, a extrapolação para respostas específicas *in vivo* é desafiadora e deve ser cautelosa. Por exemplo, metabolitos hidroxilados do B[a]P que se exibiram como agonistas *in vitro*, não mostraram afectar, *in vivo*, dois efeitos induzidos pelo 17β -estradiol (peso uterino em ratos e expressão do mRNA da lactoferrina uterina) [51].

O facto dos metabolitos dos PAHs potencialmente exercerem actividade estrogénica, é mais um dos efeitos induzidos por este grupo de carcinogénicos. Ainda que as interacções relatadas entre PAHs e o receptor dos estrogénios sejam relativamente fracas, o elevado número de compostos deste grupo, aliado à sua ubiquidade, contínua emissão e tendência para acumular, justificam mais pesquisa neste âmbito.

Impacto no desenvolvimento fetal

Ganha cada vez mais consistência a ideia que a exposição materna à poluição ambiental, nomeadamente a PAHs, se pode traduzir em consequências adversas no final da gravidez [53]. Aliás, a fetotoxicidade dos PAHs foi demonstrada em experimentação animal: a exposição pré-natal ao B[a]P demonstrou afectar o desenvolvimento e viabilidade fetal e foi responsável pela diminuição de peso de ninhadas em ratinhos [54]. Em humanos, a maior actividade genotóxica e embriotóxica da matéria particulada surgiu nas fracções particularmente ricas em PAHs [55]. Neste contexto, foi observada recentemente [56] uma associação consistente entre a exposição materna a matéria particulada ambiental com PAHs carcinogénicos adsorvidos, nas fases precoces da gestação, e um atraso do crescimento intrauterino. O primeiro mês de gestação foi identificado como o período crítico para os efeitos da exposição a PAHs no crescimento fetal [56].

A capacidade dos PAHs alcançarem o tecido placentário foi sugerida em diversos estudos. Foram detectados aductos de PAHs-ADN na placenta e vários órgãos fetais em

bebés [57], sugerindo que estas estruturas são alvo de ataque por parte destes hidrocarbonetos. Srám *et al.* [57] observaram que o atraso no crescimento intrauterino se relacionava positivamente com o nível de aductos de ADN-PAHs na placenta.

Ainda pouco se sabe acerca do possível mecanismo explicativo da influência dos PAHs no crescimento fetal, apesar de haver alguma informação que pode contribuir para uma explicação plausível. Estudos recentes [57,58] indicam que os PAHs podem modular directamente, numa fase precoce, a proliferação e função endócrina do trofoblasto, devido à sua reacção com os receptores dos factores de crescimento da placenta, nomeadamente o factor de crescimento epidérmico (EGF) e o factor de crescimento semelhante à insulina (IGF). Desta forma, as trocas feto-placentárias e, conseqüentemente, a nutrição e crescimento fetal, podem ser prejudicadas.

Foi ainda sugerida [56] uma predisposição genética à indução da actividade das AHH, levantando a hipótese do genótipo dos pais determinar os efeitos dos PAHs no desenvolvimento fetal do descendente. A elucidação da influência do polimorfismo genético no desenrolar da gravidez, e especificamente no atraso de crescimento intrauterino, vai, certamente, ser um tema de futura investigação.

Actividade anticolinesterásica

Os PAHs parecem inibir, de forma competitiva, a actividade das acetilcolinesterases, aumentando, deste modo, a concentração de acetilcolina na fenda sináptica, que se traduz numa sobre-estimulação dos receptores colinérgicos muscarínicos e nicotínicos no sistema nervoso central e periférico. Os PAHs com três ou mais anéis aromáticos parecem ser os que exibem o maior efeito inibitório, enquanto que aqueles com menor número de anéis aromáticos ou os oxo-PAHs, inibem pouco, ou não inibem por completo, a actividade das acetilcolinesterases [17].

Propriedades imunossupressoras

Determinados PAHs parecem interferir, de forma inibitória, na normal actividade do sistema imunitário. A actividade imunotóxica dos PAHs foi demonstrada experimentalmente em animais. Wim Jong e colaboradores [59] observaram o carácter tóxico do B[a]P administrado oralmente a ratinhos, quer ao nível geral, como indicado pelo efeito no peso corporal, quer imunológico. Foi observado um decréscimo dose-

dependente no peso do timo e dos gânglios linfáticos e na quantidade de células nucleadas presentes no baço, medula óssea e em circulação. Os efeitos da exposição ao B[a]P também se fizeram sentir ao nível da produção de anticorpos, como indicado pelas reduções nos níveis séricos de IgM e IgA [59]. É de salientar que os efeitos no sistema imunitário ocorreram com doses menores em relação à toxicidade geral.

Partindo do pressuposto do equipamento imunitário poder funcionar como um sistema de vigilância contra o cancro, o efeito imunossupressor de alguns PAHs pode desempenhar um papel na carcinogenicidade destes, aliado à actividade genotóxica directa e epigenética. O 7,12-dimetilbenz[a]antraceno, o benzo[a]pireno, o 3-metilcolantreno e o benz[a]antraceno são exemplos de PAHs que, para além da actividade cancerígena, demonstraram ter efeitos imunossupressores [3,60]. O efeito imunossupressor do 7,12-dimetilbenz[a]antraceno observou-se pela diminuição, a longo prazo, da produção de anticorpos e linfócitos T [3]. Outros PAHs, como o benzo[e]pireno e o antraceno, não são carcinogéneos nem imunossupressores [60].

Os mecanismos biológicos pelos quais estes compostos inibem o sistema imunitário ainda não estão bem esclarecidos, sendo necessária mais pesquisa neste domínio. Entre os propostos incluem-se: interacções com o receptor Ah, efeitos de perturbação da membrana, produção alterada de interleucina, perturbação da mobilização de cálcio intracelular e activação metabólica a metabolitos reactivos que, por sua vez, reajam com ADN ou proteínas nos tecidos imunitários [61].

A imunotoxicidade dos PAHs é ainda um campo de pesquisa com extensas áreas por explorar e constituirá, certamente, um dos focos de estudo dos PAHs mais dinâmicos nos tempos mais próximos.

6. A ALIMENTAÇÃO COMO FONTE DE EXPOSIÇÃO A PAHs

A disseminação generalizada de PAHs pelo meio ambiente, oriunda das mais diversas fontes emissoras, e o largo espectro de materiais que podem constituir veículos destes, estão na base de uma exposição constante, inevitável e involuntária, a este grupo de carcinogéneos. Contudo, esta ubiquidade não deve ser aceite resignadamente, como um fado toxicológico inalterável. Conhecendo e compreendendo as causas mais importantes de contaminação, e tomando medidas preventivas de forma a evitá-las/reduzi-las, pode eliminar-se uma parte significativa da exposição e conseqüente risco para a saúde.

Com o desígnio de diagnosticar a situação, foram realizadas, numa série de países, estimativas da exposição humana a PAHs, a partir de padrões de consumo alimentar e da extrapolação de dados analíticos de diferentes géneros alimentícios, ou pela análise da alimentação total, cabazes de compra ou dos principais contribuintes alimentares [9,62-80]. Da observação atenta dos resultados destas investigações, sobressai a importância da alimentação como veículo privilegiado deste grupo de químicos. De facto, apesar de *à priori* se parecer tratar de um problema de contaminação ambiental, os estudos não confirmam esta premissa. Os diversos trabalhos apontam, para não fumadores e indivíduos não expostos profissionalmente, a alimentação como a principal fonte de exposição humana aos PAHs; variável passível de manipulação, em maior ou menor escala, pelos indivíduos. Parece, então, que a pedra angular da redução da exposição a estes carcinogéneos depende de cada um de nós; ou seja, o Homem tem um papel activo na exposição a que está sujeito, o qual passa pela preparação, confecção e selecção dos alimentos que ingere e pelo controlo das emissões de PAHs que se traduzirão numa menor deposição atmosférica nos géneros alimentícios não processados.

A Academia Nacional de Ciências americana [70] estimou que a população em geral tem uma ingestão média diária de 1,6 a 16 μg de PAHs resultantes da alimentação, 0,21 μg provenientes do ar e 0,03 μg com origem na água de bebida. Aliás, e como seria de esperar pelo carácter hidrofóbico dos PAHs, a água não é uma fonte importante destes compostos, contribuindo, segundo Musial e Uthe [11], apenas com 0,1% da exposição total de PAHs.

Um estudo efectuado em Itália [64] apresentou resultados no mesmo sentido, indicando que a ingestão alimentar de PAHs (de 4 e 5 anéis) é de uma ordem de

grandeza superior à inalada com as partículas de ar citadino poluído; a exposição total de PAHs via alimentar foi calculada em 3 µg/dia por pessoa (1,4µg/dia de PAHs carcinogêneos), enquanto por via respiratória a estimativa foi de 370 ng/dia [64]. Curiosamente, o mesmo valor (3 µg/dia) foi estimado por Menzie e colaboradores [71] para a ingestão alimentar de PAHs, representando cerca de 96% da exposição total para não fumadores. Os hábitos tabágicos eram responsáveis por acréscimos de 2-5 µg/dia (1 maço/dia) até 15 µg/dia para grandes fumadores (3 maços dia). No estudo de Dennis *et al.* [62], a ingestão alimentar total de PAHs de 4 e 5 anéis cifrou-se em 3,7 µg/dia.

Um estudo realizado na Holanda [65] estimou que a ingestão alimentar diária de PAHs estava compreendida entre 1,1 e 22,5 µg. De Vos *et al.* [63] avaliaram, no mesmo país, a ingestão entre 5 e 17 µg por dia - ou seja, dentro dos valores atrás referidos - aproximadamente metade dos quais eram carcinogêneos, à semelhança dos resultados de Lodovici *et al.* [64]. Na Nova Zelândia, alguns autores [72] estimam que a ingestão alimentar média de PAHs ascenda a 1,2 µg/dia.

Após os acontecimentos bélicos de 1991 no Golfo Pérsico, uma equipa de investigação [32] do Kuwait avaliou os níveis destes compostos em diversos produtos alimentares de origem animal produzidos na região. A concentração de PAHs carcinogêneos foi relativamente baixa para a maioria dos alimentos analisados (leite de vaca e ovelha, ovos, rins de cabra e ovelha e fígado de cabra, ovelha e galinha), pelo que concluíram que a situação não era alarmante [32]. O nível de alguns PAHs (fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno e benzo[g,h,i]perileno) encontrava-se relativamente elevado em algumas amostras [32], todavia estes compostos provavelmente não representam um perigo declarado de saúde pública, pois não há evidência que sejam carcinogêneos [7].

O B[a]P é, entre os PAHs, o composto sobre o qual existem mais estudos, o que se justifica, em parte, pelas limitações analíticas de outrora e pela sua reconhecida carcinogenicidade. Existem muitos trabalhos acerca da exposição humana ao B[a]P, frequentemente usada como indicador de exposição total a PAHs. Butler e colaboradores [66] estudaram a exposição humana a este composto, tendo estimado que a ingestão alimentar (140 ng/dia) superava a quantidade inalada (12 ng/dia) e da água de bebida (0,6 ng/dia). Liyo *et al.* [73] estimaram que, para não fumadores, cerca de 70 % da exposição a B[a]P era derivada da alimentação. A alimentação afigurou-se, no trabalho de Kikawa *et al.* [74], como a principal fonte deste composto (80%), contribuindo a água de bebida com 0,2% e o ar com 19,7%. Outros autores [67] foram

mais audazes ao “responsabilizarem” a alimentação por 97% do B[a]P a que o Homem estava exposto. Waldman *et al.* [75] sublinham que os níveis de exposição são, como esperado, muito variáveis de refeição para refeição.

No estudo de Dennis *et al.* [62], o B[a]P representava 250ng/dia da ingestão alimentar total de PAHs de 4 e 5 anéis (3700 ng/dia). Um grupo de trabalho liderado por de Vos [63], ao avaliar a ingestão alimentar de PAHs dos holandeses, estimou a de B[a]P entre 120 a 290 ng/dia. Num estudo que visava avaliar os teores de ingestão diária alimentar de PAHs, efectuado em 117 amostras alimentares, verificou-se que a ingestão de B[a]P variava entre 1,7 a 160 ng/dia (média 32 ng/dia), sendo no entanto o pireno, entre os PAHs testados, o mais abundante (740 ng/dia) [76]. Num trabalho, realizado entre 1986 e 87 no Japão, a ingestão de B[a]P por mulheres foi calculada entre 22 e 41 ng/dia [76]. Shiraishi e Shiratori demonstraram que a ingestão média destes compostos por estudantes japoneses era de 60 ng/dia, variando entre 25 e 131 ng/dia [77]. Estes resultados sugerem que a ingestão média, por via alimentar, de B[a]P pelos japoneses é de, aproximadamente, 30 a 50 ng/dia [13].

Nos EUA, durante um período de aproximadamente 20 anos, foi feita uma série de estimativas da ingestão diária alimentar de B[a]P, apresentando valores de três ordens de grandeza: 140 ng [66]; 2100 ng [67]; 2200 ng [68]; 160-1600 ng [69]; 50 ng [78]; 30 ng [79]. A *Environmental Protection Agency* (EPA) avaliou também outras vias de exposição a este carcinogéneo, avançando com valores médios de 20 a 2000 ng/dia ou 0,2 a 200 ng/dia de B[a]P do ar ambiente, conforme se tratasse de um ambiente urbano ou rural, respectivamente, e de 600 ng decorrente dos hábitos tabágicos (25 cigarros/dia) [78]. Kramers *et al.* [80] adiantaram que a captação máxima de B[a]P do ar ambiente era cerca de dez vezes inferior à ingestão decorrente das práticas alimentares e equivalente a uma média de 10 cigarros por dia. Por seu lado, Bartle [9] referiu que a quantidade de PAHs ingerida pela alimentação era da mesma ordem de grandeza do tabagismo (20 cigarros/dia). A leitura científica plausível destes trabalhos permite-nos afirmar, com segurança, que os fumadores estão sujeitos a uma exposição adicional de PAHs sem, no entanto, ter convicções quanto à magnitude desta.

As estimativas da ingestão alimentar de PAHs relatadas são, e talvez inesperadamente, muito similares. As pequenas diferenças nas estimativas dos diferentes estudos podem dever-se a discrepâncias nos hábitos alimentares entre os diversos países, na avaliação da importância relativa dos componentes alimentares, na

extensão dos analitos determinados, na selecção de dados analíticos publicados e na metodologia analítica utilizada [6].

Esta epítome de estudos representativos indica que, e para a população em geral, a alimentação constitui a principal fonte de exposição humana não ocupacional a PAHs ambientais. As doses inconscientemente ingeridas na alimentação, parecem ser suficientes para causar inquietação, justificando um olhar atento da comunidade científica. Isto não significa, como é obvio, que a exposição ambiental não alimentar e ocupacional sejam inconsequentes para a saúde humana, visto que a via de exposição deva ser, quase de certeza, um factor importante.

Estudos epidemiológicos indicam que uma grande proporção dos cancros humanos é atribuível a factores alimentares [81]. Embora não haja uma evidência epidemiológica clara acerca do risco dos PAHs ingeridos nos alimentos, estes podem desempenhar um papel relevante como factor etiológico de alguns cancros humanos, na medida em que diversos compostos deste grupo demonstraram ser carcinogéneos potentes em experimentação animal [7]. Neste contexto, são poucos os trabalhos que se debruçam sobre o risco carcinogéneo decorrente da exposição alimentar, centrando-se, na sua maioria, noutras vias de exposição (ocupacional e tabágica). Têm, no entanto, sido desenvolvidas, em alguns laboratórios, avaliações do risco carcinogéneo da exposição alimentar aos PAHs [66,67].

Hattemer-Frey e Travis [67] avaliaram o risco para a saúde da população americana devido à exposição ao B[a]P. Concluíram que, e assumindo que todo B[a]P ingerido é absorvido, o risco associado a uma exposição de 2,2 µg/pessoa/dia de B[a]P (97% do qual de origem alimentar), se cifrava na probabilidade da ocorrência de 345 novos casos de cancro por milhão de pessoas, o que constituía um risco sério e inaceitável para a saúde. Butler e colaboradores [66] também avaliaram os potenciais riscos para a saúde da exposição ao B[a]P. Os riscos acrescidos de cancro ao longo da vida atribuídos à inalação e ingestão alimentar foram da ordem de 4×10^{-7} e 10^{-5} , respectivamente; ou seja, a exposição alimentar resultou num risco 25 vezes superior ao da exposição a B[a]P do ar. Apesar deste nível de risco (10^{-5}) exceder o habitualmente considerado mínimo aceitável (10^{-6}), é cerca de dez vezes inferior ao estimado para certos poluentes ambientais, como por exemplo o benzeno no ar interior, o clorofórmio em água de bebida e as dioxinas e os furanos nos alimentos [82].

Neste sentido, pode-se concluir que a redução da exposição humana a PAHs é inequivocamente vantajosa em termos de saúde pública e pode - e deve - ser alcançada,

em parte, pela redução da exposição alimentar através, por exemplo, de alterações nas práticas culinárias e da redução da deposição destes contaminantes ambientais nos alimentos. A quantidade disponibilizada pelos alimentos depende de vários factores, nomeadamente da quantidade consumida dos vários géneros alimentícios, da sua concentração em PAHs e da eficiência de absorção destes [11]. Contudo, há pouca informação acerca da absorção intestinal dos PAHs veiculados nos alimentos, embora se pense que possa ser fortemente influenciada pelos outros componentes alimentares. Este assunto será discutido, mais pormenorizadamente, adiante.

7. PRINCIPAIS CONTRIBUINTES ALIMENTARES

Pelo referido, e constituindo a alimentação humana o foco capital de contaminação de PAHs - pelo menos para indivíduos não fumadores ou expostos profissionalmente, é legítima a averiguação sobre os géneros alimentícios principalmente envolvidos. Neste sentido, é importante considerar não apenas a concentração em PAHs dos alimentos, mas também atender à sua contribuição relativa no padrão alimentar, ou seja às quantidades em que habitualmente são consumidos.

Foram efectuadas diversas investigações [26,62-64,71], utilizando diferentes abordagens metodológicas, para determinar o nível de ingestão de PAHs associado à alimentação e discriminar as contribuições relativas dos diferentes itens alimentares. De uma forma geral, nestes estudos, os alimentos são divididos por grupos alimentares (fruta, hortícolas, óleos e gorduras, carne e peixe, etc.), sendo cada um destes analisado separadamente.

Dennis e colaboradores [62] avaliaram a ingestão alimentar total de PAHs no Reino Unido em 3,7 µg/dia, tendo observado que as maiores contribuições eram da responsabilidade dos grupos dos cereais (pão, bolachas, bolos, etc.) e dos óleos e gorduras, contribuindo cada um destes com aproximadamente um terço do total da ingestão. Estes dois grupos de alimentos justificavam também cerca de 80% da ingestão alimentar de B[a]P, estimada em 250 ng/dia. Os hortofrutícolas e os açúcares contribuíam com uma grande parte do restante; as quotas de carne, peixe, leite e bebidas eram comparativamente menores (deve ter-se em conta que os churrascos não são uma actividade frequente no Reino Unido como o são nos EUA, por exemplo). As amostras cerealíferas examinadas não possuíam uma concentração particularmente alta de PAHs, mas contribuíam significativamente para o aprovisionamento de PAHs, em virtude das doses relativamente elevadas de ingestão [62].

De forma a escarpelizar mais as suas observações, Dennis *et al.* [26] analisaram em detalhe uma série de produtos cerealíferos e de óleos e gorduras. Nesse estudo [26], o grupo dos cereais foi sub-dividido: um conjunto incluía o pão (grupo A), enquanto o outro (grupo B) englobava farinha, biscoitos, bolos e cereais de pequeno-almoço. Observaram-se diferenças marcadas nas concentrações de PAHs entre os grupos: os valores encontrados no pão correspondiam a cerca de metade dos observados nos outros produtos à base de cereais. Estas observações vão de encontro ao trabalho de Vaessen e colaboradores [65] que detectaram níveis de PAHs totais, em média, duas vezes

superiores em biscoitos comparativamente com o pão. Excluída a hipótese de serem, quer a utilização de farelo, quer o uso de fornos a gás na cozedura do pão, os responsáveis pela assimetria entre os grupos A e B [26,65], os dados sugerem que a discrepância possa ser devida à contribuição significativa, no grupo B, de alimentos que exigem normalmente mais gordura na sua preparação do que o pão. De facto, as maiores concentrações de B[a]P (2,2 µg/kg) foram detectadas em pudins, biscoitos e bolos, todos contendo óleos vegetais como ingrediente. Estes parecem, desta forma, contribuir significativamente para os valores de PAHs encontrados no grupo dos cereais e derivados [26]. A plausibilidade desta especulação assenta no facto dos óleos e gorduras serem, como referido anteriormente, um dos principais fornecedores destes compostos carcinogéneos na alimentação humana.

Quando dissecado o grupo dos óleos e gorduras observou-se que, e por larga distância, a maior contribuição de B[a]P se devia às margarinas (70%), sendo também contribuintes relevantes os óleos vegetais (11%) e o sebo (9%). Ao invés, a contribuição da manteiga (3%) e do queijo (2%) foram mínimas, apesar de no conjunto estes géneros alimentícios corresponderem a 44% do peso do grupo [26]. Os níveis de PAHs determinados em óleos e gorduras de origem vegetal foram mais elevados e mais variáveis do que os de origem animal, que, regra geral, foram baixos. No sebo, por exemplo, a concentração média de B[a]P foi de 0,36 µg/kg, enquanto na manteiga foi de 0,06 µg/kg, o que está de acordo com outros trabalhos; Hopia e colaboradores [83] inclusivamente não encontraram B[a]P nesta matriz. Os teores observados em produtos lipídicos vegetais foram superiores, com uma concentração média de B[a]P de 1,29 µg/kg nos óleos vegetais e de 1,68 µg/kg nas margarinas [26]. Um espectro mais largo de valores deste contaminante foi determinado em óleos vegetais holandeses (de 0,3 a 26,1 µg/kg) [84]. No trabalho de Dennis e colaboradores [26] verificou-se uma grande variabilidade dos teores de PAHs em diferentes lotes de mesmo produto. Citam-se, como exemplo, dois lotes de margarina da mesma marca, em que um apresentava um valor 20 vezes superior ao outro [26].

Lodovici e colaboradores [64] avaliaram o teor de PAHs em 33 alimentos comumente consumidos em Itália. A ingestão diária de PAHs totais foi estimada em 3 µg/pessoa, sendo perto de metade (1,4 µg) contributo dos componentes carcinogéneos desta família. Os níveis mais elevados de PAHs totais foram encontrados em pizza, cozinhada em fornos a lenha, e em carnes de porco e vaca grelhadas. Outros géneros alimentícios também apresentaram concentrações relativamente elevadas, como

hortícolas folhosos, chocolate, fruta, carnes curadas, carne frita, beterrabas, abóboras, maçãs, pão, etc. Ao invés, foram detectados níveis reduzidos em batatas, peixe cozinhado, bebidas e ovos [64]. Os produtos cerealíferos e lácteos, carne e hortofrutícolas foram identificados como os maiores contribuintes para a ingestão de PAHs totais, como consequência do padrão de consumo característico dos italianos [64]. Pelo contrário, alguns produtos alimentares com elevadas concentrações de PAHs, como a pizza e a carne grelhada, contribuíam apenas marginalmente para o aporte de PAHs totais, devido ao seu modesto consumo [64].

Num estudo na Holanda, de Vos e colaboradores [63] analisaram 220 itens alimentares diferentes e estimaram que a média de ingestão diária na alimentação estava compreendida entre 5 e 17 $\mu\text{g}/\text{pessoa}$, contribuindo os PAHs carcinogêneos com sensivelmente metade da exposição, sendo grande a proporção proveniente de açúcares e doces, cereais, nozes, óleos e gorduras. Estes autores [63] identificaram os produtos cerealíferos como a principal fonte de PAHs, representando, também, os óleos vegetais uma parcela muito importante da exposição.

Estes dois estudos [63,64], apesar das diferenças metodológicas, apresentam resultados muito semelhantes. De facto, e não obstante as apreciáveis diferenças entre a alimentação do norte e sul da Europa, foi observado um perfil similar em relação aos principais grupos alimentares fornecedores de PAHs [64]. Foram encontradas diferenças significativas no grupo dos óleos e gorduras, contribuintes importantes de PAHs na alimentação dos holandeses e percentualmente negligenciáveis na alimentação italiana. As diferenças de consumo entre estas populações (75g/dia na Holanda e 40,2g/dia em Itália) podem ajudar a explicar a discrepância observada. No trabalho de de Vos e colaboradores [63] observou-se também uma contribuição significativa do grupo dos açúcares e doces para a ingestão diária de PAHs. Pode especular-se que, e na medida em que estes géneros alimentícios requerem frequentemente a adição de óleos e gorduras, possam ser contaminados por estes últimos.

Menzie *et al.* [71] estimaram o nível de ingestão de PAHs em 3 $\mu\text{g}/\text{dia}$ e concluíram que uma alimentação vegetariana, rica em hortícolas folhosos e cereais não refinados, podia resultar numa ingestão elevada comparativamente a uma alimentação dita normal. A exposição também era elevada em dietas que privilegiavam carne e peixe grelhados ou fumados [71].

Estes trabalhos dão resultados bastante próximos nas estimativas de exposição e nas concentrações nos diferentes tipos de alimentos, mas diferem na importância relativa

dos itens alimentares nos respectivos padrões alimentares. No entanto, a maioria dos estudos [26,62-65,71] responsabiliza o elevado consumo de produtos cerealíferos, óleos e gorduras e açúcar/doces, pela contribuição maioritária da alimentação para a ingestão diária humana de PAHs. Embora alguns alimentos, como carne e peixe grelhados ou fumados e moluscos contaminados, possam conter concentrações elevadas de PAHs, o seu contributo em termos absolutos para a ingestão é pouco significativo, pois regra geral são consumidos em pequena escala [9]. Assim, e a menos que o consumo desses alimentos seja anormalmente frequente, os cereais e derivados e os óleos e gorduras parecem ser os maiores contribuintes para a exposição alimentar humana a PAHs.

Ressalta, deste modo, a importância dos óleos vegetais como fontes de PAHs não apenas *per si*, mas também pelo influência que parecem ter nos níveis elevados de PAHs em muitos doces e produtos cerealíferos, pelo facto se serem ingredientes em muitos deles.

8. PRESENÇA DE PAHs NOS ÓLEOS VEGETAIS

O diagnóstico da presença de PAHs em alimentos é um interesse de saúde pública primário, devido à reconhecida actividade carcinogénea destes compostos [7]. Tendo em consideração que os óleos e gorduras são, segundo alguns autores [26,62,63,83], veículos importantes de PAHs na alimentação, devido à sua natureza lipofílica, parece pertinente conhecer a extensão da sua contaminação e, conseqüentemente, avaliar se levantam um risco carcinogéneo acrescido para a população em geral. A comunidade científica deu a devida atenção a este facto, tendo dedicado muita pesquisa ao estudo da ocorrência de PAHs em óleos vegetais.

Os óleos vegetais, nativamente livres de PAHs, são contaminados por várias vias, tais como: a poluição atmosférica (de tráfico rodoviário, por exemplo), a secagem directa com gases de combustão dos grãos antes da extracção, a queima dos solos, o material de embalagem, a captação dos solos pelas oleaginosas, o contacto com solventes de extracção, resíduos de óleos minerais contaminados e a transmigração de solos ou águas conspurcados com estes compostos [22,85-87].

A poluição atmosférica com poeira e matéria particulada, albergando grandes quantidades de PAHs, pode depositar-se sobre as plantas durante o período de crescimento, sendo plausível que parte desta contaminação superficial se transfira para o produto final [22]. Hopia e colaboradores [83] identificaram na maioria dos óleos vegetais que estudaram, concentrações variadas de ciclopenta(cd)pireno e benzo[b]nafto(2,1-d)tiofeno, considerados indicadores de contaminação de emissões de tráfico rodoviário. Aparentemente, a maior fonte de contaminação de óleos e gorduras é a combustão de origem antropogénica [83].

As sementes têm, no entanto, baixos teores de PAHs no momento da colheita [6]. É conceptível que as sementes possam ser contaminadas, durante as operações de colheita, transporte e armazenamento e que, mesmo após purificação e secagem, algumas dessas impurezas se mantenham. A análise de sementes de colza revelou que as partículas sólidas que as contaminavam durante a colheita, tratamento inicial, transporte e armazenamento contribuíam, em média, com 36% dos PAHs de baixo peso molecular e 64% dos PAHs de peso molecular elevado [12]. Estes PAHs estavam principalmente localizados na camada cuticular, uma vez que eram removidos facilmente dos grãos íntegros por simples lavagem com solvente orgânico (clorofórmio) num banho ultrasónico. Esta operação pode, e talvez deva, ser utilizada no processamento dos óleos

vegetais para remoção de parte dos PAHs antes da trituração, com a vantagem de que não acarreta prejuízos para o produtor, pois não parece implicar perdas significativas de óleo; apenas 0,1-0,2% do peso da amostra (provavelmente só lípidos cuticulares) são extraídos [12].

O processo de secagem directa pode, também, ser responsável por aumentos consideráveis de PAHs em alguns tipos de óleos vegetais [26,85]. Aliás, os elevados teores de PAHs detectados na maioria dos estudos para os óleos de coco devem-se ao habitual processo de secagem deste alimento [83]. No estudo de Biernoth e Rost [88] foram analisados os óleos brutos obtidos a partir de coco fresco e copra sujeita a secagem com ar quente ou por fumo. Os teores que estas amostras evidenciaram foram bastante diferentes, sendo respectivamente de 24, 1783 e 2872 $\mu\text{g}/\text{kg}$ [88].

A secagem de sementes de colza, com recurso a gases de combustão (óleo, gásóleo ou propano), provocou aumentos médios entre 41 e 126% para o fluoranteno, o pireno e o criseno, apesar de não ter tido qualquer efeito nos teores de PAHs de maior peso molecular, como o B[a]P [26]. Observou-se um aumento do benz[a]antraceno mas não foi estatisticamente significativo no intervalo de confiança a 95%. Por seu lado, a secagem pelo ar (frio ou aquecido electricamente) não resultou num aumento do teor destes compostos [26]. O controlo das condições de combustão é claramente um factor a ter em conta quanto à contaminação com PAHs durante a secagem.

A prática de incendiar os campos após a colheita é, igualmente, uma operação suspeita no que concerne à contaminação com PAHs [89]. Há ainda a possibilidade da redifusão de PAHs a partir de filmes de polietileno reciclados utilizados em embalagem de óleos [90]. A hipótese de alguns vegetais biossintetizarem ou translocarem PAHs de solos ou água contaminados não reúne consenso da comunidade científica que, regra geral, minimiza estas alternativas como focos de contaminação [91].

Cejpek *et al.* [12] não confirmaram a assunção de uma influência substancial do solvente de extracção – hexano – nos níveis de PAHs em óleos após extracção. Os relativamente maiores teores de PAHs no óleo extraído, em relação ao expresso mecanicamente, pode dever-se à maior afinidade destes pela matriz com impurezas sólidas na prensagem, sendo transferidos, na maioria, para a fase oleosa apenas na extracção.

Outra forma de contaminação pode derivar do contacto com resíduos de óleos minerais. Desta forma, a prática de armazenar e transportar sementes oleaginosas em sacos de juta tratados com este tipo de óleos pode causar migração de PAHs para os

alimentos [31]. Este tipo de contaminação é de fácil diagnóstico, pois estes óleos são naturalmente ricos em PAHs alquilados, característicos do processo de origem (geoquímico) [22]. Por vezes, vestígios de óleos lubrificantes, usados para a manutenção da maquinaria nas indústrias de extracção, podem ocasional e incredulamente, ser encontrados em óleos vegetais [22].

O tempo de armazenamento (entre a colheita e o processamento tecnológico propriamente dito) pode afectar substancialmente os teores de PAHs das sementes e consequentemente dos óleos a que dão origem. Cejpek *et al.* [12] verificaram que as sementes de colza armazenadas em silos durante vários meses (30) apresentavam níveis de contaminação significativamente inferiores (ca. 50%) aos da matéria-prima processada pouco tempo após a colheita [12].

Os resultados de alguns trabalhos [12,26] em óleos e gorduras disponíveis comercialmente têm revelado, de uma forma geral, concentrações de PAHs muito reduzidas. Uma tese explicativa plausível para este ocorrência pode ter a ver com certos procedimentos tecnológicos que parecem estar envolvidos na diminuição destes carcinogéneos nos óleos vegetais [11]. De facto, as concentrações de PAHs nos óleos vegetais brutos, preparados a maior parte das vezes a partir de sementes contaminadas por fontes ambientais, são geralmente reduzidas durante a refinação, nomeadamente nas etapas de branqueamento e desodorização [26]. Hopia *et al.* [83] detectaram teores de PAHs cerca de 10 vezes inferiores nos óleos desodorizados relativamente aos brutos correspondentes. O perfil de PAHs permanecia semelhante ao da matéria-prima, observando-se apenas um decréscimo da proporção dos PAHs de menor peso molecular [83].

Pode-se teorizar, nesta conjuntura, que os consumidores que prefiram óleos virgens prensados a frio possam obter um grau mais elevado de exposição a estes carcinogéneos.

A influência das diversas operações tecnológicas no teor total de PAHs foi objecto de estudo de diversos autores [12,26,85,89], no sentido de a melhor caracterizar, certamente movidos pela espírito curioso idiossincrático dos investigadores.

Os níveis relativamente baixos de contaminação encontrados nos óleos vegetais podem em alguns casos dever-se, também, à utilização de carvão activado no processo de refinação. Aliás, e no caso dos óleos brutos com um teor elevado de PAHs, caso do óleo de coco, tem sido recomendada [85] a utilização de carvão activado na etapa de branqueamento, considerando-se uma acção suficientemente efectiva para a redução dos

teores de PAHs com 5 e 6 anéis. O teor em B[a]P no óleo de coco pode atingir 50 µg/kg, enquanto que em muitos outros óleos vegetais não ultrapassa alguns, poucos, µg/kg [19]. Esta situação deve-se ao facto da copra, de onde o óleo é prensado, ser muitas vezes seca directamente com gases de combustão [85]. Como tal, Biernoth e Rost [88] foram os primeiros a sugerir e desenvolver um procedimento de limpeza especial para remover PAHs nesta matriz, acompanhado de filtração através de carvão activado. Demonstraram a eficiência do recurso a carvão activado: os níveis de PAHs foram reduzidos de 1923 µg/kg, em amostras de óleo de coco bruto, para 13µg/kg, nos mesmos óleos desodorizados. A partir de um óleo fortemente contaminado (1940,7 µg/kg de PAHs totais, 1844 µg/kg de baixo peso molecular e 96,7 µg/kg de alto peso molecular), Sagredos *et al.* [89] também demonstraram um descontaminação tecnológica efectiva (9,6 µg/kg PAHs totais, 9,4 µg/kg baixo peso molecular, 0,2 µg/kg de alto peso molecular). São exemplos de como o processo de refinação pode, felizmente, reduzir drasticamente a quantidade destes contaminantes.

A actividade do carvão activado não deve ser influenciada pela presença de terras no branqueamento que não parecem capazes de adsorver os PAHs dos óleos vegetais [88].

O tratamento com carvão activado adsorve principalmente PAHs condensados de peso molecular mais elevado (4-5 anéis) [22,85,87]. Ao invés, o uso da desodorização a vapor elimina a maior parte dos PAHs de baixo peso molecular (2-3 anéis), deixando os de maior peso molecular permanecerem no óleo [26,86,87]. Isto significa que estes dois tipos de tratamentos são complementares no seu efeito.

Embora as propriedades carcinogéneas dos PAHs tenham sido amplamente demonstradas em experimentação animal, a dificuldade em extrapolar dados de toxicidade deste tipo de estudos para humanos não permite a fixação de níveis inequívocos de PAHs que constituam um risco sério e real para a saúde.

Alguns países europeus, como a Alemanha, a Áustria e a Polónia adoptaram o limite legal de 1 µg/kg de B[a]P em alimentos fumados [22], mas a esmagadora maioria dos países não tem nenhum limite legal para o teor de PAHs em óleos e gorduras. Este facto não deixa de ser uma incongruência, tendo em conta que os fumados representam apenas uma pequena parte da exposição alimentar a PAHs, enquanto que a fatia atribuída aos óleos e gorduras tem uma representatividade muito maior.

De forma análoga, a legislação portuguesa não estabelece nenhum limite legal para PAHs nos óleos vegetais, mas decreta para aditivos alimentares – que devem estar isentos de PAHs [92], e águas de consumo [93]. O limite máximo admissível para águas

é de 0,2 µg/L, para o conjunto dos seguintes hidrocarbonetos: fluoranteno, benzo[b]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno, benzo[a]pireno, benzo[g,h,i]perileno e indeno[1,2,3-cd]pireno [93].

Acrescenta-se que, e ao melhor do nosso conhecimento, não existe nenhum nível de referência de “segurança” para PAHs em óleos vegetais que, mesmo sem valor legal, constituísse uma directriz.

As autoridades espanholas sentiram necessidade de legislar neste domínio [94], de forma a dar resposta à problemática de Junho de 2001, em que óleos de bagaço de azeitona apresentaram valores de B[a]P considerados preocupantes, e, pelo que nos possível saber, vão propor futuramente o façam a nível comunitário

Para colmatar o vazio legislativo, a *German Society for Fat Science* (GSFS) estabeleceu limites para óleos e gorduras refinados. Esta entidade recomenda que o teor de PAHs (fenantreno, antraceno, pireno, benz[a]antraceno, criseno, benzo[a]pireno, benzo[e]pireno, perileno, antantreno, benzo[g,h,i]perileno, dibenzo[a,h]antraceno e coroneno) não exceda 25 µg/kg e que a soma dos PAHs de alto peso molecular (benzo[a]pireno, benzo[e]pireno, benzo[a]fluoranteno, benzo[b]fluoranteno, benzo[j]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno, perileno, indeno[1,2,3-cd]pireno, dibenzo[a,h]antraceno, dibenzo[a,c]antraceno e benzo[g,h,i]perileno) se situe abaixo de 5 µg/kg [12,86,87,95].

Em diversos estudos em óleos vegetais refinados disponíveis comercialmente, aparentemente não influenciados por fontes directas de emissão de PAHs, têm sido encontrados níveis destes compostos, em termos individuais, da ordem dos µg/kg. Os hidrocarbonetos aromáticos mais frequentemente detectados têm sido o antraceno, o benz[a]antraceno, o criseno, o fluoranteno, o indeno[1,2,3-cd]pireno, o benzo[g,h,i]perileno, o pireno e o fenantreno [96].

Todavia, aparecem, amiúde, níveis particularmente elevados destes compostos. Morgante *et al.* [97] encontraram concentrações elevadas numa amostra de óleo refinado e duas amostras de azeite virgem: até 40 µg/kg de B[a]P e 196 µg/kg de fenantreno. Larsson *et al.* [85] detectaram, em óleos de coco brutos, quantidades de B[a]P e PAHs totais de 20 a 34 µg/kg e 2600 a 3700 µg/kg, respectivamente. Contudo, o produto refinado correspondente apresentou concentrações consideravelmente menores (0,1-0,3 µg/kg para o B[a]P e 2-59 µg/kg para PAHs totais). No mesmo sentido, Hopia e o seu grupo de trabalho [83] encontraram valores de 4600 µg/kg na mesma matriz em bruto, sendo que o óleo de coco desodorizado apresentava valores

médios de 92 µg/kg. Níveis extraordinariamente altos foram encontrados [98] em óleos virgens italianos obtidos de sementes de plantas expostas a emissões industriais de condensado de piche (B[a]P 60µg/kg e fenantreno 3800µg/kg) e de plantas expostas à exaustão de veículos (fenantreno 800 µg/kg).

Uma amostra de óleo de colza analisada por Dennis *et al.* [26] apresentava 60 µg/kg de B[a]P. Níveis ocasionalmente elevados de contaminação em óleos de colza brutos foram reportados por Sagredos *et al.* [89].

Kolarovič e Trailer [99] quantificaram os teores de 19 PAHs em óleos de grainha de uva, colza, girassol, manteiga de cacau, soja e 2 amostras de amendoim; os valores totais encontrados foram de 22,93, 34,61, 41,35, 57,78, 220,23, 750,25 e 129,10 µg/kg, respectivamente. O nível mais elevado de um PAH individual foi de 105,74 µg/kg para o B[a]P num dos óleos de amendoim [99].

Numa análise a 28 óleos vegetais brutos, Speer *et al.* [87] determinaram um vasto intervalo de concentrações de PAHs (0,7 a 124 µg/kg). De uma forma geral, os teores de PAHs foram baixos; os óleos de girassol, de sésamo e de gérmen de trigo analisados satisfizeram as recomendações da GSFS, tendo apenas uma amostra de óleo de cártamo não preenchido este requisito. No entanto, os resultados dos óleos de linhaça e gérmen de trigo foram notoriamente altos (76,3 e 124,2 µg/kg, respectivamente).

Gertz e Kogelheide [95] descreveram, em óleos italianos e franceses, concentrações médias de 114,7 µg/kg para os PAHs de menor peso molecular e 94,7 µg/kg para os de maior peso molecular. Entre os 11 tipos diferentes de óleos vegetais analisados, a maioria dos exemplares não refinados continha mais de 25 µg/kg de PAHs totais, enquanto que os exemplares refinados apenas ocasionalmente excediam o limite de 25 µg/kg; a exceção foram as amostras de óleo de grainha de uva, que possuíam sempre níveis elevados de PAHs. Similarmente, no estudo de Balenovic *et al.* [100] os óleos de grainha de uva exibiram níveis de PAHs de alto peso molecular (média 108 µg/kg) cerca de 15 vezes superiores aos outros óleos vegetais analisados, enquanto os teores em PAHs de menor peso molecular foram, em média, apenas o dobro dos determinados nos outros óleos. A quase totalidade dos óleos analisados por Balenovic e colaboradores [100] apresentaram PAHs totais acima de 25 µg/kg, devido fundamentalmente à grande quantidade de PAHs de peso molecular baixo, tornando-os, segundo a GSFS, impróprios para consumo humano. Estes autores [100] argumentam que o limite de 25 µg/kg para PAHs totais é algo irrealista, especialmente para produtos não refinados,

enquanto os limites de 5 µg/kg para PAHs de alto peso molecular e 1 µg/kg de B[a]P se afiguram adequados.

Sagredos e colaboradores [89] detectaram concentrações compreendidas entre 3 e 276 µg/kg (média 38µg/kg) de PAHs de baixo peso molecular e entre 1 e 20 µg/kg (média 6µg/kg) para PAHs de alto peso molecular em óleos de colza brutos. Para a mesma matriz, Grimmer e Hildebrandt [101] encontraram 1,3 a 4,0 µg/kg de B[a]P e Larsson *et al.* [85] determinou 0,6-2,1 µg/kg e 43-61 µg/kg para B[a]P e PAHs totais, respectivamente. Apesar das concentrações medianas de PAHs em óleos comercializados serem muito baixas, ocasionalmente são referidas concentrações elevadas de PAHs em óleos de colza desodorizados. Larsson *et al.* [85] reportaram níveis de 0,3-1,3 µg/kg de B[a]P e 5-12 µg/kg de PAHs totais e Kolarovič e Traitler [99] mais de 2 µg/kg de B[a]P em óleos de colza desodorizados.

Pupin e Toledo [86] avaliaram o teor de B[a]P numa série de óleos vegetais (colza, milho, soja, girassol, arroz, palma e alho) do mercado brasileiro. Este PAH foi detectado em todas as amostras, com valores máximos de 58,9 µg/kg. Os teores médios de B[a]P detectados nos óleos de arroz, girassol, soja, milho e palma foram 1,8, 0,2, 2,2, 10,8 e 2,1 µg/kg, respectivamente, não sendo detectado nos óleos de alho e colza. Os mesmos investigadores [102] estudaram o mesmo carcinogéneo em azeites brasileiros e encontraram-no em todas as amostras com valores até 164 µg/kg.

Os níveis encontrados por Pupin e Toledo [86] são similares a outros descritos na literatura. Dennis *et al.* [26] analisaram uma série de óleos (milho, soja, girassol, colza e palma), que apresentavam valores no intervalo de poucos µg/kg de B[a]P, à excepção de uma amostra de óleo de colza (68,6 µg/kg). Concordantemente, Kazerouni *et al.* [103] encontraram 0,2 µg/kg de B[a]P, como valor médio de um conjunto de óleos vegetais analisados. Welling e Kaandorp [84] determinaram 0,3-26,1 µg/kg de B[a]P em óleos vegetais holandeses, enquanto Speer e Montag [104] encontraram um espectro de < 0,1 a 4,1 µg/kg do mesmo composto em óleos de origem alemã.

Muitos dos óleos comercialmente disponíveis resultam de uma mistura de óleos provenientes de diversas localizações. Esta mescla de óleos pode ser, de acordo com Menichini *et al.* [96], um dos factores explicativos da homogeneidade dos níveis de contaminação encontrados em diferentes marcas de óleos.

9. BIODISPONIBILIDADE DE PAHs

Como foi discutido em capítulos anteriores, a alimentação é a principal via de exposição a PAHs, estando reservado aos óleos vegetais um papel de relevo, com maior ou menor impacto conforme os trabalhos. Outro aspecto que enfatiza a importância destes alimentos como fontes de PAHs tem a ver com o facto dos lípidos, possivelmente, aumentarem a biodisponibilidade intestinal de PAHs [105].

O estudo de Stravic e Klassen [105] mostrou que a absorção intestinal de B[a]P é marcadamente afectada por componentes alimentares e que a presença de qualquer alimento retarda a biodisponibilidade do B[a]P no tubo digestivo. Quando uma determinada dose de B[a]P marcado (14C) era administrada a ratos por via subcutânea, a recuperação ao final de 24 horas era de 64%, mas diminuía para 1% a 25% quando ingerida oralmente com alimentos. Os autores [105] observaram que a excreção de B[a]P na bile era inibida pela presença de água, compostos fenólicos (quercetina e ácido clorogénico) e carbono (carvão activado) mas aumentava pela adição de óleo de milho. Ou seja, a água, na qual o B[a]P não é solúvel, parece reduzir a transferência deste das partículas alimentares para a mucosa intestinal, enquanto que o óleo de milho possivelmente a aumenta. Foi já demonstrado, também, que as fibras alimentares são outro componente alimentar que adsorve fortemente o B[a]P [106].

Neste sentido, Laurent *et al.* [1] estudaram a cinética da absorção de PAHs, alimentando animais com leite contaminado com fenantreno e B[a]P marcados (14C). Os picos de radioactividade observados após 4-6 horas da ingestão de PAHs situavam-se no mesmo intervalo dos relativos à absorção da gordura láctea e eram notavelmente diferentes dos picos de absorção da glicose (45 min) e das proteínas (30 min) [1]. Estes resultados sugerem que a absorção de PAHs está, provavelmente, relacionada com a absorção das gorduras, o que inclusivamente é suportado pelo facto das cinéticas de absorção do fenantreno e benzo[a]pireno serem similares, apesar das diferenças de solubilidade em água [1].

Em resumo, a absorção intestinal de PAHs dos alimentos é um processo complexo e pouco conhecido, e pode, eventualmente, contribuir para a falta de elo epidemiológico entre a ingestão alimentar de PAHs e a incidência de alguns cancros humanos [61], apesar do forte potencial carcinogénico destes químicos demonstrado em animais de laboratório.

O facto dos óleos vegetais, para além de constituírem fontes importantes de PAHs, poderem aumentar a sua biodisponibilidade, faz deles veículos alimentares privilegiados neste tipo de contaminação, e vem justificar toda a atenção de que têm sido alvo e de que vão, concerteza, continuar a ser.

10. MÉTODOS ANALÍTICOS DE DETERMINAÇÃO DE PAHs

Os PAHs são poluentes orgânicos vastamente distribuídos pela biosfera, constituindo um problema de saúde pública devido aos efeitos toxicológicos que alguns exibem. Como tal, torna-se particularmente importante conhecer a sua presença, em termos qualitativos e quantitativos, no sentido de estimar rigorosamente o risco que representam e, no sentido de o reduzir, estabelecer medidas preventivas no que concerne à diminuição da sua formação. Na medida em que os géneros alimentícios constituem uma via privilegiada de exposição a esta família de compostos, para a qual os óleos vegetais muito contribuem, a determinação analítica de PAHs nestes é importante para a avaliação do risco carcinogénico humano oferecido pela alimentação. Neste contexto, foram desenvolvidos, desde os anos 70, diversos procedimentos para a análise multiresidual de PAHs, contudo a maioria não é satisfatória para análises de rotina, devido à sua complexidade e custo [13]. É necessário, para este desígnio, desenvolver um método que seja simples, rápido e exacto [13].

Preparação da amostra

É necessário ter um especial cuidado no manuseamento dos produtos alimentares, quando se pretende determinar quantitativamente a presença de PAHs. Estes estão normalmente presentes em concentrações vestigiárias nos alimentos, pelo que se deve ter o máximo cuidado para evitar contaminações adventícias. Nesse sentido, deve proceder-se a um armazenamento adequado das amostras, pois os PAHs são contaminantes ubíquos no ambiente. Deve, também, reduzir-se ao mínimo o contacto com plásticos, preferindo a utilização de material de vidro sujeito a um protocolo de limpeza rigoroso [6].

No sentido de se evitarem perdas indesejáveis, e na medida em que se está a lidar com um grupo de substâncias de volatilidade e solubilidade diferentes, deve ter-se muita precaução, especialmente nas etapas de evaporação de solventes, para minimizar as perdas dos voláteis PAHs de dois e três anéis [6]. Este facto faz com que a determinação destes últimos compostos seja, na maioria das vezes, apenas qualitativa.

As fases de colheita e armazenamento são delicadas devido à tendência dos PAHs para adsorverem às superfícies com que contactam, o que pode resultar em grandes e indesejáveis perdas. A adição de solventes orgânicos à amostra permite, pelo aumento

da solubilidade, minorar este problema. O uso de sais biliares, por serem anfipáticos, também contribui para reduzir este tipo de perda de analitos [107].

Um outro facto a ter em conta, é o material de que é feito o recipiente que contém a solução de PAHs; Lopez Garcia e colaboradores [108] mostraram que o polietileno acarreta perdas superiores comparativamente com o vidro.

Durante o processo analítico, a degradação de PAHs também deve ser tida em consideração, com o objectivo de melhorar as taxas de recuperação. Recomenda-se a redução ao máximo do contacto com a luz e o ar para se evitarem perdas. Takatsuki *et al.* observaram num dos seus estudos [109] que o B[a]P era facilmente decomposto em condições alcalinas, na presença de luz e oxigénio, pelos peróxidos presentes no éter etílico e pelo oxigénio. Para evitar a decomposição e obter uma boa recuperação, adicionaram sulfureto de sódio como antioxidante [109].

A análise, propriamente dita, de PAHs envolve geralmente as seguintes etapas: extracção, purificação ou limpeza, separação cromatográfica e identificação espectroscópica.

Extracção e purificação

A extracção deve ser feita o mais rapidamente possível, de forma a diminuir os efeitos de degradação e de adsorção que, como vimos, contribuem para as perdas de PAHs da amostra [110].

Duas circunstâncias tornam especialmente problemática e complexa a determinação analítica de PAHs nos alimentos e particularmente nos óleos vegetais: as concentrações extremamente baixas em que normalmente estão presentes - ao nível dos $\mu\text{g}/\text{kg}$, e o facto de se encontrarem juntamente com outros tipos de matéria orgânica - como os lípidos - que se dissolvem nos mesmos solventes e que devem ser extraídos, o mais selectivamente possível, e eliminados para uma melhor detecção e identificação instrumental [13,22]. Esta conjuntura torna necessárias, e se o objectivo é a identificação e quantificação do maior número possível de compostos presentes na amostra estudada, várias etapas de extracção e purificação muito complexas. Estas técnicas visam isolar os analitos da matriz, remover as interferências e melhorar a sensibilidade do método; contudo podem acarretar, também, riscos e erros adicionais. Neste sentido, alguns autores utilizam padrões internos para monitorizarem eventuais perdas de analitos durante a purificação e, caso necessário, corrigi-las. O composto

escolhido varia, sendo exemplos o benzo[b]criseno [99,111,112], o β,β' binaftil [85], o perileno [62], o 3-metilcolantreno [64], o 3,6-dimetilfenantreno [113], o B[a]P marcado com trítio [114], os PAHs deuterados [87,115,116] e, mais recentemente, os PAHs monofluoretados [117]. Estes últimos têm como vantagens terem propriedades físico-químicas e perfis de eluição muito similares aos PAHs, não ocorrerem naturalmente no ambiente e serem menos dispendiosos que os PAHs deuterados [117].

Está descrita uma vasta gama de métodos de extracção e limpeza da fracção de PAHs dos géneros alimentícios e as razões pelas quais os diversos autores as seleccionam são, segundo Guillén [10], aparentemente empíricas. A extracção pode recorrer a métodos que envolvam solventes ou por adsorção em fase sólida. No primeiro caso citam-se a extracção por Soxhlet, por ultrassons ou por partilha de solventes (extracção líquido-líquido). A extracção líquido-líquido é o processo tradicional de extracção dos PAHs. Requer um solvente orgânico imiscível, de elevado grau de pureza e com boas propriedades de solubilidade relativamente aos PAHs. Este processo tem algumas desvantagens: é muito demorado e requer grandes quantidades de solventes – muitas vezes tóxicos e inflamáveis [118]. As técnicas de extracção em fase sólida incluem extracção com carvão, com resinas macroreticulares (Tenax, Xad, Poliuretano), com adsorventes (gel de sílica, Alumina, Florisil, Sephadex LH-20), por fluidos supercríticos e por fases ligadas, vulgarmente empregues em HPLC, constituídas por sílica porosa ligada a grupos octadecilo (C18) ou grupos amino (NH₂) [19].

A propriedade mais importante a ter em conta aquando da extracção de um grupo de compostos de uma matriz, mais ou menos complexa, é a sua solubilidade, que no caso dos PAHs depende de três características estruturais: tamanho molecular, topologia e grau de planaridade [10]. Os PAHs são solúveis em solventes orgânicos, contudo as solubilidades são diferentes e nem todos os solventes orgânicos são igualmente efectivos relativamente a estes compostos [10]. A escolha de um solvente deve ter em conta a sua capacidade de extracção e o seu ponto de ebulição; se este for baixo está facilitada a posterior remoção do solvente. O diclorometano é um exemplo de um solvente com estas características [10]. No entanto, e de uma forma geral, estes factores não são, segundo Gullén [10], tidos em conta para a selecção do solvente que irá ser usado; a razão da escolha não é normalmente referida. Na maioria dos exemplos a escolha recai no hexano, ciclohexano ou pentano [10].

A extracção de PAHs de óleos vegetais levanta mais problemas do que, por exemplo, em água, onde a mistura desta com um solvente orgânico permite a rápida extracção dos

hidrocarbonetos. A concentração de PAHs em materiais lipídicos implica que os lípidos devam ser destruídos ou extraídos e os PAHs isolados da matriz. Os três procedimentos mais utilizados na extração de PAHs de óleos vegetais são a partição líquido-líquido, a complexação com cafeína e a saponificação [22].

Com o método de partição, a amostra de óleo é dissolvida num solvente orgânico, caso do ciclohexano [65,87,119] ou pentano [96,113], e os PAHs são extraídos com uma solução de dimetilformamida (DMF)-água (9:1) [65,87,104,119] ou dimetilsulfóxido (DMSO) [96,113], enquanto a maioria da matéria lipídica (constituída principalmente por triacilgliceróis) permanece na fase orgânica. O isolamento é levado a cabo por diluição com água, por forma a alterar os coeficientes de partição dos PAHs entre as duas fases, e nova partição com ciclohexano, que é eliminado mais facilmente (a temperaturas mais baixas). Este procedimento permite reduções do resíduo para valores próximos de 10% do valor de massa inicial [22], e recuperações, em média, entre 87 e 159% para os PAHs de quatro a seis anéis, e menores para os de três anéis [85].

Kolarovič e Trailer [99] obtiveram resultados reprodutíveis a partir de óleos e gorduras vegetais ao complexar os PAHs com cafeína, de acordo com a metodologia descrita num trabalho prévio em alimentos fumados. Trata-se de um procedimento analítico relativamente rápido para a determinação de PAHs em óleos e gorduras, tendo apresentado uma recuperação entre 68 e 95% [99]. A amostra é dissolvida em ciclohexano e os PAHs são selectivamente extraídos por meio de agitação vigorosa numa solução de cafeína-ácido fórmico. Após decomposição do complexo, com uma solução aquosa de cloreto de sódio (2%), os PAHs são re-extraídos com ciclohexano, separados por cromatografia em coluna e cromatografia em camada fina (TLC), respectivamente, e determinados por cromatografia gasosa (GC) [99].

Se as matrizes alimentares são solúveis num solvente orgânico, como o ciclohexano, as extracções estão relativamente facilitadas. No entanto, para o isolamento quantitativo dos PAHs em gorduras insolúveis e alimentos ricos em proteínas (como carne, peixe e queijo) é, segundo alguns autores [10,13,119], absolutamente necessária a saponificação alcalina da amostra, de acordo com o método proposto por Grimmer e Böhnke [119]. Os extractos obtidos desta forma contém inevitavelmente quantidades substanciais de materiais interferentes, pelo que há necessidade de se proceder à sua purificação, por intermédio de partição de solventes [9]. Alguns autores sugerem que uma digestão alcalina severa pode ter consequências ao nível dos PAHs mais lábeis da amostra [109].

Este procedimento foi utilizado na análise de uma variedade de amostras alimentares, entre as quais óleos vegetais [62-65,95,119] e visava a eliminação de gordura, de forma a libertar os PAHs antes da extracção, aumentando o rendimento desta. No estudo de Gertz *et al.* [95], o óleo é saponificado sob refluxo durante pelo menos 40 minutos com uma solução alcoólica de hidróxido de potássio e a matéria insaponificável é extraída com ciclohexano. O recurso à saponificação permite alcançar concentrações consideráveis da fracção de PAHs (obtenção de 100-200 mg de matéria insaponificável a partir de 10g de óleo) [95].

Moret e colaboradores [120] compararam os três procedimentos extractivos acima descritos, com ligeiras alterações, numa amostra de azeite. O grau de purificação obtido, bem como a capacidade de obter uma fracção isenta de esqualeno, foram diferentes entre os métodos sujeitos a comparação. O esqualeno representa uma grande fatia (ca. 50%) da matéria insaponificável do azeite e constitui um problema, na medida em que co-elui com os PAHs nos cartuchos, sendo capaz de os fixar, especialmente os mais pesados. O método de saponificação gerava resíduos de esqualeno em quantidades apreciáveis, justificando a necessidade de mais uma etapa de purificação, enquanto a partição líquido-líquido revelou um maior poder de purificação: não permaneceram nas amostras quantidades significativas de esqualeno [120]. A partição líquido-líquido, seguida de extracção em fase sólida, revelou-se o melhor método. A recuperação variou entre 42,5 e 92,2%, dependendo das massas moleculares, enquanto os coeficientes de variância (CV) variaram entre 2,5 e 12% excepto para o naftaleno (31,9%), provavelmente devido à sua volatilidade [120].

O extracto obtido de qualquer um dos procedimentos extractivos acima descritos contém, inevitavelmente, quantidades significativas de compostos, que não PAHs, que poderão interferir com as determinações analíticas posteriores. Segundo Knize *et al.* [121] estes componentes da matriz co-extraídos influenciam mais os limites de detecção do que a própria sensibilidade do detector. De forma a obviar esta ocorrência, são tradicionalmente aplicados diferentes processos de purificação, como TLC e cromatografia em coluna com diferentes materiais adsorventes [22], dependendo a escolha do procedimento do grau de pureza e a selectividade desejados. A maioria destes procedimentos assenta em etapas morosas com colunas de diferentes materiais como gel de sílica, alumina, Florisil, Sephadex LH-20, etc. Entre estas, as colunas de gel de sílica isoladamente ou em combinação com outros materiais, principalmente Sephadex LH-20, são vastamente usadas. No entanto, a preparação destas colunas é

muito morosa, requer grande quantidade de solventes e nem sempre dá resultados reprodutíveis [22].

O recurso à extracção em fase sólida (SPE) é cada vez mais comum, como técnica de extracção/purificação de amostras, particularmente quando é necessário determinar quantidades vestigiárias de compostos semi-voláteis em matrizes complexas [122]. Nesta técnica (SPE) intervêm duas fases mutuamente imiscíveis, uma sólida (enchimento) e outra líquida (eluente) [122]. Há uma grande variedade de enchimentos disponíveis, com vários graus de selectividade, sendo os mais utilizados para a extracção dos PAHs, a sílica, a sílica quimicamente ligada a C8, C18, CN e NH₂ [123]. A SPE é uma técnica de extracção simples, eficiente, económica, selectiva, permite boas recuperações e a separações de componentes interferentes, tempo de análise reduzido, exequibilidade aumentada, reprodutibilidade de resultados, segurança para o operador e meio ambiente pela redução de solventes tóxicos e inflamáveis [122]. Apresenta, no entanto, algumas desvantagens como o risco de sobrecarga do enchimento por lixiviação de amostras desconhecidas com elevado conteúdo de contaminantes, a possível perda de analitos quando se utilizam sistemas pouco conhecidos, o uso de solventes orgânicos tóxicos no passo da eluição, ainda que em menor quantidade, e o seu custo relativamente elevado [124].

Um estudo de Moret *et al.* [120] mostrou que as colunas de sílica apresentavam capacidade semelhante de purificação aos cartuchos de SPE, embora, em muitos casos, os últimos apresentassem melhores recuperações e CV. De facto, a SPE representa um avanço sobre a extracção líquido-líquido e o uso de grandes colunas com resinas XAD [125], e tem vindo progressivamente a substituí-las. As vantagens desta técnica, comparativamente à extracção líquido-líquido, são as de empregar menor volume de solventes tóxicos, reduzir o tempo de análise, possibilitar automatização e conferir maior selectividade e reprodutibilidade à extracção [126], apresentando precisão e exactidão analíticas superiores [22].

De forma a otimizar as recuperações deve-se ter em conta os factores que a modulam, como o acondicionamento do cartucho, a velocidade de passagem da amostra, a concentração de PAHs na amostra, a secagem após passagem e os solventes de eluição utilizados [99]. O primeiro passo da SPE em fase reversa (p.e. C18) é a limpeza do cartucho com um solvente apolar, como o diclorometano, que se destina a eliminar possíveis impurezas que possam interferir com a análise [127]. Após este procedimento, o cartucho é usualmente humedecido com um solvente mais polar

(metanol, acetonitrilo) para activar as cadeias octadecilo. A secagem do cartucho por vazio após a passagem da amostra melhora as recuperações de todos os PAHs, no entanto não deve ser muito prolongada – alguns minutos parecem suficientes [127], pois pode haver perdas dos compostos voláteis [128]. Entre os possíveis eluentes utilizados para a remoção dos PAHs dos cartuchos, o diclorometano e o tetrahydrofurano apresentaram melhores desempenhos (recuperações) que o acetonitrilo ou o hexano [127].

Começam a surgir novas técnicas em alternativa aos métodos tradicionais de preparação de amostras. Foi recentemente relatada a utilização de membranas semi-permeáveis como uma nova abordagem para o isolamento quantitativo de PAHs de amostras lipídicas [129]. Trata-se de um método não destrutivo, onde mais de 20 g de lípidos podem ser dializados por uma única membrana. O teor lipídico pode ser reduzido em 90 a 99%, dependendo do tipo e quantidade de lípidos.

O recurso à extracção com fluidos supercríticos (SFE) tem aumentado consideravelmente, nos últimos anos, como método alternativo às clássicas extracções e purificações com solventes. A SFE é um processo extractivo em que os solventes normalmente utilizados são substituídos por um fluido supercrítico, que na maioria das vezes é, e de forma eficiente, o dióxido de carbono. Este solubiliza não apenas os contaminantes, mas também os lípidos [22], pelo que se exige uma limpeza do extracto antes da determinação [10]. Para contornar este obstáculo, alguns autores [130] desenvolveram um método SFE que permite a extracção selectiva de PAHs em matrizes biológicas ricas em lípidos, sem a necessidade de uma limpeza suplementar, que aplicaram, recentemente, a amostras alimentares (carne fumada) [131]. Este método baseia-se na adição de esferas absorptivas C18 à da amostra inicial, que é colocada na câmara de SFE. Durante a SFE, os lípidos são preferencialmente retidos naquelas esferas C18, e os PAHs extraídos selectivamente com CO₂ supercrítico. Esta técnica, quando comparada com a SFE convencional, apresentava melhores recuperações dos PAHs (94 e 100%), enquanto apenas co-extraía 11 a 17% do material lipídico referido na metodologia clássica [131]. As técnicas de extracção por fluido supercrítico são cada vez mais utilizadas pois são mais rápidas, menos laboriosas, mais seguras, utilizam menores quantidades de solventes tóxicos, são menos dispendiosas que outras técnicas, como por exemplo a extracção por Soxhlet [132], possibilitam extracções e limpezas selectivas [22] e exigem menores volumes de amostra [131].

Perrin *et al.* [133] e van Stijn *et al.* [134] procederam à preparação da amostra por *donor acceptor complex chromatography* (DACC) com um sílica modificada (tetracloroftalimidopropilo). Esta técnica baseia-se na formação de complexos moleculares, por interacções fracas (forças de dispersão e dipolo-dipolo), entre os PAHs (dadores de electões) e a fase aceitadora, que aumentam de força com o número de anéis aromáticos. Isto resulta na retenção dos PAHs e na eluição da grande maioria dos outros componentes do óleo [134]. Após limpeza nesta coluna, os PAHs eram transferidos e separados numa coluna analítica de HPLC. Comparada com os métodos tradicionais, esta técnica hifenada poupa tempo considerável e reduz significativamente o desperdício de solvente. O uso de colunas de sílica não modificadas também pode ser vantajosamente utilizada para a separação, por cromatografia líquida (LC), dos triacilgliceróis da fracção hidrocarbonada [135,136].

Para a purificação parcial de PAHs, a cromatografia de permeação em gel (GPC) também é aplicável. Esta técnica separa as substâncias pelo tamanho molecular. A GPC parece adequada como método de controlo, para a estimativa rápida da extensão da contaminação com PAHs [13].

São usados grandes volumes de solventes durante a preparação da amostra, pelo que, e para obter um limite de detecção razoavelmente baixo, é necessário concentrar o extracto final para um volume muito pequeno. É claro que esta operação também resulta numa concentração de impurezas potencialmente interferentes. As amostras parcialmente purificadas são subsequentemente sujeitas a concentração antes da determinação cromatográfica. Neste processo, é crítico concentrar a solução (remover o solvente) cuidadosamente de forma a não secar completamente o extracto, caso contrário os PAHs de tamanho molecular mais reduzido, extremamente voláteis, caso do acenafteno, o fluoreno e o fenantreno, são facilmente evaporados, diminuindo as recuperações alcançadas [76]. Este facto determina que nalguns procedimentos, estes compostos não possam ser quantificados, procedendo-se apenas a uma avaliação qualitativa.

Separação cromatográfica e detecção

A fracção de PAHs extraída e isolada dos alimentos é uma mistura complexa de variados compostos individuais, pelo que se exigem métodos eficientes de separação, com a maior capacidade de resolução possível, acoplados a métodos de detecção

específicos [9,11]. Há uma grande diversidade de técnicas analíticas descritas para a separação e identificação destes carcinogêneos em variadas matrizes alimentares, como TLC, cromatografia com fluidos supercríticos (SFC) [137], electroforese capilar [138,139], cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), PAHs-RIS (*Rapid Immunoassay Screening*) ou cromatografia gasosa (GC). Os métodos mais frequentemente aplicados na análise quantitativa de PAHs em óleos vegetais são TLC, HPLC e GC.

A escolha do método analítico deve ter em conta a natureza e os níveis em que normalmente estes compostos se encontram na amostra [6]. Quando predominam PAHs não substituídos, a técnica de eleição é HPLC [22]. Entre as vantagens habitualmente reconhecidas à HPLC na análise de PAHs, destacam-se o grande poder resolutivo, facultado pela utilização de uma grande variedade de fases estacionárias capazes de permitirem uma boa selectividade, a possibilidade de análise de substâncias termolábeis, o curto tempo de análise, a facultade de fraccionamento dos analitos antes da aplicação de outra técnica cromatográfica ou espectroscópica e a capacidade para utilizar directamente certas propriedades moleculares dos compostos como a absorção no ultravioleta (UV) e a fluorescência [13].

A HPLC ou a RF-HPLC (cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa) podem ser usadas com igual facilidade com estes compostos, pelo que o único requerimento necessário para os PAHs serem analisados por HPLC é a sua solubilidade nos solventes comumente utilizados para cada método [23]. A cromatografia líquida em fase reversa é uma das técnicas separativas mais frequentemente utilizadas para análise de PAHs. Nesta, a fase móvel é mais polar que a estacionária e, de uma forma geral, o tempo de retenção é maior para os compostos que têm menor polaridade ou maior número de anéis aromáticos. Os materiais de enchimento são constituídos por hidrocarbonetos com diversos comprimentos de cadeia (C2, C8 ou C18), quimicamente ligados a partículas de sílica; as colunas de octadecilo (C18) são as mais comumente utilizadas para a separação de PAHs pela sua alta eficiência de resolução [140]. O modo como estas fases C18 são preparadas é um factor importante a ter em conta. Alguns dos 16 PAHs da EPA – nomeadamente, o criseno e o benz[a]antraceno, e o benzo[g,h,i]perileno e o indeno[1,2,3-cd]pireno - não podem ser separados convenientemente em colunas monoméricas [23,99], pelo que alguns produtores (Supleco e Vydac, por exemplo) fabricam enchimentos poliméricos de C18 específicos para a análise de PAHs.

A fase móvel é normalmente uma mistura de água com vários solventes orgânicos, principalmente metanol e acetonitrilo, estabelecendo-se frequentemente um gradiente [6,9,22]. Aumentando a proporção de solvente orgânico na fase móvel, diminui o tempo de retenção dos compostos menos polares. Usando uma coluna de fase reversa obtêm-se uma relação entre o número de carbonos e os tempos de retenção no cromatograma, pelo que permite a estimativa dos tamanhos moleculares dos compostos a partir destes últimos [13].

A eficiência de resolução da HPLC é geralmente superior à obtida por TLC, mas não se aproxima da observada por GC para os PAHs de baixo peso molecular (para a separação de PAHs com 5 ou menos anéis benzênicos a GC é um método poderoso) [13]. Contudo, permite, usando colunas de fase reversa, uma rápida e ímpar selectividade na separação de um número de isómeros difíceis de espartir por GC [13,22]. Esta discriminação é importante na medida em que as propriedades carcinogénicas e mutagénicas diferem significativamente entre isómeros, como no caso dos benzo[e]- e [a]-pirenos e dos benz[j]-, [b]- [k]-fluorantenos [23,110].

A HPLC, como é geralmente levada a cabo à temperatura ambiente, tem ainda a vantagem de permitir a detecção de PAHs de alto peso molecular que não podem ser detectados por GC [23], devido à decomposição térmica destes a altas temperaturas [10], ou por TLC, devido à vaporização [13].

A identificação dos picos cromatográficos dos PAHs é possível pelos seus espectros de absorção no UV e fluorescência e pode, dado que este tipo de detecção não é destrutiva, ser confirmada usando ambos os detectores em série. A detecção destes compostos na gama ultravioleta (254 nm) é frequentemente usada [6] mas, e na medida em que a maioria dos PAHs tem fortes características fluorescentes intrínsecas, a acoplação de um detector espectrofluorimétrico permite, através da optimização de comprimentos de onda de excitação e de emissão, torná-la numa técnica poderosa no que concerne a sensibilidade e selectividade [13], apenas comparável à obtida com GC-MS [22]. O detector de fluorescência é cerca de 1000 vezes mais sensível (pg) que os de UV [19]. As quantidades mínimas detectáveis de PAHs individuais, determinadas por HPLC-fluorescência, podem ser tão baixas como 0,8 pg com limites de quantificação no intervalo 0,02 ng/g a 3ng/g [6]. Encontram-se descritos na literatura científica [13,26,28,64,103,141-145] exemplos de comprimentos de onda referenciados para a detecção fluorimétrica de PAHs; um par universal típico é 290 nm/430 nm [62,64,143]. Cada PAH tem um espectro de excitação e de emissão por fluorescência característico,

enquanto que os isómeros têm espectros de massa muito semelhantes ou mesmo idênticos [110], o que está na base da possibilidade de separação dos isómeros por esta técnica. Contudo, a detecção por fluorescência também tem limitações. Por exemplo, é perfeitamente possível ter substâncias interferentes nas complexas amostras com emissão no mesmo intervalo de comprimentos de onda do analito de interesse. No sentido de ultrapassar este eventual fenómeno, pode tornar-se a detecção selectiva estabelecendo comprimentos de onda de excitação e emissão específicos para os PAHs ou recorrendo à utilização de agentes fluorescentes quelantes selectivos destes carcinogêneos, como o nitrometano e o cloreto de piridinio [146]. Esta técnica simplifica os cromatogramas de misturas complexas de PAHs, facilitando a sua identificação e ajudando a estabelecer a pureza do pico cromatográfico [146].

Recentemente [147], foi descrito um método alternativo de separação de PAHs em óleos vegetais por HPLC, envolvendo uma fase estacionária aceitadora de electrões (sílica modificada com tetracloroftalimidopropilo) e, como fases móveis, misturas de solventes orgânicos: hexano/diclorometano, tetrahidrofurano, etc., que são bons solventes de PAHs, ao contrário dos habitualmente utilizados (acetonitrilo/água ou metanol/água). Estes sistemas permitem a injeção directa do óleo na coluna cromatográfica, evitando o procedimento extractivo, perdas durante a concentração, poupando tempo e solventes [147].

A GC capilar é também vastamente utilizada na separação de PAHs. A característica fundamental para um composto ser analisado por GC é a sua volatilidade dentro do intervalo de temperaturas usado, pelo que PAHs contendo até 24 carbonos podem ser analisados por GC [23]. As maiores vantagens da GC são a rapidez, o seu poder resolutivo e a capacidade de detectar concentrações muito baixas (sensibilidade) [23].

A identificação de PAHs presentes numa mistura e separados por GC é geralmente efectuada pelos seus índices de retenção, com a ajuda da detecção por espectrometria de massa (MS). A GC capilar com detecção de espectrometria de massa (GC-MS) representa uma combinação poderosa para análise de PAHs, e tem sido sugerida [10,65,148] como o método mais fidedigno para a separação e identificação dos componentes de uma mistura de PAHs na maioria dos substratos. Em contraste com outros métodos, o superior poder resolutivo proporcionado pelas colunas capilares associado à especificidade de detecção da espectrometria de massa, permite a detecção simultânea de misturas complexas de PAHs, alquilados ou não, conhecidos e desconhecidos, em concentrações extremamente baixas [9,13,22]. Trata-se da melhor

opção para a análise de fracções complexas de PAHs ricas em espécies alquiladas, como as de amostras contaminadas com óleos minerais [149]. A GC-MS tem ainda a vantagem de proporcionar o uso de padrões internos deuterados [116,150] para quantificações exactas. A GC-MS tem como inconveniente o facto dos PAHs termolábeis, ou com baixa volatilidade, necessitarem de processos de derivatização [151]. Fases estacionárias não polares e de baixa a mediana polaridade são tipicamente usadas para PAHs [150]; neste contexto, as OV-1701 fornecem melhores separações que as tradicionalmente recomendadas SE-52 e SE-54, especialmente se as amostras incluírem derivados benzocarbazol [10,22].

A GC capilar é a favorita quando é desejável analisar um grande número de PAHs, enquanto a HPLC é preferível para a determinação individual de um número pequeno de isómeros de PAHs [143]. Apesar da desvantagem, no que concerne à resolução cromatográfica, que pode ser compensada pelo uso de detectores sensíveis e específicos (fluorescência), a HPLC permite a separação de isómeros com relativa facilidade ao invés da GC [143].

Se apenas se pretende determinar o B[a]P, pode usar-se TLC com detecção fluorimétrica [6], apresentando uma excelente correlação ($r = 0,99$) com a determinação por HPLC [103]. A TLC é uma técnica simples e rápida aplicada à determinação de PAHs seleccionados [152], no entanto a oxidação destes pode levantar problemas [6]. Tem a vantagem de permitir que os componentes separados possam ser recuperados para análise posterior. A LC em fase reversa com detecção UV é muito selectiva, mas não tem o poder resolutivo da GC; se for acoplado um detector de fluorescência, a técnica torna-se muito mais sensível, em particular para os PAHs de peso molecular elevado [153].

Têm sido desenvolvidas técnicas hífenadas para a determinação de PAHs em óleos vegetais, envolvendo nomeadamente LC-GC-MS [115] e LC-LC-GC [154]. Estes sistemas são adequados para a análise de PAHs apresentando um rol de vantagens: evitam perda de analitos, reduzem drasticamente o tempo de análise, o volume de solventes e o manuseamento das amostras; a sensibilidade é aumentada, pois toda a fracção é transferida para a coluna; o sistema pode ser automatizado para análises de rotina; possibilitam a análise seriada de amostras [19,22].

O *Community Bureau of Reference of the Comission of the European Communities* organizou e coordenou [111,112], no sentido de desenvolver materiais de referência para a avaliação dos procedimentos de quantificação, um estudo interlaboratorial de

comparação de métodos para a determinação de PAHs em alimentos. O programa analítico comparativo envolveu 14 laboratórios europeus, tendo utilizado, como amostra, óleo de coco contaminado com uma mistura de PAHs (pireno, benzo[e]pireno, benzo[a]pireno, indeno[1,2,3-cd]pireno e benzo[g,h,i]perileno) [111,112]. Os métodos usados pelos laboratórios para a extracção e limpeza foram diversos, com ou sem saponificação, assim como os solventes utilizados. As técnicas utilizadas foram GC-FID, GC-MS e HPLC com detecção por fluorescência e/ou UV. Alguns laboratórios usaram TLC, mas a precisão e reprodutibilidade foram extremamente baixas. Os resultados da primeira abordagem [111] sugeriram a necessidade de estudar os diferentes passos dos procedimentos de forma a obter um método melhorado, pois os resultados relatados não foram muito exactos e precisos, tendo-se revelado uma inconsistência entre os diversos laboratórios intervenientes. No desenvolvimento do estudo [112], já se observou uma melhoria considerável nos resultados, nomeadamente ao nível da exactidão - principalmente - e precisão dos procedimentos analíticos usados. No entanto, o pireno tinha tendência a ser subestimado, principalmente em HPLC, e o benzo[g,h,i]perileno a ser sobreestimado, fundamentalmente em GC. Foi possível realçar, pela leitura atenta dos resultados, algumas diferenças entre laboratórios que usavam métodos similares. Não se observaram evidências de uma sobreposição clara de qualquer técnica analítica em estudo (HPLC e GC) [112].

Este tipo de estudos é uma pedra angular no sentido de melhorar a qualidade das determinações analíticas de PAHs em alimentos, possibilitando, mediante a comparação de resultados, a identificação e posterior correcção dos principais factores de erro.

O Quadro II sumariza alguns métodos de análise de PAHs em óleos vegetais, discutidos ao longo do texto.

Quadro II: Métodos de análise de PAHs em óleos vegetais

Extracção	Limpeza	Separação e detecção	Referência
Saponificação e extracção com ciclohexano	Coluna de gel de sílica	HPLC-fluorescência	[155]
Saponificação e extracção com iso-octano	Cartucho de sílica	HPLC-fluorescência	[62]
Saponificação, extracção com iso-octano e DMF		HPLC-fluorescência	[64]
LC (gel de sílica), evaporação de solvente	LC (coluna de aminosilano)	GC-FID	[120]
DACC-HPLC	DACC-HPLC	HPLC-UV	[156]
DACC-HPLC	DACC-HPLC	HPLC-fluorescência	[133,134]
LC (gel de sílica)	LC (sílica)	GC-MS	[115]
Partição líquido-líquido com DMF-água e extracção com ciclohexano	Florisil	HPLC-fluorescência	[157]
Partição líquido-líquido com DMF-água e extracção com ciclohexano	Sephadex LH 20 e coluna de gel de sílica	GC-MS	[101]
Partição líquido-líquido com DMF-água e extracção com ciclohexano	Coluna de gel de sílica	GC-MS	[83,85]
Complexação com cafeína-ácido fórmico e extracção com ciclohexano	Coluna de gel de sílica, TLC	GC-FID	[99]
Saponificação, extracção com ciclohexano	Coluna de gel de sílica	HPLC-fluorescência	[63]
Dissolução pentano, partição com DMSO, re-extracção com ciclohexano	Coluna de gel de sílica, TLC	GC-FID	[96,113]
Partição líquido-líquido com DMF-água e extracção com ciclohexano	Coluna em gel de sílica	HPLC-fluorescência	[86,102]
Partição líquido-líquido com DMF-água e extracção com ciclohexano	Coluna em gel de sílica	GC-MS	[87,104]
Partição líquido-líquido com DMSO-água e extracção com ciclohexano	Coluna de gel de sílica, GPC (coluna S-X3)	GC-MS	[158]
Partição líquido-líquido com DMSO-água e extracção com ciclohexano	Coluna em gel de sílica, TLC em gel de sílica	GC-FID	[159]
Partição líquido-líquido com DMF-água e extracção com ciclohexano	Coluna em gel de sílica, TLC em gel de sílica	GC-FID	[160]
Partição líquido-líquido com DMF-água e extracção com ciclohexano	Coluna gel de sílica	HPLC-fluorescência	[149]
Partição líquido-líquido com DMF-água e extracção com ciclohexano	SPE em cartucho de gel de sílica (500 mg)	HPLC-fluorescência	[89,161]
Complexação com cafeína e extracção com ciclohexano	Coluna gel de sílica, TLC	Espectroscopia UV e FL	[162]
Extracção com hexano	SPE em cartucho de gel de sílica (5 g)	HPLC-FL	[162]
Saponificação e extracção com ciclohexano	Partição líquido-líquido, coluna em gel de sílica	HPLC-FL	[95,163]

* estudos extensivos a outros géneros alimentícios

B[a]P único compostos determinado

PARTE EXPERIMENTAL

1. OBJECTIVOS

Como foi realçado na parte introdutória desta dissertação, a exposição a PAHs constitui um problema de saúde pública pelo carácter tóxico, e particularmente carcinogéneo, destas substâncias. Assim, é primordial a avaliação da exposição humana a PAHs, no intuito de estimar o risco decorrente.

Na medida em que a alimentação constitui - para indivíduos não expostos profissionalmente - o principal foco de contaminação de PAHs [32], a quantificação destes compostos em matrizes alimentares é fundamental para a avaliação desse risco. Neste sentido, é essencial calcular a ingestão actual de PAHs pela população portuguesa para identificar os riscos potenciais associados com o consumo alimentar. Todavia, não existem, à data, estudos disponíveis sobre os níveis de PAHs nos alimentos consumidos pelos portugueses. Existem alguns trabalhos avulso noutras matrizes, nomeadamente em águas [110] e solos [123], insuficientes, contudo, para fazer uma estimativa de risco global e integrada.

No sentido de contribuir para o estudo da exposição alimentar a PAHs em Portugal, investigaram-se os seus teores em óleos vegetais, apontados em diversos estudos [62,63] como um dos principais veículos alimentares de PAHs. Deste modo, a determinação de PAHs nestes géneros alimentícios reveste-se, certamente, de grande interesse em termos de saúde pública.

Neste contexto, o presente trabalho de investigação teve como principais objectivos a quantificação de 15 PAHs em amostras de óleos vegetais disponíveis no mercado português, bem como o estudo da evolução do teor destes compostos ao longo do refinação destes géneros alimentícios. O grupo de PAHs sobre o qual incidiu a análise integra a lista de poluentes prioritários enunciada pela EPA [6,8], o que facilitou a sua selecção. O interesse da monitorização dos valores de PAHs durante o processamento industrial deve-se ao facto de algumas etapas da refinação serem responsáveis pela diminuição dos seus teores [12,85] e justificarem, deste modo, os níveis geralmente baixos encontrados nos óleos disponíveis comercialmente.

Havia ainda a pretensão de, e com consciência de todas as limitações, estimar a quantidade de PAHs veiculada pelos óleos vegetais em Portugal, de acordo com os dados de disponibilidade destes na alimentação da população portuguesa.

Durante o decurso dos trabalhos experimentais decorreu um estudo interlaboratorial a nível internacional (ISO/TC34/SC11) coordenado pelo *Institut des Corps Gras*

(ITERG), que visava estudar a aplicabilidade e precisão dos resultados de uma metodologia analítica de determinação de PAHs em óleos e gorduras vegetais e animais (ISO/WD 15753 : 2001), que se encontra em fase de normalização. A colaboração nesse estudo permitiu contribuir para a melhoria do método, por intermédios das sugestões que atempadamente foram feitas, na medida em que foram alteradas as condições cromatográficas da técnica e estudados os parâmetros essenciais à sua validação.

2. AMOSTRAS

Foram avaliados os teores de PAHs em óleos vegetais de diferentes marcas comerciais e em óleos vegetais ao longo das diferentes fases de refinação.

Para tal desígnio, foram adquiridos, em grandes superfícies comerciais do distrito do Porto, óleos vegetais com origem em diferentes tipos de sementes oleaginosas num total de 21 exemplares: 5 óleos alimentares, 3 óleos de milho, 3 óleos de soja, 3 óleos de girassol, 3 óleos de amendoim, 2 azeites virgens, 1 óleo de avelã e 1 óleo de sésamo. Todos os óleos se apresentavam nas embalagens originais devidamente fechadas, em bom estado de conservação e dentro dos prazos de validade.

Apesar de inicialmente haver o propósito de se estender a análise a óleos de palma, de grão de uva e de bagaço de azeitona, não se obtiveram resultados satisfatórios para estes óleos com o procedimento analítico utilizado, pela presença de grande quantidade de impurezas no extracto final. Há necessidade de desenvolver um processo de limpeza mais apurado para a análise quantitativa dos PAHs presentes neste tipo de óleos.

As amostras referentes aos óleos vegetais em diferentes etapas de refinação – brutos, neutralizados, branqueados e desodorizados - foram gentilmente fornecidas por uma indústria refinadora nacional. Os tipos de óleos analisados (soja e girassol) dependeram da matéria-prima em laboração na altura da colheita das amostras.

O azeite refinado foi originário de uma empresa com sede no país vizinho, pois não se produz azeite com aquelas características (refinado) para comercialização em Portugal. Nesta matriz, foram analisadas amostras correspondentes às várias etapas envolvidas no processo de refinação: azeite lampante, neutralizado, branqueado e desodorizado.

Todas as amostras dos óleos em refinação estavam contidas em embalagens adequadas (garrafas de vidro ou plástico) perfeitamente seladas e acondicionadas. O transporte deste material foi feito ao abrigo da luz.

Uma vez no laboratório, todas as amostras foram armazenadas à temperatura ambiente num local ao abrigo da luz até ao momento da análise, de forma a minimizar a ocorrência de fotodegradação dos compostos em estudo.

Após homogeneização, as amostras foram filtradas por filtro de papel e desumedecidas com sulfato de sódio anidro, de acordo com a EN/ISO 661 (1995).



Durante a preparação das amostras foram tomadas as medidas entendidas como necessárias para reduzir o risco de contaminações indesejáveis com possível influência na detecção final.

Cada uma das amostras dos diversos óleos vegetais sujeitos a análise foi extraída duas vezes, sendo posteriormente cada um dos extractos injectado em duplicado. Desta forma, os resultados apresentados correspondem à média de quatro injeções, duas de cada extracto.

3. REAGENTES

Na execução deste trabalho foram utilizados os seguintes reagentes: metanol, Fluka[®], n-hexano, acetonitrilo, diclorometano, tetrahydrofurano, tolueno e sulfato de sódio anidro, todos Merck[®], acetona, Aldrich[®] e azoto industrial, Air Liquide[®].

Todos os solventes orgânicos utilizados neste trabalho tinham grau de pureza para HPLC (Lichrosolv) ou superior, excepto o n-hexano utilizado na lavagem do material de vidro.

A água utilizada na preparação dos eluentes para a análise cromatográfica era desionizada e bidestilada (Seraldest LFM 20 da Seral) e posteriormente filtrada.

4. SOLUÇÕES PADRÃO

No estudo que se apresenta empregaram-se duas soluções padrão certificadas dos 16 PAHs classificados como poluentes prioritários pela EPA. A ITERG facultou uma delas, no âmbito do estudo interlaboratorial, que apresentava concentrações individuais de PAHs de 100,0 µg/mL. A outra foi adquirida à Ultra Scientific (referência PM-831 A), e apresentava as seguintes concentrações dos analitos: acenafteno 1002,4 µg/mL, acenaftileno 501,2 µg/mL, antraceno 20,0 µg/mL, benz[a]antraceno 50,2 µg/mL, benzo[b]fluoranteno 20,0 µg/mL, criseno 50,2 µg/mL, benzo[b]fluoranteno 20,0 µg/mL, benzo[g,h,i]perileno 80,2 µg/mL, benzo[a]pireno 50,2 µg/mL, dibenz[a,h]antraceno 200,4 µg/mL, fluoranteno 50,2 µg/mL, fluoreno 100,2 µg/mL, indeno[1,2,3-cd]pireno 50,2 µg/mL, naftaleno 502,1 µg/mL, fenantreno 40,2 µg/mL e pireno 100,0 µg/mL.

As soluções padrão certificadas foram conservadas a - 20°C, acondicionadas nas respectivas embalagens originais, de forma a evitarem-se eventuais volatilização e fotodegradação dos PAHs. Estas soluções permaneciam à temperatura ambiente pelo menos 1 hora antes de se proceder à preparação de soluções com diferentes concentrações, quer de referência (200 µg/L) quer de trabalho (50 µg/L).

Na preparação da solução padrão de referência, adicionavam-se 100 µL da solução padrão certificada facultada pela ITERG (100 µg/mL) a um balão volumétrico de 25 ml de capacidade, perfazendo-se o volume total com acetonitrilo. A partir desta era elaborada a solução de trabalho (50 µg/L) por diluição com tetrahidrofurano/metanol (50:50, v/v). A solução de trabalho foi utilizada para a obtenção dos espectros de emissão e excitação em fluorescência, para a determinação dos tempos de retenção e estudo da reprodutibilidade, bem como para servir de referência para a quantificação dos PAHs e cálculo dos seus coeficientes de extração, após injeção em HPLC e detecção fluorimétrica.

5. MATERIAL

Para a realização deste trabalho de investigação utilizou-se, entre outro, o seguinte material:

- tubos de ensaio de vidro com rolha esmirilada e capacidade de 15 mL
- copos e matrizes de diferentes tamanhos
- balões volumétricos de 25 mL
- funis de vidro
- proveta de vidro de 1L
- frascos de vidro de 200 mL, 500 mL e 1L
- papel de filtro
- *Vials* de 2 mL da Supleco[®]
- *Inserts* de 0,25 mL da Supelco[®]
- *Solid cap* com *PTFE Liner* 12mm da Supelco[®]

Todo o material de vidro utilizado nas diversas etapas foi sujeito a um procedimento de limpeza que englobava uma lavagem prévia com água e detergente Teepol[®] e nova lavagem com álcool etílico, acetona e n-hexano (2 vezes), sendo posteriormente seco em estufa a 90°C.

6. EQUIPAMENTO

Para o doseamento dos PAHs foi utilizado um cromatógrafo líquido de alta resolução, marca Jasco, equipado com uma bomba perfusora modelo PU-1580, uma unidade quaternária de gradiente LG-1580-04, um desgaseificador LG-1580-54 e um injector automático Jasco modelo AS-950, com *loop* de 20 μ L.

Foi utilizada, numa primeira fase da investigação e sem sucesso, uma coluna cromatográfica TosoHaas[®] TSK-gel ODS-80TM (5 μ m, 25 cm x 4,6 mm) para a separação dos analitos, sendo posteriormente substituída por uma coluna Supelcosil[™] LC-PAH (5 μ m, 25 cm x 4,6 mm) C18 fase reversa da Supelco[®], que foi termostatada a 20,0 °C.

Os sistemas de detecção usados foram um detector de díodos Jasco modelo MD-910 e um detector de fluorescência Jasco FP-920, ligados em série.

A recolha e tratamento dos dados foi efectuada pelo programa informático Borwin[™] PDA Controller Software (JMBS, France), versão 1.50.

As amostras foram sujeitas a agitação num aparelho de ultra-sons Bandelin[®], modelo Sonorex RK 100H.

A centrífuga usada era da Heraeus Sepatech Labofuge Ae.

A secagem do material de vidro foi efectuada em estufa WTC binder, a 90° C.

Usaram-se pipetas automáticas marca Gilson[®] e respectivas pontas descartáveis.

A eliminação dos solventes foi efectuada num evaporador Pierce[®] com unidade de evaporação Reacti-Vap[™] modelo 18 780 e módulo de aquecimento Reacti-Therm[™] modelo 18 790, a 35°C.

Todas as determinações de massa foram realizadas numa balança analítica Mettler[®] modelo Toledo AG204.

As amostras eram agitadas e homogeneizadas num Vortex da Heidolph[®].

Os cartuchos de extracção utilizados foram Sep-Pak[®] vac 12cc (2g) C18 e Sep-Pak[®] vac 6cc (500 mg) Florisil ambos da Waters[®]. Foi utilizado um extractor em fase sólida Visiprep[™] da Supelco[®], com sistema de vácuo.

7. METODOLOGIA ANALÍTICA

A escolha do processo analítico utilizado neste trabalho de investigação justifica-se pela sua adequação à análise de PAHs nesta matriz alimentar, conforme demonstrado em capítulos anteriores, corroborada pelo facto de ser o método de determinação de PAHs em óleos e gorduras animais e vegetais em fase de normalização (ISO/WD 15753 : 2001). Ademais, a utilização deste procedimento era uma condição *sine qua non* para participar no estudo interlaboratorial.

Em resumo, o princípio do método (ISO/WD 15753 : 2001) consiste na extracção dos PAHs com uma mistura de acetonitrilo/acetona 60:40 (v/v) seguida por purificação em cartuchos com fases C18 e Florisil ligadas. A determinação do teor dos PAHs individuais, após separação por HPLC, fez-se pela medição da fluorescência a vários comprimentos de onda de excitação e emissão. As quantidades vestigiárias em que os PAHs estão presentes nos óleos vegetais exigem a inclusão no protocolo analítico de fases prévias de extracção e concentração de analitos e a utilização de métodos de detecção muito sensíveis.

7.1 EXTRACÇÃO

No presente trabalho empregaram-se extracções líquido-líquido e em fase sólida com fases ligadas, em sistema *off-line*, utilizando para tal dois tipos de cartuchos: Sep-pak C18 e Florisil. O procedimento de extracção utilizado derivou da ISO/WD 15753 : 2001 e consistiu nos seguintes passos:

Extracção líquido/líquido

- Pesar, ao centimilograma, 2,5 g de amostra para um tubo de vidro
- Adicionar 10 mL de acetonitrilo/acetona 60:40 (v/v)
- Agitar em vortex o tubo 30 segundos (velocidade média)
- Colocar o tubo num banho ultrasónico durante 5 minutos
- Centrifugar 5 minutos a 4000 rpm
- Transferir cuidadosamente, com uma pipeta automática, o sobrenadante para um tubo de vidro previamente tarado
- Evaporar o solvente do tubo sob fluxo de azoto, a 35°C
- Repetir a extracção duas vezes, concentrando os extractos no mesmo tubo de vidro sob fluxo de azoto (o resíduo lipídico deve-se ser de 200 a 800 mg)

Purificação em cartuchos C18 (extracção sólido/líquido)

- Acondicionar o cartucho colocado no Visiprep™ com 6 volumes de 4 mL de metanol (24 mL) e depois 6 volumes de 4 mL de acetonitrilo (24 mL), deixando os solventes fluírem à pressão atmosférica
- Introduzir, com pipeta automática, 2 mL de acetonitrilo/acetona 60:40 (v/v) no tubo com o material lipídico residual
- Agitar em vortex durante 15 segundos
- Centrifugar 30 segundos a 4000 rpm
- Transferir a camada superior para o cartucho C18 recolhendo o eluido para um novo tubo de vidro tarado
- Repetir a operação duas vezes
- Eluir 4 mL da mistura de acetonitrilo/acetona 60:40 (v/v) através do cartucho

- Submeter os cartuchos a vácuo de forma a recolher a totalidade dos solventes
- Remover os solventes no evaporador (o resíduo lipídico deve aproximar-se de 50 mg)
- Retomar o resíduo com 1 mL de hexano, fechar hermeticamente e, se necessário, guardar a -20°C para o dia seguinte

Purificação em cartuchos Florisil (extracção sólido/líquido)

- Deixar o extracto à temperatura ambiente, pelo menos uma hora, de acordo com o ponto anterior
- Acondicionar o cartucho colocado no Visiprep™ com 5 volumes de 3 mL de diclorometano (15mL) e depois com 4 volumes de 3 mL de hexano (12mL)
- Transferir o extracto para o cartucho
- Introduzir 1 mL de hexano/diclorometano 75:25 (v/v) no tubo de vidro que contém o extracto
- Agitar 15 segundos em vortex e transferir para o cartucho
- Repetir a operação de lavagem duas vezes
- Eluir 4 mL de hexano/diclorometano 75:25 (v/v) através do cartucho
- Submeter os cartuchos a vácuo de forma a recolher a totalidade dos solventes
- Remover os solventes no evaporador até cerca de 1 mL.
- Acrescentar 500 µL de tolueno
- Continuar a evaporar até cerca de 20 µL
- Retomar este resíduo com tetrahidrofurano/metanol 50:50 (v/v) até perfazer 250 µL

O resíduo assim obtido foi transferido para *inserts*, colocado em frascos e guardado a -20°C até ao momento da análise, em HPLC.

Na remoção do solvente teve-se o cuidado de não deixar secar completamente o resíduo, caso contrário, o acenafteno, o fluoreno e o fenantreno eram perdidos. Aliás, estes compostos, extremamente voláteis, não podem ser quantificados por este método; apenas é possível uma avaliação qualitativa da sua presença em óleos vegetais, dado ocorrerem perdas por volatilização.

A extracção inicial da amostra por solventes é melhorada pela utilização de ultrasons pois a intensa agitação molecular proporcionada por esta técnica permite um contacto mais eficaz entre a amostra e o solvente, reduzindo também o tempo de extracção necessário [164].

7.2 SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA

7.2.1 Condições cromatográficas

Foram injectados 20 μL de extracto de cada uma das amostras no cromatógrafo Jasco. A coluna utilizada para a separação dos analitos foi uma Supelcosil™ LC-PAH (5 μm , 25 cm x 4,6 mm) C18 fase reversa da Supelco®, termostatada a 20,0 °C.

As fases móveis seleccionadas foram acetonitrilo e acetonitrilo/água (40:60) e após intenso estudo estabeleceu-se o gradiente e o fluxo apresentados no quadro seguinte:

Quadro III: Gradiente e fluxo utilizados na separação cromatográfica de PAHs em óleos vegetais

Tempo (minuto)	Acetonitrilo (%)	Acetonitrilo/água (40:60) %	Fluxo (mL.min ⁻¹)
0	0	100	1,5
5	0	100	
30	100	0	1,5
30,1			1,4
45	100	0	
46	0	100	1,4
46,1			1,5
50	0	100	

Os PAHs foram detectados fluorimetricamente. As vantagens deste tipo de detecção foram elencadas em capítulos anteriores, nomeadamente em relação aos métodos de detecção por absorção espectrofotométrica, destacando-se a excelente selectividade e sensibilidade.

O quadro IV detalha o programa de comprimentos de onda de excitação e de emissão utilizado na determinação.

O acenaftileno é o único composto entre os 16 PAHs da EPA que não é fluorescente, razão pela qual não foi determinado neste trabalho e no estudo da ITERG, embora pudesse utilizar-se o detector de díodos para o efeito.

Quadro IV: Comprimentos de onda de excitação ($\lambda_{exc.}$) e emissão ($\lambda_{emi.}$) utilizados

Composto	$\lambda_{exc.}$ (nm)	$\lambda_{emi.}$ (nm)
Naftaleno	275	326
Acenafteno	270	324
Fluoreno	270	324
Fenantreno	251	358
Antraceno	251	382
Fluoranteno	280	462
Pireno	270	385
Benz[a]antraceno	270	385
Criseno	270	385
Benzo[b]fluoranteno	256	446
Benzo[k]fluoranteno	292	410
Benzo[a]pireno	292	410
Dibenz[a,h]antraceno	295	416
Benzo[g,h,i]perileno	292	410
Indeno[1,2,3-cd]pireno	274	507

7.2.2 Optimização das condições cromatográficas

A primeira coluna cromatográfica testada - Tosohaas TSK-gel ODS-80TM (5 μ m, 25 cm x 4,6 mm), não permitiu separações satisfatórias (resolução) de alguns compostos, nomeadamente entre o benz[a]antraceno e o criseno, entre o benzo[b]fluoranteno e o benzo[k]fluoranteno e o benzo[g,h,i]perileno e o indeno[1,2,3-cd]pireno. Este obstáculo era ainda mais grave pelo facto de ser necessário alterar os comprimentos de onda de excitação e de emissão entre estes dois últimos pares de compostos, pois não havia uma solução de compromisso satisfatória (par de comprimentos de onda partilhado). Para obviar este problema, testaram-se diversos gradientes com o objectivo de aumentar as diferenças entre os tempos de retenção, mas as melhorias observadas não foram consideradas satisfatórias. Além disso, o tempo total de separação de todos os compostos nestas condições era considerado elevado (65

minutos), sendo a eluição dos primeiros compostos muito tardia. Procedeu-se, então, à substituição, com sucesso, desta coluna por uma especificamente indicada para a análise destes compostos: a LC-PAHs da Supelco[®]. Trata-se de uma coluna polimérica, como tal mais vantajosa na separação de alguns PAHs, como descrito na parte teórica desta dissertação.

O gradiente das fases móveis utilizado (*vide supra*) foi diferente do alvitado no projecto de norma que serviu de suporte, pois este não permitia uma resolução eficiente dos hidrocarbonetos em estudo.

Aquando das primeiras injeções das amostras surgiu um problema decorrente da existência de substâncias interferentes com o mesmo tempo de retenção e emitindo nos mesmos comprimentos de onda de alguns dos analitos, inviabilizando a determinação precisa destes. Os PAHs mais afectados por esta interferência eram o acenafeno, o fluoreno, o naftaleno e o fenantreno, principalmente os dois últimos. Na tentativa de detectar esses interferentes, e após eliminação de alguns suspeitos, como os solventes utilizados e contaminação pelos cartuchos, descobriu-se que os responsáveis pelo aparecimento daqueles picos/compostos eram os tubos de plástico utilizados na extracção líquido-líquido. A ocorrência deste fenómeno provavelmente justificava-se pelo contacto demorado destes materiais com a série de solventes orgânicos utilizada nas diversas etapas da extracção. Neste sentido, e por forma a viabilizar a determinação destes compostos, substituiu-se todo o material de plástico por equivalente de vidro, à excepção, por não haver alternativa, das pontas das pipetas automáticas.

Foi necessário termostatar a coluna devido à influência que a temperatura tinha nos tempos de retenção dos compostos, particularmente nos últimos compostos a eluir, o benzo[g,h,i]perileno e o indeno[1,2,3-cd]pireno. Com temperaturas mais elevadas (ambiente ou superior) estes compostos eluíam muito próximos, não havendo tempo para a imprescindível alteração dos comprimentos de onda de excitação e emissão. Desta forma, e no sentido de tornar reproduzíveis os tempos de retenção e obter uma boa separação dos compostos, decidiu-se controlar a temperatura de determinação para 20,0°C.

Apesar do projecto de norma (ISO/WD 15753 : 2001) sugerir pares de comprimento de onda de excitação e de emissão, bem como se encontrarem vários exemplos descritos na literatura, decidiu-se pesquisar quais os mais adequados ao equipamento utilizado, para otimizar a análise quantitativa nas condições operacionais. Segundo alguns

autores [165] a utilização de valores indicados na literatura ou obtidos noutros espectrofluorímetros pode acarretar uma perda substancial de sensibilidade.

Em fluorimetria, a procura do melhor comprimento de onda para a excitação da espécie molecular em estudo e do comprimento de onda de máxima emissão é feita com base no registo prévio dos espectros de absorção (espectro de excitação) e de emissão (espectro de fluorescência). Assim, procedeu-se ao estudo dos comprimentos de onda de excitação e de emissão, ou seja, à obtenção dos espectros de absorção e fluorescência de cada composto da seguinte forma:

- fixou-se o comprimento de onda de excitação e fez-se o varrimento dos comprimentos de onda de emissão na zona do ultravioleta/visível, obtendo-se um espectro característico do composto;

- uma vez determinado o comprimento de onda de emissão máxima, fixou-se o detector nesse valor e determinou-se o espectro de excitação peculiar da espécie molecular pelo varrimento de comprimentos de onda menores que os de emissão.

A partir dos espectros de excitação e de emissão obtidos experimentalmente foram encontrados os comprimentos de onda de absorção e emissão máximas para os diferentes compostos, sendo comparados com os descritos na ISO/WD 15753 : 2001.

A selecção final dos comprimentos de onda de excitação e emissão (Quadro IV) foi estabelecida conciliando os valores referidos na norma e os obtidos experimentalmente, por forma a manter ao máximo as condições do teste interlaboratorial mas nunca com prejuízo da máxima sensibilidade.

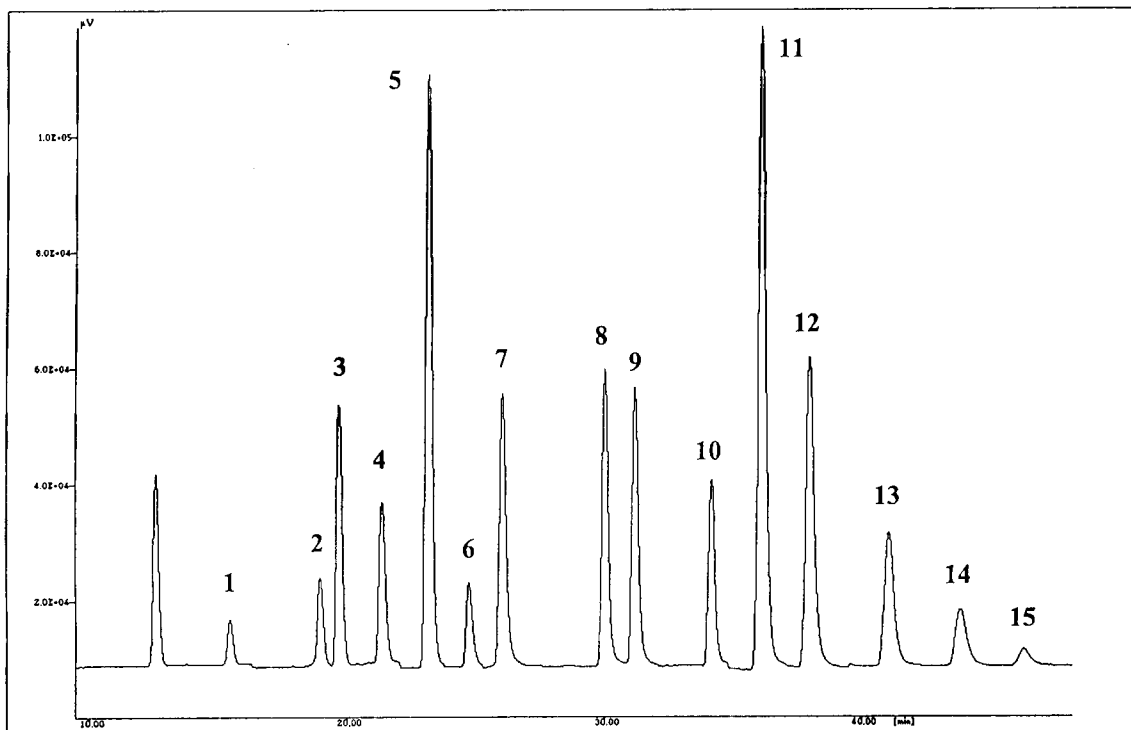
7.3 IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO

Os 15 PAHs em estudo foram identificados por comparação cromatográfica com padrões externos e com base nos seus tempos de retenção. A injeção das duas soluções padrão destes compostos permitiu conhecer a sequência de eluição dos mesmos, a qual é, do primeiro para o último, naftaleno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benz[a]antraceno, criseno, benzo[b]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno, benzo[a]pireno, dibenz[a,h]antraceno, benzo[g,h,i]perileno e indeno[1,2,3-cd]pireno.

A quantificação dos PAHs foi efectuada pelo método do padrão externo, tendo-se utilizado as áreas dos picos correspondentes no cromatograma.

A figura seguinte apresenta um cromatograma representativo de uma solução padrão (50 µg/L) de PAHs lida por fluorescência, sendo possível verificar a boa resolução dos 15 compostos estudados.

Figura 3: Cromatograma de uma solução padrão de PAHs (50 µg/L)



- 1- naftaleno 2- acenafteno 3- fluoreno 4- fenantreno 5- antraceno
 6- fluoranteno 7- pireno 8- benz[a]antraceno 9- criseno 10- benzo[b]fluoranteno
 11- benzo[k]fluoranteno 12- benzo[a]pireno 13- dibenzo[a,h]antraceno
 14- benzo[g,h,i]perileno 15- indeno[1,2,3-cd]pireno

7.4 VALIDAÇÃO DO MÉTODO

Na medida em que se alteraram algumas das condições descritas no projecto de norma ISO/WD 15753 : 2001, principalmente a nível cromatográfico, determinaram-se alguns dos parâmetros habitualmente utilizados na validação de metodologias analíticas, nomeadamente curvas de calibração, linearidade, precisão, reprodutibilidade, rendimento de extracção e limites de detecção e quantificação.

7.4.1 Curva de calibração

As curvas de calibração (Figuras 4a a 4p) foram obtidas pela injeção em triplicado de soluções padrão dos 15 PAHs, abrangendo uma larga gama de concentrações (200, 100, 50, 20, 10, 5, 2 e 1 µg/L).

Figura 4a: Curva de calibração do naftaleno

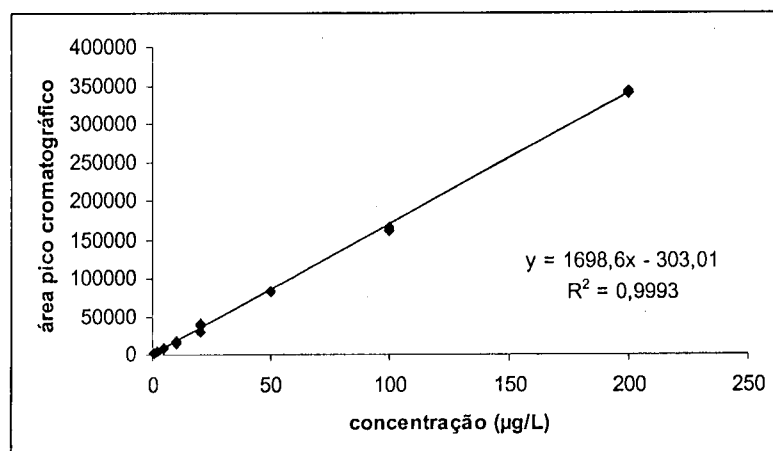


Figura 4b: Curva de calibração do acenafteno

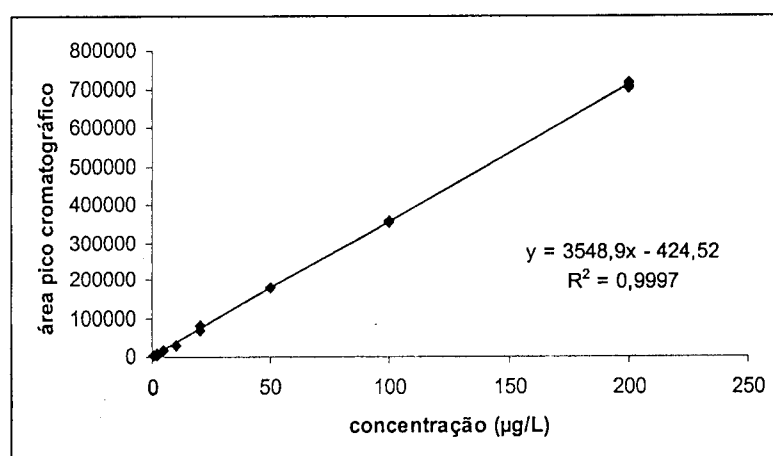


Figura 4c: Curva de calibração do fluoreno

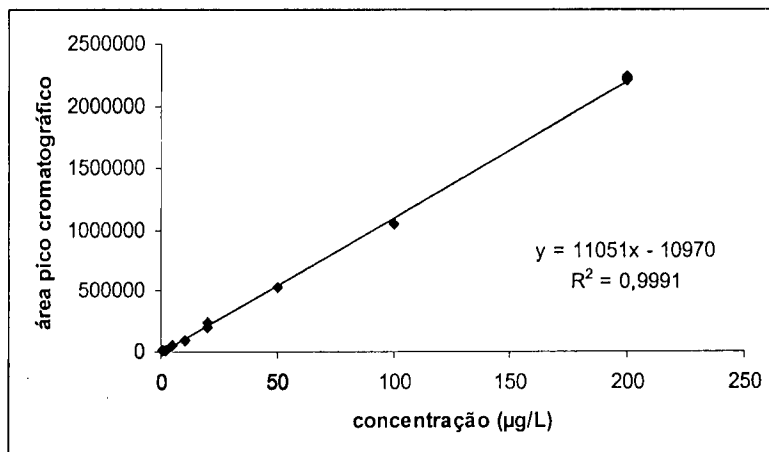


Figura 4d: Curva de calibração do fenantreno

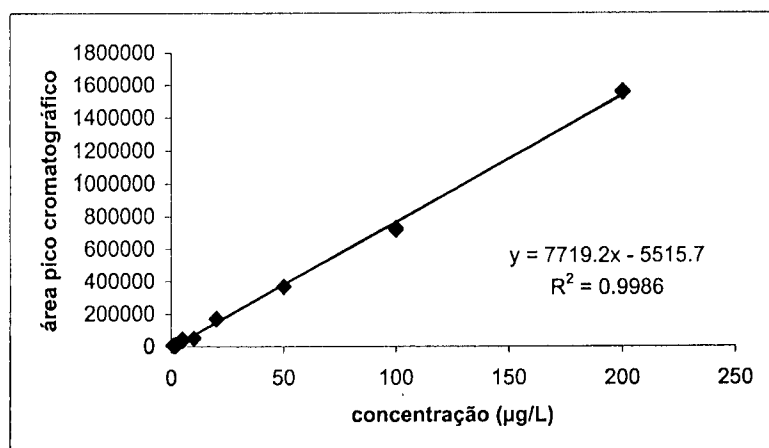


Figura 4e: Curva de calibração do antraceno

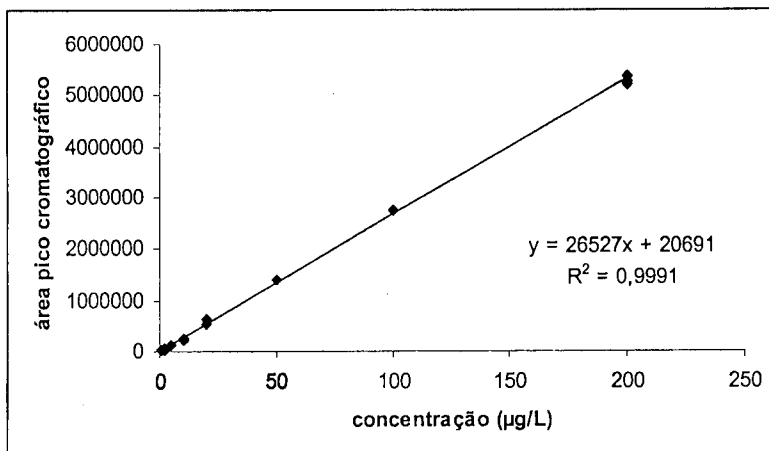


Figura 4f: Curva de calibração do fluoranteno

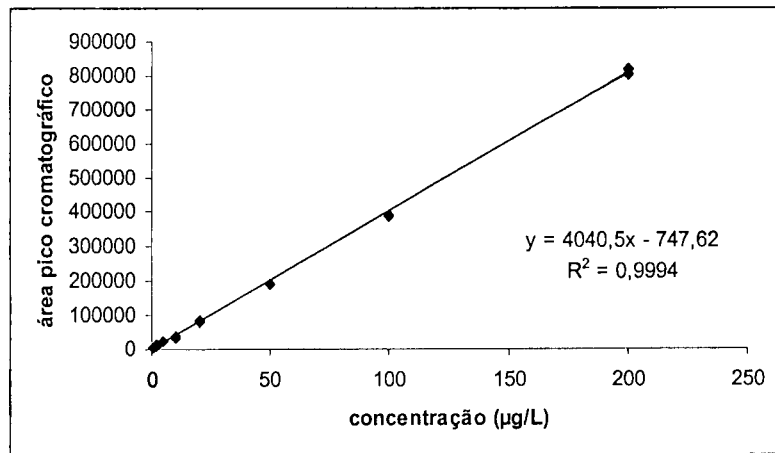


Figura 4g: Curva de calibração do pireno

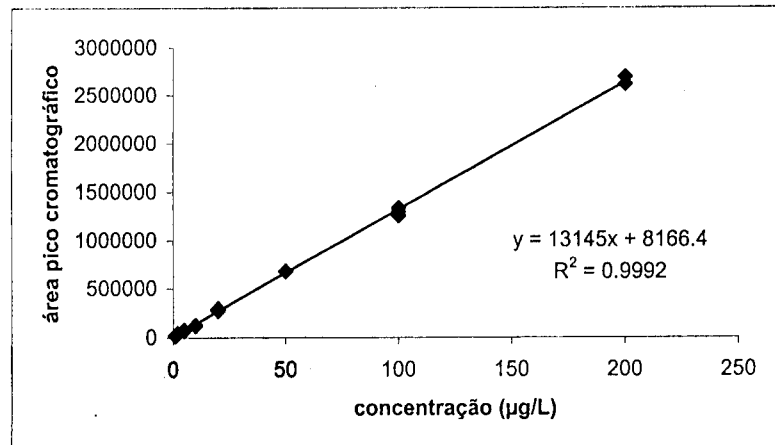


Figura 4h: Curva de calibração do benz[a]antraceno

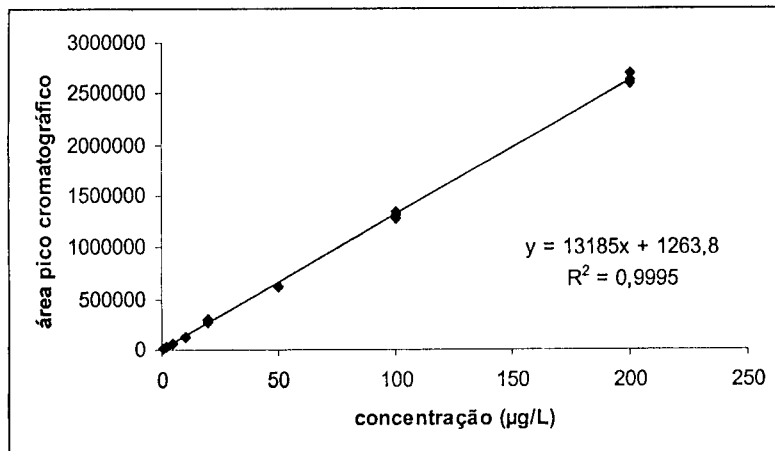


Figura 4i: Curva de calibração do criseno

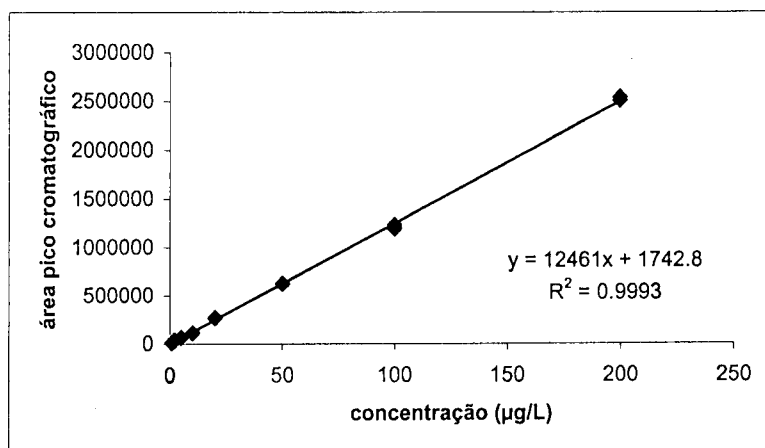


Figura 4j: Curva de calibração do benzo[b]fluoranteno

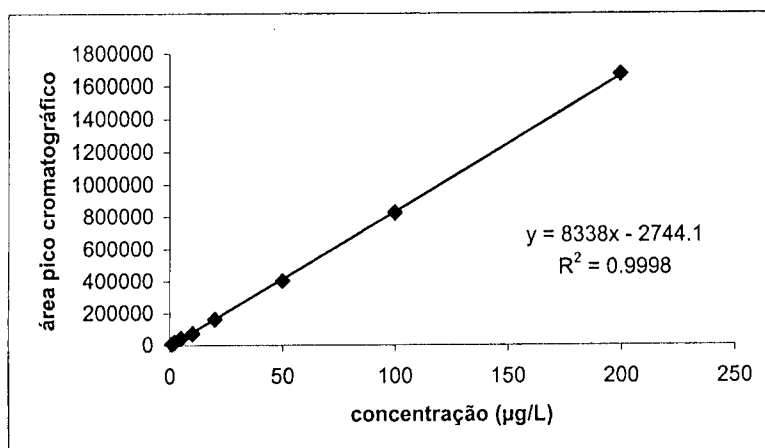


Figura 4l: Curva de calibração do benzo[k]fluoranteno

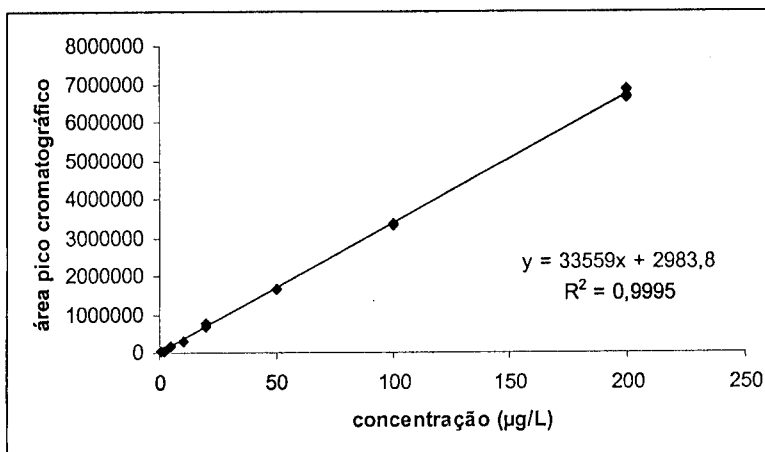


Figura 4m: Curva de calibração do benzo[a]pireno

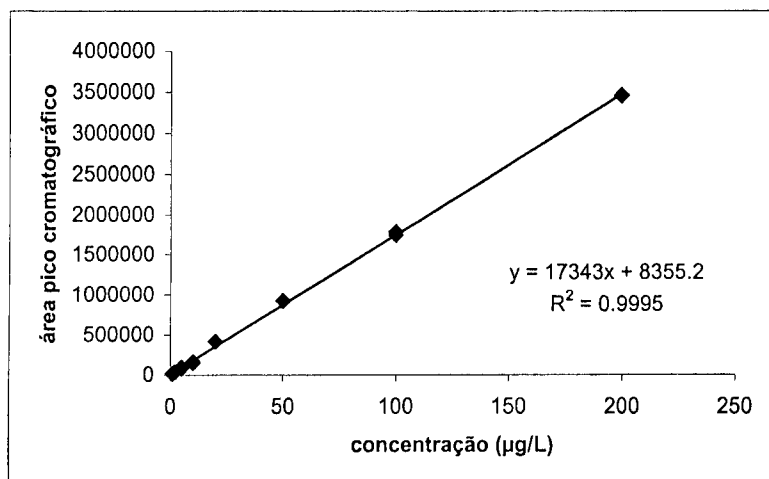


Figura 4n: Curva de calibração do dibenzo[a,h]antraceno

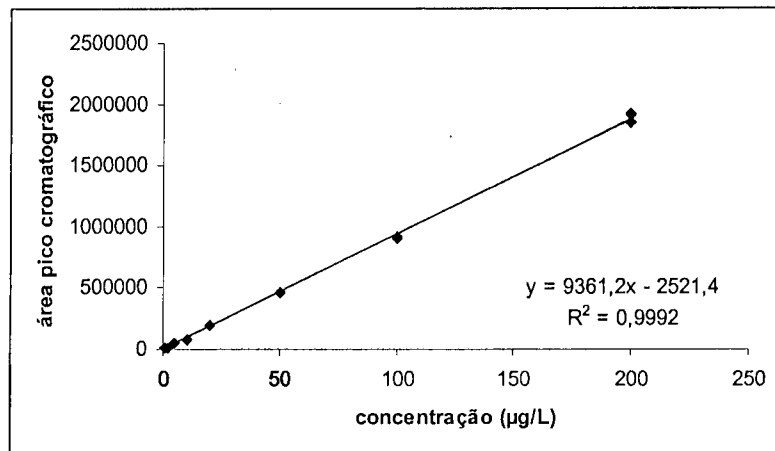


Figura 4o: Curva de calibração do benzo[g,h,i]perileno

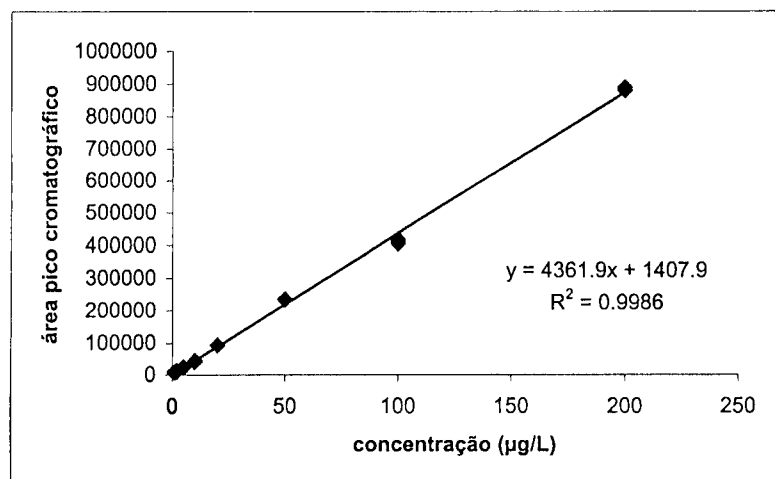
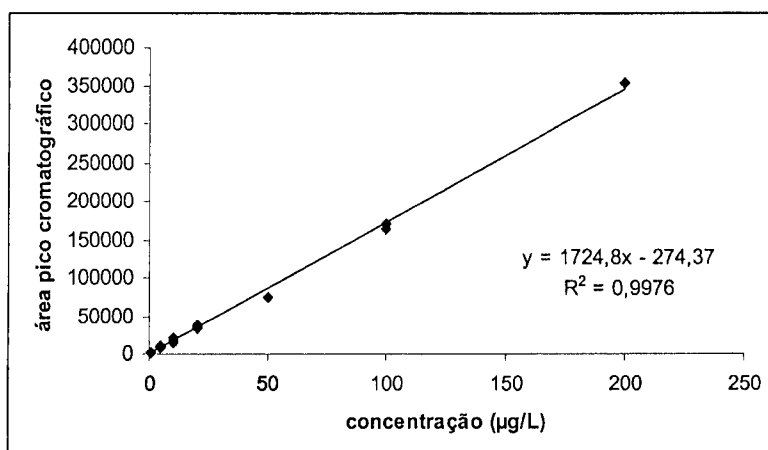


Figura 4p: Curva de calibração do indeno[1,2,3-cd]pireno

7.4.2 Linearidade

O estudo da linearidade de resposta consistiu na injeção da solução padrão de PAHs em concentrações progressivamente superiores até cobrir o espectro de concentrações habitualmente detectados neste tipo de amostras. Foi observada uma correlação linear, para todos os compostos analisados, até à concentração máxima testada (500 µg/L), suficiente para abranger toda a gama de concentrações detectadas no estudo em apreciação.

7.4.3 Precisão

O estudo da repetibilidade da técnica analítica cromatográfica foi efectuado com base em 10 ensaios efectuados em diferentes dias (3) com soluções padrão das misturas de PAHs com uma concentração de 50 µg/kg. A média, o desvio padrão e o coeficiente de variância dos resultados obtidos para cada um dos compostos encontram-se descritos no Quadro V.

A análise dos coeficientes de variação (CV), compreendidos entre 1,09 e 4,23%, permite concluir que o método cromatográfico aplicado apresenta uma precisão dentro do preconizado para este tipo de metodologias.

Quadro V: Repetibilidade do método analítico

Composto	Área	Desvio padrão	CV (%)
Naftaleno	131819	3535	2,68
Acenafteno	257440	8178	3,18
Fluoreno	878247	15432	1,76
Fenantreno	595284	12463	2,09
Antraceno	2238358	41357	1,85
Fluoranteno	309849	6071	1,96
Pireno	955655	18249	1,91
Benz[a]antraceno	1026184	11197	1,09
Criseno	957919	13187	1,38
Benzo[b]fluoranteno	631375	20825	3,30
Benzo[k]fluoranteno	2536387	73122	2,88
Benzo[a]pireno	1114613	47147	4,23
Dibenz[a,h]antraceno	688519	25925	3,77
Benzo[g,h,i]perileno	309906	4220	1,36
Indeno[1,2,3-cd]pireno	109195	4415	4,04

7.4.4 Reprodutibilidade

O estudo da reprodutibilidade do método foi desenvolvido pela comparação dos resultados de três extracções diferentes de óleos de amendoim refinados sem e com PAHs adicionados (Quadro VI); cada um dos extractos foi injectado em duplicado. Estes ensaios foram efectuados sobre o auspício do ITERG, no âmbito do ISO/TC34/SC11, pelo que foi possível comparar a reprodutibilidade obtida neste trabalho com a alcançada por outros laboratórios participantes (Quadro VII).

Os valores relativos ao naftaleno, acenafteno e fluoreno apresentados nos quadros são meramente indicativos, na medida em que o método analítico utilizado não é quantitativo para estes compostos voláteis, como já foi referido.

Quadro VI: Reprodutibilidade do óleo de amendoim refinado sem (a) e com (b) adição de PAHs (+ 4,77 $\mu\text{g}/\text{kg}$)

Composto	Concentração (a) ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	CV (%)	Concentração (b) ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	CV (%)
Naftaleno	21,45	35,3	22,84	15,5
Acenafteno	0,00	-	1,50	18,3
Fluoreno	0,73	19,9	3,53	3,3
Fenantreno	2,18	18,1	5,07	20,3
Antraceno	0,22	23,2	3,31	7,0
Fluoranteno	0,44	4,7	3,22	12,9
Pireno	0,74	36,3	3,11	9,2
Benz[a]antraceno	0,20	25,0	3,05	13,0
Criseno	0,23	20,3	2,99	13,7
Benzo[b]fluoranteno	0,09	40,6	2,27	6,5
Benzo[k]fluoranteno	0,08	13,9	2,88	7,6
Benzo[a]pireno	0,10	22,3	3,03	10,9
Dibenz[a,h]antraceno	0,01	38,6	2,81	10,0
Benzo[g,h,i]perileno	0,23	50,1	1,70	9,3
Indeno[1,2,3-cd]pireno	0,00	-	1,38	14,8

Pode-se constatar, em primeiro lugar, que a reprodutibilidade alcançada não é, de todo, exemplar, fundamentalmente no que respeita ao óleo de amendoim não adicionado de PAHs.

Salienta-se a diferença marcada entre os coeficientes de variância dos ensaios com o óleo de amendoim sem (4,7 a 50,1%) e com adição de PAHs (6,5 a 20,3%). À excepção do fenantreno e do fluoranteno, a reprodutibilidade é muito superior nos óleos com teor artificialmente aumentado de PAHs. Uma explicação plausível para esta discrepância assenta nas muito baixas concentrações de PAHs observadas para o óleo de amendoim não adicionado, que se aproximam mais dos limites de quantificação da técnica.

No entanto, os resultados obtidos neste estudo, quando equiparados com os alcançados por diferentes participantes do ISO/TC34/SC11 (Quadro VII), podem ser considerados satisfatórios. De facto, apenas para o benzo[b]fluoranteno, no óleo sem adição, e para o benz[a]antraceno e criseno, no óleo adicionado de PAHs, se obtiveram

resultados menos reprodutíveis que a média dos outros laboratórios. Inclusivamente, obtiveram-se as melhores reprodutibilidades para o fluoranteno, no óleo sem adição, e para o fluoreno, no óleo com adição. Note-se que os valores do estudo interlaboratorial apresentados correspondem à média dos coeficientes de variância de cada laboratório e não ao coeficiente de variância do conjunto de resultados de todos os participantes. Ou seja, estão em comparação os valores de reprodutibilidade obtidos neste estudo com a média das reprodutibilidades alcançadas pelos outros laboratórios e não com a reprodutibilidade média do estudo interlaboratorial.

Quadro VII: Comparação das reprodutibilidades deste trabalho (a) com as do ISO/TC34/SC11 (b) do óleo de amendoim refinado sem e com adição de PAHs

Composto	Óleo sem adição de PAHs				Óleo com adição de PAHs			
	CV (%)				CV (%)			
	(a) Média	ISO/TC34/SC11 (b) Média Máx. Min.			(a) Média	ISO/TC34/SC11 (b) Média Máx. Min.		
Naftaleno	35,3	70,2	165,6	8,9	15,5	62,8	200,0	6,5
Acenafteno	-	74,8	200,0	17,9	18,3	52,1	149,1	4,1
Fluoreno	19,9	49,9	115,5	5,1	3,3	37,3	85,4	4,1
Fenantreno	18,1	33,2	69,9	3,9	20,3	21,4	54,8	2,8
Antraceno	23,2	48,2	125,4	8,7	7,0	20,7	53,9	2,4
Fluoranteno	4,7	58,9	200,0	5,0	12,9	10,2	25,4	3,3
Pireno	36,3	50,1	173,2	4,8	9,2	27,9	277,2	3,2
Benz[a]antraceno	25,0	68,3	173,2	9,8	13,0	9,7	25,3	3,1
Criseno	20,3	27,1	92,2	3,0	13,7	10,5	31	2,1
Benzo[b]fluoranteno	40,6	31,7	137,6	0,0	6,5	14,7	66,8	2,2
Benzo[k]fluoranteno	13,9	54,9	200,0	0,0	7,6	13,7	66,7	2,0
Benzo[a]pireno	22,3	40,0	142,8	0,0	10,9	17,0	66,9	2,7
Dibenz[a,h]antraceno	38,6	101,6	127,7	25,0	10,0	15,5	67,1	3,1
Benzo[g,h,i]perileno	50,1	74,7	200,0	5,1	9,3	18,1	66,7	4,0
Indeno[1,2,3-cd]pireno*	-	200,0	200,0	200,0	14,8	15,4	36,9	3,6

* apenas um laboratório o detectou

Analisando os dados do ISO/TC34/SC11, pode-se constatar a grande dispersão de valores no que concerne ao óleo não adicionado de PAHs. Isto pode dever-se às muito baixas concentrações de PAHs neste óleo, perto ou abaixo dos limites de detecção

apontados na ISO/WD 15753 : 2001 e, eventualmente, à inexperiência com o método. Por outro lado, os resultados do óleo de amendoim adicionado de PAHs são mais homogêneos.

Em jeito de conclusão, pode-se realçar que os níveis de reprodutibilidade obtidos com base na ISO/WD 15753 : 2001 não são óptimos, facto para o qual contribuem a pouca experiência de aplicação do método, a “severidade” do processo extractivo, o uso sistemático de evaporações ao longo do procedimento - como já argumentaram van Stijn e colaboradores [134], e os níveis extremamente baixos em que os PAHs se encontram nos óleos vegetais refinados, que ainda por cima se dissolvem nos mesmos solventes que os analitos, obstando a extracção.

7.4.5 Recuperação

De forma a verificar a capacidade extractiva do método, executaram-se estudos de recuperação (rendimento de extracção) sem matriz - com uma solução padrão - e com um óleo de amendoim refinado contaminado com uma quantidade conhecida (4,77 µg/kg) de cada PAH, no âmbito do estudo interlaboratorial. O teste na ausência de matriz foi levado a cabo diluindo 2,5µL da solução padrão a 50 µg/L em 2mL de acetonitrilo/acetona 60:40 (v/v), transferindo esta mistura para um cartucho C18 e cumprindo o procedimento analítico subsequente. O óleo de amendoim foi sujeito ao processo de análise completo descrito anteriormente. Cada um destes ensaios foi realizado em triplicado. A partir das quantidades determinadas de cada composto e do seu teor original, calcularam-se as respectivas percentagens de recuperação.

Os resultados obtidos em ambos os ensaios, sem e com matriz, encontram-se descritos nos quadros VIII e IX, respectivamente. Para efeitos comparativos os quadros apresentam também a média das recuperações e dos respectivos coeficientes de variância dos resultados dos 21 laboratórios participantes no estudo interlaboratorial ISO/TC34/SC11.

Quadro VIII: Recuperações sem matriz, obtidas no trabalho que se descreve (a) e no ISO/TC34/SC11 (b)

Composto	Recuperação (a) (%)	CV (%)	Recuperação (b) ISO/TC34/SC11 (%)	Média CV (%)
Naftaleno	80	70,1	37	82,7
Acenafteno	46	28,6	34	55,5
Fluoreno	67	10,6	46	60,0
Fenantreno	82	20,2	68	36,8
Antraceno	82	2,9	57	27,3
Fluoranteno	76	6,2	84	14,9
Pireno	78	5,9	82	17,5
Benz[a]antraceno	84	7,5	92	8,3
Criseno	83	8,2	92	9,2
Benzo[b]fluoranteno	85	5,0	92	7,5
Benzo[k]fluoranteno	87	9,3	92	6,5
Benzo[a]pireno	107	15,1	72	18,7
Dibenz[a,h]antraceno	88	10,7	86	10,9
Benzo[g,h,i]perileno	103	18,6	77	13,5
Indeno[1,2,3-cd]pireno	76	11,1	82	10,6

Excluindo os valores do naftaleno, acenafteno e fluoreno que são meramente indicativos, pode-se constatar pela leitura do Quadro VIII que as recuperações obtidas (76 a 107%) são satisfatórias, tendo em conta a “complexidade” do processo extractivo. De facto, extrair o mais selectivamente possível quantidades vestigiárias destes compostos lipossolúveis de um óleo alimentar, que se dissolve nos mesmos solventes, é uma tarefa analítica árdua. Para obter tais desígnios são necessárias etapas de extracção e purificação muito complexas, de forma a isolar os analitos da matriz, remover as interferências e melhorar a sensibilidade do método; todavia, estes procedimentos também podem acarretar riscos e erros adicionais. Genericamente, os dados observados aproximam-se muito dos encontrados, em termos médios, pelos outros laboratórios; as principais diferenças prendem-se com o antraceno (82 Vs. 57%), o benzo[a]pireno (107 Vs. 72%) e o benzo[g,h,i]perileno (103 Vs. 77%).

Quadro IX: Recuperações com matriz, obtidas no trabalho que se descreve (a) e no ISO/TC34/SC11 (b)

Composto	Recuperação (a) (%)	CV (%)	Recuperação (b) ISO/TC34/SC11 (%)	Média CV (%)
Naftaleno	42	173,2	32	89,2
Acenafteno	31	18,3	37	41,7
Fluoreno	58	8,0	62	46,5
Fenantreno	61	38,5	73	47,2
Antraceno	65	6,0	67	25,8
Fluoranteno	58	14,4	79	15,4
Pireno	50	16,6	71	22,7
Benz[a]antraceno	60	14,0	75	13,4
Criseno	58	13,6	73	14,3
Benzo[b]fluoranteno	46	5,1	69	11,3
Benzo[k]fluoranteno	59	7,7	68	10,1
Benzo[a]pireno	62	11,1	63	14,1
Dibenz[a,h]antraceno	57	9,9	63	12,3
Benzo[g,h,i]perileno	31	6,3	48	15,3
Indeno[1,2,3-cd]pireno	29	14,9	56	17,6

Pode-se constatar, numa primeira análise, que há uma diferença significativa entre os resultados obtidos na ausência (76 a 107%) ou na presença de matriz alimentar (29 a 65%). Da mesma forma, há uma diferença nos valores das recuperações obtidos no estudo em avaliação e no estudo interlaboratorial, particularmente para alguns compostos (fluoranteno, pireno, benzo[b]fluoranteno, benzo[g,h,i]perileno e indeno[1,2,3-cd]pireno).

Entre outros, as diferenças encontradas podem ser explicadas muito provavelmente pela natureza lipofílica da matriz alimentar, que dificulta a extração dos PAHs, e, eventualmente, por uma menor eficácia da extração líquido-líquido (este passo era omissa no cálculo das recuperações com soluções padrão). Neste último passo utilizaram-se tubos de vidro com capacidade inferior (20 mL) ao sugerido no projecto de norma (100 mL), pelo que pode ter-se perdido alguma eficácia no procedimento pela redução da superfície de contacto entre o óleo e a mistura de solventes (acetonitrilo/acetona 60:40).

Menichini *et al.* [113] defendem que rendimentos de extracção médios superiores a 50% são aceitáveis para análises de avaliação de risco de contaminantes ambientais.

7.4.6 Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção e quantificação da técnica para cada PAH foram calculados como sendo a concentração correspondente a três e dez vezes, respectivamente, o desvio padrão do ruído de fundo de um branco; os valores obtidos para cada um dos compostos estão indicados no quadro seguinte.

Quadro X – Limites de detecção e quantificação (ng/kg)

Composto	Limites de detecção	Limites de quantificação
Naftaleno	84	278
Acenafteno	39	129
Fluoreno	13	44
Fenantreno	19	63
Antraceno	5	17
Fluoranteno	36	119
Pireno	10	34
Benz[a]antraceno	11	37
Criseno	11	37
Benzo[b]fluoranteno	17	57
Benzo[k]fluoranteno	4	14
Benzo[a]pireno	7	25
Dibenz[a,h]antraceno	15	50
Benzo[g,h,i]perileno	29	98
Indeno[1,2,3-cd]pireno	92	307

7.5 COMENTÁRIOS AO MÉTODO

A metodologia seleccionada para a execução analítica deste trabalho de investigação teve como alicerces a ISO/WD 15753 : 2001. Este método revelou-se extremamente moroso e de elevados custos - fundamentalmente pelos cartuchos de SPE. Utilizam-se 120 mL de 7 solventes diferentes em cada ensaio extractivo, a que se juntam ainda os gastos de eluentes na separação cromatográfica, pelo que se trata de um método pouco “amigo do ambiente”, embora melhor que as clássicas extracções líquido-líquido.

Os resultados obtidos no seio do ISO/TC34/SC11 permitem concluir que esta técnica deve ser alvo de algumas melhorias, principalmente a nível das recuperações alcançadas na presença de uma matriz alimentar. As relativamente baixas recuperações obtidas na presença do óleo vegetal podem dever-se principalmente a um mau procedimento nas fases de extracção líquido-líquido e de evaporação do solvente. As repetidas vezes que um extracto é sujeito a evaporação dos solventes, ao longo do procedimento, concorrem para perdas consideráveis dos PAHs mais voláteis, sendo que em alguns momentos havia a necessidade de evaporar totalmente os solventes para se proceder à pesagem da matéria lipídica restante. Assim, e para obviar estes problemas, dever-se-ia deixar sempre uma margem de segurança de solvente, bem como se poderia reduzir o número de evaporações, pela evaporação conjunta dos sobrenadantes numa só vez após cada fase extractiva.

Por outro lado, o último passo, que consiste em evaporar até 20 μL e perfazer com 230 μL tetrahydrofurano/metanol (50:50, v/v) a totalidade da solução a injectar, é um potencial gerador de erros pela imprecisão com que se consegue desenrolar tal operação. Para contornar este obstáculo, decidiu-se evaporar até aproximadamente 20 μL e completar o volume final (250 μL) com a quantidade necessária de tetrahydrofurano/metanol (50:50, v/v). Outra abordagem possível seria evaporar até um volume superior (p.e. 50-100 μL) e deixar secar espontaneamente à temperatura ambiente.

Ao nível da extracção líquido-líquido poder-se-ia, visando uma adequada homogeneização entre a amostra e os solventes, prolongar o tempo no Vortex ou no banho ultra-sónico.

Contudo, o calcanhar de Aquiles deste método é, indiscutivelmente, a não utilização de um padrão interno. Este procedimento, apesar de não ser uma resolução universal de todos os problemas, contribuiria para evitar aqueles relacionados com a eficiência da

extração líquido-líquido e com a diluição exacta dos extractos, como referido anteriormente. Aliás, a utilização de padrões internos é, como referido anteriormente, relativamente frequente nos estudos de avaliação de PAHs para a monitorização de eventuais perdas de analitos durante a purificação e, caso necessário, sua correção. O eventual inconveniente desta adição é a dificuldade de definir a quantidade exacta de padrão interno a adicionar, uma vez que as concentrações de PAHs na amostra a analisar são desconhecidas, mas principalmente a garantia de que o seu comportamento químico é semelhante aos compostos em estudo e que é possível obter a sua resolução cromatográfica completa no seio dos 15 PAHs.

Neste contexto, a escolha recairia sobre os PAHs fluoretados, pois têm perfis de eluição muito similares aos congéneres e não ocorrem naturalmente no ambiente [117]. Obviamente, esta sugestão carece de um estudo analítico profundo que a corrobore.

8. AVALIAÇÃO DO TEOR DE PAHs EM ÓLEOS VEGETAIS

Com o objectivo de contribuir para a avaliação da exposição alimentar a PAHs da população portuguesa, bem como colmatar um vazio existente nesta matriz a nível nacional, avaliou-se o teor de PAHs em alguns ($n = 21$) óleos vegetais, de diversas marcas comerciais, disponíveis em Portugal.

Apresentam-se e discutem-se os resultados desta análise, que abrangeu os seguintes tipos de óleos vegetais: azeite, amendoim, girassol, soja, milho, alimentar, avelã e sésamo.

Uma vez que não está estabelecida nenhuma restrição legislativa relativa à presença de PAHs nos óleos vegetais, tanto a nível nacional como comunitário, utilizaram-se como referencial as recomendações da GSFS descritas na parte introdutória. Salvaguarda-se, contudo, que não foram determinados neste trabalho todos os compostos previstos por aquela instituição, pelo que os valores que se apresentam pecam por defeito. Neste contexto, o teor total máximo de PAHs recomendado pela GSFS ($25 \mu\text{g}/\text{kg}$), engloba para além dos 7 compostos estudados (fenantreno, antraceno, pireno, criseno, benz[a]antraceno, benzo[a]pireno, benzo[g,h,i]perileno e dibenzo[a,h]antraceno), o benzo[e]pireno, o perileno, o antantreno e o coroneno. O valor apresentado neste estudo para os PAHs de alto peso molecular – que de acordo com a GSFS deve ser menor que $5 \mu\text{g}/\text{kg}$ - corresponde à soma das concentrações do benzo[a]pireno, benzo[b]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno, dibenzo[a,h]antraceno, indeno[1,2,3-cd]pireno e benzo[g,h,i]perileno, estando no entanto privado do contributo, preconizado pela GSFS, do benzo[e]pireno, benzo[a]fluoranteno, benzo[j]fluoranteno e dibenzo[a,c]antraceno.

Entre os obstáculos que se colocam à plena discussão dos resultados dos diversos trabalhos científicos, destacam-se as diferenças ao nível das metodologias analíticas empregues, do número e tipo de compostos estudados, da expressão dos resultados, da ausência de informação sobre os procedimentos tecnológicos que as amostras foram alvo, etc. Como tal, e sempre que possível, referem-se as informações descritas nos diversos estudos e consideradas úteis para uma discussão mais organizada.

Os resultados obtidos, aplicando a técnica validada e descrita anteriormente, encontram-se compilados nos quadros seguintes, sob a forma de média, desvio-padrão e coeficiente de variação. Os valores apresentados não têm em consideração as diferentes recuperações obtidas.

8.1 Azeite

Foram analisados, no âmbito deste trabalho, dois exemplares de azeite virgem, que apresentaram uma concentração total de PAHs de 26,35 e 18,02 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Quadro XI).

Quadro XI: Teor de PAHs ($\mu\text{g}/\text{kg}$) em azeites virgens

PAH	Azeite	Amostra 1		Amostra 2	
		Média \pm d.p.	CV (%)	Média \pm d.p.	CV (%)
Naftaleno		3,69 \pm 0,16	4,4	6,12 \pm 0,21	3,5
Acenafteno		2,28 \pm 0,02	0,7	0,86 \pm 0,01	1,0
Fluoreno		1,95 \pm 0,10	5,0	1,32 \pm 0,03	2,2
Fenantreno		9,43 \pm 0,05	0,5	4,72 \pm 0,37	7,8
Antraceno		0,40 \pm 0,02	4,9	0,18 \pm 0,02	12,4
Fluoranteno		2,91 \pm 0,05	1,6	1,40 \pm 0,09	6,7
Pireno		2,74 \pm 0,13	5,2	1,52 \pm 0,06	3,7
Benz[a]antraceno		0,92 \pm 0,01	1,3	0,48 \pm 0,06	12,0
Criseno		0,59 \pm 0,02	3,8	0,07 \pm 0,01	16,8
Benzo[b]fluoranteno		0,38 \pm 0,04	9,2	0,33 \pm 0,01	3,6
Benzo[k]fluoranteno		0,11 \pm 0,01	5,9	0,07 \pm 0,01	10,3
Benzo[a]pireno		0,28 \pm 0,00	1,6	0,07 \pm 0,02	22,8
Dibenz[a,h]antraceno		0,07 \pm 0,00	6,2	0,08 \pm 0,02	21,7
Benzo[g,h,i]perileno		0,37 \pm 0,01	2,9	0,35 \pm 0,11	29,8
Indeno[1,2,3-cd]pireno		0,51 \pm 0,03	5,3	0,43 \pm 0,07	16,3
Total		26,35		18,02	

Os valores determinados podem ser considerados relativamente baixos, por comparação com os obtidos por outros autores para este género alimentício. São, no entanto, superiores - como esperado, aliás - aos encontrados para a grande maioria dos outros óleos vegetais estudados ao longo deste trabalho; apenas os óleos de avelã e sésamo e um óleo alimentar apresentaram teores mais elevados. De facto, e uma vez que se tratam de azeites virgens, estes óleos não foram submetidos a refinação química que, como referenciado anteriormente, esta implicada segundo diversos autores [12,26,85,88,89] na diminuição da concentração de PAHs. Aliás, o efeito das diversas

etapas do processo de refinação na redução da contaminação com PAHs nesta matriz (azeite) é explorado adiante (capítulo 10).

Os valores de PAHs totais detectados nas amostras (26,35 e 18,02 $\mu\text{g}/\text{kg}$) encontram-se dentro do intervalo de concentrações (1-142,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$) descrito por diversos autores [64,83,87,96,134] para azeite, aproximando-se mais, contudo, do limite inferior do mesmo.

Hopia *et al.* [83] encontraram um valor médio de PAHs de 16 $\mu\text{g}/\text{kg}$, que se aproxima bastante dos nossos resultados, correspondente a 16 dos 40 PAHs que pesquisaram em amostras de azeite. Por outro lado, Van Stijn *et al.* [134] ao estudarem o teor de 16 PAHs em 10 azeites, observaram um largo espectro de teores de PAHs: de 23,2 a 142,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Menichini *et al.* [96] analisaram o teor de 28 PAHs em 7 azeites virgens e 6 azeites (mistura de refinado e virgem), que se encontravam entre os mais consumidos em Itália. O teor total médio dos 8 PAHs encontrados por estes investigadores [96] foi de 70 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para azeite virgem e 32 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para azeite. Lodovici *et al.* [64] encontraram, em amostras de azeite no mesmo país (Itália), concentrações bastante diferentes, com valores de PAHs totais (9 compostos) de 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Speer *et al.* [87] também referem concentrações elevadas de PAHs (18) em amostras de azeite virgem (n=7), muito próximas, aliás, às apontadas por Menichini *et al.* [96]. A concentração média observada foi de 78,2 $\mu\text{g}/\text{kg}$, oscilando entre 54,5 e 110,8 $\mu\text{g}/\text{kg}$. É de realçar que, naquele estudo [87], apenas um óleo de gérmen de trigo possuía teores superiores destes compostos, com 124,2 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

A juntar a todos estes trabalhos em azeites, é de realçar que já haviam sido detectados PAHs em azeitonas italianas em níveis até 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ [166].

Apesar de haver alguma diferença entre os valores totais de PAHs nas duas amostras de azeite estudadas (26,35 Vs. 18,02 $\mu\text{g}/\text{kg}$), há uma similitude bastante acentuada no perfil de PAHs que apresentam. Neste contexto, observa-se um domínio de PAHs de baixo peso molecular (2-4 anéis), que representam aproximadamente 93% do total de PAHs em ambos os exemplares, correspondendo o restante (~ 7%) a PAHs de alto peso molecular (5 ou mais anéis). De forma semelhante, os PAHs de baixo peso molecular compreendiam a quase totalidade dos teores de PAHs observados por Van Stijn *et al.* [134] (94-99% do total) e por Hopia *et al.* [83] (94%). Quantidades consideráveis de PAHs de menor peso molecular também foram encontrados em azeites por Gertz e Kogelheide [95]; estes compostos representavam 54,9 $\mu\text{g}/\text{kg}$, enquanto a soma dos PAHs de maior peso molecular era apenas de 0,2 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Nesta sintonia, as elevadas concentrações observadas por Speer e colaboradores [87] alicerçavam-se na grande quantidade de PAHs de menor peso molecular (53-105,6 $\mu\text{g}/\text{kg}$) que os azeites continham; a contribuição relativa dos PAHs de alto peso molecular era apenas de 5,8% do total (próxima dos 6,5% do estudo em avaliação). Aliás, os teores de PAHs de alto peso molecular das amostras de azeite eram semelhantes aos dos outros 7 tipos de óleos analisados por Speer *et al.* [87]; a diferença residia ao nível dos congêneres de menor peso molecular. Este cenário pode ser explicado por diferenças no processamento tecnológico; os óleos vegetais podem ser sujeitos a tratamento pelo vapor (desodorização) que, como vimos anteriormente, diminui os teores de PAHs com menor número de anéis (logo, menor peso molecular), enquanto o azeite é apenas submetido a clarificação por decantação, centrifugação e filtração, sem influência directa neste domínio.

A amostra 1 apresentou os níveis mais elevados de acenafteno (2,28 $\mu\text{g}/\text{kg}$) e fluoreno (1,95 $\mu\text{g}/\text{kg}$) de entre todos os óleos vegetais analisados no trabalho. Por seu turno, a outra amostra (n.º 2) de azeite manifestou o teores mais reduzido de criseno (0,07 $\mu\text{g}/\text{kg}$) e, juntamente com outros óleos, o mais baixo de B[a]P (0,07 $\mu\text{g}/\text{kg}$).

Os PAHs predominantes foram o naftaleno (3,69 e 6,12 $\mu\text{g}/\text{kg}$), o fenantreno (9,43 e 4,72 $\mu\text{g}/\text{kg}$), o fluoranteno (2,91 e 1,40 $\mu\text{g}/\text{kg}$) e o pireno (2,74 e 1,52 $\mu\text{g}/\text{kg}$). À excepção do naftaleno, que não foi avaliado em qualquer outro estudo relativo ao azeite, estes compostos eram também os mais abundantes noutros trabalhos de investigação [83,87,96,134]. Ademais, com reserva do trabalho de Hopia e colaboradores [83], a ordem de predominância era igual: fenantreno, fluoranteno e pireno, por ordem decrescente. Os níveis encontrados é que mostraram alguma variabilidade. Ou seja, o teor pode ser diferente, mas o perfil parece semelhante.

Neste contexto, os valores encontrados num estudo liderado por Hopia [83] são muito próximos das aqui referidas; o fenantreno foi o composto presente em maior quantidade (4,7 $\mu\text{g}/\text{kg}$), seguido pelo pireno (2,1 $\mu\text{g}/\text{kg}$), enquanto o nível de fluoranteno foi um pouco mais baixo (0,40 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Os teores de benzo[g,h,i]perileno (0,58 $\mu\text{g}/\text{kg}$) e dibenzo[a,h]antraceno (0,04 $\mu\text{g}/\text{kg}$) são, também, bastantes idênticos aos descritos.

No entanto, encontram-se descritos na literatura [87,96,134], valores mais elevados para o fenantreno. Entre as 7 amostras de azeite avaliadas por Speer *et al.* [87], o valor médio de fenantreno foi de 39,3 $\mu\text{g}/\text{kg}$, com um mínimo e um máximo respectivamente

de 31,3 e 62,2 $\mu\text{g}/\text{kg}$. O fenantreno foi também o composto que exibiu a concentração mais alta (81 $\mu\text{g}/\text{kg}$) entre todos os PAHs estudados por Van Stijn *et al.* [134].

As concentrações para cada um dos PAHs identificados por Menichini e colaboradores [96] foram sempre superiores às obtidas, nunca ultrapassando, todavia, os 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$. A exceção foi o fenantreno, um dos PAHs mais abundantes no ar, com concentrações máximas de cerca de 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ em ambos os tipos de azeite (virgem e refinado) [96]. Este composto também era o mais abundante na amostra 1 e secundarizava o naftaleno na amostra 2, apesar dos valores mais modestos: 9,43 e 4,72 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectivamente nas amostras 1 e 2.

No conjunto destes trabalhos, os PAHs que se encontraram em maiores quantidades foram os de 3 e 4 anéis aromáticos. No trabalho que se apresenta, estes compostos representavam 71 % do total, na primeira amostra, e 54%, na amostra 2. Estes compostos são, também, os mais abundantes no ambiente, particularmente na atmosfera [96], o que pode fornecer algumas indicações quanto à origem dos PAHs nos alimentos em questão. Todavia, a classificação carcinogénica destes compostos é de “evidência inadequada” [7], à exceção do criseno (“evidência limitada”). Como tal, os potenciais perigos toxicológicos parecem ser atenuados.

A exceção foi o estudo de Lodovici *et al.* [64], em que o criseno e o benzo[b]fluoranteno eram os compostos maioritários. Poder-se-ia especular que este trabalho ao avaliar quase exclusivamente os PAHs de maior peso molecular (5 em 9 compostos), não representaria fielmente os de menor número de anéis. Todavia, as baixas concentrações de pireno e fluoranteno fazem supor que, mesmo na ausência de mais dados, se trata, de facto, de um azeite muito pouco contaminado, especialmente por espécies de mais baixo peso molecular. Aliás, a vestigial concentração evidenciada por aquela amostra de azeite (1,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$) não tem paralelo na literatura disponível.

Aproximadamente 10% do total de PAHs evidenciado pelos exemplares de azeite analisados, tratavam-se de compostos com reconhecida actividade carcinogénica e mutagénica. A contribuição relativa destes PAHs específicos nestas amostras, está de acordo dos valores médios (c.a. 12 %) observados para os outros óleos vegetais estudados no seio deste trabalho. Ao invés, no estudo de Lodovici *et al.* [64] a contribuição de PAHs carcinogénicos (c-PAHs) no total é muito elevada (84%). Dois factores podem contribuir para explicar esta situação: primeiro, não terem sido pesquisados PAHs com 2 e 3 anéis geralmente presentes em quantidades consideráveis noutros trabalhos, caso do aqui discutido; segundo, o facto de 6 dos 9 compostos

analisados serem carcinogêneos, nomeadamente benz[a]antraceno, criseno, benzo[b]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno, benzo[a]pireno e dibenz[a,h]antraceno. Todavia, em termos absolutos a quantidade de c-PAHs expressa (0,84 µg/kg) era inferior às patentes por qualquer uma das nossas amostras (2,86 e 1,54 µg/kg).

As concentrações de c-PAHs dos azeites virgens aqui em estudo assemelham-se bastante às apresentadas noutros trabalhos: 2,84 µg/kg [83], 9,6 µg/kg [87] e 3,62 µg/kg (1,1 e 9,9 µg/kg). Ao contrário, na investigação de Menichini *et al.* [96] não foram detectados os PAHs mais suspeitos de serem carcinogêneos para os humanos, classificados pelo IARC [7] como “prováveis” ou “possíveis” carcinogêneos: benz[a]antraceno, benzo[b]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno, benzo[a]pireno, dibenz[a,h]antraceno e indeno[1,2,3-cd]pireno. É preciso ter em conta, no entanto, que o limite de detecção do método analítico aplicado nesse trabalho [96] era elevado (3 µg/kg). Os autores preferiram um menor limite de detecção, que poderiam alcançar pelo recurso a HPLC-FL por exemplo, por uma melhor resolução face ao elevado número (28) de compostos que analisaram. Repare-se que, no trabalho que se descreve todos estes compostos cancerígenos foram detectados, mas sempre em quantidades inferiores àquele limite de detecção.

O B[a]P é um dos PAHs com maior potência carcinogénica e, também por isso, sobre o qual existe mais informação. Os níveis de B[a]P detectados em azeites são, de uma forma geral, da ordem dos µg/kg [87,95,96], embora níveis tão elevados como 60 µg/kg tenham sido referenciados [98]. Estes elevados níveis encontrados por Corradetti *et al.* [98] correspondiam a amostras de azeite provenientes de oliveiras expostas a emissões industriais de condensado de piche.

Em consonância com os resultados da maioria dos estudos, os teores deste composto nas amostras analisadas foram 0,28 e 0,07 µg/kg, ou seja inferiores ao 1 µg/kg proposto como máximo aceitável. Assim, no trabalho de van Stijn *et al.* [134] os teores deste composto navegaram entre <0,1 e 0,4 µg/kg, enquanto Lodovici *et al.* [64] encontrou 0,1 µg/kg. O B[a]P inclusivamente não foi detectado nas amostras de azeite analisadas por Hopia *et al.* [83] (<0,02 µg/kg) e por Menichini *et al.* [96] (<3 µg/kg).

Algumas amostras de azeite avaliadas noutros trabalhos [95,96] apresentaram um patamar ligeiramente superior de contaminação, em que alguns exemplares ultrapassavam 1 µg/kg; o intervalo de concentrações enunciado por Speer *et al.* [87] foi de 0,2-1,2 µg/kg (média 0,7 µg/kg), ao passo que Gertz e colaboradores [95] encontraram teores entre 0,2 e 2,2 µg/kg.

Um largo espectro de contaminação com B[a]P foi observado por Pupin e Toledo [102] em azeite disponível comercialmente no mercado brasileiro. Detectaram B[a]P em quase todas as 40 amostras de azeite que avaliaram, até níveis máximos de 164 $\mu\text{g}/\text{kg}$ [102]. As marcadas diferenças encontradas entre as amostras podem ser atribuídas principalmente à origem dos azeites e sua composição. Os níveis mais baixos foram encontrados em óleos importados da Europa, desde níveis não detectáveis (limite de detecção 0,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$) a 1,2 $\mu\text{g}/\text{kg}$, com uma média de 0,6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ [102]. No entanto, quando estes espécimes importados eram embalados no Brasil apresentavam teores relativamente mais altos, de não detectado a 9,7 $\mu\text{g}/\text{kg}$, com uma média de 2,3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ [102]. Esta situação pode dever-se a uma mistura dos azeites importados com óleos vegetais previamente contaminados. De facto, quando os investigadores analisaram misturas de azeite com óleos de soja ou milho, os valores encontrados foram bastante próximos, com uma média igual (2,3 $\mu\text{g}/\text{kg}$) e um intervalo muito próximo (2,2 a 9,2 $\mu\text{g}/\text{kg}$). As amostras com origem na Argentina foram as que apresentaram teores mais elevados, atingindo um máximo de 164 $\mu\text{g}/\text{kg}$ [102].

Os exemplares de azeite analisados neste estudo não transpuseram as recomendações da GSFS relativas ao total de PAHs (13,94 e 7,40 $\mu\text{g}/\text{kg}$) e à soma de PAHs de alto peso molecular (1,73 e 1,34 $\mu\text{g}/\text{kg}$), à semelhança do observado por Lodovici *et al.* [64] e Hopia [83].

Todas as amostras de azeites virgens avaliadas por Menichini *et al.* [96] e Van Stijn *et al.* [134] - à excepção de uma neste último - ultrapassavam os 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de PAHs totais preconizados pela GSFS, mas nenhuma o fazia para os PAHs de alto peso molecular. Da mesma forma, os exemplares estudados por Speer *et al.* [87] transgrediram sempre o limite de 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ "imposto" pela GSFS para PAHs totais. O teor médio de PAHs de alto peso molecular (4,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$) era inferior ao estipulado, no entanto algumas amostras ultrapassavam o limite estabelecido de 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$. À semelhança do estudo anterior [87], Moret *et al.* [149] encontraram concentrações totais de PAHs ultrapassando 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para a maioria dos 51 azeites virgens analisados, mas apenas uma amostra continha mais que 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para a soma dos PAHs de alto peso molecular e mais que 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de B[a]P. Quatro dos 5 azeites refinados analisados, tinham um teor de PAHs de alto peso molecular superior a 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Em jeito de conclusão, pode referir-se que os azeites estudados apresentam teores de PAHs na margem inferior do intervalo de concentrações observados em vários trabalhos

de investigação. O perfil de PAHs encontrado é muito similar ao descrito por outros investigadores, nomeadamente pelo predomínio de PAHs de menor peso molecular, em que se destacam o fenantreno, o fluoranteno e o pireno. Os teores de B[a]P, e dos c-PAHs em geral, das amostras de azeites analisadas são comparativamente baixos. Apesar de se tratarem de óleos não refinados, as recomendações da GSFS são integralmente cumpridas nestas amostras de azeite.

8.2 Óleo de amendoim

Os resultados analíticos das 3 amostras de óleo de amendoim estudadas encontram-se compilados no quadro seguinte (Quadro XII). Pode constatar-se que os níveis de contaminação observados foram muito baixos, de 9,09 a 10,62 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

É de realçar a proximidade de concentração total de PAHs entre as 3 amostras estudadas. Aliás, um fenómeno idêntico foi encontrado, no âmbito deste estudo, para os óleos de soja (9,31 a 10,81 $\mu\text{g}/\text{kg}$) e girassol (8,78 a 9,72 $\mu\text{g}/\text{kg}$).

Não havia a expectativa de encontrar tais semelhanças, na medida em que não há um nível nem perfil de contaminação característico de qualquer espécie de semente oleaginosa - aliás, a síntese endógena de PAHs pelas plantas está praticamente desacreditada. Como referido anteriormente, a contaminação depende de factores externos às características biológicas das plantas, tais como a poluição atmosférica a que estão sujeitos, os tipos de secagem que sofrem, etc. Os habitualmente elevados níveis de PAHs em óleos de coco não se devem a peculiaridades de metabolismo, mas antes ao procedimento de secagem normalmente utilizado nesta espécie que origina grandes quantidades de PAHs.

Sendo assim, qualquer proximidade entre os teores dos óleos das diversas marcas comerciais era inesperada, dada a mais do que provável diferente origem geográfica e por conseguinte nível de exposição a estes contaminantes.

Pode especular-se que a refinação seja, provavelmente, o factor de "reconciliação" dos valores observados. Ou então, como sugerem Menichini e colaboradores [96], a mistura de óleos de diferentes origens geográficas pode ajudar a explicar a homogeneidade dos níveis de contaminação de diferentes marcas comerciais.

Quadro XII: Teor de PAHs ($\mu\text{g}/\text{kg}$) em óleos de amendoim

O. amendoim PAH	Amostra 1		Amostra 2		Amostra 3	
	Média \pm d.p.	CV (%)	Média \pm d.p.	CV (%)	Média \pm d.p.	CV (%)
Naftaleno	3,31 \pm 1,33	40,2	5,12 \pm 0,24	4,7	3,65 \pm 0,51	13,8
Acenafteno	0,06 \pm 0,01*	21,0	n.d.		0,16 \pm 0,02	10,1
Fluoreno	0,65 \pm 0,02	3,1	0,86 \pm 0,07	8,3	0,59 \pm 0,04	6,7
Fenantreno	1,67 \pm 0,16	9,4	2,08 \pm 0,10	4,7	1,23 \pm 0,09	7,5
Antraceno	0,11 \pm 0,00	4,5	0,13 \pm 0,01	4,5	0,09 \pm 0,01	6,8
Fluoranteno	0,97 \pm 0,19	19,3	0,66 \pm 0,02	3,3	0,68 \pm 0,05	6,8
Pireno	1,68 \pm 0,55	33,0	0,54 \pm 0,04	6,5	1,12 \pm 0,24	21,7
Benz[a]antraceno	0,19 \pm 0,01	6,1	0,09 \pm 0,01	13,1	0,16 \pm 0,01	8,0
Criseno	0,28 \pm 0,01	2,2	0,16 \pm 0,02	11,8	0,31 \pm 0,02	6,2
Benzo[b]fluoranteno	0,17 \pm 0,01	4,3	0,16 \pm 0,01	7,5	0,15 \pm 0,00	3,2
Benzo[k]fluoranteno	0,04 \pm 0,00	6,1	0,05 \pm 0,00	6,0	0,05 \pm 0,00	9,8
Benzo[a]pireno	0,11 \pm 0,01	13,2	0,07 \pm 0,00	7,2	0,09 \pm 0,02	20,5
Dibenz[a,h]antraceno	0,58 \pm 0,26	44,4	0,03 \pm 0,00*	7,5	0,33 \pm 0,05	15,2
Benzo[g,h,i]perileno	0,52 \pm 0,14	25,8	0,20 \pm 0,01	4,1	0,49 \pm 0,13	26,5
Indeno[1,2,3-cd]pireno	0,29 \pm 0,06*	20,9	n.d.		n.d.	
Total	10,62		10,14		9,09	

n.d. – não detectado

* abaixo do limite de quantificação

Há semelhança da quase totalidade do universo de óleos vegetais estudados, o naftaleno foi o PAH predominante nestes exemplares de óleos de amendoim, contribuindo inclusivamente com mais de metade da concentração na amostra 2; destacam-se ainda as participações do fenantreno e do pireno.

Os PAHs de baixo peso molecular encontrados na amostra 2 representavam 95% do teor total de PAHs, o mais elevado neste estudo. Dada a baixa contaminação desta amostra e a marginal contribuição dos PAHs de maior peso molecular, não é de estranhar que os teores destes sejam praticamente desprezíveis. Contrariamente, nos exemplares 1 e 3 a contribuição de PAHs de alto peso molecular (16,1 e 12,1% do total, respectivamente) foi das mais elevadas identificadas neste estudo. Estes valores mais elevados devem-se principalmente ao contributo do dibenzo[a,h]antraceno e do benzo[g,h,i]perileno. Aliás, a amostra 1 apresentou, entre todos os óleos, o nível mais elevado de dibenzo[a,h]antraceno (0,58 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Por outro lado, continha, em conjunto

com outros tipos de óleo, o valor mais baixo de benzo[k]fluoranteno (0,04 µg/kg). Por sua vez, a amostra 2 apresentou a concentração mais baixa de dibenzo[a,h]antraceno (0,03 µg/kg) e, à semelhança de um azeite, de B[a]P (0,07 µg/kg).

Pode especular-se que as pequenas discrepâncias no teor de PAHs de alto peso molecular entre a amostra 2 e os outros dois óleos se devam a diferenças no procedimento de refinação, nomeadamente a utilização ou não de carvão activado no branqueamento ou a quantidades diferenciadas do mesmo, bem como, tão simplesmente estarem originalmente contaminadas de forma divergente de acordo com o tipo de exposição que sofreram.

Os óleos de amendoim aqui estudados podem, de acordo com as recomendações alemãs, serem classificados como pouco contaminados, pois quer o teor total (5,13, 3,29 e 3,82 µg/kg) quer o de PAHs de alto peso molecular (1,71, 0,51 e 1,10 µg/kg) ficam muito aquém dos máximos admissíveis, 25 e 5 µg/kg respectivamente. Analogamente, os valores observados para o carcinogénico B[a]P encontram-se muito abaixo de 1 µg/kg (0,11, 0,07 e 0,09 µg/kg).

Resultados diametralmente opostos aos referidos foram obtidos por Kolarovič e Traitler [99]. As duas amostras de óleo de amendoim que analisaram [99] apresentaram valores algo díspares entre si, mas ambos muito mais elevados (750,25 e 129,10 µg/kg) que os das amostras deste estudo (9,09-10,62 µg/kg). É de notar que nesse mesmo estudo houve outros exemplos de teores elevados de contaminação, nomeadamente os óleos de soja com 220,23 µg/kg e de girassol com 41,35 µg/kg. Nesta conjuntura, pode teorizar-se que na base das discrepância observadas possam estar os mais modernos e eficazes procedimentos tecnológicos nas refinarias, algum tipo de secagem que permitisse o contacto directo com as sementes ou, apenas e só, aqueles óleos serem o reflexo de níveis de poluição menos controlados de então (1982).

Digna de ainda maior atenção é a quantidade de PAHs carcinogénicos que as amostras daquele estudo [99] possuíam: no exemplar mais contaminado, 88% dos PAHs exibiam potencial efeito carcinogénico, ou seja 656,41 µg/kg. Na outra amostra, apesar dos teores serem menores não deixam de ser elevados: os c-PAHs estavam presentes em 86,41 µg/kg. Estes valores são extraordinariamente mais elevados do que os obtidos neste estudo, que vagueavam entre 0,56 e 1,65 µg/kg. Identicamente, os teores de B[a]P daquele trabalho [99] (10,69 e 105,74 µg/kg), eram de outra ordem de grandeza dos detectados neste trabalho (0,07-0,11 µg/kg). O valor de PAHs totais e de alto peso

molecular em ambos os óleos excedia em larga medida o alvitado pela GSFS, representando, respectivamente, 464,64 $\mu\text{g}/\text{kg}$ e 580,33 $\mu\text{g}/\text{kg}$, no primeiro óleo, e 72,99 e 69,04 $\mu\text{g}/\text{kg}$, no outro.

No que respeita aos óleos de amendoim estudados, pode-se referir que o nível de contaminação patenteado é baixo, não parecendo levantar reservas quanto à segurança do seu consumo.

8.3 Óleo de girassol

Os resultados referentes à pesquisa destes contaminantes lipofílicos em 3 marcas comerciais de óleo de girassol encontram-se agrupados no Quadro XIII. A concentração dos 15 PAHs em estudo não chegou à dezena de $\mu\text{g}/\text{kg}$ (8,78 a 9,72 $\mu\text{g}/\text{kg}$) em qualquer uma das amostras avaliadas. Como tal, não é de estranhar que nestas amostras se encontrem alguns dos valores mais baixos determinados neste trabalho de índole científica, nomeadamente dibenz[a,h]antraceno (0,03 $\mu\text{g}/\text{kg}$) nas amostras 1 e 2, benzo[k]fluoranteno (0,04 $\mu\text{g}/\text{kg}$) nas amostras 2 e 3, benzo[b]fluoranteno (0,14 $\mu\text{g}/\text{kg}$) na amostra 2 e benzo[g,h,i]perileno (0,18 $\mu\text{g}/\text{kg}$) na amostra 1.

Os níveis de contaminação que as amostras ostentavam enquadravam-se entre os descritos por outros trabalhos nesta matriz alimentar.

O teor mais elevado de PAHs para um óleo de girassol foi observado por Kolarovič *et al.* [99], com 41,35 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Em contrapartida, Hopia e colaboradores [83] ao avaliarem o teor de 44 PAHs em óleo de girassol, encontraram 17 destes compostos que totalizavam apenas 2,8 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Estes autores [83] avaliaram também o conteúdo em PAHs de um óleo de girassol prensado a frio (virgem), encontrando valores mais elevados de todos os compostos anteriormente observados, num total de 21 $\mu\text{g}/\text{kg}$, sendo que, inclusivamente, alguns compostos passaram a manifestar níveis detectáveis, como por exemplo o B[a]P (0,16 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Estas diferenças são paradigmáticas da influência da refinação química no teor de PAHs exibido pelos óleos vegetais. O facto do óleo menos contaminado apresentar um teor reduzidíssimo de PAHs totais, quer pelos menores teores das espécies de maior quer das de menor peso molecular, faz supor que esta amostra foi alvo de uma desodorização e branqueamento com carvão activado ao longo do processo de refinação.

Os resultados de Speer *et al.* [87] são mais parecidos com os obtidos; os óleos de girassol avaliados por este grupo de trabalho apresentavam uma concentração média de 16,6 µg/kg.

Quadro XIII: Teor de PAHs (µg/kg) em óleos de girassol

Óleo girassol PAH	Amostra 1		Amostra 2		Amostra 3	
	Média ± d.p.	CV (%)	Média ± d.p.	CV (%)	Média ± d.p.	CV (%)
Naftaleno	4,36 ± 0,80	18,5	3,24 ± 0,61	18,9	1,98 ± 0,50	25,0
Acenafteno	0,05 ± 0,01*	18,4	0,04 ± 0,02*	43,8	0,22 ± 0,03	14,6
Fluoreno	0,96 ± 0,03	3,2	0,62 ± 0,02	3,6	0,56 ± 0,07	12,0
Fenantreno	2,12 ± 0,13	6,1	1,70 ± 0,17	9,9	1,96 ± 0,39	19,9
Antraceno	0,12 ± 0,01	11,0	0,13 ± 0,01	7,6	0,11 ± 0,01	11,2
Fluoranteno	0,64 ± 0,05	7,7	1,18 ± 0,11	9,6	0,97 ± 0,10	9,8
Pireno	0,62 ± 0,04	5,9	1,53 ± 0,10	6,7	1,72 ± 0,17	9,9
Benz[a]antraceno	0,14 ± 0,01	7,5	0,18 ± 0,01	3,1	0,12 ± 0,01	8,5
Criseno	0,19 ± 0,02	8,5	0,25 ± 0,04	15,1	0,11 ± 0,03	28,9
Benzo[b]fluoranteno	0,19 ± 0,03	13,2	0,14 ± 0,01	6,7	0,19 ± 0,01	8,0
Benzo[k]fluoranteno	0,05 ± 0,00	5,0	0,04 ± 0,01	12,8	0,04 ± 0,00	7,1
Benzo[a]pireno	0,09 ± 0,01	7,8	0,08 ± 0,00	4,4	0,09 ± 0,00	3,7
Dibenz[a,h]antraceno	0,03 ± 0,00*	11,6	0,03 ± 0,00*	12,6	0,04 ± 0,01*	14,0
Benzo[g,h,i]perileno	0,18 ± 0,02	8,6	0,24 ± 0,01	4,1	0,40 ± 0,06	15,7
Indeno[1,2,3-cd]pireno	n.d.		n.d.		0,29 ± 0,02*	5,9
Total	9,72		9,38		8,78	

n.d. – não detectado

*abaixo do limite de quantificação

Mais uma vez, o naftaleno, o fenantreno e o pireno foram os PAHs quantitativamente mais representativos entre os analisados, com uma média de 3,19 µg/kg, 1,93 µg/kg, 1,29 µg/kg, respectivamente. Este perfil de PAHs foi comum aos observados pela maioria dos outros trabalhos [83,87,95,99], normalmente em quantidades superiores. As excepções foram o naftaleno, que não foi determinado em mais nenhum estudo, e a intromissão do fluoranteno que predominava nos óleos de girassol avaliados por Kolarovič *et al.* (6,70 µg/kg) [99] e Hopia *et al.* (1,4 µg/kg) [83].

Face aos baixos valores de PAHs de alto peso molecular exibidos pelos óleos de girassol ensaiados (0,52-1,04 µg/kg), adivinha-se a utilização de carvão activado na refinação destes espécimes.

Por conseguinte, os valores de c-PAHs encontrados, de 0,68 a 0,87 $\mu\text{g}/\text{kg}$, podem ser considerados baixos. Concentrações mais elevadas destes compostos foram observados por Kolarovič *et al.* [99], com 18,66 $\mu\text{g}/\text{kg}$, e por Speer *et al.* [87], com 5,2 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Apenas Hopia e colaboradores [83] conseguiram, e de que maneira, apresentar valores de c-PAHs inferiores, com apenas 0,09 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

A presença do carcinogéneo B[a]P nos óleos analisados foi muito modesta (0,08-0,09 $\mu\text{g}/\text{kg}$), revelando-se próxima do limite inferior do intervalo de concentrações encontrado na literatura científica (n.d. até 10,6 $\mu\text{g}/\text{kg}$) [84,88,104,155]. Apesar desta largura de intervalo, a maior parte dos trabalhos também se avizinha dos teores mais baixos de B[a]P: Speer *et al.* [87] estimou-o em 0,7 $\mu\text{g}/\text{kg}$, Hopia *et al.* [83] não o detectaram ($< 0,02 \mu\text{g}/\text{kg}$), Kolarovič *et al.* [99] observaram 1,51 $\mu\text{g}/\text{kg}$, enquanto as 4 marcas comerciais de óleo de girassol estudadas por Pupin e Toledo [86] apresentavam concentrações desde níveis abaixo do limite de detecção (0,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$) até 2,2 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Os teores de PAHs totais, de alto peso molecular e B[a]P das amostras de óleos de girassol ficaram categoricamente abaixo dos valores estipulado pela GSFS, respectivamente com 3,48, 0,054 e 0,09 $\mu\text{g}/\text{kg}$ na amostra 1, 4,13, 0,52 e 0,08 $\mu\text{g}/\text{kg}$ no exemplar 2 e 4,54, 1,04 e 0,09 $\mu\text{g}/\text{kg}$ na 3ª amostra. Em conformidade, os óleos avaliados por Hopia *et al.* [83] e por Speer *et al.* [87] respeitaram as sugestões daquele organismo. Todavia, as amostras investigadas por Kolarovič *et al.* [99] transpunham a recomendação para PAHs de alto peso molecular, com uma média de 13,75 $\mu\text{g}/\text{kg}$, mas não o faziam no que respeita ao estabelecido para PAHs totais.

Pode-se concluir que os óleos de girassol analisados exibem uma baixa contaminação com PAHs, com especial relevo para os reduzidos teores das espécies de maior peso molecular, na maior parte carcinogéneas. Como tal, não é crível que estes óleos representem uma ameaça em termos toxicológicos.

8.4 Óleo de soja

À semelhança dos óleos de amendoim e girassol, as amostras de óleos de soja avaliadas apresentaram teores reduzidos de PAHs, na ordem dos 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Quadro XIV).

Quadro XIV: Teor de PAHs ($\mu\text{g}/\text{kg}$) em óleos de soja

Óleo soja PAH	Amostra 1		Amostra 2		Amostra 3	
	Média \pm d.p. CV (%)		Média \pm d.p. CV (%)		Média \pm d.p. CV (%)	
Naftaleno	4,97 \pm 0,23	4,6	2,37 \pm 0,20	8,6	4,43 \pm 1,12	25,2
Acenafteno	0,07 \pm 0,01*	14,3	n.d.		0,04 \pm 0,01*	26,6
Fluoreno	0,74 \pm 0,12	15,6	0,51 \pm 0,02	3,8	0,74 \pm 0,15	20,3
Fenantreno	0,95 \pm 0,06	6,4	2,42 \pm 0,01	0,6	1,67 \pm 0,31	18,4
Antraceno	0,08 \pm 0,01	14,5	0,19 \pm 0,01	5,3	0,08 \pm 0,02	21,9
Fluoranteno	0,65 \pm 0,02	2,5	1,50 \pm 0,16	10,5	0,62 \pm 0,05	7,8
Pireno	0,80 \pm 0,09	10,8	1,82 \pm 0,33	18,2	0,63 \pm 0,11	16,9
Benz[a]antraceno	0,15 \pm 0,03	20,7	0,22 \pm 0,01	2,9	0,14 \pm 0,01	9,1
Criseno	0,08 \pm 0,02	21,0	0,31 \pm 0,03	9,1	0,16 \pm 0,01	8,1
Benzo[b]fluoranteno	0,18 \pm 0,03	15,4	0,28 \pm 0,02	8,6	0,22 \pm 0,01	2,8
Benzo[k]fluoranteno	0,04 \pm 0,01	11,3	0,10 \pm 0,00	5,1	0,06 \pm 0,00	7,1
Benzo[a]pireno	0,09 \pm 0,00	1,5	0,17 \pm 0,02	12,5	0,09 \pm 0,01	15,9
Dibenz[a,h]antraceno	0,04 \pm 0,01*	13,3	0,09 \pm 0,02	19,2	0,09 \pm 0,00	5,0
Benzo[g,h,i]perileno	0,24 \pm 0,04	18,0	0,49 \pm 0,12	23,7	0,34 \pm 0,02	6,3
Indeno[1,2,3-cd]pireno	0,24 \pm 0,03*	10,7	0,32 \pm 0,05	15,3	n.d.	
Total	9,33		10,81		9,31	

n.d. – não detectado

* abaixo do limite de quantificação

As concentrações totais evidenciadas pelos óleos de soja avaliados, de 9,31 a 10,8 $\mu\text{g}/\text{kg}$, encontram-se dentro dos valores referenciados por outros autores. Larsson *et al.* [85] avaliaram o teor em PAHs (20 compostos) de óleos de soja ($n=7$), que variava entre 5 e 17 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Duas amostras de óleo de soja estudadas por Hopia e colaboradores [83], apresentaram teores totais de PAHs de 36 e 27 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Dennis *et al.* [26] obtiveram valores muito próximos a estes: a média de PAHs totais (11 compostos) das 19 amostras de óleo de soja analisadas foi de 28,4 $\mu\text{g}/\text{kg}$. A menor concentração identificada para esta matriz (3,6 $\mu\text{g}/\text{kg}$) foi observada no trabalho de Lawrence e Weber [157] e foi certamente resultado de eficientes etapas de desodorização e branqueamento com carvão activado. No outro extremo, Kolarovič e Traitler [99] encontraram num óleo de soja uma contaminação acentuada com PAHs (220,23 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Este espectro de concentrações é exemplificativo das variações que se podem observar nos óleos vegetais, ainda que dentro do mesmo tipo de sementes oleaginosas.

O naftaleno foi responsável, nas amostras 1 e 3, por aproximadamente metade dos teores encontrados. Nestes mesmos exemplares (1 e 3), as concentrações de antraceno (0,08 µg/kg) foram as menores entre toda a gama de óleos vegetais avaliados neste trabalho, assim como as de benzo[k]fluoranteno (0,04 µg/kg) no primeiro deles (amostra 1). Ao invés, a amostra 2 apresentou um contributo relativo de PAHs de alto peso molecular superior (13,2% Vs. ~9% nas outras duas amostras), destacando-se entre estes o benzo[k]fluoranteno, o benzo[a]pireno, o benzo[g,h,i]perileno e o indeno[1,2,3-cd]pireno.

Os PAHs de menor peso molecular eram os quantitativamente mais importantes nos óleos de soja estudado, com destaque para o naftaleno, o fenantreno e o pireno. Estes compostos foram também os predominantes no estudo de Dennis *et al.* [26] e numa amostra avaliada por Hopia *et al.* [83], mas nestes casos em quantidades mais elevadas. O pireno variou entre 1,94 e 36,4 µg/kg e o fluoranteno entre 1,51 e 12,6 µg/kg nos diversos óleos de soja de Dennis *et al.* [26]. Hopia *et al.* [83] quantificaram 8,5 µg/kg de pireno no seu trabalho.

No entanto, noutros trabalhos [85,99,157] os PAHs de maior peso molecular prevaleceram. O benzo[b]fluoranteno, o criseno, o trifenileno e o indeno[1,2,3-cd]perileno, no trabalho de Larsson *et al.* [85], e o dibenzo[a,h]antraceno, no estudo de Lawrence e Weber [157], são exemplos disso mesmo. Os reduzidíssimos teores de PAHs de menor peso molecular observados por estas duas equipas de investigação [85,157] serão com certeza reflexo de uma eficiente desodorização.

A soma dos teores de PAHs com actividade carcinogénica valia entre 0,76 e 1,50 µg/kg, nos óleos de soja que constituíram a amostra. Estes valores são os mais baixos de entre todos os descritos na mais diversa literatura científica, o que muito abona em seu favor, em termos de segurança toxicológica.

Apesar da extremamente baixa contaminação das amostras pesquisadas por Lawrence e Weber [157], cerca de 2/3 dos compostos eram carcinogéneos (2,4 µg/kg), o que era suficiente para superar os valores aqui apresentados. No trabalho de Larsson e colaboradores [85], os teores de c-PAHs correspondiam sensivelmente a metade (48-58%) do total de PAHs, desde 2,80 a 8,20 µg/kg. Grimmer e Hildebrandt [101] reportaram níveis de c-PAHs de 12,1 µg/kg nas amostras de óleo de soja que analisaram, um pouco menores que os apontados por Dennis *et al.* [26] (17,47 µg/kg). A elevada presença destes compostos podia resultar da não aplicação de carvão activado

na refinação, que diminuiria o teor de PAHs de alto peso molecular (como quase todos os c-PAHs são).

A amostra de óleo de soja avaliada por Kolarovič e Traitler [99], apresentava 185,12 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de c-PAHs. Este valor verdadeiramente invulgar pode ser produto de uma contaminação atmosférica maciça ou resultar do processo de secagem utilizado.

Os teores detectados do potente carcinogéneo B[a]P (0,09 a 0,17 $\mu\text{g}/\text{kg}$) são os mais baixos valores relatados para este tipo de óleo específico. De uma forma geral, as concentrações de B[a]P encontradas nesta matriz por outros autores [26,83,85,101,157] são ligeiramente superiores (0,2 a 2,2 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Um exemplar de óleo de soja de origem brasileira exibiu 6,1 $\mu\text{g}/\text{kg}$, no entanto a maioria das amostras situavam-se entre 1 e 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ [86]. Em contraposição, Kolarovič e Traitler [99] detectaram 28,45 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de B[a]P.

À semelhança do trabalho de Lawrence e Weber [157], todas as amostras dos óleos de soja analisados cumpriram os requisitos preconizados pelo movimento associativo industrial alemão, respeitantes ao teor de PAHs totais (2,35-5,42 $\mu\text{g}/\text{kg}$), de PAHs de alto peso molecular (0,79-1,46 $\mu\text{g}/\text{kg}$) e de B[a]P (0,09-0,17 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Resultados exactamente opostos foram obtidos por Kolarovič e Traitler [99] que trasgrediam estas referências; os níveis de PAHs totais correspondiam a 133,56 $\mu\text{g}/\text{kg}$ e os de PAHs de alto peso molecular a 162,7 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Um padrão curioso a este respeito foi observado numa série de trabalhos [26,83,85], pois embora as recomendações da GSFS para PAHs totais fosse sempre satisfeitas, os teores de PAHs de alto peso molecular eram quase sempre superiores ao sugerido.

Os óleos de soja estudados apresentavam níveis de contaminação com PAHs comparativamente baixos. No mesmo sentido, a presença de PAHs carcinogéneos era diminuta. Estes factores contribuem para que não se levante nenhum óbice de ordem toxicológico ao consumo deste tipo particular de óleos vegetais.

8.5 Óleo de milho

A concentração total de PAHs nos óleos de milho que constituíram a amostra em estudo é superior, particularmente nas amostras 1 e 3, às encontradas para os outros tipos de óleos atrás descritos e muito semelhante às observadas nos azeites virgens.

Quadro XV: Teor de PAHs ($\mu\text{g}/\text{kg}$) em óleos de milho

Óleo milho PAH	Amostra 1		Amostra 2		Amostra 3	
	Média \pm d.p. CV (%)		Média \pm d.p. CV (%)		Média \pm d.p. CV (%)	
Naftaleno	7,34 \pm 0,68	9,2	4,02 \pm 0,90	22,3	4,07 \pm 0,32	7,8
Acenafteno	0,12 \pm 0,02*	13,0	0,10 \pm 0,01*	14,1	n.d.	
Fluoreno	0,49 \pm 0,04	8,9	0,52 \pm 0,04	6,8	1,02 \pm 0,08	8,0
Fenantreno	0,87 \pm 0,12	14,2	6,88 \pm 0,25	3,7	2,55 \pm 0,26	10,1
Antraceno	0,34 \pm 0,06	18,3	0,10 \pm 0,00	2,2	0,19 \pm 0,00	2,0
Fluoranteno	4,74 \pm 0,55	11,6	0,64 \pm 0,01	1,0	1,46 \pm 0,09	6,4
Pireno	5,70 \pm 0,14	2,5	0,81 \pm 0,04	5,0	1,79 \pm 0,12	6,7
Benz[a]antraceno	2,49 \pm 0,31	12,3	0,23 \pm 0,00	0,5	1,57 \pm 0,11	6,9
Criseno	2,97 \pm 0,12	4,0	0,30 \pm 0,01	3,9	1,60 \pm 0,14	8,7
Benzo[b]fluoranteno	1,11 \pm 0,08	7,6	0,19 \pm 0,01	4,9	0,95 \pm 0,08	8,3
Benzo[k]fluoranteno	0,28 \pm 0,05	18,1	0,07 \pm 0,00	1,3	0,34 \pm 0,03	8,7
Benzo[a]pireno	0,45 \pm 0,01	2,0	0,12 \pm 0,00	4,1	0,50 \pm 0,04	7,4
Dibenz[a,h]antraceno	0,11 \pm 0,01	11,5	0,04 \pm 0,00*	6,6	0,11 \pm 0,01	12,1
Benzo[g,h,i]perileno	1,30 \pm 0,20	15,6	0,35 \pm 0,02	7,0	0,54 \pm 0,03	4,6
Indeno[1,2,3-cd]pireno	0,61 \pm 0,13	21,6	0,18 \pm 0,02*	11,3	0,49 \pm 0,04	8,2
Total	28,92		14,56		17,19	

n.d. – não detectado

* abaixo do limite de quantificação

A similitude de teores com os azeites leva a teorizar que os óleos de milho em causa, apesar de terem sido submetidos a refinação, não devem ter sido filtrados com carvão activado neste procedimento, pelos valores observados para os PAHs de alto peso molecular. Aliás, o benzo[g,h,i]perileno e o indeno[1,2,3-cd]pireno atingiram, no óleo 1, o valor máximo entre todo o espectro de óleos examinados ao longo deste estudo.

Há ainda a possibilidade deste tipo de óleos apresentarem níveis mais elevados, não por definição biológica, mas por serem submetidos a processamento comum, à semelhança do que se passa com os óleos de coco. Nestes, os valores de PAHs são quase sempre elevadíssimos (3100 e 3700 $\mu\text{g}/\text{kg}$ [88], por exemplo) não por ser característico da espécie, mas por habitualmente a copra ser submetida a uma secagem própria que catapultas as concentrações de PAHs para aquele patamar.

No entanto, justifica-se a rastreabilidade destes óleos de milho para corroborar, ou dissolver, estas duas hipóteses levantadas.

O óleo de milho 1 ensaiado apresentou níveis particularmente elevados de alguns compostos; para além dos atrás citados, expressou níveis máximos para o benz[a]antraceno (2,49 µg/kg) e o criseno (2,97 µg/kg).

A amostra 2 para além de exibir uma concentração mais baixa do que os outros congéneres, apresenta um perfil próximo dos outros tipos de óleos vegetais, com predomínio claro do fenantreno e do naftaleno, com 47 e 28% do total. Neste óleo de milho (n.º 2) o teor de c-PAHs (1,13 µg/kg) estava dentro do habitualmente observado para os óleos de outras origens.

Ao invés, os mais elevados teores das outras amostras (1 e 3) escondiam uma maior homogeneidade entre os compostos, destacando-se os maiores valores de PAHs de alto peso molecular em relação a outros óleos. Nestas amostras, os c-PAHs tiveram a maior contribuição relativa observada neste trabalho (28 e 32%), que se traduziu em termos absolutos em 8,02 e 5,56 µg/kg. Estes valores são suficientes para se justificar a aplicação de carvão activado, com o objectivo de diminuir a carga de PAHs deste tipo.

Todavia, o mais elevado teor de PAHs de alto peso molecular observado neste tipo de óleos não era suficientemente significativo para que alguma das amostras ultrapassasse os valores limite enunciados pela GSFS. No entanto, a amostra n.º 1 foi, de todos os óleos estudados no âmbito deste trabalho, a que mais se aproximou (3,86 µg/kg) do limite de 5 µg/kg para PAHs de alto peso molecular.

Os níveis de contaminação das amostras de óleos de milho são muito semelhantes aos descritos noutros trabalhos [26,83,85]. Os três exemplares de óleo de milho estudados por Dennis *et al.* [26] apresentaram concentrações médias de 32,0 µg/kg de PAHs totais (11 compostos). O teor de c-PAHs era de 11,7µg/kg, que pode ser parcialmente explicado por não ter sido usado carvão activado durante a refinação. O teor de PAHs de alto peso molecular (9,07 µg/kg) era quase o dobro do recomendado pela GSFS (5 µg/kg). Ademais, o preconizado para o B[a]P (1µg/kg) também foi excedido (1,54 µg/kg). Todavia, o total de PAHs, de 19,50 µg/kg, era menor que 25 µg/kg, a que não deve ser alheio o facto de serem avaliados apenas metade (6) dos compostos que integram este parâmetro.

Lawrence e Weber [157] encontraram um total de PAHs (15) de 13,6 µg/kg. O fluoranteno (7,5 µg/kg) representava mais que a soma de todos os outros. O segundo

quantitativamente mais importante era o dibenzo[a,c]antraceno. O teor de c-PAHs era de 4,6 µg/kg.

O total dos 10 PAHs detectados por Hopia *et al.* [83] no óleo de milho foi de 0,71 µg/kg. Trata-se do valor mais baixo em toda a literatura consultada. A maior parte dos PAHs presentes eram de elevado peso molecular, ainda que o fenantreno fosse o que registasse o maior valor (0,14 µg/kg). O mesmo tipo de óleo, mas virgem obtido por pressão a frio, apresentou um teor mais elevado (18 µg/kg), com predomínio dos PAHs de alto peso molecular de natureza carcinogénica (no conjunto 9,3 µg/kg); estes valores são mais próximos dos narrados noutros estudos, incluindo o que se apresenta. Fica vincada a diferença, apesar de não se tratar da mesma amostra, entre os óleos que são sujeitos a refinação e os que são submetidos apenas a processos físicos, neste caso pressão a frio.

Nos óleos de milho analisados os valores de B[a]P foram quantificados entre 0,12-0,50 µg/kg, enquadrando-se entre o observado noutros trabalhos [26,83,157] (0,02 a 1,54 µg/kg). Noutra margem, Pupin e Toledo [86] encontraram grandes variações nos níveis de B[a]P em óleos de milho brasileiros, gravitando entre 1,6 e 58,9 µg/kg, com uma média de 10,8 µg/kg. Os autores [86] atribuírem esta contaminação ao processo de secagem: a algumas amostras de milho pode ter sido permitido que secassem ao sol, enquanto outras podiam ter sido sujeitas a um processo de secagem directa usando madeira ou óleo como combustível. O maior valor relatado anteriormente para B[a]P havia sido de 26,1 µg/kg [84].

Os óleos de milho estudados apresentam um nível de PAHs mais elevado que os outros tipos de óleos vegetais, destacando-se a maior contribuição das espécies de maior peso molecular. Neste contexto, talvez fosse recomendável a aplicação permanente de carvão activado na refinação deste tipo de género alimentício, não por se levantar um risco toxicológico proeminente, mas no sentido cautelar.

8.6 Óleo alimentar

Os óleos alimentares constituem misturas de duas ou mais espécies diferentes de óleos vegetais. Na maior parte das vezes, a informação relativa à elucidação de quais os óleos que integram a mescla não está disponível no rótulo, não sendo, de qualquer forma, de menção obrigatória. No propósito deste trabalho de investigação este conhecimento também não é essencial; as fontes de contaminação com PAHs são

indiferentes ao património genético. Seria, neste sentido, mais importante conhecer o nível de contaminação a que as plantas estiveram sujeitas, o tipo de tratamento (de secagem e refinação) a que os óleos foram submetidos, etc.

Os resultados da análise das 5 amostras de óleos alimentares descritos no quadro seguinte (Quadro XVI) são, sem dúvida, interessantes. Encontram-se, entre estes exemplares, desde os valores mais baixos de PAHs totais (7,26 µg/kg, na amostra 5) ao segundo mais elevado (52,39 µg/kg, na amostra 2) de todos os óleos vegetais estudados. Esta diferença não se espera ser consequência dos diferentes tipos e contribuições relativas de óleos estemes utilizados, pois a hipótese de síntese endógena é remota e a de síntese característica de cada espécie praticamente descartada. Aliás, a amostra 2 era uma mistura de óleos de soja e girassol (informação do rótulo) que como visto anteriormente apresentavam concentrações mais baixas destes cancerígenos, de 8,78 a 10,81 µg/kg. Deste modo, são outros factores, como a contaminação atmosférica a que as plantas estiveram sujeitas, o processo de secagem utilizado, a pureza dos solventes de extracção e o próprio processo de refinação, entre outros, os responsáveis pelas discrepâncias observadas.

As amostras 3, 4 e 5 assemelham-se entre si e com os outros óleos refinados na concentração final de PAHs, sensivelmente à volta de 10 µg/kg. Da mesma forma, o naftaleno e o fenantreno são os PAHs mais representativos. As pequenas divergências prendem-se apenas com a maior contribuição relativa dos PAHs de maior peso molecular (dibenz[a,h]antraceno, benzo[g,h,i]perileno e indeno[1,2,3-cd]pireno) na amostra 5, muito pelo contributo dos valores mínimos observados para o benz[a]antraceno, o fluoranteno e o fluoreno.

A amostra 1 situa-se, em termos de concentração global de PAHs, num patamar intermédio, ao nível do observado para os óleos de milho. Não se entenda, no entanto, que isto significa que se trata de um óleo de milho. Este tipo de contaminação não nos possibilita fazer tal juízo. A análise do teor total de PAHs ou a caracterização do seu perfil servem como ferramentas de autenticidade.

Quadro XVI: Teor de PAHs ($\mu\text{g}/\text{kg}$) em óleos alimentares

PAH	O. alimentar		Amostra 1		Amostra 2		Amostra 3		Amostra 4		Amostra 5	
	Média \pm d.p.	CV (%)	Média \pm d.p.	CV (%)	Média \pm d.p.	CV (%)	Média \pm d.p.	CV (%)	Média \pm d.p.	CV (%)	Média \pm d.p.	CV (%)
Naftaleno	5,00 \pm 0,63	12,6	6,94 \pm 1,22	17,6	3,97 \pm 0,24	6,0	4,50 \pm 0,49	11,0	2,37 \pm 0,67	28,3	0,18 \pm 0,06	35,7
Acenafteno	0,17 \pm 0,03	20,1	0,10 \pm 0,00*	0,7	0,05 \pm 0,02*	44,9	0,05 \pm 0,00*	6,1	0,47 \pm 0,04	9,3	1,34 \pm 0,39	29,3
Fluoreno	0,78 \pm 0,07	8,7	1,52 \pm 0,14	9,0	0,91 \pm 0,05	5,7	0,74 \pm 0,03	4,1	0,10 \pm 0,01	14,8	0,56 \pm 0,05	9,3
Fenantreno	2,17 \pm 0,26	12,2	16,89 \pm 0,48	2,8	1,88 \pm 0,04	1,9	2,31 \pm 0,21	9,3	0,95 \pm 0,16	16,6	0,08 \pm 0,01	11,6
Antraceno	0,16 \pm 0,02	11,5	2,26 \pm 0,06	2,5	0,10 \pm 0,01	5,8	0,15 \pm 0,02	10,7	0,12 \pm 0,02	13,7	0,16 \pm 0,00	2,6
Fluoranteno	2,21 \pm 0,21	9,6	10,22 \pm 0,33	3,2	0,62 \pm 0,01	0,9	1,26 \pm 0,09	7,1	0,05 \pm 0,01	24,1	0,08 \pm 0,01	18,8
Pireno	2,83 \pm 0,31	10,8	9,27 \pm 0,95	10,3	0,45 \pm 0,00	1,0	1,33 \pm 0,13	9,6	0,12 \pm 0,02	29,8	0,40 \pm 0,12	29,8
Benz(a)antraceno	1,04 \pm 0,15	14,8	1,16 \pm 0,13	11,1	0,18 \pm 0,01	5,7	0,16 \pm 0,01	5,8	0,28 \pm 0,03*	11,0	0,28 \pm 0,03*	11,0
Criseno	0,90 \pm 0,01	0,6	1,76 \pm 0,18	10,2	0,26 \pm 0,01	4,4	0,26 \pm 0,01	2,3	0,28 \pm 0,03*	11,0	0,28 \pm 0,03*	11,0
Benzo(b)fluoranteno	0,51 \pm 0,04	8,8	0,69 \pm 0,02	3,5	0,29 \pm 0,01	3,3	0,29 \pm 0,01	3,1	0,16 \pm 0,00	2,6	0,16 \pm 0,00	2,6
Benzo(k)fluoranteno	0,13 \pm 0,02	11,5	0,18 \pm 0,00	2,7	0,09 \pm 0,00	3,1	0,08 \pm 0,01	9,3	0,05 \pm 0,01	24,1	0,05 \pm 0,01	24,1
Benzo(a)pireno	0,25 \pm 0,03	10,0	0,34 \pm 0,01	3,5	0,17 \pm 0,01	3,8	0,14 \pm 0,01	7,7	0,08 \pm 0,01	18,8	0,08 \pm 0,01	18,8
Dibenz(a,h)antraceno	0,09 \pm 0,01	10,5	0,10 \pm 0,01	10,4	0,07 \pm 0,00	3,6	0,06 \pm 0,00	4,1	0,12 \pm 0,00	3,3	0,12 \pm 0,00	3,3
Benzo(ghi)perileno	0,38 \pm 0,11	29,6	0,62 \pm 0,07	11,9	0,21 \pm 0,03	14,1	0,27 \pm 0,02	6,0	0,40 \pm 0,12	29,8	0,40 \pm 0,12	29,8
Indeno(1,2,3-cd)pireno	0,45 \pm 0,02	3,7	0,34 \pm 0,02	7,0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,28 \pm 0,03*	11,0	0,28 \pm 0,03*	11,0
Total	17,07		52,39		9,25		11,60		7,26		7,26	

n.d. - não detectado

* abaixo do limite de quantificação

O perfil de PAHs apresentado pela amostra 2 é bem curioso: o seu alto teor de PAHs deve-se principalmente à presença de PAHs de menor peso molecular; os congéneres de alto peso molecular apresentam valores dentro dos habitualmente encontrados neste estudo. Este cenário praticamente exclui a hipótese de ser a ausência de carvão activado no branqueamento o factor causal da elevada concentração. Assim, e para explicar os níveis altos de PAHs de menor peso molecular, levantam-se duas hipóteses: a menor eficácia da desodorização (por exemplo, pela redução do tempo de aplicação) ou os óleos utilizados no seu fabrico apresentarem uma carga de PAHs bastante elevada que a refinação não conseguiu corrigir totalmente. Pode teorizar-se que esta contaminação possa ter origem no tráfico rodoviário, pelo facto dos valores dos PAHs de 3 e 4 anéis aromáticos, característicos deste tipo de contaminação, estarem em grande evidência nesta amostra. Aliás, os mais altos níveis observados eram relativos ao fenantreno, fluoranteno e pireno, tendo inclusivamente os dois últimos, juntamente com o antraceno, sido os mais elevados de todo o procedimento analítico.

O fluoranteno e o pireno foram também os compostos presentes em maior quantidade nos óleos alimentares analisados por Dennis e colaboradores [26], variando entre 0,21 e 12,4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ e 0,58 e 17,2 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectivamente. Como se pode depreender por estes valores, observaram-se grandes oscilações nas concentrações de PAHs entre os óleos analisados, que apresentaram, em termos médios, 19,46 $\mu\text{g}/\text{kg}$. A quantidade de c-PAHs encontrada naqueles óleos vegetais (11,32 $\mu\text{g}/\text{kg}$, em média) ultrapassava as que determinadas na mesma matriz, apesar de se terem observado concentrações totais superiores (52,39 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Mais de metade (58%) dos PAHs tinha efeito carcinogénio no trabalho de Dennis *et al.* [26]. Estes autores [26] advogam que as quantidades altas presentes em alguns óleos vegetais estudados se possam dever a métodos de secagem desapropriados, em óleos como os de coco.

Encontraram-se concentrações superiores de PAHs em óleos alimentares analisados noutra trabalho [6]; da ordem de 79,8 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Destes, 22,4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ correspondiam a PAHs com reconhecida actividade carcinogénica, valores superiores aos atrás expostos. Mais uma vez foi notória uma grande variabilidade de valores, atingindo diferenças de uma a duas ordens de grandeza.

Com tal inconstância de concentrações observadas nestes trabalhos [6,26] as recomendações da GSFS eram largamente ultrapassadas por algumas amostras que os integraram, ao passo que outros exemplares ficavam muito aquém.

Entre os óleos estudados, a amostra 2 foi a única que transgrediu os limites estabelecidos pela GSFS para PAHs totais (30,64 $\mu\text{g}/\text{kg}$), mas cumpria, à semelhança de todas as outras, os de PAHs de alto peso molecular (2,28 $\mu\text{g}/\text{kg}$).

A quase totalidade dos óleos analisados por Balenovic e colaboradores [100] apresentaram PAHs totais acima de 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$, devido fundamentalmente à grande quantidade de PAHs de menor peso molecular, tornando-os, segundo a GSFS, impróprios para consumo humano. Os níveis de PAHs em óleos vegetais finlandeses, também se aproximavam muito dos valores máximos de referência, sendo em média de 23 $\mu\text{g}/\text{kg}$ [83]. A maioria dos óleos vegetais brutos estudados por Gertz e Kogelheide [95] continham mais de 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de PAHs totais, mas uma vez refinados apenas ocasionalmente excediam aquele limite.

Os níveis de B[a]P encontrados (0,08 a 0,34 $\mu\text{g}/\text{kg}$) estão na margem inferior dos descritos na literatura científica para óleos vegetais. Kazerouni *et al.* [103] encontraram 0,2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de B[a]P nos óleos vegetais que estudaram, muito semelhante aos 0,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (de não detectável a 1,7 $\mu\text{g}/\text{kg}$) apontados noutro trabalho [6]. Por sua vez, Dennis *et al.* [26] encontraram uma concentração média de B[a]P de 1,29 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (0,29 e 4,92 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Um espectro mais largo de valores deste contaminante foi determinado em óleos vegetais holandeses (de 0,3 a 26,1 $\mu\text{g}/\text{kg}$) [84]. Speer e Montag [104] detectaram um intervalo de <0,1 a 4,1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para o mesmo composto em óleos de origem alemã.

Os valores de PAHs detectados para óleos alimentares são mais altos que os observados nas versões estremes. A junção, em diferentes quantidades, de óleos de diversas origens geográficas, submetidos a tecnologias distintas, torna imprevisível a contaminação final do óleo alimentar. Como tal, e perante esta impossibilidade, a indústria refinadora deverá proceder à rastreabilidade dos óleos que adquire e instaurar um procedimento de rotina de avaliação do teor em PAHs totais ou, pelo menos, de B[a]P e conforme o resultado proceder a um tratamento, mais ou menos severo, dos óleos em processamento.

Contudo, as amostras avaliadas no contexto deste trabalho não apresentam, de uma forma geral, níveis preocupantes destes contaminantes (apenas uma amostra ultrapassou a recomendação da GSFS para PAHs totais). Contudo, estes dados não são garante de uma segurança toxicológica perene e inquestionável, até pelos exemplos de contaminações elevadíssimas que, não raramente, são relatados na literatura.

8.7 Óleos de avelã e sésamo

Pelo facto destes óleos terem menos impacto em termos de consumo em Portugal, e como tal terem sido estudadas menos amostras, apresentam-se conjuntamente nesta secção (Quadro XVII).

O teor de PAHs no óleo de avelã (22,41 µg/kg) é semelhante ao observado para o azeite. No entanto, e distintamente do observado naquele, o naftaleno representava mais do que todos os outros PAHs em conjunto, cerca de 53% do valor total.

O óleo de avelã cumpriu as directrizes da GSFS relativas ao total de PAHs (8,08 µg/kg), aos PAHs de alto peso molecular (1,65 µg/kg) e de B[a]P (0,32 µg/kg).

Quadro XVII: Teor de PAHs (µg/kg) em óleos de avelã e sésamo

PAH	Óleo de avelã		Óleo de sésamo	
	Média ± d.p.	CV (%)	Média ± d.p.	CV (%)
Naftaleno	11,87 ± 1,10	9,3	27,12 ± 1,22	4,5
Acenafteno	0,04 ± 0,02*	41,1	n.d.	
Fluoreno	0,50 ± 0,02	3,4	1,41 ± 0,11	7,9
Fenantreno	3,93 ± 0,08	2,1	37,86 ± 1,14	3,0
Antraceno	0,18 ± 0,02	9,2	0,65 ± 0,01	2,3
Fluoranteno	1,25 ± 0,04	3,3	3,00 ± 0,03	0,9
Pireno	1,80 ± 0,08	4,6	1,55 ± 0,12	7,5
Benz[a]antraceno	0,37 ± 0,03	6,8	0,84 ± 0,01	1,0
Criseno	0,81 ± 0,02	2,4	0,78 ± 0,07	9,4
Benzo[b]fluoranteno	0,22 ± 0,03	12,9	1,23 ± 0,02	1,6
Benzo[k]fluoranteno	0,07 ± 0,01	8,4	0,41 ± 0,01	2,2
Benzo[a]pireno	0,32 ± 0,02	6,1	0,65 ± 0,05	7,1
Dibenz[a,h]antraceno	0,13 ± 0,02	14,4	0,12 ± 0,01	11,4
Benzo[g,h,i]perileno	0,53 ± 0,03	5,7	0,71 ± 0,15	21,3
Indeno[1,2,3-cd]pireno	0,37 ± 0,04	9,6	0,61 ± 0,04	6,7
Total	22,41		76,96	

n.d. – não detectado

* abaixo do limite de quantificação

Quanto ao óleo de sésamo, foi o que apresentou o teor mais elevado (76,96 µg/kg) de PAHs de todo o estudo, superando inclusivamente os óleos brutos analisados (*vide*

infra). Afinal, trata-se de um óleo não refinado, e como tal não beneficiário da redução de PAHs protagonizado neste procedimento tecnológico. É, assim, natural que se estabelecessem os máximos para alguns dos compostos analisados, como foi o caso do naftaleno, do fenantreno, do benzo[b]fluoranteno, do benzo[k]fluoranteno, do benzo[a]pireno e do indeno[1,2,3-cd]pireno. É curioso que apesar dos valores relativamente elevados para os PAHs de alto peso molecular, a contribuição relativa destes era muito pequena (4,9%), muito à custa das concentrações de naftaleno e fenantreno, que em conjunto representam 84% do total.

Speer *et al.* [87] encontraram concentrações inferiores (21,5 µg/kg) numa amostra de óleo de sésamo. O fenantreno monopolizava quase por completo essa contaminação, contabilizando 18,2 µg/kg. Esta ocorrência tinha algum paralelo na amostra estudada, especialmente se não se considerar o naftaleno, não avaliado por Speer *et al.* [87].

O teor de c-PAHs que o óleo de sésamo estudado apresentava, cerca de 4,65 µg/kg, superou por larga margem o observado na amostra alemã (0,8 µg/kg) [87].

No trabalho de Speer *et al.* [87] os limites enunciados pela GSFS foram naturalmente cumpridos. O óleo de sésamo avaliado também se quedou abaixo do preconizado para PAHs de alto PM (3,73 µg/kg) e B[a]P (0,65 µg/kg), mas foi um dos dois óleos do presente trabalho de investigação que apresentou teores de PAHs totais superiores aos recomendados pela GSFS, com 42,39 µg/kg.

Apesar do vazio legislativo, que inviabiliza qualquer restrição legal, recomenda-se precaução no consumo deste óleo em particular, pois os valores encontrados devem ser considerados, pelo menos, merecedores de atenção.

9. AVALIAÇÃO DO TEOR DE PAHs CARCINOGENÉOS EM ÓLEOS VEGETAIS

Na medida em que nem todos os PAHs exibem actividade carcinogénea, provavelmente terá tanto ou mais interesse conhecer-se o conteúdo em compostos cancerígenos dos óleos vegetais do que a simples soma dos PAHs totais detectados. Com este desígnio em mente, calculou-se o teor em PAHs cancerígenos de todos os óleos vegetais examinados neste estudo (Quadro XVIII). As parcelas desta soma foram os PAHs determinados neste estudo entre os descritos no Quadro I, ou seja, benzo[a]pireno, benz[a]antraceno, benzo[b]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno, dibenz[a]antraceno e indeno[1,2,3-cd]pireno.

Uma vez que a potência cancerígena diverge entre os PAHs atrás mencionados, calculou-se um “índice de carcinogenicidade”, que consiste na multiplicação da potência relativa de carcinogenicidade de acordo com a EPA (Quadro I) pela concentração do respectivo PAH em cada uma das amostras. Talvez este valor se aproxime mais do verdadeiro risco carcinogéneo oferecido, do que a simples soma dos teores de PAHs carcinogéneos.

Hopia *et al.* [83] observaram um perfil similar na maioria das amostras entre as espécies moleculares com actividade carcinogénica reconhecida e, como tal, aventaram a hipótese da concentração total de PAHs poder ser usada na estimativa do possível risco carcinogéneo que cada óleo oferecia. No trabalho que se apresenta, tal circunstância não se verificou, tendo-se revelado baixa a correlação entre estes dois parâmetros ($r^2 = 0,3895$). Como se pode observar pelos valores apresentados no Quadro XVIII, um teor mais elevado de PAHs totais não significa obrigatoriamente uma maior concentração de PAHs cancerígenos. Por exemplo, apesar do óleo de sésamo apresentar o teor mais elevado de PAHs, era superado por dois óleos de milho (amostra 1 e 3) no que respeita à concentração de PAHs cancerígenos. Na amostra 3 do óleo de milho cerca de um terço dos PAHs eram cancerígenos. Estes dois exemplares de óleos de milho (1 e 3) foram também os que apresentaram, juntamente com o óleo de sésamo, os mais elevados índices de carcinogenicidade (0,98, 0,92 e 1,05, respectivamente).

A utilização deste parâmetro tem apenas como propósito efeitos comparativos entre os diversos óleos vegetais. Não é possível quantificar o risco oferecido por cada um deles em função do índice de carcinogenicidade.

Quadro XVIII: Tores de PAHs totais e carcinogéneos e índice de carcinogenicidade dos óleos vegetais estudados

Óleo	Amostra	PAHs totais (µg/kg)	PAHs carcinogéneos (µg/kg)	Índice de carcinogenicidade
Azeite	1	26,35	2,86	0,53
	2	18,02	1,54	0,28
Amendoim	1	10,62	1,65	0,75
	2	10,14	0,56	0,12
	3	9,09	1,08	0,44
Girassol	1	9,72	0,68	0,15
	2	9,38	0,71	0,14
	3	8,78	0,87	0,19
Soja	1	9,33	0,82	0,19
	2	10,81	1,50	0,35
	3	9,31	0,76	0,22
Milho	1	28,92	8,02	0,98
	2	14,56	1,13	0,22
	3	17,19	5,56	0,92
Alimentar	1	17,07	3,37	0,55
	2	52,39	4,57	0,66
	3	9,25	1,05	0,29
	4	11,60	0,99	0,25
	5	7,26	0,90	0,25
Avelã	1	22,41	2,30	0,56
Sésamo	1	76,96	4,65	1,05

É frequente a utilização da concentração de B[a]P como indicador da contaminação total ou carcinogénea de PAHs em diversas matrizes. Kazerouni *et al.* [103] encontraram uma correlação entre PAHs totais e B[a]P de 0,87 e de 0,98 entre este e o teor de c-PAHs, para uma série de géneros alimentícios.

Em algumas indústrias refinadoras de óleos vegetais, a determinação deste composto constitui, inclusive, um factor decisório para a aplicação, ou não, de carvão activado na etapa de branqueamento.

Neste contexto, averiguou-se a correlação entre os teores de B[a]P e uma série de parâmetros, nomeadamente PAHs totais, PAHs carcinogêneos, índice de carcinogenicidade e PAHs totais e de alto peso molecular segundo a GSFS; os coeficientes de correlação obtidos foram $r^2 = 0,6511$, $r^2 = 0,7449$, $r^2 = 0,7821$, $r^2 = 0,6107$ e $r^2 = 0,839$, pela mesma ordem.

Tendo em conta estes resultados, a determinação de B[a]P pode ser sugestiva do teor de c-PAHs, mas não ser usada de forma taxativa. Dennis *et al.* [62] também defendem que o conteúdo em B[a]P não tem uma relação constante com os putativos PAHs carcinogêneos.

A determinação analítica de B[a]P poderá apenas funcionar como indicador qualitativo da presença de PAHs na amostra e não como uma medida quantitativa do efeito carcinogêneo total. Eventualmente útil em exames de rotina, mas insuficiente para controlo oficial e fiscalizador.

Justifica-se, com este desígnio, a necessidade de desenvolver um método menos moroso, em que seja determinado um espectro maior de analitos por forma a conferir uma visão mais abrangente e fidedigna da carga hidrocarbonada carcinogênea.

10. EVOLUÇÃO DOS TEORES DE PAHs AO LONGO DAS ETAPAS DE REFINAÇÃO DOS ÓLEOS VEGETAIS

Na medida em que a teoria da síntese endógena tem, actualmente, poucos defensores, pode-se pressupor que as sementes oleaginosas estão naturalmente isentas de PAHs. Desta forma, a possível contaminação das sementes por estes compostos, e consequentemente dos óleos vegetais que originarão, é de origem exógena. Entre os eventuais focos destes carcinogéneos, podem destacar-se a poluição atmosférica, por exemplo, pelas emissões de motores de combustão interna dos veículos motorizados, e a secagem directa dos grãos com gases de combustão.

A despeito da diversa e virtualmente inevitável exposição, os teores de PAHs encontrados actualmente nos óleos vegetais são, regra geral, relativamente baixos. Esta condição parece explicar-se, pelo menos em parte, pelo efeito que a refinação tem na redução dos teores de PAHs, como foi observado por alguns autores [12,26,85,88,89].

No sentido de verificar experimentalmente tais observações, estudou-se a evolução do teor de PAHs em óleos vegetais ao longo das diferentes fases da refinação, de acordo com o procedimento tecnológico das indústrias que facultaram as amostras. Assim, foram estudadas amostras de óleo de soja e de girassol brutos e azeite lampante e os óleos correspondentes após neutralização, branqueamento e desodorização.

10.1 Evolução do teor de PAHs ao longo da refinação de azeite

O teor total de PAHs decresceu de 38,95 $\mu\text{g}/\text{kg}$ no azeite lampante para 7,00 $\mu\text{g}/\text{kg}$ na sua forma desodorizada (Quadro XIX).

Quadro XIX: Teor de PAHs ($\mu\text{g}/\text{kg}$) em azeite ao longo da refinação

PAH	Azeite	Lampante	Neutralizado	Branqueado	Desodorizado
		Média \pm d.p.	Média \pm d.p.	Média \pm d.p.	Média \pm d.p.
Naftaleno		10,64 \pm 0,25	3,75 \pm 0,14	4,40 \pm 0,34	2,68 \pm 1,04
Acenafteno		3,06 \pm 0,27	3,13 \pm 0,40	4,34 \pm 0,39	0,07 \pm 0,01*
Fluoreno		1,46 \pm 0,20	1,24 \pm 0,05	1,53 \pm 0,05	0,08 \pm 0,01
Fenantreno		13,22 \pm 0,88	12,09 \pm 1,07	12,26 \pm 0,82	1,08 \pm 0,03
Antraceno		0,67 \pm 0,05	0,61 \pm 0,03	0,66 \pm 0,03	0,06 \pm 0,00
Fluoranteno		3,79 \pm 0,26	3,26 \pm 0,34	3,47 \pm 0,13	0,50 \pm 0,02
Pireno		2,57 \pm 0,10	2,30 \pm 0,16	2,89 \pm 0,54	0,58 \pm 0,02
Benz[a]antraceno		0,42 \pm 0,01	0,42 \pm 0,06	0,47 \pm 0,05	0,18 \pm 0,02
Criseno		1,05 \pm 0,13	0,74 \pm 0,07	0,42 \pm 0,08	0,38 \pm 0,08
Benzo[b]fluoranteno		0,43 \pm 0,04	0,39 \pm 0,02	0,49 \pm 0,02	0,31 \pm 0,01
Benzo[k]fluoranteno		0,12 \pm 0,00	0,13 \pm 0,01	0,18 \pm 0,03	0,11 \pm 0,00
Benzo[a]pireno		0,27 \pm 0,00	0,20 \pm 0,03	0,19 \pm 0,02	0,17 \pm 0,01
Dibenz[a,h]antraceno		0,29 \pm 0,04	0,15 \pm 0,02	0,10 \pm 0,00	0,07 \pm 0,00
Benzo[g,h,i]perileno		0,51 \pm 0,01	0,41 \pm 0,02	0,54 \pm 0,19	0,35 \pm 0,02
Indeno[1,2,3-cd]pireno		0,45 \pm 0,04	0,42 \pm 0,00	0,43 \pm 0,00	0,36 \pm 0,01
Total		38,95	29,25	32,27	7,00

* abaixo do limite de quantificação

A marcada diferença obtida foi resultado do decréscimo de todos os compostos ao longo da refinação, com destaque para os de menor peso molecular (2-4 anéis) (Figura 5) essencialmente como resultado da desodorização (Figura 6); o impacto desta etapa nas espécies de maior peso molecular (5-6 anéis) é menos marcado. Este facto, aliado à não utilização de carvão activado no branqueamento, ajuda a explicar a menor descida dos PAHs de maior número de anéis.

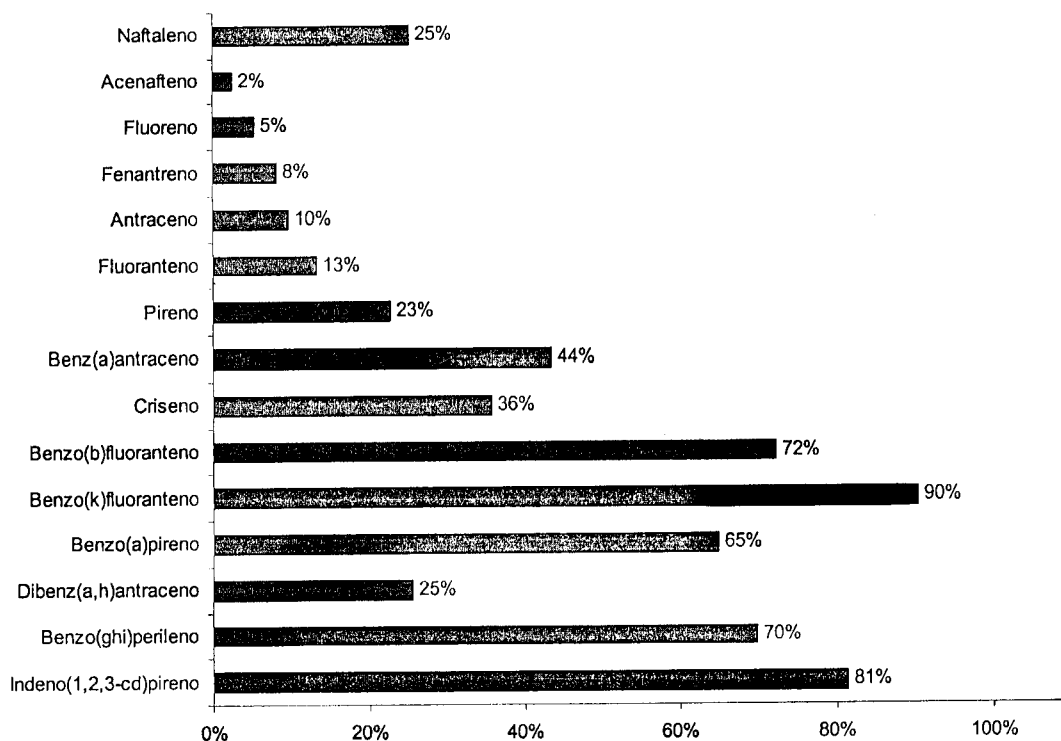
O azeite lampante já cumpria os critérios da GSFS para PAHs totais (19,00 $\mu\text{g}/\text{kg}$) e de alto peso molecular (2,06 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Logicamente, o azeite desodorizado apresentou valores considerados ainda mais seguros (2,88 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de PAHs totais e 1,38 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de

PAHs de alto peso molecular). O teor em PAHs carcinogénicos e o índice de carcinogenicidade foram também objecto de uma descida dos seus valores (de 3,02 para 1,59 $\mu\text{g}/\text{kg}$ e 0,69 para 0,33, respectivamente).

Pode concluir-se que, como esperado, o azeite desodorizado apresenta um património de PAHs mais delapidado, representando uma vantagem do ponto de vista de segurança toxicológica.

Estes resultados corroboram a teoria defendida por Speer *et al.* [87] quando argumentam que os consumidores ao preferirem um óleo não refinado estão a expor-se a teores aumentados de PAHs em relação aos equivalentes refinados.

Figura 5: Decréscimo da concentração de PAHs no azeite após refinação
(concentração desodorizado/bruto, em %)



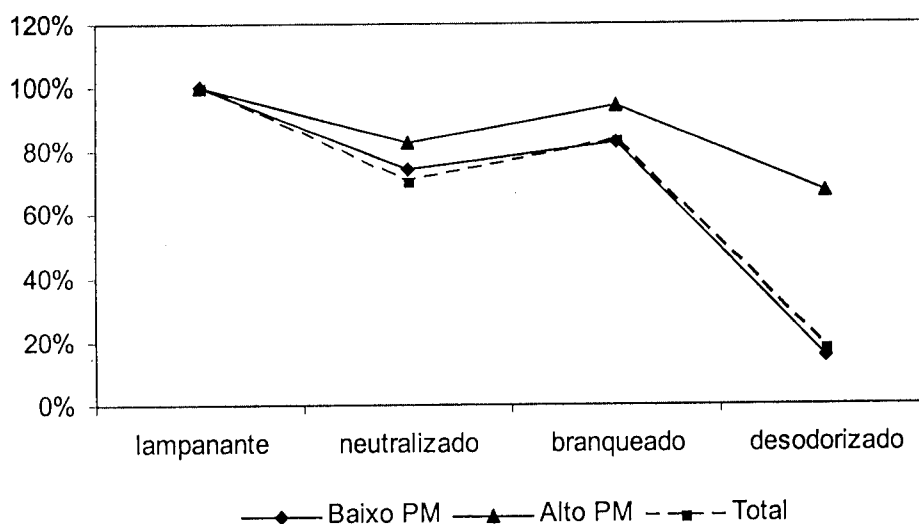
Não se observou ao longo do processo refinativo, um decréscimo contínuo de PAHs. Aliás, durante a fase de branqueamento verificou-se um aumento da maioria dos PAHs do azeite (apenas o dibenz[a,h]antraceno e o criseno diminuíram), o que se traduziu num ligeiro acréscimo do teor total de PAHs – de 29,25 para 32,27 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

A fase de neutralização foi responsável pelo primeiro decréscimo da concentração de PAHs. Nesta etapa verificou-se uma diminuição do valor de quase todos os PAHs (com excepção do acenafteno e benzo[k]fluoranteno).

A desodorização privilegiou, como era de supor, o decréscimo dos PAHs mais voláteis (menor peso molecular).

A desodorização foi a principal protagonista na diminuição de PAHs observada durante a refinação do azeite em estudo e juntamente com a refinação alcalina, constituem as fases responsáveis pelos baixos teores nos óleos finais; pelo contrário o branqueamento teve acção no sentido inverso

Figura 6: Evolução do teor de PAHs durante a refinação do azeite



O azeite lampante apresentava teores em PAHs totais mais elevados que os observados para os azeites virgens comercializados analisados (26,35 e 18,02 $\mu\text{g}/\text{kg}$) (*vide supra*). Contudo, o perfil obtido foi relativamente semelhante, com predomínio do fenantreno, naftaleno e fluoranteno. No azeite lampante, apesar das contribuições absolutas de PAHs de maior peso molecular serem geralmente superiores às dos outros óleos, o valor relativo era algo inferior: apenas 5,3% do total. A quantidade de PAHs carcinogéneos e o índice de carcinogenicidade neste azeite lampante, respectivamente 3,02 $\mu\text{g}/\text{kg}$ e 0,69, eram maiores que os observados nos azeites virgens.

10.2 Evolução do teor de PAHs ao longo da refinação de óleo de soja

A concentração de PAHs determinada no óleo de soja bruto era elevada, cerca de 65,33 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Quadro XX), apenas superada no decurso deste estudo pela amostra de óleo de sésamo, com 76,96 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

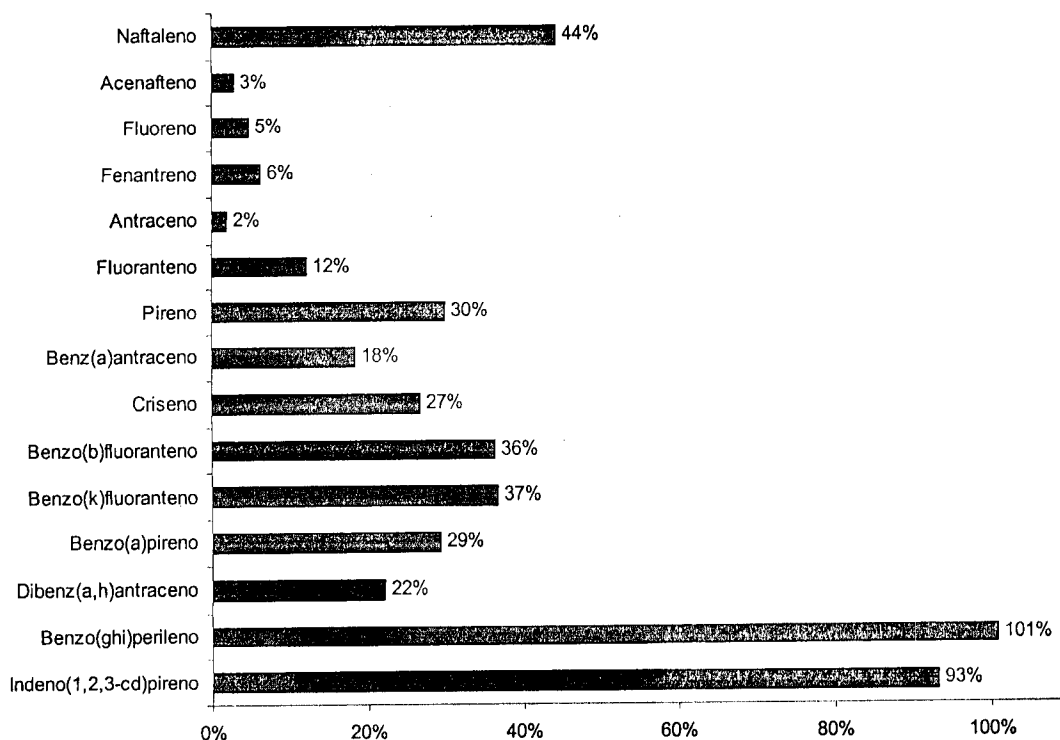
O efeito da refinação no teor de PAHs fica bem patenteado neste exemplo, como se pode observar pelo muito menor valor destes compostos no óleo refinado (8,67 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Apenas as concentrações de benzo[g,h,i]perileno e indeno[1,2,3-cd]pireno se mantiveram praticamente inalteradas; todos os outros PAHs, de baixo e alto peso molecular, viram os seus teores diminuir acentuadamente (Figura 7).

Quadro XX: Teor de PAHs ($\mu\text{g}/\text{kg}$) em óleo de soja ao longo da refinação

Óleo de soja PAH	Bruto Média \pm d.p.	Neutralizado Média \pm d.p.	Branqueado Média \pm d.p.	Desodorizado Média \pm d.p.
Naftaleno	5,46 \pm 0,96	2,04 \pm 0,29	4,50 \pm 1,33	2,41 \pm 0,03
Acenafteno	10,01 \pm 0,71	6,28 \pm 0,20	6,92 \pm 0,44	0,28 \pm 0,00
Fluoreno	2,26 \pm 0,16	1,45 \pm 0,04	1,81 \pm 0,08	0,11 \pm 0,01
Fenantreno	25,04 \pm 1,78	16,91 \pm 0,79	16,85 \pm 1,45	1,58 \pm 0,00
Antraceno	4,32 \pm 0,30	2,97 \pm 0,16	2,49 \pm 0,19	0,08 \pm 0,00
Fluoranteno	7,40 \pm 0,45	5,73 \pm 0,28	4,47 \pm 0,23	0,90 \pm 0,07
Pireno	5,67 \pm 0,50	4,63 \pm 0,28	5,04 \pm 0,15	1,70 \pm 0,00
Benz[a]antraceno	2,17 \pm 0,14	1,60 \pm 0,11	0,95 \pm 0,14	0,40 \pm 0,00
Criseno	1,26 \pm 0,09	0,95 \pm 0,10	0,43 \pm 0,05	0,34 \pm 0,01
Benzo[b]fluoranteno	0,56 \pm 0,05	0,43 \pm 0,03	0,23 \pm 0,01	0,20 \pm 0,00
Benzo[k]fluoranteno	0,21 \pm 0,03	0,15 \pm 0,01	0,11 \pm 0,02	0,08 \pm 0,00
Benzo[a]pireno	0,30 \pm 0,03	0,23 \pm 0,03	0,17 \pm 0,02	0,09 \pm 0,00
Dibenz[a,h]antraceno	0,19 \pm 0,04	0,13 \pm 0,03	0,15 \pm 0,02	0,04 \pm 0,01*
Benzo[g,h,i]perileno	0,23 \pm 0,05	0,41 \pm 0,06	0,34 \pm 0,06	0,23 \pm 0,04
Indeno[1,2,3-cd]pireno	0,27 \pm 0,06*	0,26 \pm 0,02*	0,24 \pm 0,01*	0,25 \pm 0,01*
Total	65,33	44,15	44,71	8,67

* abaixo do limite de quantificação

Figura 7: Decréscimo da concentração de PAHs no óleo de soja após refinação
(concentração desodorizado/bruto, em %)



Este óleo de soja, quando refinado, satisfaz os critérios de PAHs totais, com 4,45 $\mu\text{g}/\text{kg}$, de alto peso molecular, com 0,89 $\mu\text{g}/\text{kg}$, e de B[a]P, com 0,09 $\mu\text{g}/\text{kg}$. No entanto, enquanto bruto e após neutralização e branqueamento, os teores de PAHs totais ainda ultrapassavam o recomendado, com 39,19, 27,83 e 26,42 $\mu\text{g}/\text{kg}$, por esta ordem. No óleo bruto, e por conseguinte nos que lhe seguiam, o valor para os PAHs de alto peso molecular (1,74 $\mu\text{g}/\text{kg}$) e B[a]P (0,30 $\mu\text{g}/\text{kg}$) já não constituíam problema.

Similarmente, a quantidade de PAHs carcinogêneos e relacionado índice de carcinogenicidade viram-se diminuídos pela eficácia do processo refinativo, decaindo de 4,94 para 1,39 $\mu\text{g}/\text{kg}$ e de 0,79 para 0,21, respectivamente.

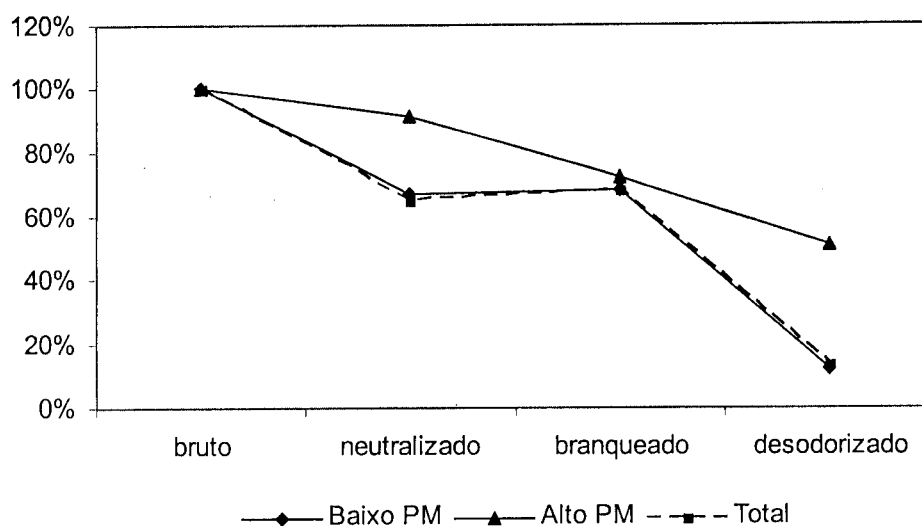
As etapas mais eficazes na quebra das concentrações de PAHs foram a desodorização, com o maior contributo, e a neutralização (Figura 8). Nesta última, observa-se a diminuição de todos os compostos, à excepção do benzo[g,h,i]perileno, para valores de cerca de 65-75% dos teores originais. A queda continua durante o branqueamento para alguns compostos, enquanto para outros (naftaleno, acenafteno,

fluoreno, fluoranteno, pireno e dibenz[a,h]antraceno) notou-se um aumento, já observado no caso do azeite.

A confirmar as expectativas, a desodorização teve como resultado um decréscimo muito acentuado dos PAHs de menor peso molecular e mais moderado dos compostos com maior número de anéis aromáticos, à semelhança do detectado no processamento do azeite.

O baixo teor encontrado após a refinação, era fruto do papel da desodorização e refinação alcalina, principalmente daquela.

Figura 8: Evolução do teor de PAHs durante a refinação do óleo de soja



Após refinação, o óleo de soja examinado apresentava teores finais de PAHs (8,67 $\mu\text{g}/\text{kg}$) muito próximo do observado nos congêneres estudados (amostra 1: 9,33 $\mu\text{g}/\text{kg}$, amostra 2: 10,81 $\mu\text{g}/\text{kg}$ e amostra 3: 9,31 $\mu\text{g}/\text{kg}$). A concentração de B[a]P foi inclusivamente igual (0,09 $\mu\text{g}/\text{kg}$) entre este exemplar e as amostras 1 e 3 (*vide supra*).

No que respeita ao perfil de PAHs, o óleo de soja desodorizado aproximou-se mais da amostra 2, embora os principais contribuintes relativos sejam semelhantes em todos: naftaleno, fenantreno e pireno. Entre as diferenças destaca-se a maior presença de acenafteno, benz[a]antraceno e criseno e menor de fluoreno.

Houve também concordância no que respeita aos PAHs carcinogêneos, cujo valor de 1,39 $\mu\text{g}/\text{kg}$ identificado no óleo de soja desodorizado se encaixa no intervalo verificado nas amostras comerciais (0,76-1,50). Situação exactamente idêntica verificou-se com o

índice de carcinogenicidade; sendo o valor no óleo de soja de 0,21 e o intervalo observado nos outros óleos de girassol refinados de 0,19 a 0,35.

Talvez se possa concluir que a amostra estudada em mais pormenor ao longo do processamento pode ser considerada um protótipo do que sucedeu tecnologicamente com os outros óleos de soja.

10.3 Evolução do teor de PAHs ao longo da refinação de óleo de girassol

O Quadro XXI apresenta os resultados analíticos do estudo da evolução do teor em PAHs durante a refinação de um óleo de girassol. Esta amostra apresentava, após refinação, uma concentração de 4,90 µg/kg, quando em bruto exibia 17,36 µg/kg. Todos os compostos determinados foram cúmplices dessa descida, apresentando, na sua maioria, taxas de decréscimo muito próximas (Figura 9).

Parece possível afirmar que, do ponto de vista estritamente toxicológico, a versão bruta deste óleo quase não precisava ser refinada. De facto, satisfazia largamente os requisitos da GSFS, apresentando um total de PAHs (8,62 µg/kg) nitidamente abaixo dos estipulados 25 µg/kg e de PAHs de alto peso molecular (1,77 µg/kg) aquém dos estabelecidos 5 µg/kg. Evidentemente, após refinação, estes parâmetros ainda se valorizavam mais, correspondendo a 2,14 e 0,37 µg/kg, respectivamente.

Quadro XXI: Teor de PAHs (µg/kg) em óleo de girassol ao longo da refinação

Óleo girassol PAH	Bruto Média ± d.p.	Neutralizado Média ± d.p.	Branqueado Média ± d.p.	Desodorizado Média ± d.p.
Naftaleno	6,28 ± 0,53	2,12 ± 0,10	2,02 ± 0,51	2,03 ± 0,40
Acenafteno	0,18 ± 0,01	n.d.	n.d.	0,13 ± 0,00
Fluoreno	0,53 ± 0,01	0,54 ± 0,01	0,42 ± 0,03	0,16 ± 0,02
Fenantreno	5,03 ± 0,32	5,00 ± 0,05	3,58 ± 0,29	1,38 ± 0,16
Antraceno	0,39 ± 0,02	0,47 ± 0,02	0,17 ± 0,01	0,08 ± 0,00
Fluoranteno	1,18 ± 0,13	1,29 ± 0,02	0,70 ± 0,09	0,34 ± 0,08
Pireno	1,72 ± 0,50	1,37 ± 0,13	0,54 ± 0,04	0,36 ± 0,05
Benz[a]antraceno	0,15 ± 0,01	0,16 ± 0,00	0,06 ± 0,00	0,03 ± 0,01*
Criseno	0,12 ± 0,00	0,11 ± 0,02	0,02 ± 0,00*	0,03 ± 0,00*
Benzo[b]fluoranteno	0,51 ± 0,13	0,23 ± 0,00	0,12 ± 0,00	0,08 ± 0,01
Benzo[k]fluoranteno	0,06 ± 0,00	0,05 ± 0,01	0,03 ± 0,00	0,03 ± 0,00
Benzo[a]pireno	0,15 ± 0,00	0,11 ± 0,01	0,04 ± 0,00	0,04 ± 0,00
Dibenz[a,h]antraceno	0,07 ± 0,00	0,05 ± 0,00	0,04 ± 0,00*	0,06 ± 0,00
Benzo[g,h,i]perileno	0,98 ± 0,02	0,29 ± 0,02	0,23 ± 0,03	0,17 ± 0,01
Indeno[1,2,3-cd]pireno	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Total	17,36	11,80	7,96	4,90

n.d. – não detectado

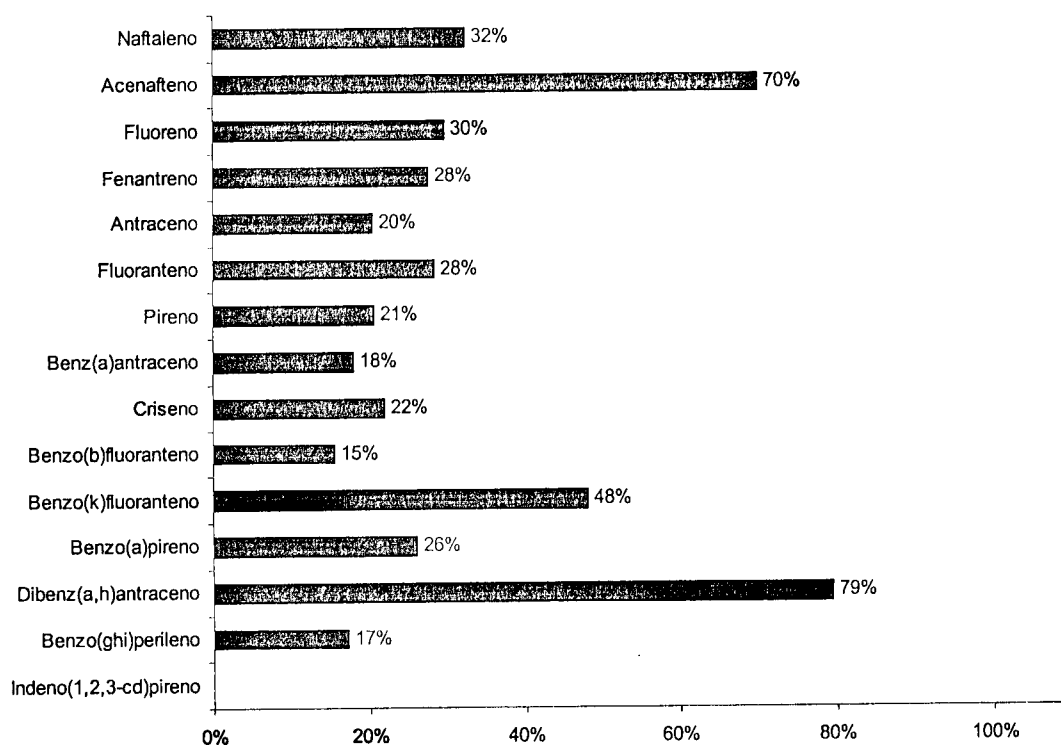
* abaixo do limite de quantificação

Tal-qualmente, o B[a]P já existia no óleo bruto numa concentração menor que 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$, concretamente 0,15 $\mu\text{g}/\text{kg}$, tendo, no decurso da refinação, caído para 0,04 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

É de realçar que o teor inicial (em bruto) de PAHs carcinogéneos era menor (1,06 $\mu\text{g}/\text{kg}$) que os do azeite e óleo de soja refinados (1,59 e 1,39 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectivamente), e que após desodorização atingiu o nível baixíssimo de 0,26 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Fenómeno semelhante foi observado para o índice de carcinogenicidade que, durante a refinação, passou de 0,29 para 0,11, o mais baixo de todo o trabalho.

Figura 9: Decréscimo da concentração de PAHs no óleo de girassol após refinação (concentração desodorizado/bruto, em %)



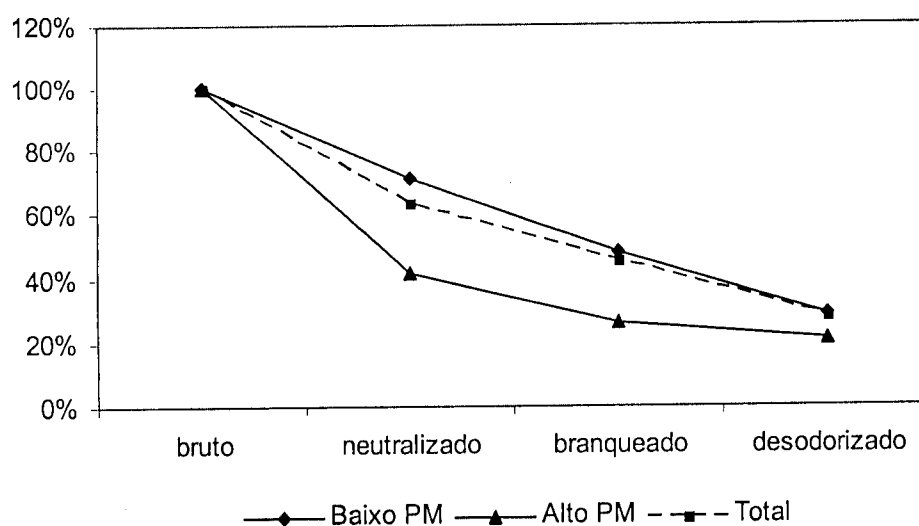
Ao longo do processamento, o teor total de PAHs foi continuamente decrescendo (17,36 $\mu\text{g}/\text{kg}$ no bruto, 11,80 $\mu\text{g}/\text{kg}$ no neutralizado, 7,96 $\mu\text{g}/\text{kg}$ no branqueado e 4,90 $\mu\text{g}/\text{kg}$ no desodorizado).

O efeito da neutralização sobre os PAHs foi símil ao observado para o azeite e para a soja. O branqueamento do óleo de girassol teve, apesar das baixas concentrações iniciais, um maior impacto na redução das espécies de maior peso molecular. Este

fenómeno pode ser explicado pelo recurso a carvão activado nesta etapa neste óleo em particular.

Por outro lado, a desodorização apesar de baixar os PAHs de menor peso molecular, fê-lo menos severamente que para os outros óleos (azeite e soja), provavelmente pelos reduzidos teores destes que se apresentavam no óleo após branqueamento.

Figura 10: Evolução do teor de PAHs durante a refinação do óleo de girassol



Quando comparados os teores de PAHs do óleo de girassol desodorizado e aqueles obtidos da mesma semente disponíveis comercialmente (*vide supra*), observa-se que o primeiro apresenta cerca de metade ($4,90 \mu\text{g}/\text{kg}$) da já baixa concentração exibida por estes ($9,72$, $9,38$ e $8,78 \mu\text{g}/\text{kg}$). Aliás, o teor em PAHs deste óleo não tem paralelo com qualquer outro analisado no âmbito deste estudo. Neste mesmo sentido, a quantidade de PAHs carcinogêneos, cerca de $0,26 \mu\text{g}/\text{kg}$, e o índice de carcinogenicidade ($0,11$) foram menores que os verificados para outros óleos de girassol.

Em termos de perfil de PAHs, as diferentes amostras apresentaram bastantes afinidades, com predomínio do naftaleno e do fenantreno.

10.4 Efeito da refinação nos óleos analisados

Em cada um dos três óleos vegetais estudados (azeite, soja e girassol) observou-se uma redução categórica dos teores totais de PAHs durante a refinação, tal como já havia sido demonstrado em trabalhos anteriores [12,26,85,89,88].

A concentração global de PAHs decresceu 82%, 87% e 72% após refinação nas amostras de azeite e óleos de soja e girassol, respectivamente. A magnitude destas reduções foi similar às observadas por Larsson *et al.* [85] (82-84%), enquadra-se nas descritas por Cejpek *et al.* [12] (27-82%; média 57%) e é superior às referidas por Dennis *et al.* [26] (50-54%). Por outro lado, Biernoth e Rost [88] e Sagredos *et al.* [89] encontraram reduções superiores a 99% nas suas amostras de óleos de coco. Possivelmente, duas situações concorreram para estes resultados: o elevadíssimo grau de contaminação inicial das amostras (1923 e 1940,7 $\mu\text{g}/\text{kg}$) e a aplicação de carvão activado no branqueamento.

O decréscimo dos teores de PAHs de menor peso molecular observado nas amostras estudadas foi de 85%, 88% e 71% para o azeite e os óleos de soja e girassol, respectivamente. Este nível de redução enquadra-se no descrito por outros trabalhos [12,26,85] para este tipo de PAHs, que vagueia entre 57-92%. Este intervalo exclui, obviamente, os resultados de Biernoth e Rost [88] e Sagredos *et al.* [89] que expressaram reduções maiores que 99%.

Nos congéneres de alto peso molecular, a redução da concentração evidenciada foi de 33% para o azeite, 49 % no óleo de soja e 79% no óleo de girassol. A maior diminuição dos teores de PAHs de maior número de anéis aromáticos neste último óleo explica-se fundamentalmente pela aplicação de carvão activado na fase do branqueamento, que se reflecte, fundamentalmente, numa remoção maciça dos compostos com 5 e 6 anéis. Com o recurso a esta mesma técnica, Biernoth e Rost [88] e Sagredos *et al.* [89] conseguiram diminuir o teor para valores abaixo de um 1% dos iniciais. No entanto, pensa-se que a superior eficácia evidenciada por estes autores se deva, essencialmente, às enormes diferenças no nível de contaminação entre amostras em bruto, até porque a concentração final de PAHs de alto peso molecular no óleo de girassol avaliado neste trabalho (0,37 $\mu\text{g}/\text{kg}$) não era muito díspar da observada por Sagredos *et al.* [89] (0,20 $\mu\text{g}/\text{kg}$) para o óleo de coco.

Os valores de decremento apontados noutros estudos para os PAHs de maior peso molecular são mais modestos: 11% [26], 22% [85] e 41% [12]. Todavia, nenhuma das amostras incluída nestes trabalhos foi submetida a tratamento com carvão activado, o que pode ajudar a explicar estes resultados. Em sentido inverso, um óleo de soja avaliado por Dennis *et al.* [26] apresentou um aumento, não explicado, dos seus teores em PAHs de peso molecular elevado em 59%.

Em termos individuais, e à excepção do benzo[g,h,i]perileno no óleo de soja, todos os compostos avaliados viram os seus teores reduzidos de forma significativa pela refinação, com especial destaque para os de baixo peso molecular. No caso particular do óleo de girassol, as diferenças nas taxas de diminuição entre PAHs de maior ou menor peso molecular esbateram-se, pela utilização de carvão activado no processamento tecnológico.

Todavia, algumas das conclusões do estudo apresentado relativas à eliminação de PAHs durante a refinação, não são totalmente concordantes com resultados publicados anteriormente [12,26,85], nomeadamente no que concerne ao decréscimo de PAHs de alto peso molecular, com o *handicap* de ter sido avaliada apenas uma amostra de cada etapa da refinação dos óleos vegetais.

Neste contexto, Cejpek e colaboradores [12] observaram, na maioria dos lotes analisados de óleo de colza, um decréscimo estatisticamente significativo (IC = 95%) nos teores de PAHs de baixo peso molecular (fenantreno, antraceno, fluoranteno e pireno), do benz[a]antraceno e do benzo[a]pireno ao longo do processo de refinação. A diminuição de outros PAHs de maior peso molecular (criseno, benzo[b]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno, indeno[1,2,3-cd]pireno) não foi estatisticamente significativa, enquanto as quantidades de dibenzo[a,h]antraceno e benzo[g,h,i]perileno inclusivamente aumentaram. No trabalho de Dennis [26], e tomando todos os diferentes tipos de óleos analisados (colza, soja, peixe e milho) como um todo, as únicas reduções estatisticamente significativas (IC= 95%) após refinação foram observadas para o fluoranteno, o pireno, o benz[a]antraceno e o criseno (o fenantreno e o antraceno não foram analisados). Padrões similares de redução de PAHs foram obtidos por Larsson *et al.* [85] e Sagredos *et al.* [89], que relataram remoções marcadas do fluoranteno e do pireno durante a refinação, enquanto as subtracções do criseno e do benz[a]antraceno foram, regra geral, muito menores.

Há um elevado grau de concordância entre a maioria destes estudos [12,26,85,89] e o trabalho que se apresenta relativamente à diminuição dos teores de fenantreno,

antraceno, fluoranteno e pireno, como resultado da refinação química. Ressalva-se que o efeito da refinação sobre os teores de naftaleno, acenafteno e fluoreno não pode ser discutido comparativamente com trabalhos publicados, pois estes não pesquisaram os referidos PAHs. Pode-se, adso, supor as alterações que sofreram naqueles estudos pelas expressas pelos PAHs quimicamente mais próximos, o que permite teorizar que tenham sofrido reduções dos seus valores, a exemplo do que se observou neste estudo.

Contudo, o decréscimo de PAHs de alto peso molecular nos óleos vegetais após refinação não foi conclusivo na maioria dos estudos [12,26,85,89], nem harmónico com o aqui descrito. De uma forma geral, os resultados destas investigações não fornecem evidências que os processos de refinação empregues na produção das amostras tivessem qualquer efeito na redução dos níveis dos PAHs de maior peso molecular; a excepção é o decréscimo do B[a]P nos óleos de colza avaliados por Cejpek *et al.* [12].

Refira-se que nenhum dos óleos vegetais analisados no seio de qualquer um destes estudos havia sido submetido a branqueamento com carvão activado no procedimento refinativo que, de acordo com Dennis *et al.* [26], é uma condição necessária para haver reduções significativas nos PAHs de 5 e 6 anéis, pois o impacto que a desodorização tem nestes compostos é relativamente pequeno. Biernoth e Rost [88] e Sagredos *et al.* [89] já haviam demonstrado a eficácia desta técnica, em óleos de coco, ao diminuir os teores de PAHs de maior peso molecular para menos de 1% do seu valor original. Este argumento pode ajudar a explicar os resultados obtidos no óleo de girassol, mas não o faz para o azeite e óleo de soja.

Da observação detalhada dos resultados, denotou-se que as etapas mais activamente implicadas na redução dos compostos de 5 e 6 anéis foram a neutralização e a desodorização. Estas etapas - mais a neutralização - mas não o branqueamento, já haviam demonstrado diminuir os teores desta classe de PAHs, ainda que de forma estatisticamente significativa apenas para o B[a]P [12].

O efeito da desodorização na redução dos teores de PAHs de peso molecular mais baixo encontra-se inequivocamente demonstrado [12,17,88]. É, também, perfeitamente inteligível que o impacto desta etapa seja menos acentuado nos congéneres de maior peso molecular. No entanto, bioquimicamente não será muito plausível que haja um ponto de clivagem a partir do qual os efeitos da desodorização não se façam sentir; é mais verosímil que estes se atenuem com o aumento do peso molecular dos compostos, que foi, genericamente, o observado.

Provavelmente, mais difíceis de explicar serão os resultados do trabalho de Cejpek e colaboradores [12], no qual alguns compostos com peso molecular igual ou muito próximo, como por exemplo o benz[a]antraceno e o criseno, manifestaram comportamentos divergentes.

Faltam, porém, algumas informações presumivelmente importantes para uma discussão mais substancial, como as relativas ao tempo e temperatura de desodorização a que foram submetidos os óleos vegetais avaliados nos diversos trabalhos.

Como se pode constatar, os investigadores têm-se dedicado ao estudo do efeito da refinação dos óleos vegetais nos PAHs desde há várias décadas. Todavia, e ao melhor do conhecimento actual, apenas um trabalho científico [12] avaliou o teor de PAHs ao longo das várias etapas da refinação de um óleo vegetal, neste caso de colza.

Os autores [12] concluíram que as etapas tecnológicas a que sujeitaram o óleo bruto concorreram para um decréscimo evidente dos níveis de PAHs, principalmente de baixo peso molecular. Os passos mais efectivos nessa diminuição foram a refinação alcalina e, principalmente, a desodorização [12]; o branqueamento teve um pequeno efeito. Os resultados obtidos confirmam estas observações.

De uma forma geral, os resultados de Cejpek *et al.* [12] confirmaram que o total de PAHs decresce continuamente durante o processamento tecnológico, tendo cada um dos passos que se seguiu à extracção contribuído para essa diminuição evidente. Esta involução constante da concentração de PAHs ao longo do processamento não foi observada para todas as amostras do estudo. No caso particular do azeite, houve um aumento do teor de quase todos os compostos, com excepção do criseno, do B[a]P e do dibenz[a,h]antraceno. No óleo de soja, houve oscilações em ambos os sentidos que se equivaleram, pelo que, praticamente, não alteraram a concentração de PAHs após o branqueamento. No caso do óleo de girassol, e como havia sido usado carvão activado, observou-se uma descida na quantidade de PAHs. Ao contrário, no processamento do azeite e soja este material (carvão activado) não era utilizado, mas somente argilas activadas. Esta ocorrência, por si só, não justifica os resultados observados, especulando-se que possa ocorrer, nesta fase, uma contaminação, eventualmente por parte das argilas activadas.

Em jeito de conclusão, pode referir-se que a refinação é responsável pela diminuição dos teores de PAHs, fundamentalmente de peso molecular baixo, em óleos vegetais. A aplicação de carvão activado durante o branqueamento, ainda que não frequente, parece

vantajosa na diminuição do risco toxicológico. Os seus efeitos são mais marcados nos PAHs de maior peso molecular, onde se incluem os compostos com maior potencial carcinogéneo, e são complementares aos da desodorização, que se expressam sobretudo nos congéneres de menor peso molecular.

Assim, e se por imperativos de ordem económica, o tratamento com carvão activado não for prática corrente, é, pelo menos, desejável que as indústrias refinadoras monitorizem regularmente os teores de PAHs de alto peso molecular nos óleos brutos, com o objectivo de que as que apresentem níveis preocupantes serem tratadas com tal procedimento.

11. ESTIMATIVA DE INGESTÃO DE PAHs COM ORIGEM EM ÓLEOS VEGETAIS

Apesar das concentrações de PAHs em óleos vegetais descritas na literatura não serem habitualmente altas, o consumo elevado destes géneros alimentícios pode torná-los fontes importantes de PAHs, como observado por Dennis *et al.* [62] e de Vos *et al.* [63].

Com o objectivo de estimar o aprovisionamento de PAHs a que a população portuguesa está sujeita pela ingestão de óleos vegetais, utilizaram-se os dados descritos ao longo desta dissertação. Uma vez que o último inquérito alimentar a nível nacional tem mais de 20 anos (1980), o que o torna quase obsoleto com as modificações do comportamento alimentar, utilizou-se a informação sistematizada na balança alimentar da FAO de 2000 [167] acerca da disponibilidade de óleos vegetais pela população portuguesa (Quadro XXII).

Quadro XXII: Disponibilidade de óleos vegetais em Portugal [167]
(kg/pessoa/ano)

Óleo vegetal	kg/pessoa/ano
Óleo de soja	3,4
Óleo de amendoim	0,3
Óleo de girassol	5,8
Óleos de colza e mostarda	-
Óleo de algodão	-
Óleo de palma vermelha	0,0
Óleos de palma	2,6
Óleo de coco	0,1
Óleo de sésamo	0,0
Azeite	4,0
Óleo de milho	0,3
Total	16,6

A utilização destes dados acarreta algumas limitações; entre outras, estes valores são relativos à disponibilidade e não ao consumo, ou seja, não há informações relativas ao

que é desperdiçado (não ingerido), por exemplo, o que no caso dos óleos vegetais é significativo – basta referir a utilização e subsequente descarte após o processo de fritura.

Por outro lado, os resultados encontrados não podem ser considerados como representativos dos óleos vegetais à venda em Portugal, devido ao número limitado de amostras e à aquisição se ter restringido a uma área geográfica e tempo restritos. Assim, as observações feitas devem ser encaradas com meramente indicativas e não conclusivas.

Com base nos dados facultados pela FAO, a disponibilidade anual de 4,0 kg de azeite traduzir-se-ia num aporte de 88,7 μg dos 15 PAHs avaliados e de 0,7 μg de B[a]P.

Estes valores são inferiores ao relatados por Menichini *et al.* [96] que estimaram que o azeite na sua totalidade (virgem e refinado), com um consumo anual *per capita* em Itália de ca. 9,4 kg, seria responsável por uma ingestão média anual de 560 μg da soma dos 8 PAHs detectados. Com o *handicap* do limite de detecção ser de 3 $\mu\text{g}/\text{kg}$, o B[a]P não foi encontrado nas amostras daquele estudo [96].

Resultados completamente diferentes foram difundidos por Lodovici *et al.* [64], que estimaram que os 35g/pessoa/dia de azeite ao dispor dos italianos eram responsáveis por uma ingestão diária de 35ng de PAHs, ou seja 12,8 μg por ano.

Os valores apontados neste trabalho (88,7 $\mu\text{g}/\text{ano}$) enquadram-se entre os descritos por estas duas equipas de investigação (64,96) (12,8-560 $\mu\text{g}/\text{ano}$).

No Brasil a disponibilidade anual *per capita* de azeite é cerca de 100 mL [102]. No entanto, estima-se que, e devido a restrições económicas, uma pequena parte da população seja responsável pela maioria do azeite consumido, recalculando-se um novo valor de disponibilidade *per capita* em 2000 mL. Considerando um valor médio de 2,4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de B[a]P nos azeite, neste estudo [102], as disponibilidades anuais seriam de 0,22 μg e 4,32 μg conforme as situações atrás referidas. As amostras de azeite avaliadas apresentaram um teor médio de B[a]P muito menor (0,18 $\mu\text{g}/\text{kg}$), o que se reflete também num menor aporte anual de B[a]P, de cerca de 0,7 μg .

A disponibilidade anual dos restantes óleos vegetais é de 12,6 kg por pessoa. Para estimar a contribuição total destes dever-se-ia, idealmente, multiplicar a média das concentrações de PAHs de cada tipo de óleo pela sua disponibilidade específica. No entanto, e como há temos dados relativos ao óleo de palma, recorreu-se a outra alternativa que passa por utilizar a disponibilidade total destes óleos (12,6

kg/pessoa/ano) e a média de concentrações dos óleos alimentares avaliados (19,51 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Deste modo, a disponibilidade anual de PAHs com esta origem é de 245,9 μg e a de B[a]P corresponde a 2,5 μg .

A ingestão anual *per capita* de PAHs estimada por Hopia e colaboradores [83] foi de 40 μg provenientes de óleos vegetais. No entanto, neste caso particular, está-se a falar de um consumo que representava anualmente na Finlândia, em 1982, cerca de 1,8 kg por pessoa. A quantidade total de óleos e gorduras ascendia a 230 μg , divididos da seguinte maneira, para além dos óleos: 27 μg da manteiga, 160 μg das margarinas e 3 μg de misturas de manteiga (80%) e óleos vegetais (20%).

Quando escalpelizados os dados dos diversos tipos de óleos vegetais que constituíram a amostra em estudo, observou-se que o óleo de girassol, a despeito de possuir a menor concentração de PAHs, era o maior contribuinte individual, com uma disponibilidade anual de 53,9 μg de PAHs e 0,5 μg de B[a]P. Os restantes óleos avaliados contribuíam com uma disponibilidade anual de PAHs e B[a]P de, respectivamente, 3,0 e 0,03 μg no óleo de amendoim, 33,4 e 0,4 μg no equivalente de soja e 6,1 e 0,1 μg no derivado do milho.

Pupin e Toledo [86] concluíram que os óleos vegetais, como o de soja e principalmente o de milho, contribuem com uma quantidade significativa de B[a]P na alimentação dos brasileiros. Estimaram que a disponibilidade anual e diária de B[a]P proveniente de óleo de soja seria de 31,1 e 0,09 μg por pessoa, respectivamente, e a atribuída ao óleo de milho seria ainda maior, 152,6 e 0,4 μg , por esta ordem [86]. A contribuição dos outros óleos por eles estudados (colza, girassol, arroz, palma e alho) é muito menos significativa por causa da sua menor disponibilidade e nível de contaminação. Os valores relativos à contribuição dos óleos de soja e milho são extraordinariamente elevados. Segundo os autores [86], talvez se expliquem, em parte, por as refinarias brasileiras não usarem carvão activado que, desde os trabalhos de Biernoth e Rost [88], se sabe que reduzem os níveis de PAHs de alto peso molecular, onde o B[a]P se inclui. Recorrem à desodorização que remove os PAHs de 2-3 anéis permanecendo no óleo, todavia, os de maior peso molecular (4-5 anéis).

Não existem em Portugal estimativas da ingestão alimentar de PAHs. Nesta circunstância, utilizaram-se os valores descritos na literatura referentes a outras realidades alimentares, para tentar perceber a dimensão dos óleos vegetais como fornecedores destes contaminantes.

A exposição diária a PAHs por via alimentar foi estimada por diversos autores, sendo diversos os valores apontados: 3,7 µg [62], 5 a 17 µg [63], 3 µg [64,71], 1,1 a 22,5 [65] e 1,6-16 µg [70]. No que respeita à ingestão diária de B[a]P, os estudos indicam o seguinte: 250 ng [62], 120 a 290 ng [63], 140 ng [66], 32 ng [76] e 50 ng [78].

De acordo com os dados obtidos, o azeite e os outros óleos vegetais disponibilizam em conjunto, anualmente, 334,6 µg de PAHs e 3,2 µg de B[a]P. Em termos diários são 920 ng e 8,72 ng, respectivamente.

No exercício audaz de tomar os dados dos diversos estudos de estimativa de ingestão como um todo, a contribuição dos óleos vegetais seria de 13,3% para o aporte dos PAHs totais e 6,4% para o aprovisionamento de B[a]P.

Como se pode constatar pela comparação com as estimativas de ingestão alimentar, os óleos vegetais constituiriam um considerável foco de contaminação com estes compostos, apesar dos baixos níveis de concentração que as amostras exibiram.

Aliás, estes valores igualam ou inclusivamente superam os enunciados para a exposição respiratória a estes cancerígenos: 370 ng [64], 210 ng [70] e 20 a 2000 ng (ambiente urbano) e 0,2 e 200 ng (meio rural) [78].

Ademais, a contribuição dos óleos vegetais é das mais facilmente controláveis, pois existem meios eficazes de diminuir as concentrações de PAHs nesta matriz alimentar, como uma secagem apropriada das sementes, uma eficiente e controlada desodorização e o recurso ao carvão activado no branqueamento.

12. CONCLUSÕES

Os valores totais dos 15 PAHs determinados nos óleos vegetais que constituíram a amostra podem considerar-se baixos, enquadrando-se, de uma forma geral, no limiar inferior dos valores descritos na literatura científica para esta matriz alimentar. Os PAHs de menor peso molecular foram os mais representativos em todas as amostras avaliadas; a contribuição dos compostos de peso molecular mais elevado, como o são a maioria dos PAHs carcinogéneos, foi marginal.

Observaram-se, genericamente, teores mais elevados de PAHs nos óleos vegetais não refinados, caso dos óleos de sésamo e de avelã e do azeite. Entre os óleos vegetais estremes refinados, as amostras de óleo de milho apresentaram os níveis mais altos de contaminação com PAHs.

Os resultados obtidos confirmaram uma redução marcada ao longo da refinação dos teores totais de PAHs nos óleos vegetais (azeite, soja e girassol) avaliados, principalmente dos compostos de menor peso molecular. O decréscimo dos congéneres de alto peso molecular foi, comparativamente, mais modesto, ainda que superior ao apontado por outros trabalhos.

As etapas mais efectivas na diminuição dos PAHs foram a refinação alcalina e, sobretudo, a desodorização. Os efeitos desta última centraram-se nos PAHs de peso molecular mais baixo. A aplicação de carvão activado durante o branqueamento pareceu, também, vantajosa na diminuição do teor de PAHs. Os seus efeitos estenderam-se aos PAHs de maior peso molecular, pelo que são, em certa medida, complementares aos da desodorização.

Apesar dos baixos teores que as amostras avaliadas exibiram, a contribuição dos óleos vegetais para o aprovisionamento alimentar de PAHs não deve ser negligenciada. Com base nos dados da FAO relativos à disponibilidade deste grupo de alimentos no nosso país, estimou-se em 334,6 µg/ano a quantidade de PAHs veiculada pelos óleos vegetais na alimentação dos portugueses.

Os resultados obtidos no âmbito do ISO/TC34/SC11 permitem augurar que a técnica analítica utilizada (ISO/WD 15753 : 2001) possa, ainda, ser objecto de algumas melhorias, nomeadamente ao nível da sua reprodutibilidade e das recuperações alcançadas. A inclusão de um padrão interno no protocolo analítico pode contribuir para obviar estas dificuldades.

13. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O panorama relativamente desanuviado que se encontrou neste estudo, no que concerne à contaminação de óleos vegetais refinados com PAHs, é um bom indicador da eficiência do processamento tecnológico na remoção destes compostos e é abonatório para as indústrias refinadoras. Contudo, estes resultados não avalizam a segurança toxicológica unânime e perenemente. O nível de PAHs que as sementes apresentam antes da extracção é um incógnita, sendo dependente da magnitude de exposição a alguma das múltiplas potenciais fontes de contaminação. Na realidade, e ainda que de forma esporádica, encontram-se valores extraordinariamente elevados de PAHs nos óleos vegetais, particularmente nos exemplares não refinados.

As indústrias refinadoras devem tomar medidas de índole preventiva para minimizarem este tipo de situações. Neste contexto enquadram-se, por exemplo, um conhecimento dos fornecedores, nomeadamente pela observação *in loco* das instalações e campo de cultivo, de forma a avaliarem, ainda que empiricamente, o nível de exposição a PAHs a que as plantas estão sujeitas (por exemplo, pela proximidade de vias rodoviárias). É, também, importante conhecer o processo pelo qual as oleaginosas foram secas, propondo-se que se evite o contacto directo com combustíveis de combustão.

As unidades industriais devem, também, implementar medidas de natureza fiscalizadora, como uma monitorização sistemática e eficaz dos níveis de PAHs (ou, pelo menos, de B[a]P) nos óleos vegetais, antes e após refinação. A ocorrência de valores elevados deve desencadear um procedimento de rastreabilidade das sementes de forma a identificar e corrigir a sua causa. É, igualmente, possível utilizar a refinação como factor correctivo de níveis indesejáveis de PAHs, havendo, inclusive, a possibilidade de a alterar de acordo com o tipo e teor de contaminação.

Na medida em que alguns PAHs são carcinogéneos genotóxicos, não é possível estabelecer um nível de ingestão que não acarrete risco potencial; a exposição deve ser tão baixa quanta razoavelmente possível. Neste sentido, e como também compete ao Estado zelar pela saúde da população, devia colmatar-se o vazio legislativo relativo à presença de PAHs nos óleos vegetais, estabelecendo-se máximos entendidos com aceitáveis baseados na evidência científica actual.

14. BIBLIOGRAFIA

- [1] Laurent C, Feidt C, Lichtfouse E, Grova N, Laurent F, Rychen G. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 2001; 49: 2493-2496
- [2] Blumer M. *Scientific American* 1998; 50:35-48
- [3] Harbinson R. *Polyaromatic Hydrocarbons*. In: Raymond Harbison (eds). *Hamilton & Hardy's Industrial Toxicology* 5th edition. St Louis: Mosby, 1998: 325-331
- [4] Harvey RG. *The Handbook of Environmental Chemistry of PAHs and Related Compounds*. Nielsen AH (eds). London: Springer Verlag, 1998
- [5] Schlemitz A, Pfannhauser W. *Food Additives and Contaminants* 1996; 8: 969-977
- [6] Moffat CF, Whittle KJ. *Polycyclic aromatic hydrocarbons, petroleum and other hydrocarbon contaminants*. In: Moffat CF, Whittle KJ (eds). *Environmental contaminants in food*. Sheffield Academic Press, 1999: 364-429
- [7] IARC. *Polycyclic aromatic compounds*. In: *Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans*. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 1983: 34, 55-58
- [8] Chen BH. *Journal of Food and Drug Analysis* 1997; 5:25-42
- [9] Bartle KD. *Analysis and Occurrence of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Food*. In: Colin Creaser and Rupert Purchase (eds). *Food Contaminants: sources and surveillance*. London: The Royal Society of Chemistry, 1991: 41-59
- [10] Guillén MD. *Food Additives and Contaminants* 1994; 11: 669-684
- [11] Musial CJ, Uthe JF. *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*. In: Macrae R, Robinson RK, Sadler MJ (eds). *Encyclopaedia of Food Science, Food Technology and Nutrition*. London: Academic Press, 1992: 3639-3644
- [12] Cejpek K, Hajšlová J, Kocourek, Tomaniová M, Cmolík J. *Food Additives and Contaminants* 1998; 15: 563-574
- [13] Tamakawa K, Kato, Oba M. *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*. In: Leo Nollet (ed). *Handbook of Food Analysis*. New York: Marcel Dekker, 1996: 1641-1664
- [14] Hawthorne SB, Yang Y, MillerDJ. *Analytical Chemistry* 1994; 66: 2912-2920
- [15] Bengård A, Colmsjö, Wrangskog K. *Analytical Chemistry* 1994; 66: 4288-4294

-
- [16] Niederflner J, Lenoir D, Matuschk G, Rehfeldt F, Utschick H, Brüggemann R. Quantitative Structure-Activity Relationships 1997; 16: 38-48
- [17] Kang JJ, Fang HW. Biochemical and Biophysical Research Communications 1997; 238: 367-369
- [18] Henner P, Schiavon M, Morel JL, Lichtfouse É. Analisis Magazine 1997; 25: M56-M59
- [19] SM Cardoso M. Estudo de Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos por cromatografia líquida de alta pressão. Análise do comportamento de alguns destes compostos face a diferentes tipos de detecção: absorção ultravioleta/visível com diodo array e fluorescência. Dissertação de candidatura ao grau de Mestre apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, 1997
- [20] Andelman JB, Suess MJ. Bull WHO 1970; 43: 479-508
- [21] Phillips DH. Mutation Research 1999; 443: 139-147
- [22] Moret S, Conte L. Journal of Chromatography 2000; 882:245-253
- [23] Lee HK. Journal of Chromatography A 1995; 710, 79-92
- [24] Kipopoulou AM, Manoli E, Samara C. Environmental Pollution 1999; 106: 369-380
- [25] Tuominen JP, Pyysalo HS, Sauri M. Journal of Agriculture and Food Chemistry 1988; 36: 118-120
- [26] Dennis MJ, Massey RC, Cripps G, Venn I, Howarth N, Lee G. Food Additives and Contaminants 1991; 8: 517-530
- [27] Roda A, Simoni P, Ferri EN, Girotti S, Ius A, Raunch P, Poplstein M, Pospisil M, Pipek P, Hochl I, Fukal L. Journal of the Science of Food and Agriculture 1999; 79: 58-62
- [28] Gomaa EA, Gray JI, Rabie S, Lopex-bote C, Booren AM. Food Additives and Contaminants 1993; 10: 503-521
- [29] Guillén MD, Sopelana P, Partearroyo MA. Journal of Agriculture and Food Chemistry 2000; 48: 5083-7
- [30] Guillén MD, Sopelana P, Partearroyo MA. Journal of Agriculture and Food Chemistry 2000; 48: 126-131
- [31] Grob K, Lanfranchi M, Egli J, Artho A. Journal of the Association of Official Analytical Chemists 1991; 74: 506-512
-

-
- [32] Husain A, Naeemi E, Dashti B, Al-Omirah H, Al-Zenki S. *Food Additives and Contaminants* 1997; 14: 295-299
- [33] Sivaswamy SN, Nagarajan B. *Medicine Science Research* 1991; 19: 289-290
- [34] Saint-Aubert B, Cooper JF, Astre C, Spiliotis J, Joyeux H. *Journal of Food Composition and Analysis*; 5: 257-263
- [35] Ward M, Sinh R, Heineman E, Rothman N, Markin R, Weisenburger D, Correa P, Zahn S. *International Journal of Cancer* 1997; 71: 14-19
- [36] Baan RA, Steenwinkel MJST, van der Berg PTM, Roggeband R, van Delft JHM. *Human and Experimental Toxicology* 1994; 13: 880-887
- [37] Redmond CK, Stobino BR, Cypress RH. *Annals of the NY Academy of Science* 1976; 271: 102-115 citado por [36]
- [38] Hogstedt C, Andersson K, Frenning B, Gustavsson A. *Scandinavian Journal of Work & Environmental Health* 1981; 1: 72-78
- [39] Hammond EC, Selikoff IJ, Lawther PL, Seidman H. *Annals of the NY Academy of Science* 1976; 271: 116-124 citado por [36]
- [40] Gibbs GW. *Journal of occupational Medicine* 1985; 27: 761-770
- [41] Krewski D, Thorslund T, Withey. *Toxicology and Industrial Health* 1989; 5: 851-867
- [42] Willett KL, Randerath K, Zhou GD, Safe SH. *Biochemical Pharmacology* 1998; 55: 931-939
- [43] Lutz WK. *Mutation Research* 1978; 65: 289-356
- [44] Vermeulen NPE, Kelder GDO, Commandeur JNM. *Perspectives in Medicinal Chemistry*, VCH Publishers, 1993: capítulo 37
- [45] Kang DH, Rothman N, Poirier MC, Greenberg A, Hsu CH, Schwartz BS, Baser ME, Groopman JD, Weston A, Strickland PT. *Carcinogenesis* 1995; 16: 1079-1085
- [46] Yang SK, Deutsch J, Gelboin HV. *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Cancer*. Academic Press, 1978: 206-209,
- [47] Cavalieri ER, Rogan EG. *Pharmacology & Therapeutics* 1992; 55: 183-199
- [48] Chaloupka K, Krishnan V, Safe S. *Carcinogenesis* 1992; 13: 2233-2239
- [49] Tran DQ, Ide CF, McLachlan JA, Arnold SF. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1996; 229: 101-108
- [50] Charles GD, Bartles MJ, Zacharewski TR, Gollapudi BB, Freshour N, Carney EW. *Toxicological Sciences* 2000; 55: 320-326
-

-
- [51] Fertuck KC, Kumar S, Sikka HC, Matthews JB, Zacharewski TR. *Toxicology Letters* 2001; 121: 167-177
- [52] Clemons JH, Allan LM, Marvin CH, Wu Z, McCarry BE, Bryant DW, Zacharewski TR. *Environmental Science Technology* 1998; 32: 1853-1860
- [53] Wang X, Ding H, Ryan L, Xu X. *Environmental Health Perspectives* 1997; 105: 514-520
- [54] MacKenzie KM, Angevine DM. *Biol Reprod* 1981; 24: 83-191 citado por [56]
- [55] Binková B, Vesely D, Veselá D, Jel'nek R, Srám RJ. *Mutation Research* 1999; 440: 45-58
- [56] Dejmek J, Solansky', Benes I, Lenícek, Srám R. *Environmental Health Perspective*, 108 (12), 1159-1164, 2000
- [57] Srám RJ, Binková B, Rössner P, Rubes J, Topinka J, Demjek J. *Mutation Research* 1999; 428: 203-215
- [58] Zhang L, Connor EE, Chegini N, Shiverick KT. *Biochem Pharmacol* 1995; 10: 1171-1180 citado por [56]
- [59] De Jong WH, Kroese ED, Vos JG, Loveren HV. *Toxicological Sciences* 1999; 50: 214-220
- [60] Yuan JW, Krieger JA, Maples KR, Born JL, Burchiel SW. *Fundamental and Applied Toxicology* 1994; 23: 336-341
- [61] Steinhart CE, Doyle ME, Cochrane BA. Indirect additives, residues and contaminants. In: Steinhart CE, Doyle ME, Cochrane BA (eds). *Food Safety* 1996. New York: Marcel Dekker, 1996: 256-257
- [62] Dennis MJ, Massey RC, McWeeny DJ, Knowles ME. *Food Chemical Toxicology* 1983; 21: 569-574
- [63] De Vos RH, van Dokkum W, Schouten A, Jong-Berkhout P. *Food and Chemical Toxicology* 1990 ; 28: 263-268
- [64] Lodovici M, Dolara P, Casalini C, Ciappellano S, Testolini G. *Food Additives and Contaminants* 1995; 12: 703-713
- [65] Vaessen HAMG, Jekel AA, Wilbers AAMM. *Toxicological and Environmental Chemistry* 1988; 16: 281-294
- [66] Butler JP, Post GB, Liroy PJ, Walman JM, Greenberg A. *Journal of the Air and Waste Management Association* 1993; 43: 970-977
- [67] Hattermer-Frey HÁ, Travis CC. *Toxicology and Industrial Health* 1991; 7: 141-157
-

-
- [68] Suess MJ. The science of the Total Environment 1976; 6: 239-250
- [69] Santodonato J, Howard P, Basu D. Journal of Environmental Pathology and Toxicology 1981; 5: 1-364
- [70] National Academy of Science: Drinking water and health. Washington DC: National Academy Press, 1986
- [71] Menzie CA, Potocki BB, Santodonato Journal of Environmental Science Technology 1992; 26: 1278-1284
- [72] Thomson B, Lake R, Lill R. Polycyclic Aromat. Compd. 11 1996: 177-184 citado por [21]
- [73] Liyo PJ, Greenberg A. Toxicology and Industrial Health 1990; 6: 209-223
- [74] Kikawa *et al.* (comunicação pessoal) citado por [13]
- [75] Waldman JM, Liyo PJ, Greenberg A, Butler JP. Journal of Exposure Analysis and Environmental Epidemiology 1991; 1: 193-225
- [76] Tamakawa K, Seki T, Tsunoda A. In: L Nollet (Ed). Food Analysis by HPLC. New York: Marcel Dekker, 1992: 697
- [77] Shiraishi Y, Shiratori. J Food Hyg Soc Jpn 1984; 25: 35 citado por [13]
- [78] EPA Exposure and risk Assessment for Benzo[a]pyrene and other Polycyclic Hydrocarbons, US Environmental Protection Agency, Office of Environmental Criteria and Assessment: Cincinnati 1982 citado por [6]
- [79] Liyo PL, Harkov R, Waldman JM, Pietarinen C, Greenberg A. Archives of Environmental Health 1988; 43: 304-312
- [80] Kramers PGN, Van der Heijden CA. Toxicological and Environmental Chemistry 1988; 16: 341-351
- [81] Doll R. Carcinogenesis 1996; 1996: 177-184
- [82] Travis CC, Hester ST. Environmental Science and Technology 1990; 22: 271-276
- [83] Hopia A, Pyysalo H, Wickström K. Journal of the American Oil Chemists' Society 1986; 63: 889-893
- [84] Welling P, Kaandorp B. Z Lebens Unters Forsch 1986; 183: 111-115
- [85] Larsson BK, Eriksson AT, Cervenka M. Journal of the American Oil Chemists' Society 1987; 64: 365-370
- [86] Pupin AM, Toledo MCF. Food Additives and Contaminants 1996; 13: 639-646
- [87] Speer K, Steeg E, Horstmann P, Kunh Th, Montag A. Journal of High Resoluiton Chromatography 1990; 13: 104-111
-

-
- [88] Biernoth G, Rost HE. *Chemistry and industry* 1967; 2002-2003
- [89] Sagredos AN, Sinha-Roy D, Thomas A. *Fat Science and Technology* 1988; 90: 70-81
- [90] Sinko P, Khunova V, Simon P, Hrubá M. *International Journal of Food Science and Technology* 1995; 30: 807-811
- [91] Cejpek K, Hajslova J, Jehlickova Z, Merhaut J. *Analytical Chemistry* 1995; 61: 65-70
- [92] Decreto-lei n.º 365/98
- [93] Decreto-Lei n.º 74/90
- [94] Boletín Oficial del Estado 2001, número 178, Madrid, 26 July 2001, 27398
- [95] Gertz Ch, Kogelheide H. *Fat Science Technology* 1994; 96: 175-182
- [96] Menichini E, Bocca A, Merli F, Ianni D, Monfredini F. *Food Additives and Contaminants* 1991; 8: 363-369
- [97] Morgante A. *Quaderni di Merceologia* 1973; 12: 49-62 citado por [96]
- [98] Corradetti E, Abbondanza C, Mazzanti L, Poli G. *Bolletino dei Chimici Igienisti* 1988; 39: 297-317 citado [96]
- [99] Kolarovič L, Traitler H. *Journal of Chromatography* 1982; 237: 263-272
- [100] Balenovic J, Petrovic I, Perkovic M. *Proceedings of Euro Food Chem VIII*, Viena, 1995, vol.2: 275 citado por [22]
- [101] Grimmer G, Hildebrandt A. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists* 1972; 55: 631-635
- [102] Pupin AM, Toledo MCF. *Food Chemistry* 1996; 55: 185-188
- [103] Kazerouni N, Sinha R, Hsu CH, Greenberg A, Rothman N. *Food and Chemical Toxicology* 2001; 39: 423-436
- [104] Speer K, Montag A. *Fat Science Technology* 1988; 90: 76-81
- [105] Stravic B, Klassen R. *Food Chemical Toxicology* 1994; 32: 727-734
- [106] Howard JW, Fazio T. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists* 1980; 63:1077-1104
- [107] Hertz PMR, McGown LB. *Analytical Chemistry* 1992; 64: 2920-8
- [108] Lopez Garcia A, Blanco González E, Garcia Alonso JI, Sanz-Medel A. *Analytica Chimica Acta* 1992; 264: 241-248
- [109] Takatsuki K, Suzuki S, sato N, Ushizawa I. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists* 1985; 68: 945-951
-

-
- [110] Alpendurada MF. Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos – contribuição para o estudo em águas de bebida. Dissertação de candidatura ao grau de Doutor apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, 1988.
- [111] Vaessen HAMG, Wagstaffe PJ, Lindsey AS. *Fresenius Zeitschrift für Analytische Chemie* 1988; 332: 325-332
- [112] Vaessen HAMG, Wagstaffe PJ, Lindsey AS. *Fresenius Journal Analytical Chemistry* 1990; 336: 503-510
- [113] Menichini E, Domenico A, Bonanni L. *Journal of Chromatography* 1991; 555: 211-220
- [114] Dunn BP, Armour RJ. *Analytical Chemistry* 1980; 52: 2031-2035
- [115] Vreuls JJ, de Jong GJ, Brinkman UATH. *Chromatographia* 1991; 31: 113-118
- [116] Nyman PJ, Perfetti GA, Joe FL, Diachenko GW. *Food Additives and Contaminants* 1993; 10: 489-501
- [117] Luthe G, Broeders J, Brinkman UATH. *Journal of Chromatography A* 2001; 933: 27-35
- [118] Grob K, Kaelin I, Artho A. *Journal of the High Resolution Chromatography* 1991; 14: 373-376
- [119] Grimmer G, Böhnke H. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists* 1975; 58: 725
- [120] Moret S, Bortomeazzi R, Rebecca S, Conte LS. *Riv Ital Sost Grasse* 1996; 73: 141 citado por [22]
- [121] Knize MG, Felton JS, Gross GA. *Journal of Chromatography* 1992; 624: 253-256
- [122] Castilho MC, Ramos F, Silveira MIN. *Química* 1995; 59: 38-45
- [123] Castro C. Doseamento de Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos em solos florestais. Dissertação de candidatura ao grau de Mestre apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, 2000
- [124] Eisert R, Levsen K. *Journal of Chromatography A* 1996, 733: 143-157
- [125] Rivera L, Curto MJC, Pais P, Galceran MT, Puignou L. *Journal of Chromatography A* 1996; 731: 85-94
- [126] Brower ER, Hermans ANJ, Lingeman H, Brinkman UATH. *Journal of Chromatography A* 1994; 669: 45-57
- [127] Kiss G, Varga-Puchony Z, Hlavay J. *Journal of Chromatography A* 1996; 725: 261-272
-

-
- [128] Junk GA, Richard JJ. *Analytical Chemistry* 1988; 60: 451-454
- [129] Strandberg B, Bergqvist PA, Rappe C. *Analytical Chemistry* 1998; 70: 526-533
- [130] Yeakub AM, Cole RB. *Analytical Chemistry* 1998; 70: 3242-3248
- [131] Ali Y, Cole RB. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 2001; 49: 4192-4198
- [132] Miller DJ, Hawthorne SB. *Analytical Chemistry* 1995; 67: 273-279
- [133] Perrin JL, Poirot N, Liska P, Thienpont A, Felix G. *Fat Science and Technology* 1993; 95: 46-51
- [134] Van Stijn F, Kerkoff MAT, Vandeginste BGM. *Journal of Chromatography A* 1996; 750: 263-273
- [135] Moret S, Conte LS. *Journal of High Resolution Chromatography* 1998; 21: 253-257
- [136] Moret S, Conte LS, Dean D. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 1999; 47:1367-1371
- [137] Heaton DM, Bartle KD, Clifford AA, Myers P, King BW. *Chromatographia* 1994; 39: 607-611
- [138] Szolar OHJ, Brown RS, Luong JHT. *Analytical Chemistry* 1995; 67: 3004-3010
- [139] Takagai Y, Igarashi S. *Analyst* 2001; 126: 551-552
- [140] Wise, Stephen A. High Performance Liquid Chromatography for the determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. In: *Handbook of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*. New York: Marcel Dekker, 1983: 191-230
- [141] Beltrán JL, Ferrer R, Guiteras J. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technology* 1996; 19: 477-188
- [142] Amigo A, Yusti M, Lozano J. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists* 2002; 85: 141-145
- [143] Dennis MJ, Massey RC, McWeeny D. *Journal of Chromatography* 1984; 285: 127-133
- [144] Kayali-Sayadi MN, Barroso SR, Cuesta-Jimenez MP, Polo-Díez LM. *Journal Liquid Chromatography & Related Technology* 1999; 22: 615-627
- [145] Chiang TA, Wu PF, Ko YC. *Environmental Research Section A* 1999; 81: 18-22
- [146] Mao C, Tucker SA. *Journal of Chromatography A* 2002; 966: 53-61
- [147] Dorthe AM, Ramberti JL, Thienpont A. *Analisis* 2000; 28: 587-591
- [148] Uthe JF, Musial CJ. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists* 1988; 71: 363-368
-

- [149] Moret S, Piani B, Bortolomeazzi LS, Conte LS. *Z Lebens Unters Forsch* 1997; 205: 116-120
- [150] Law RJ, Klungsoyr J. *Marine Pollution Bulletin* 1996; 32: 667-673
- [151] Doerge DR, Clayton J, Fu PP, Wolfe DA. *Biological Mass Spectrometry* 1993; 22: 654-660
- [152] Poole CF, Butler HT, Coddens ME, Khatib S, Vandervennet R. *Journal of Chromatography*, 302, 149-158, 1984
- [153] Perfetti GA, Nyman PJ, Fisher S, Joe FL, Diachenko GW. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists* 1992; 75: 872-876
- [154] Moret S, Krob K, Conte LS. *Journal of Chromatography A*, 1996; 750: 361-368
- [155] Stijve T, Hischenhuber C. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau* 1987; 83: 276-282 citado por [6]
- [156] Dorthe AM, Ramberti JL, Thienpont A. *Analisis* 2000; 28: 587-591
- [157] Lawrence JF, Weber DF. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 1984, 32: 794-797
- [158] Zedek MS. *Journal of Environmental Control* 1980: 280 citado por [22]
- [159] Ciusa W, Morgante A. *Riv Merceol* 1990; 29: 5 citado por [22]
- [160] Toledo MC, Camargo MSFO. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 1998; 18: 73-76
- [161] Sagredos AN, Sinha-Roy D. *Deutsche Lebens Rundshau* 1979; 75:350 citado por [22]
- [162] Moret Sabrina. Conte L. *Journal os Separation Science* 2002; 25: 96-100
- [163] Arens M, Gertz C. *Fett/Lipid* 98 196; 98: 216-219
- [164] Poole SK, Dean TA, Oudsema JW, Poole CF. *Analytica Chimica Acta* 1990; 236: 3-42
- [165] Marriott PJ, Carpenter PD, Brady PH, McCornick MJ, Griffiths AJ, Hatvani TSH, Rasdell SG. *Journal of Liquid Chromatography* 1993; 16: 3229:3247
- [166] Ignesti G, Lodovici M, Dolara P, Lucia P, Grechi D. *Bulletin of environmental contamination and toxicology* 1992; 48: 809-814
- [167] <http://apps.fao.org/lim500/wrap.pl?FoodBalanceSheet&Domain=FoodBalanceSheet&Language=english>

