



## HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS EM AZEITES DE OLIVA

Raquel M. Reis<sup>1a</sup>; Mônica C. R. Camargo<sup>2b</sup>; Regina P. Z. Furlani<sup>2b</sup>; Sílvia A. V. Tfouni<sup>2c</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Química – Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), <sup>2</sup>Centro de Ciência e Qualidade de Alimentos - Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL)

Nº 13203

**RESUMO** - Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) são compostos formados a partir da queima incompleta de material orgânico, são considerados importantes contaminantes ambientais e têm sido muito estudados devido ao seu potencial carcinogênico e genotóxico. O Brasil é o terceiro maior importador de azeite de oliva do mundo. Há uma alta incidência de adulterações nesse tipo de produto, sendo a adição de outros óleos vegetais de menor valor comercial a forma mais frequente. Sendo assim os HPAs podem estar presentes em azeites de oliva comercializados no país devido à adulteração do produto ou através de contaminação ambiental. O objetivo do presente estudo foi validar uma metodologia analítica para determinação de 13 HPAs em azeite de oliva e avaliar a presença desses contaminantes em produtos disponíveis no comércio. O método envolveu extração com hexano e dimetilformamida:água, limpeza em cartucho SPE C18 e determinação por HPLC com detector de fluorescência. A metodologia utilizada se mostrou adequada, com valores médios de recuperação entre 62% e 115% e limites de detecção e quantificação menores que 0,52 µg/kg e 3,00 µg/kg, respectivamente. HPAs foram detectados em todas as 30 amostras analisadas com a somatória dos compostos variando de 0,56 µg/kg a 39,52 µg/kg. Houve uma grande variação nos níveis de HPAs entre as diferentes marcas avaliadas e também entre diferentes lotes de uma mesma marca. Duas amostras apresentaram níveis de benzo(a)pireno acima do limite permitido para óleos e gorduras pela legislação europeia (2,0 µg/kg).

**Palavras-chaves:** azeite de oliva, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA), HPLC-FLD

<sup>a</sup> Bolsista CNPq; Graduação em Química Tecnológica, raquel\_m\_reis@hotmail.com, <sup>b</sup> Colaborador, <sup>c</sup> Orientador



**ABSTRACT** - *Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are organic compounds formed during incomplete combustion or pyrolysis of organic matter, they are considered important environmental contaminants and have been widely studied due to their carcinogenic and genotoxic potential. Brazil is the third largest importer of olive oil in the world. There is a high incidence of adulteration in this type of product, usually through the addition of cheaper, lower-grade oils. In this way, PAHs may be present in olive oils commercialized in Brazil due to product adulteration or environmental contamination. The objective of the present study was to validate an analytical methodology for determination of 13 PAHs in olive oil and evaluate their presence in commercially available products. The method involved extraction with hexane and N,N-dimethylformamide, SPE clean-up with C18 cartridges and analyses by HPLC with fluorescence detection. Method was adequate for PAHs analyses presenting recovery of 62% to 115% and detection and quantification limits up to 0.52 µg/kg and 3.00 µg/kg, respectively. PAHs were detected in all 30 samples analyzed with sum ranging from 0.56 µg/kg to 39.52 µg/kg. There was a high variability of PAHs levels among different brands evaluated and also among different batches of the same brand. Two samples presented benzo(a)pyrene levels above the maximum limit for oil and fats laid down by the European regulation (2.0 µg/kg).*

**Key-words:** olive oil, polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH), HPLC-FLD

## 1 INTRODUÇÃO

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) constituem uma ampla classe de compostos formados a partir da queima incompleta de material orgânico. Esses compostos têm sido muito estudados ao longo dos anos devido ao seu potencial carcinogênico (WHO, 1998; WHO, 2005). Em avaliação realizada em 2005, o JECFA (Comitê Conjunto FAO/OMS de Peritos em Aditivos Alimentares) concluiu que 13 HPAs são claramente carcinogênicos e genotóxicos (WHO, 2005). Em 2008, o painel de peritos em contaminantes da EFSA (European Food Safety Authority) revisou os dados disponíveis sobre ocorrência e toxicidade de HPAs e concluiu que o benzo(a)pireno, que é tradicionalmente utilizado individualmente como marcador para a presença de HPAs em alimentos, não é indicado para esse fim; tendo então sugerido como indicador a presença combinada de quatro HPAs (HPA4: benzo(a)pireno, criseno, benzo(a)antraceno e benzo(b)fluorenteno) ou de oito HPAs (HPA8: os quatro anteriores mais benzo(k)fluoranteno, benzo(ghi)perileno, dibenzo(ah)antraceno e indeno (1,2,3 cd-pireno)) (EFSA, 2008).



## VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013 13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

Os alimentos são uma das principais rotas de exposição humana aos HPAs. A presença desses compostos em alimentos se deve principalmente à contaminação ambiental e à sua formação durante o processamento de alimentos em etapas envolvendo defumação, torrefação e secagem direta com madeira (WHO, 1998). A presença de HPAs já foi detectada em muitos produtos, entre eles óleos vegetais, margarinas, produtos defumados, açúcar e cereais (Camargo e Toledo, 2002a; Camargo e Toledo, 2002b).

O azeite de oliva representa um pequeno volume em termos de produção mundial, entretanto, é um produto que possui um alto valor agregado sendo alvo frequente de fraudes e adulterações. Vários trabalhos publicados comprovam a alta incidência de adulterações em azeite de oliva, sendo que no Brasil a mais comum é a adição de outros óleos vegetais de menor valor comercial, especialmente quando o produto importado é envasado no país (Badolato *et al.*, 1981; Aued-Pimentel *et al.*, 2002; Aued-Pimentel *et al.*, 2008; Fasciotti e Pereira Neto, 2010).

A presença de HPAs em azeite de oliva pode ocorrer em decorrência da poluição ambiental (Rodriguez-Acuña *et al.*, 2008) ou adição, fraudulenta ou não de outros óleos vegetais ao produto, como os óleos de soja, milho, girassol, ou ainda pela adição de óleo de bagaço de oliva (Pupin e Toledo, 1996). A contaminação desses outros óleos vegetais por HPAs é muito comum e tem sido muito estudada, sendo reportada como uma das maiores fontes de ingestão desses compostos através da dieta (Toledo e Camargo, 1998; Moret e Conte, 2000; Teixeira *et al.*, 2007).

Sendo assim, o objetivo do presente estudo foi validar uma metodologia analítica para determinação de 13 HPAs em azeite de oliva e avaliar a presença desses contaminantes nos produtos disponíveis no comércio.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Amostras

Foram coletadas, em supermercados da região de Campinas-SP, amostras de 15 diferentes marcas de azeite de oliva, sendo 2 lotes de cada, totalizando 30 amostras. Os azeites de oliva foram então analisados em duplicata quanto à presença de 13 HPAs: benzo(a)antraceno (BaA), criseno (Chy), 5-metilcriseno (5MeChy), benzo(j)fluoranteno (BjF), benzo(b)fluoranteno (BbF), benzo(k)fluoranteno (BkF), benzo(a)pireno (BaP), dibenzo(al)pireno (DalP), dibenzo(ah)antraceno (DahA), indeno(1,2,3-cd)pireno (Indeno), dibenzo(ae)pireno (DaeP), dibenzo(ai)pireno (DaiP) e dibenzo(ah)pireno (DahP).



## VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013 13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

### 2.2 Extração e limpeza

O método analítico foi baseado naquele proposto por Camargo *et al.* (2011a) e envolveu dissolução da matriz em hexano, extração com solução de dimetilformamida-água (9:1, v/v) e limpeza em cartuchos de extração em fase sólida (C18).

### 2.3 Análise cromatográfica

A técnica empregada foi a cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência. Para a separação dos compostos foi utilizada uma coluna C18 e um gradiente de fase móvel composta por acetonitrila-água a um fluxo de 1 mL/min e volume de injeção de 30  $\mu$ L. A detecção foi feita através de uma programação de comprimentos de onda. A quantificação foi feita por padronização externa.

### 2.4 Validação da metodologia analítica

A curva de calibração foi construída com injeções em duplicata de soluções padrão dos 13 HPAs em acetonitrila com seis níveis de concentrações variando de 0,30 a 10,00  $\mu$ g/L. Para os testes de recuperação, amostras de azeite de oliva foram fortificadas com soluções padrão de HPAs em 4 diferentes concentrações (0,3, 1,0, 2,0 e 5,0  $\mu$ g/kg) e as análises foram feitas em cinco replicatas. A repetibilidade do método foi avaliada pelo coeficiente de variação (CV) associado às medidas de cada HPA durante os testes de recuperação. Os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) foram calculados de acordo com a orientação do INMETRO (2011).

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

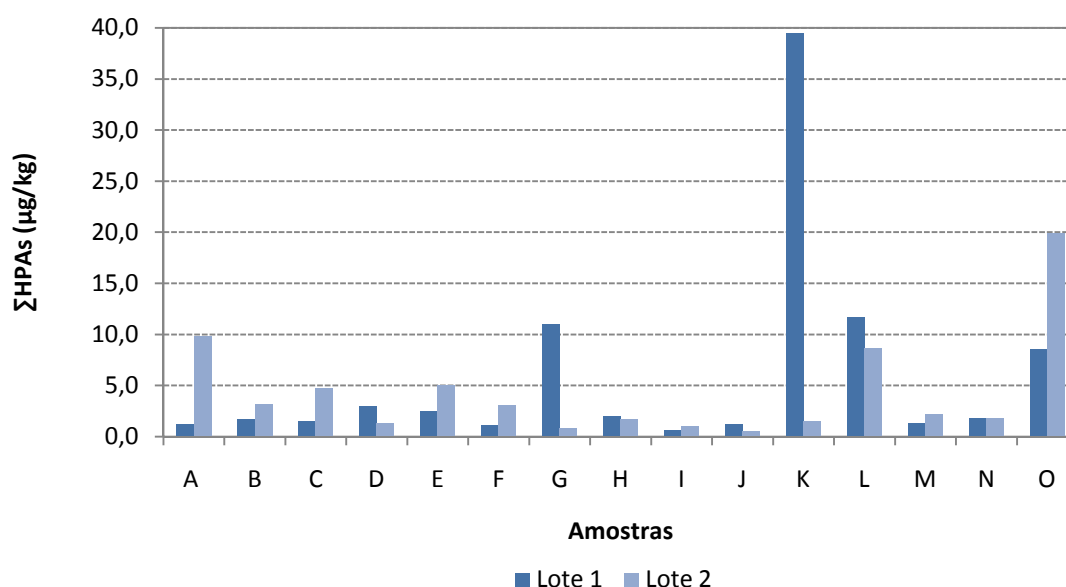
A metodologia utilizada se mostrou adequada para a análise dos 13 HPAs em amostras de azeite de oliva. As curvas de calibração se mostraram lineares na faixa de trabalho utilizada, sendo que os coeficientes de correlação linear ( $r$ ) variaram de 0,9990 a 0,9998. Os valores médios de recuperação obtidos ficaram entre 62% e 115%, com um CV máximo de 20%. O limite de detecção do método variou de 0,02  $\mu$ g/kg (DahP) a 0,52  $\mu$ g/kg (BjF), e o limite de quantificação variou de 0,30  $\mu$ g/kg a 3,00  $\mu$ g/kg. O método apresentou baixa sensibilidade para os compostos BjF e Indeno que conseqüentemente apresentaram limites de detecção e quantificação mais altos do que os do



VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013  
13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

restante dos HPAs. Apesar da menor sensibilidade para esses compostos, o método pode ser considerado adequado para a determinação de 13 HPAs em azeite de oliva, uma vez que atende aos critérios de desempenho propostos pela União Européia para análise de BaP em alimentos, onde é estabelecido que o LOD e o LOQ sejam menores que 0,3 e 0,9  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , respectivamente, e que a recuperação fique na faixa de 50 a 120% (CEC, 2007).

A figura 1 apresenta a somatória dos 13 HPAs nas amostras de azeite de oliva avaliadas. Os HPAs foram detectados em todas as amostras analisadas com níveis variando de 0,56  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (marca J, lote 2) a 39,52  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (marca K, lote 1).



**FIGURA 1.** Somatória de HPAs, por lote, nas amostras de azeite de oliva analisadas.

De acordo com os resultados apresentados na figura 1 pode-se notar que houve uma variação nos níveis de HPAs entre as diferentes marcas e também entre os lotes de uma mesma marca. Essa variabilidade pode ser decorrente das diferentes origens da matéria-prima (contaminação ambiental) ou da possível adulteração através da adição de óleo vegetal contaminado. Esses resultados estão de acordo com os reportados na literatura, onde também houve grande variação nos níveis de HPAs entre diferentes marcas e lotes de óleos vegetais (Ballesteros *et al*, 2006; Léon-Camacho, *et al.*, 2003; Camargo *et al*, 2011b).

A legislação brasileira não estabelece limites máximos de HPAs em azeites de oliva, há apenas regulamentação para óleo de bagaço ou caroço de oliva cujo limite é de 2,0  $\mu\text{g}/\text{kg}$  para o



## VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013

13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

BaP (Brasil, 2003). A legislação europeia, por sua vez, estabelece limites de 2,0 µg/kg para BaP, e 10,0 µg/kg para a soma das concentrações de BaA, Chy, BbF e BaP (HPA4), sendo que essa abrange toda a categoria de óleos e gorduras (CEC, 2011). Ao se utilizar esses limites como base de comparação verifica-se que os valores determinados para esses compostos, apresentados na tabela 1, podem ser considerados baixos, sendo que somente duas amostras apresentaram níveis acima do limite para o BaP, e para a soma de BaA, Chy, BbF e BaP.

**Tabela 1.** Níveis de benzo(a)pireno (BaP) e da soma de benzo(a)antraceno (BaA), criseno (Chy), benzo(b)fluoranteno (BbF) e benzo(a)pireno (BaP) em diferentes marcas e lotes de azeites de oliva.

Marca	BaP (µg/kg)*			HPA4(µg/kg)*		
	Lote 1	Lote 2	Média	Lote 1	Lote 2	Média
A	nd	1,54	0,77	0,83	7,75	4,29
B	nd	nd	nd	1,34	0,90	1,12
C	nd	0,27	0,13	1,52	2,09	1,81
D	nd	nd	nd	2,58	1,31	1,95
E	nd	nd	nd	1,76	2,27	2,01
F	nd	nd	nd	1,11	1,32	1,22
G	0,98	nd	0,49	7,48	0,89	4,18
H	nd	nd	nd	1,62	1,71	1,66
I	nd	nd	nd	0,59	1,04	0,82
J	nd	nd	nd	1,24	0,56	0,90
K	5,95	nd	2,97	22,50	1,50	12,00
L	0,87	0,60	0,73	9,71	7,84	8,77
M	nd	0,01	0,01	1,36	1,72	1,54
N	nd	nd	nd	1,45	1,43	1,44
O	0,79	3,57	2,18	7,39	14,98	11,19

HPA4 = BaA+Chy+BbF+BaP

\* Média de duplicata

nd – não detectado

#### 4 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos a partir dos testes de recuperação, linearidade e limites de detecção e quantificação indicam que a metodologia é adequada e pode ser empregada para análise de 13 HPAs em azeite de oliva.

Foi encontrada uma grande variação nos níveis de HPAs nas diferentes marcas e lotes dos produtos analisados, o que pode indicar a presença de outros óleos vegetais em algumas amostras avaliadas. Estudos adicionais são necessários para determinar se essas amostras encontram-se adulteradas e verificar a correlação da adulteração com a presença de HPAs.



## VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013

13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

Os níveis encontrados, quando comparados com a legislação, mostram que, assim como outros óleos vegetais, os azeites de oliva são uma classe de produtos passíveis de contaminação por HPAs, sendo, portanto indicado que, na legislação nacional, limites máximos sejam estabelecidos para esses compostos na categoria de óleos e gorduras.

### 5 AGRADECIMENTOS

Ao CNPq pela bolsa de iniciação científica concedida (PIBIC/CNPq) e à FAPESP pelo apoio financeiro ao projeto de pesquisa (processo 2011/10966-4).

### 6 REFERÊNCIAS

Aued-Pimentel, S.; Takemoto, E.; Minazzi-Rodriguez, R. S.; Badoloto, E.S.G. Azeite de oliva: incidência de adulterações entre os anos de 1993 e 2000. **Revista do Instituto Adolf Lutz**, v. 61, n. 2, p. 69-75, 2002.

Aued-Pimentel, S.; Takemoto, E.; Kumagai, E. E.; Cano, C. B. Determinação de diferença entre o valor real e o teórico do triglicerídeo ECN 42 para a detecção de adulteração em azeites de oliva comercializados no Brasil. **Química Nova**, v. 31, n. 1, p. 31-34, 2008.

Badoloto, E. S. G.; Durante, F.; Almeida, M. E. W.; Silveira, N. V. Óleo de oliva – Avaliação de sua qualidade. **Revista do Instituto Adolf Lutz**, v. 41, n. 1, p. 63-70, 1981.

Ballesteros, E.; García Sánchez, A.; Ramos Martos, N. Simultaneous multidetermination of residues of pesticides in olive and olive-pomace oils by gas chromatography/tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1111, p. 89-96, 2006.

Brasil. Resolução RDC nº 281, de 06 de outubro de 2003. **Diário Oficial da União**, 08 outubro, 2003.

Camargo, M.C.R.; Toledo, M.C.F. Avaliação da contaminação de diferentes grupos de alimentos por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 5, p. 19-26, 2002a.

Camargo, M.C.R.; Toledo, M.C.F. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos – uma revisão. **Boletim SBCTA**, Campinas, v. 36, n. 1, p. 69-78, 2002b.

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

Camargo, M.C.R.; Antonioli, P.R.; Vicente, E.; Tfouni, S.A.V. Polycyclic aromatic hydrocarbons in Brazilian soybean oils and dietary exposure. **Food Additives and Contaminants Part B**, v. 4, n. 2, p. 152-159, 2011b.

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

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

Fascioli, M. Pereira, A.D.N. Optimization and application of methods of triacylglycerol evaluation for characterization of olive oil adulteration by soybean oil with HPLC-APCI-MS-MS. **Talanta**, v. 81, p. 1116-1125, 2010.

EFSA – European Food Safety Authority. Polycyclic aromatic hydrocarbons in food, Scientific opinion of the panel on contaminants in the food chain. **The EFSA Journal**, 724: 1-114, 2008.





## VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2013

13 a 15 de agosto de 2013 – Campinas, São Paulo

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

Léon-Camacho, M.; Vieira-Alcaide, I.; Ruiz-Méndez, M.V. Elimination of polycyclic aromatic hydrocarbons by bleaching of olive pomace oil. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 105, p. 9-16, 2003.

Moret, S.; Conte, L.S. Polycyclic aromatic hydrocarbons in edible fats and oils: occurrence and analytical methods. **Journal of Chromatography A**, v. 882, p. 245-253, 2000.

Pupin, A.M.; Toledo, M.C.F. Benzo(a)pyrene in Brazilian vegetables oils. **Food Additives and Contaminants**, v. 13, n. 6, p. 639-646, 1996.

Rodríguez-Acuña, R.; Pérez-Camino, M. C.; Cert, A.; Moreda, W. Polycyclic aromatic hydrocarbons in Spanish olive oils: relationship between benzo(a)pyrene and total polycyclic aromatic hydrocarbon content. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 10428-10432, 2008.

Teixeira, V.H.; Casal, S.; Oliveira, M.B.P.P. PAHs content in sunflower, soybean and virgin olive oils: evaluation in commercial samples and during refining process. **Food Chemistry**, v. 104, p. 106-112, 2007.

Toledo, M.C.F.; Camargo, M.S.F.O. Benzo(a)pireno em óleos de milho comercializados no Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 18, n. 1, p. 73-76, 1998.

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

WHO - World Health Organization. **Summary and conclusions of the sixty-fourth meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives**. Rome, 47p, 2005.