



**RANIELY DE LOURDES FONSECA LUZ**

**HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS  
AROMÁTICOS (HPAs) EM QUEIJOS  
DEFUMADOS E EM QUEIJOS ASSADOS EM  
CHURRASQUEIRAS**

**LAVRAS - MG  
2013**

**RANIELY DE LOURDES FONSECA LUZ**

**HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS (HPAs) EM  
QUEIJOS DEFUMADOS E EM QUEIJOS ASSADOS EM  
CHURRASQUEIRAS**

Dissertação apresentada ao Departamento de Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Ciência dos Alimentos, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador

Prof. Luiz Ronaldo de Abreu

**LAVRAS - MG  
2013**

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Coordenadoria de Produtos e  
Serviços da Biblioteca Universitária da UFLA**

Luz , Raniely de Lourdes Fonseca.

Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) em queijos defumados e em queijos assados em churrasqueiras / Raniely de Lourdes Fonseca. – Lavras : UFLA

122 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2013.

Orientador: Luiz Ronaldo de Abreu.

Bibliografia.

1. Queijos defumados - Compostos cancerígenos. 2. HPAs. 3. Cromatografia. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 637.3

**RANIELY DE LOURDES FONSECA LUZ**

**HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS (HPAs) EM  
QUEIJOS DEFUMADOS**

Dissertação apresentada ao Departamento de Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Ciência dos Alimentos, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 29 de agosto de 2013

Prof. Maria das Graças Cardoso	DQI
Profa. Sandra Maria Pinto	DCA
Profa. Ivana Aparecida da SILVA	UNILAVRAS

Prof. Luiz Ronaldo de Abreu  
Orientador

**LAVRAS MG  
2012**

*São nossas escolhas que revelam o que realmente somos, muito mais do que  
nossas qualidades.*

*J. K. Rowling*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar comigo em cada instante de dúvida, angústia e medo, e mesmo assim, sempre abrir caminhos em minha vida.

Ao meu pai, Carlos, por me incentivar com exemplos e apoio, sempre ao meu lado com conselhos, os quais me fizeram ser a pessoa que sou hoje. Te amo pai!

À minha mãe, Regina, pelo seu colo acolhedor, seu sorriso e jeito simples de ver a vida, que me ajudam a vencer cada desafio. Te amo mãe!

Ao meu irmão, Bruno, pelo seu apoio, amor e cumplicidade durante todas as etapas de minha vida, te amo muito!

Ao meu marido, Gustavo, pelo carinho, compreensão e amor durante toda nossa longa jornada e por estar sempre ao meu lado. Te amo, amor!

Ao meu orientador, Luiz Ronaldo de Abreu, por todo o seu apoio desde a graduação, pela amizade e amparo, que me fizeram crescer como profissional e pessoa.

À minha co-orientadora, Maria das Graças Cardoso, pela iniciativa de discussão sobre HPAs na UFLA, que serviu de base para o planejamento e condução desta dissertação.

À professora Sandra Maria Pinto, por dividir seus conhecimentos e me apoiar em muitos momentos de minha vida.

Aos membros da banca examinadora, (Maria das Graças e Ivana), pela disposição, correções e sugestões.

À Capes, pela bolsa de pesquisa concedida durante a pesquisa.

Ao CNPq e FAPEMIG, pelo apoio financeiro.

À pesquisadora Monica C. Rojo Camargo, do Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL), pelo fundamental apoio durante as corridas cromatográficas e por dispor seu método de identificação e quantificação dos HPAs.

À técnica administrativa do Laboratório de Laticínios Creusa P. do A. Resende, por ser como uma segunda mãe desde a época de graduação. Eu te devo muito do que sou como profissional.

Aos amigos do Laboratório de Laticínios, Elisângela, Marcel, Thaís, Rejiane, Ana Paula e Sérgio, pela amizade, descontração e por tornar nosso laboratório “tão especial”.

Aos funcionários, técnicos e professores do Departamento de Ciência dos Alimentos, Constantina (Tina), Denise, Lucilene e Luiz Carlos Oliveira e tantos outros que estiveram sempre dispostos quando precisava de uma colaboração.

E a todos aqueles que participaram, direta ou indiretamente, para que este trabalho fosse realizado com afinco, dedicação e amor...

Raniely

## RESUMO GERAL

Neste trabalho estudou-se o efeito do processo de defumação em queijos na geração de compostos cancerígenos como os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs). A identificação e a quantificação dos HPAs na primeira etapa foram feitas em queijos defumados provenientes do mercado de São Paulo, SP e Lavras, MG. Com relação aos diferentes tipos de processo de defumação, houve maior contaminação de queijos submetidos ao processo tradicional, comparado com o processo de defumação por fumaça líquida. Níveis relativamente altos foram encontrados para os compostos criseno e 5-metilcriseno ( $\Sigma = 1.308\mu\text{g.kg}^{-1}$  e  $\Sigma = 1,568\mu\text{g.kg}^{-1}$ ). Na segunda etapa, o objetivo foi avaliar o gradiente de migração dos HPAs nos queijos em relação à sua massa, sendo os queijos oriundo das amostras da etapa anterior. Níveis relativamente mais altos foram encontrados na casca dos queijos, em comparação com o interior da massa. Houve efetivo gradiente de migração dos HPAs da periferia para o centro dos queijos defumados, essa migração ocorreu no contrafluxo da gordura total do queijo. Na terceira etapa, amostras de queijo coalho, adquiridas no comércio de Lavras – MG foram assadas em churrasqueira convencional, tentando, assim, simular um hábito rotineiro da população, em especial da região sudeste do país, para, dessa forma, estudar a possível contaminação dos HPAs nos queijos. Não ocorreu contaminação acima do permitido pela legislação europeia.

Palavras-Chave: Queijos defumados. HPAs. Cromatografia.

## GENERAL ABSTRACT

In this work the effect of the smoking process in cheese in the generation of carcinogenic compounds such as polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) was studied. The identification and quantification of PAHs in the first stage was carried out in smoked cheeses acquired on the market of São Paulo, SP, and Lavras, MG. With regard to different types of smoking process, cheeses submitted to the traditional process was more contaminated compared to the as liquid smoking. Relatively high levels were found for the compounds 5metil-chrysene and chrysene ( $\Sigma = 1.308\mu\text{g.kg}^{-1}$  e  $\Sigma = 1,568\mu\text{g.kg}^{-1}$ ). In the second phase the objective was to evaluate the migration gradient of PAHs in cheeses into its mass, and the cheeses in question derived from samples from the previous phase. Relatively high levels were found in the rind of the cheese in comparison to the interior of the mass. There was effective migration gradient of PAHs from the periphery to the center of the smoked cheese, and this migration was against the flow of the fat. Finally in the third stage samples of rennet cheeses, acquired in Lavras - MG were baked in conventional grill, trying to simulate a routine habit of the population, especially in the southeast region of the country, so as to study the possible contamination of PAHs in cheeses. It was not contamination above that allowed by European legislation.

Keywords: Smoked cheeses. PAHs. Chromatography.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### CAPÍTULO 2

Quadro 1	Relação de alguns HPAs com relação a carcinogenicidade .....	25
Quadro 2	Relação alimentos e HPAs .....	38
Figura 1	Esquema do metabolismo do benzo[a]pireno .....	28
Figura 2	Regiões dos HPAs .....	29
Figura 3	Esquema propostos para formação de adutos entre HPAs e DNA .....	30

### CAPÍTULO 3

Tabela 1	Caracterização Físico-Química Queijos .....	55
----------	---	----

### CAPÍTULO 4

Tabela 1	Características das amostras queijos .....	67
Tabela 2	Identificação e quantificação HPAs ( $\mu\text{g.kg}^{-1}$ ) .....	72
Figura 1	Cromatograma HPLC de uma das amostras de queijo .....	73
Figura 2	Relação de HPAs presentes em amostras de queijos frescos .....	75
Figura 3	Relação de HPAs presentes em amostras de queijos maturados .....	76
Figura 4	Relação de HPAs dos queijos defumados sob o processo tradicional. ....	77

Figura 5	Relação de HPAs dos queijos defumados sob o processo de defumação líquida. ....	78
----------	---	----

## **CAPÍTULO 5**

Tabela 1	Características dos queijos provolone defumado curado submetidos ao processo tradicional .....	90
Tabela 2	Caracterização Físico-Química Queijos* .....	95
Tabela 3	Identificação e quantificação HPAs ( $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) .....	96
Tabela 4	HPAs na gordura .....	97
Figura 1	Taxa de gradiente de migração dos HPAs em relação à massa dos queijos. ....	97

## **CAPÍTULO 6**

Tabela 1	Caracterização Físico-Química Queijos .....	114
Tabela 2	Identificação e quantificação HPAs ( $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) .....	115
Figura 1	Cromatograma HPLC de uma das amostras de queijo .....	116

## SUMÁRIO

	<b>CAPÍTULO 1</b> Introdução geral.....	15
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	16
	<b>CAPÍTULO 2</b> Revisão bibliográfica: hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) em queijos defumados .....	18
<b>1</b>	<b>HIDROCARBONETOS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS</b> ....	19
<b>1.1</b>	<b>Definição, origem e exposição</b> .....	19
<b>1.2</b>	<b>Características físico-químicas e reatividade</b> .....	21
<b>1.3</b>	<b>Transformação e degradação dos HPAs no ar, solo e água</b> .....	23
<b>1.4</b>	<b>Genotoxicidade dos HPAs e seus derivados</b> .....	24
<b>1.5</b>	<b>Metabolismo dos HPAs</b> .....	26
<b>1.6</b>	<b>Reatividade com macromoléculas biológicas</b> .....	29
<b>2</b>	<b>O BENZO[A]PIRENO</b> .....	32
<b>3</b>	<b>DEFUMAÇÃO</b> .....	34
<b>3.1</b>	<b>Defumação tradicional</b> .....	34
<b>3.2</b>	<b>Defumação por fumaça líquida</b> .....	35
<b>4</b>	<b>RELAÇÃO ENTRE OS HPAS E OS QUEIJOS DEFUMADOS</b> .....	37
<b>5</b>	<b>QUEIJO COALHO</b> .....	40
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	41
	<b>CAPÍTULO 3</b> Avaliação das propriedades físico-químicas de queijos provolones defumados comerciais.....	48
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	51
<b>2</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	52
<b>3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	55
<b>4</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	56
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	58

	<b>CAPÍTULO 4 Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAS): identificação e quantificação em queijos defumados comerciais.....</b>	<b>59</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>62</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>65</b>
<b>2.1</b>	<b>Reagentes .....</b>	<b>65</b>
<b>2.2</b>	<b>Preparo de soluções.....</b>	<b>65</b>
<b>2.3</b>	<b>Amostras .....</b>	<b>65</b>
<b>2.4</b>	<b>Análises hidrocarbonetos policíclicos aromáticos.....</b>	<b>68</b>
<b>2.4.1</b>	<b>Extração e Clean-up .....</b>	<b>68</b>
<b>2.4.2</b>	<b>Análise HPLC .....</b>	<b>69</b>
<b>2.4.3</b>	<b>Identificação e quantificação HPAs.....</b>	<b>69</b>
<b>2.5</b>	<b>Análises estatísticas.....</b>	<b>70</b>
<b>3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>71</b>
<b>3.1</b>	<b>Identificação e quantificação dos HPAs .....</b>	<b>71</b>
<b>3.2</b>	<b>Relação HPAs em queijos maturados .....</b>	<b>75</b>
<b>3.3</b>	<b>Relação HPAs em tipo de defumação.....</b>	<b>77</b>
<b>4</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>80</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>82</b>
	<b>CAPÍTULO 5 Gradiente de migração de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAS) em queijos defumados comerciais.....</b>	<b>85</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>88</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>90</b>
<b>2.1</b>	<b>Amostras .....</b>	<b>90</b>
<b>2.2</b>	<b>Reagentes .....</b>	<b>90</b>
<b>2.3</b>	<b>Preparo de soluções.....</b>	<b>91</b>
<b>2.4</b>	<b>Métodos.....</b>	<b>91</b>

2.4.1	Caracterização físico-química .....	91
2.4.2	Análises hidrocarbonetos policíclicos aromáticos .....	92
2.4.2.1	Extração e Clean-up .....	92
2.4.2.2	Análise HPLC .....	93
2.4.2.3	Identificação e quantificação HPAs.....	93
2.4.2.4	Relação do teor de Hpas pelo teor de gordura.....	94
2.5	Análises estatísticas.....	94
3	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	95
3.1	Caracterização físico-química .....	95
3.2	Identificação e quantificação dos HPAs .....	96
4	<b>CONCLUSÃO</b> .....	100
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	102
	<b>CAPÍTULO 6</b> Geração de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAS) em queijos submetidos à tosta em churrasqueira.....	104
1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	107
2	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	109
2.1	Amostras .....	109
2.2	Reagentes .....	109
2.3	Preparo de soluções.....	110
2.4	Métodos .....	110
2.4.1	Caracterização físico-química .....	110
2.4.2	Análises hidrocarbonetos policíclicos aromáticos .....	111
2.4.2.1	Extração e Clean-up .....	111
2.4.2.2	Análise HPLC .....	112
2.4.2.3	Identificação e quantificação HPAs.....	112
2.5	Análises estatísticas.....	113
3	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	114

<b>3.1</b>	<b>Caracterização físico-química queijo coalho.....</b>	<b>114</b>
<b>4</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>117</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>119</b>
	<b>CAPÍTULO 7 Consideração geral .....</b>	<b>121</b>
<b>1</b>	<b>CONCLUSÃO GERAL .....</b>	<b>122</b>

**CAPÍTULO 1 Introdução geral**

## 1 INTRODUÇÃO

Os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) são contaminantes amplamente distribuídos no ambiente, contendo dois ou mais anéis aromáticos fundidos, cuja importância se deve ao seu potencial carcinogênico em animais de laboratório e por relacionarem-se com alguns tipos de câncer no homem.

Os HAPs são formados durante a combustão incompleta de material orgânico. O processo de liberação desses compostos pode ser de forma natural, como vulcões e incêndios florestais ou devido a processos artificiais, como queima de madeira, combustão incompleta do carvão, degradação do petróleo, processos de defumação, entre outros. Embora o ar ou a água potável seja responsável por parte da exposição humana frente aos HPAs, a maior parte dessa exposição está associada à dieta.

O alimento é uma fonte significativa de HPAs ao qual estão expostos o ser humano e sua presença ocorre predominantemente pela poluição ambiental, e pelo processamento (secagem e defumação) e cocção (cozimento, assar, fritar). Assim, níveis variáveis de HPAs têm sido relatados em diversas categorias de alimentos e bebidas, incluindo vegetais e frutas, cereais, óleos e gorduras, produtos defumados, café e chá. Como composto marcador de contaminação por HPAs, o benzo[a]pireno é amplamente utilizado, por ser o mais estudado do grupo e por sua potente ação carcinogênica.

Apesar de o queijo defumado ser um prato muito popular em muitos países, incluindo o Brasil, apenas alguns artigos publicados nas últimas duas décadas, centraram-se nos níveis de HPAs nestes produtos. Quanto à estratégia analítica, várias técnicas têm sido relatadas na literatura para isolar os HPAs dos queijos defumados como tratamento alcalino, seguido de extração líquido-líquido, extração de amostras liofilizadas de queijos por solventes orgânicos, seguidos por saponificação e extração sólido-líquida. Para a fase de

identificação e quantificação, as técnicas cromatográficas são as mais utilizadas, dando destaque para cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), a qual se sobressai por apresentar resultados rápidos, seguros e limites de detecção e de quantificação inferiores aos obtidos por outras técnicas analíticas.

No intuito de estudar a presença e o comportamento dos HPAs em queijos defumados, objetiva-se neste trabalho: quantificar e caracterizar os HPAs em queijos defumados provenientes do mercado de Lavras, MG e São Paulo, SP, a fim de compará-los com a legislação; verificar se os diferentes processos de defumação em queijos interferem na liberação de HPAs; avaliar o comportamento dos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos HPAs, gerados no processo de defumação quanto a sua taxa de migração nos queijos; avaliar o grau de contaminação por HPAs em queijos assados em churrasqueiras convencionais, com carvão vegetal.

**CAPÍTULO 2 Revisão bibliográfica: hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAS) em queijos defumados**

## 1 HIDROCARBONETOS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS

### 1.1 Definição, origem e exposição

Os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos, (HPAs), consistem de uma família de compostos caracterizada por possuírem dois ou mais anéis aromáticos condensados. Essas substâncias, bem como seus compostos nitrados e oxigenados, têm ampla distribuição e são encontrados como constituintes de misturas complexas em todos os compartimentos ambientais (REY-SALGUEIRO et al., 2008).

Acredita-se que no mecanismo de formação dos HPAs estejam envolvidos dois processos distintos: a pirólise e a pirossíntese. Em altas temperaturas, compostos orgânicos são convertidos em moléculas pequenas não estáveis (pirólise). Essas e outros radicais se recombina para produzir moléculas maiores e mais estáveis de HPAs (pirossíntese). Uma vez formados, os HPAs podem sofrer reações pirossintéticas, originando estruturas mais complexas, com anéis altamente condensados (BETTIN; FRANCO, 2005).

A formação pirolítica de HPAs é bastante complexa e variável, dependendo das condições reacionais. O mecanismo aceito para essa reação envolve a polimerização via radicais livres, em várias etapas, até a formação de núcleos aromáticos condensados (LOPES; ANDRADE, 1996). A formação desses compostos depende de fatores, como tipo da biomassa presente, quantidade de oxigênio disponível, pressão e, principalmente, de calor, pois a concentração de HPAs aumenta linearmente na faixa de temperatura de 400 a 1000°C (CONDE et al., 2004).

Os HPAs podem ser classificados como alternante e nãoalternante. Alternante contém apenas anéis de seis membros, enquanto nãoalternante têm tanto de seis e ímpares. Se os anéis benzênicos são fundidos em uma forma

linear, o HPA é um “aceno” (por exemplo, antraceno, naftaceno, pentaceno), quando os anéis benzênicos se fundem em um arranjo angular, o seu nome termina com “feno” (pentafeno, por exemplo) (DABESTAN; IVANOV, 1999).

São poluentes orgânicos e alguns deles são capazes de reagir após reações metabólicas, o que os tornam carcinogênicos e potenciais mutagênicos (FERREIRA; MENDES; CRUZ, 2008).

Os HPAs são emitidos por fontes naturais e antropológicas (resultantes da atividade humana). Os HPAs antropológicos podem dividir-se em hidrocarbonetos de origem pirolítica (queima incompleta de combustíveis fósseis e derivados) e hidrocarbonetos de origem petrolífera (petróleo e derivados) (FERREIRA; MENDES; CRUZ, 2008).

A exposição humana aos HPAs ocorre principalmente pela contaminação ambiental. As vias de exposição para os seres vivos se dá pelo ar, água, solo e alimentos. De acordo com o estudo de Vanrooij e Bodelier-Bade (1993), realizado entre pessoas não fumantes e não ocupacionalmente expostas estima-se uma ingestão diária de cerca de 3,12 mg de 8 HPAs: (benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo[a]pireno, indeno(1,2,3-cd)pireno, dibenzo(a,h)antraceno e benzo(ghi)perileno), sendo os alimentos responsáveis por cerca de 96% desta ingestão.

Os alimentos podem ser contaminados a partir de HPAs disseminados no meio ambiente (ar atmosférico, solo ou água) ou durante o processamento e/ou cozimento. As principais etapas de processamento são secagem e defumação e as de cozimento são as que utilizam altas temperaturas, tais como aquelas que envolvem ações de grelhar, assar e fritar. Em áreas distantes de centros urbanos e industriais, os teores de HPAs presentes nos alimentos não processados refletem a contaminação ambiental (PEREIRA NETTO et al., 2000).

No âmbito do *Codex Alimentarius*, a necessidade de estabelecimento de limites para HPAs em alimentos tem sido manifestada por inúmeros países. Em 1991, o benzo[a]pireno foi reavaliado pelo Comitê Conjunto FAO/OMS de Peritos em Aditivos Alimentares (JECFA), que recomendou a elaboração de estratégias por parte das indústrias e dos consumidores para minimizar a exposição humana a esse contaminante. Na 64ª Reunião do JECFA, realizada em Roma, em fevereiro de 2005, esse Comitê identificou 13 HPAs como sendo genotóxicos e carcinogênicos: benzo(a)antraceno, benzo(b) fluoranteno, benzo(j)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a) pireno, criseno, dibenzo(a,h)antraceno, dibenzo(a,e) pireno, dibenzo(a,h)pireno, dibenzo(a,i)pireno, dibenzo(a,l) pireno, indeno(1,2,3-cd)pireno e 5-metilcriseno (JECFA, 2005).

## **1.2 Características físico-químicas e reatividade**

As propriedades físicas e químicas dos HPAs são amplamente determinadas pelo sistema de duplas conjugadas presentes nas estruturas dessa classe de compostos.

As propriedades físico-químicas são importantes para a percepção do comportamento ambiental e biológico de representantes do grupo dos HPAs. São pouco solúveis em água e, em geral, sua solubilidade diminui com o aumento do número de anéis (PEREIRA NETTO et al., 2000); apresentam também coeficientes de partição octanol/água superiores a 1000, demonstrando grande afinidade lipofílica, que aumenta com o número de anéis aromáticos da molécula (FERREIRA; MENDES; CRUZ, 2008).

Alguns HPAs são semivoláteis, porém, muitos deles podem ser transportados até longas distâncias e serem adsorvidos em material particulado (LIN; TU; ZHU, 2005). HPAs com 2 ou 3 anéis aromáticos estão quase

totalmente na fase de vapor; aqueles com 4 anéis encontram-se numa posição intermediária. Os HPAs com 5 ou mais anéis aromáticos são encontrados predominantemente em particulados (cinzas ou fuligens cujas partículas são menores que  $2,5 \mu\text{m}$ ) (CONDE et al., 2004).

A volatilidade desses compostos diminui com o aumento do peso molecular, sendo HPAs de pesos moleculares mais baixos mais voláteis e apresentam maiores pressões de vapor que os mais pesados. O mesmo é observado com os valores da constante de Henry, que diminui com o aumento do peso molecular dessas substâncias (AIR POLLUTION ABATMENT REVIEW GROUP - APARG, 1995).

A oxidação do HPA pode ocorrer pela reação de radical cátion (formado pela transferência de elétron do HPA ao oxigênio ou aceptores de outro tipo) com água. A facilidade desse processo de transferência entre elétrons, no entanto, é muito dependente do potencial de oxidação de um elétron do HPA em questão. O valor do potencial de ionização,  $I$ , pode ser utilizado para deduzir a energia total do par de íons formados (DABESTAN; IVANOV, 1999). É ainda de referir que as reações de oxidação e redução desses compostos diminuem com o aumento do peso molecular (FERREIRA; MENDES; CRUZ, 2008).

Como consequência dessas propriedades na atmosfera, essas substâncias podem ser encontradas tanto na fase gasosa, quanto adsorvida no material particular. A concentração de cada componente em ambas as fases é função de sua volatilidade e de sua afinidade pelas superfícies das partículas atmosféricas.

O tempo de meia-vida dos HPAs no ar varia numa faixa de poucas horas a dias; já, no solo, estima-se que as meias-vidas possam ser de vários meses a muitos anos. No organismo humano, os tempos de meia-vida dos compostos de maior peso molecular são relativamente mais elevados e indicam

que sua degradação é mais lenta.

Em virtude de suas propriedades físico-químicas e da grande distribuição ambiental, o risco de contaminação humana por essas substâncias é significativo. De fato, devido ao seu caráter lipofílico, HPAs e seus derivados podem ser absorvidos pela pele, por ingestão ou por inalação, sendo rapidamente distribuídos pelo organismo.

Os HPAs são quimicamente inertes, porém, quando reagem, participam de reações de substituição eletrofílica e de adição. No caso das reações de adição, os compostos formados tendem a sofrer reações de eliminação, regenerando a aromaticidade (LOPES; ANDRADE, 1996).

### **1.3 Transformação e degradação dos HPAs no ar, solo e água**

Os HPAs liberados na atmosfera são normalmente presentes na fase gasosa ou adsorvidos em partículas. Durante seu tempo de residência na atmosfera (meia-vida  $\pm$  30 dias), os HPAs podem sofrer oxidação fotoquímica (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1983). Reações químicas dos HPAs com poluentes atmosféricos, tais como o ozônio e o dióxido de enxofre podem se transformar em dióis e ácidos sulfônicos, respectivamente.

Os HPAs adsorvidos no solo podem sofrer degradação por micro-organismos químicos e oxidação fotoquímica. Infere-se que o caminho principal para a degradação dos HPAs presentes no solo, seja o metabolismo microbiano. A biotransformação do HPA no solo é dependente de uma série de fatores, como temperatura, umidade, pH, concentração de oxigênio, concentração de HPA e composição do solo. Propriedades físicas e químicas dos HPAs também desempenham um papel importante na sua biodegradação no solo. A sorção de HPA a partículas orgânicas e matéria presente no solo pode limitar o grau de biotransformação (MANILAL; ALEXANDER, 1991). A

população microbiana também pode ser afetada por alguns dos fatores acima mencionados. Chadhain et al. (2006), Ericksson et al. (2003), Silva (2002) e Silva (2007), utilizam técnicas de biorremediação e biodegradação de HPAs por micro-organismos, sejam eles extraídos do solo ou água.

#### **1.4 Genotoxicidade dos HPAs e seus derivados**

O primeiro indício de carcinogenicidade química de produtos de combustão orgânica foi publicado em 1775, quando foi observada uma maior incidência de cânceres em trabalhadores que limpavam chaminés (POTT, 1975). Anos mais tarde, atribuiu-se a presença de benzo[a]pireno nas amostras. Posteriormente, confirmou-se experimentalmente que a presença de um conjunto de HPAs seria responsável pelas doenças e não a presença de somente um composto.

A quantidade absorvida por inalação varia de acordo com o grau de contaminação atmosférica, que está diretamente relacionado com a urbanização, o tráfego de veículos (principalmente veículos com motor a diesel) e com o tipo e a industrialização da área. Em ambientes fechados, a fumaça de cigarro e as fontes de aquecimento podem contribuir para o aumento dos níveis ambientais de HPAs.

Os alimentos são considerados outra importante fonte de exposição humana, tanto devido à formação de HPAs durante o processamento, quanto devido à deposição atmosférica sobre grãos, vegetais e frutas. Os HPAs, quando ingeridos, são captados por compostos lipofílicos (FERREIRA; MENDES; CRUZ, 2008). Na Tabela 1 verificam-se dados carcinogênicos, mutagênicos e genotóxicos.

Certos tipos de processamento como, defumação, torrefação e secagem direta com madeira, poluição do ar e da água e sua presença em solos terrestres

e marinhos contribuem para a formação, (TFOUNI et al., 2007). Para os não fumantes, a dieta é a principal fonte de HPAs (FALCÓN et al., 2003), contribuindo com mais de 70% da exposição total (McGRATH et al., 2007).

Tfouni et al. (2007) encontraram HPAs em diferentes categorias de alimentos, tais como produtos lácteos, vegetais, frutas, óleos, café, chá, cereais e carne seca. A quantidade advinda da dieta depende, em grande parte, do tipo de cozimento, e da contaminação potencial do alimento, que se origina de materiais de embalagem e de transformação (PERELLÓ et al., 2009).

As atividades carcinogênicas e mutagênicas dos HPAs foram associados ao grau de planaridade (BAUM, 1978). Em geral, HPAs planos são mais estáveis e menos reativos e biologicamente menos tóxicos, devido a questões envolvendo ressonância e impedimento estérico. A substituição do grupamento metil ou outros grupos no sistema de anéis dos HPAs podem resultar em distorção da planaridade molecular que às vezes se traduz em maior reatividade e carcinogenicidade. No Quadro 1 observa-se a classificação dos HPAs, pela carcinogenicidade, segundo o IARC (Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer), sendo Grupo 1: substâncias carcinogênicas; Grupo 2B: substâncias carcinogênicas para animais e possivelmente cancerígenas para humanos; Grupo 2A: substâncias provavelmente cancerígenas; Grupo 3 substâncias classificadas como não cancerígenas e Grupo 4: substâncias provavelmente não cancerígenas.

Quadro 1 Relação de alguns HPAs com relação à carcinogenicidade

HPA	Classificação
Antraceno	Grupo 3
Benzo(a)antraceno	Grupo 2B
Benzo(b)fluoranteno	Grupo 2B

“continua”

Quadro 1 “conclusão”

HPA	Classificação
Benzo(j)fluoranteno	Grupo 2B

Benzo(k)fluoranteno	Grupo 2B
Benzo(g,h,i)fluoranteno	Grupo 3
Benzo(c)fenantreno	Grupo 2B
benzo[a]pireno	Grupo 1
Benzo(e)pireno	Grupo 3
Criseno	Grupo 2B
Coroneno	Grupo 3
Dibenzo(a,c)antraceno	Grupo 3
Dibenzo(a,h)antraceno	Grupo 2A
Dibenzo(a,j)antraceno	Grupo 3
Fluoranteno	Grupo 3
Fluoreno	Grupo 3
Indeno1,2,3-c,d-pireno	Grupo 2B
Naftaleno	Grupo 3
Pireno	Grupo 3

Fonte: Adaptado de Pereira Netto et al. (2000)

### 1.5 Metabolismo dos HPAs

A característica lipofílica dos HPAs torna-os capazes de penetrar nas membranas celulares e de permanecerem indefinidamente no organismo. A biotransformação dos HPAs envolve uma série de enzimas que catalisam reações de oxidação, redução e hidrólise e de enzimas que catalisam reações de conjugação. Essas enzimas estão distribuídas em todos os tecidos orgânicos (MUTTI; BERGAMASCHI, 1996).

A atividade carcinogênica dos HPAs é expressa pela biotransformação de intermediários reativos capazes de se ligar covalentemente ao DNA para induzir quebras e causar danos que levam à iniciação de mutação e tumores. Intermediários, como epóxido diol dos HPAs alternantes, são considerados os mais potentes agentes cancerígenos conhecidos. Esses intermediários são rapidamente convertidos para carbocátions, que são bons agentes alquilantes e mutagênicos (iniciadores da carcinogênese) de macromoléculas celulares (por exemplo, DNA) (DABESTAN; IVANOV, 1999).

Monoxigenases dependentes do citocromo P 450 (CYP1A) são responsáveis pela oxidação enzimática dos HPAs. Elas agem principalmente sobre a região de elevada densidade eletrônica ou no nível da região angular da molécula do HPA, formando óxidos de arenos (epóxidos) que podem espontaneamente formar fenóis ou, por ação das epóxido hidrolases, produzirem di-hidrodióis vicinais (ANGERER; MANNUSCHRECK; GÜNDEL, 1997).

Desses fenóis, alguns são oxidados a quinonas e outros podem sofrer nova epoxidação, levando à formação de epóxidos secundários (di-hidrodiolépóxidos). O carbono benzílico dos di-hidrodiolépóxidos é capaz de reagir com as bases nucleofílicas, do DNA, notadamente a guanidina e, eventualmente, iniciar um processo mutagênico (MUTTI; BERGAMASCHI, 1996).

Verifica-se na Figura 1 um esquema da metabolização do benzo[a]pireno.

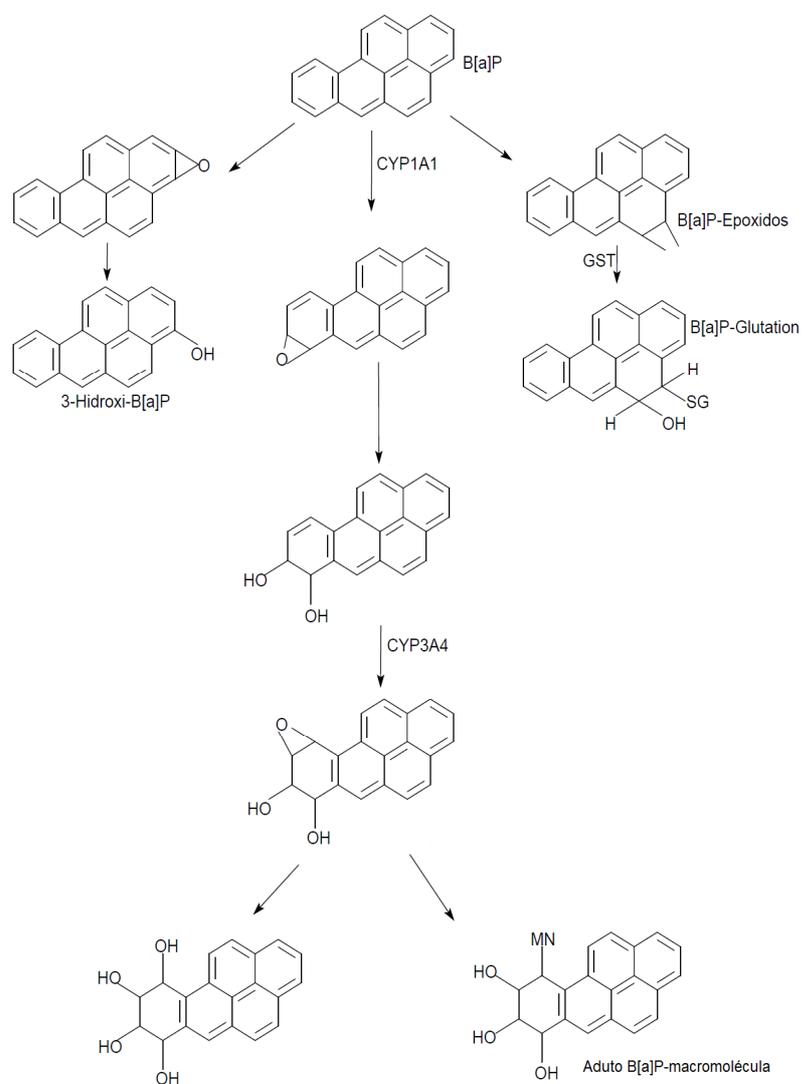


Figura 1 Esquema do metabolismo do benzo[a]pireno

Essas reações de metabolização ocorrem respeitando uma ordem de reatividade e disponibilidade dos HPAs que apresentam regiões mais propensas a reagir, como visto na Figura 2.

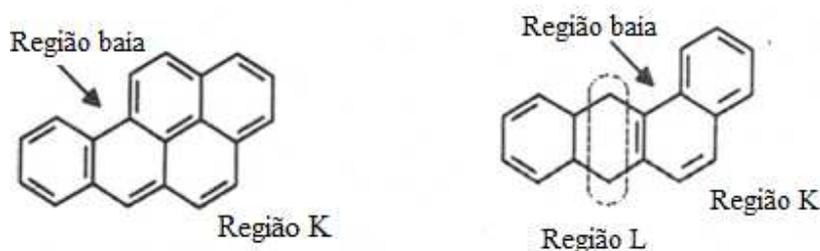


Figura 2 Regiões dos HPAs  
 Fonte: Adaptado de Laassen (2001)

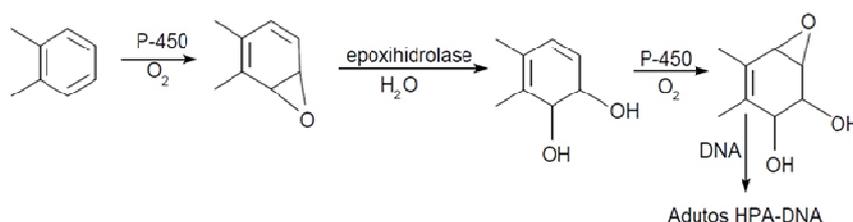
A região baía possui um anel terminal em um dos lados; a região L é o local entre dois pontos de fusão dos anéis, é alfa em relação aos dois pontos de fusão, e a região K, a região de elevada densidade eletrônica em todas as estruturas de ressonância (FERREIRA; MENDES; CRUZ, 2008). Todas essas regiões são altamente reativas. Podem-se formar epóxidos nessas três regiões, sendo que os da região baía os mais carcinogênicos devido à resistência que apresentam perante enzimas de destoxificação, por questões estéricas.

### 1.6 Reatividade com macromoléculas biológicas

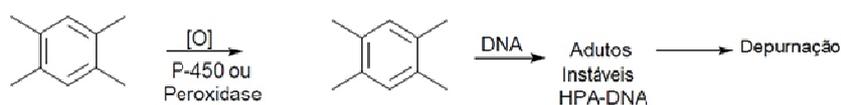
Os HPAs não são mutagênicos diretos e precisam passar por uma ativação metabólica preliminar para reagir com o DNA e outras macromoléculas. Assim, quatro mecanismos (Figura 3) têm sido propostos para a ativação dos HPAs: oxidação enzimática, seguida de hidrólise com a formação de diolepóxidos (sendo o mais aceito); formação de ésteres benzênicos, eletrofílicos, mediante uma série de reações de substituição, proposto (STANSBURY; FLESHER; GUPTA, 1994); produção de radicais catiônicos por meio de oxidação enzimática com envolvimento de um elétron e de-hidrogenação enzimática dos metabólitos di-hidrodióis produzindo quinonas

capazes de reagirem diretamente com o DNA ou capazes de reagirem com  $O_2$ , gerando espécies oxigenadas reativas, como radicais hidroxilas ou ânions superóxidos, que atacam o DNA.

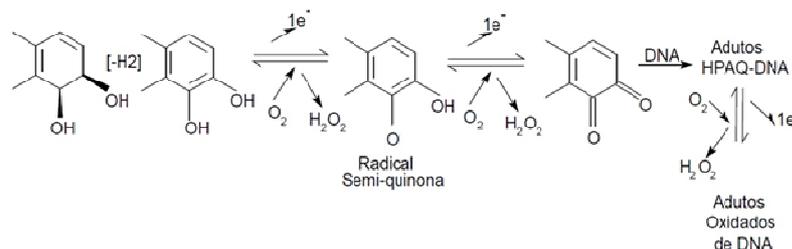
#### Mecanismo por formação de diol-epóxido



#### Mecanismo por formação de radical-cátion



#### Mecanismo via formação de quinona



#### Mecanismo por oxidação benzilica

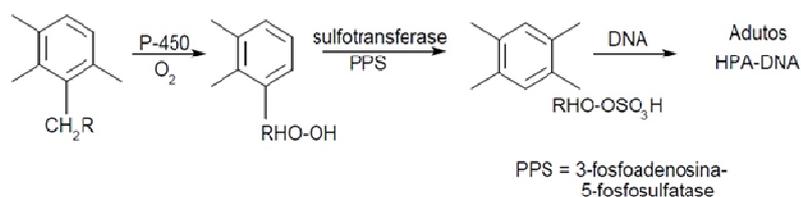


Figura 3 Esquema proposto para formação de adutos entre HPAs e DNA  
Fonte: Harvey e Dunne (1978)

Os mecanismos citados não são excludentes e podem ocorrer simultaneamente (PEREIRA NETTO et al., 2000).

De acordo com a hipótese atualmente mais aceita, a ligação entre os diolepóxidos, resultantes da ativação metabólica dessas substâncias, e o DNA é favorecida quando diolepóxidos vicinais são formados principalmente nas moléculas não lineares, como o benzo(a)antraceno.

É provável que o ataque eletrofílico do DNA aos epóxidos ocorra por um mecanismo do tipo  $SN_1$  (Substituição nucleofílica 1) e se processe através de estados de transição, nos quais os hidrocarbonetos exibem significativo caráter de íon carbonium. Assim, a reatividade com o DNA e, conseqüentemente a capacidade carcinogênica desses compostos, estaria diretamente relacionadas com a facilidade de formação desses íons (PEREIRA NETTO et al., 2000).

Algumas relações têm sido encontradas entre modelos teóricos que envolvem alguns parâmetros moleculares, como o orbital molecular vago de mais baixa energia, a hidrofobicidade e o número de anéis aromáticos e a mutagenicidade (COMBARIZA; HAJOS; WINSTON, 1995).

## 2 O BENZO[A]PIRENO

Entre os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, o benzo[a]pireno é um dos mais conhecidos e estudados. Segundo a recomendação da International Union Pure and Applied Chemistry (IUPAC), a grafia correta é benzo[a]pireno, ao passo que o Chemical Abstract adota benzo[a]pireno.

O início dos estudos dos HPAs teve sua origem em 1931 com o isolamento do benzo[a]pireno (B[a]P) a partir do carvão e sua síntese no mesmo ano. Além da atividade cancerígena do extrato de material particulado ambiental, o B[a]P foi identificado em fuligem doméstica e, posteriormente, em material particulado ambiental. Em 1970, ele foi caracterizado como um agente cancerígeno de distribuição mundial, em ambientes respiráveis e como constituintes de aerossóis urbanos (COSTA, 2001).

O B[a]P possui a aparência de cristais amarelo-pálidos em forma de agulhas, fórmula molecular  $C_{20}H_{12}$  e peso molecular 252,3 (IPCS, 1998). Apresenta baixa volatilidade, seus pontos de fusão e ebulição são 178,1 e 310-312°C (a 10mmHg), respectivamente. Sua pressão de vapor (25°C) é  $2,13 \times 10^{-5}$  e a constante de Henry (20°C)  $1,86 \times 10^{-5}$ . Sofre foto-oxidação quando exposto à luz solar ou radiação fluorescente. Reage com NO ou NO<sub>2</sub> para formar nitroderivados; é oxidado pelo ozônio, produzindo benzo[a]pireno -(1,6 ou 3,6)-quinona (PEREIRA NETTO et al., 2000).

No Brasil, foram realizadas várias pesquisas direcionadas a determinação dessa substância tóxica em produtos cárneos, óleos, gorduras e derivados, relacionando-a com seus efeitos tóxicos no organismo humano (CAMARGO; TOLEDO, 2002). Entretanto, não foram encontradas pesquisas relacionando ou mesmo quantificando os HPAs em queijos.

Em fevereiro de 2005 a Comissão da Comunidade Européia, por meio do Regulamento (CE) nº 208 de 4 de fevereiro de 2005, estabeleceu níveis

máximos para benzo[a]pireno em alguns alimentos, tais como: peixes, óleos e gorduras ( $2,0 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ); crustáceos, carnes e peixes defumados ( $5,0 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ); moluscos bivalves ( $10,0 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) e alimentos infantis ( $1,0 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) (EC, 2005).

No Brasil, a legislação vigente somente determina que os aromatizantes/aromas de fumaça não poderão fornecer mais de  $0,03\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  de benzo[a]pireno no alimento final (BRASIL, 2007) e estabelece limite máximo de  $0,7\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de benzo[a]pireno em águas potáveis (BRASIL, 2004).

Como os demais HPAs, o B[a]P é lipossolúvel, apresentando coeficiente de partição octanol/água ( $\log K_{ow}$ ) igual a 6,04 e solubilidade em água a  $25^\circ\text{C}$  de  $3,8\mu\text{g}/\text{L}$  (PEREIRA NETTO et al., 2000). Dessa forma, em sistemas aquosos, o B[a]P tende a concentrar-se em sedimentos ou permanecer associado à matéria orgânica em suspensão.

O B[a]P é considerado um dos mais potentes agentes carcinogênicos em animais, além de embriotóxico e teratogênico (AGÊNCIA INTERNACIONAL DE PESQUISA SOBRE O CANCER - IARC, 2006). Por essa razão, tem sido utilizado como indicador da presença de outros HPAs em amostras ambientais, alimentos e bebidas (EC, 2005). Benford, Dinovi e Setzer (2010) analisaram diversos tipos de alimentos contaminados por HPAs, sendo o B[a]P o composto marcador.

A toxicidade do B[a]P é provocada por sua potente ação pró-carcinogênica uma vez que alguns dos seus metabólitos intermediários são intercalantes de DNA e, portanto, agentes mutagênicos/oncogênicos. Processos neoplásicos são claramente observados em fígado de peixes e mamíferos, já após 6 horas ao tratamento com concentrações de B[a]P da ordem de 250 ppb (EUROPEAN COMMISSION - EC, 2002).

### **3 DEFUMAÇÃO**

#### **3.1 Defumação tradicional**

A defumação é uma técnica milenar de preservação de alimentos. Na atualidade, não é mais empregada somente para a conservação e, sim, como um processo do qual o produto adquire particularidades sensoriais apreciadas pelos consumidores.

Segundo Souza (2004), a defumação é um método tradicional e tem como finalidade proporcionar características sensoriais desejáveis, como cor, aroma, sabor e textura. Com o processo, ocorre redução da atividade de água através da desidratação e alteração do pH, pela ação dos compostos da fumaça, evitando-se, assim, a ação microbiológica e conseqüente aumento da vida útil do produto para consumo.

A ação conservadora dos produtos defumados ocorre devido ao efeito combinado da salga, cozimento, secagem e de certas substâncias presentes na fumaça, como fenóis, aldeídos e ácidos orgânicos (GAVA; SILVA; FRIAS, 2008).

De acordo com Pinto Netto (1995), as madeiras duras são as mais indicadas para defumar alimentos, por apresentar em, base seca, 40-60% de celulose, 20-30% de hemicelulose e 20-30 de lignina.

Da combustão da hemicelulose e da celulose, que se decompõem em altas temperaturas, resultam ácidos e alcoóis; da queima da lignina, que ocorre em alta temperatura acima de 300 °C originam-se alcatrões e substâncias fenólicas. Quando a combustão da lignina ultrapassa valores de 350 °C, são produzidas substâncias cancerígenas, entre as quais o benzopireno e o fenantreno (EVANGELISTA, 2005).

Madeiras como o carvalho, elmo e mogno são excelentes para processo de defumação; entretanto, por razões de disponibilidade e custo, no Brasil, são mais utilizados o eucalipto e o jatobá. As madeiras resinosas, como o pinho, são inaceitáveis, pelo fato de que suas substâncias voláteis, decorrentes da queima, conferem ao produto sabor desagradável.

Existem dois tipos de defumação a quente e a frio, que são diferenciadas pela temperatura empregada durante o processo. A defumação a frio ocorre a temperaturas entre 40 a 55 °C e os produtos permanecem de duas a vinte e quatro horas. Já na defumação a quente, a temperatura atingida é de 60 °C, durante noventa minutos e, depois passa a 100-120 °C durante quatro a seis horas. As peças devem ser penduradas no defumador, mantendo-se certa distância entre elas, bem como da parede, a fim de garantir a circulação de fumaça e calor (GAVA; SIVA; FRIAS, 2008).

Em queijos, a defumação a frio é mais indicada, pois a gordura desse tipo de alimento ajuda na retenção de compostos aromáticos da fumaça, evitando a sua deformação, os quais que, além de exercerem a função de conferir sabor e odor agradáveis, estendem a durabilidade do produto (LAGUNA et al., 2009).

A defumação convencional de alimentos está sendo substituída pelo emprego de aroma de fumaça líquida (BIZERRIL; PRIMO, 2001; HATULLA et al., 2001). Esses produtos são, em geral, extratos de fumaça filtrada, que são separados do material resinoso responsável pela formação dos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (STOLYHWO; SIKORSKI, 2005).

### **3.2 Defumação por fumaça líquida**

O processo de defumação convencional está sendo substituído pelo uso de aromatizantes de fumaça. Os aromatizantes de fumaça são preparações

concentradas, utilizadas para conferir aroma de defumado aos alimentos, no qual se submetem madeiras, cascas e galhos não tratados à combustão controlada; à destilação seca a temperaturas compreendidas entre 300 e 800°C; ou ao arraste com vapor de água reaquecido à temperatura entre 300 e 500°C, em seguida as frações que têm as propriedades sávido-aromáticas devem ser separadas por condensação fracionada (BRASIL, 1999).

Aromas de fumaça têm sido utilizados como conservantes e aromatizantes de carnes, peixes e queijos há muitos anos, e, atualmente, vem se destacando em função de suas inúmeras vantagens. Entre estas estão a higiene e diminuição no tempo de processamento, menor poluição ambiental e variedade de utilização da fumaça, obtendo-se produtos com diferentes características sensoriais (GUILLEN; SOPELANA, 2003; STOLYHWO; SIKORSKI, 2005).

Ao produto defumado final, proporciona uniformidade de sabor e cor, deposição de substâncias antioxidantes e antimicrobianas e baixa concentração de compostos indesejáveis, como HPAs, podendo ser de uso doméstico e/ou industrial (GONÇALVES; PRENTICE-HERNÁNDEZ, 1998).

A fumaça líquida pode ser aplicada diretamente por imersão ou na superfície da matéria-prima. Diluída, proporciona a penetração do sabor no interior dos queijos, coloração dourada e brilhante na superfície dos mesmos, enquanto a aplicação superficial, por aspersão ou atomização, produz um sabor agradável e menos intenso, quando comparada ao método por imersão.

#### 4 RELAÇÃO ENTRE OS HPAS E OS QUEIJOS DEFUMADOS

A defumação é uma técnica empregada na fabricação de certos tipos de queijo para aumentar a conservação bem como possibilitar alterações em características como cor, aroma e textura ao queijo.

Apesar de o queijo defumado ser um prato muito popular em muitos países, apenas alguns artigos publicados nos últimos anos centraram-se nos níveis de HPAs desses produtos (BARRON; HIERRO; SANTA-MARÍA, 1990). Como um marcador de contaminação amplamente utilizado, o benzo[a]pireno é determinado em todos os estudos.

Ibanñez et al. (1995) e Nájera, Barron e Barcina (1990) revelaram que a defumação exerce um efeito importante sobre o crescimento da microbiota, atividades proteolíticas e lipolíticas e as características físico-químicas durante a maturação de queijos.

Nájera et al. (1998) evidenciaram que a defumação exerceu um efeito importante na composição da fração de gordura e que o tempo de maturação influenciou significativamente os níveis de lipídeos. As diferenças nas frações de lipídeos para os queijos defumados foram atribuídos a diferentes níveis de atividade lipolítica nos queijos, que foi potencializada pelo processo de defumação.

Suchanova et al. (2008) avaliaram a presença de HPAs em queijos defumados, e encontraram diferenças nos níveis de HPAs entre queijos defumados a processos controlados e defumados caseiros, sendo encontrados no processo caseiro níveis de HPAs carcinogênicos. Para queijos defumados sob controle industrial, foram encontrados níveis de  $0,11 \mu\text{g Kg}^{-1}$ , ao passo que para queijos defumados em condições caseiras, o teor de HPAs foi até dez vezes maiores. Ainda nestes trabalho houve análises distintas entre a casca do queijo (superfície) e o queijo como todo, sendo encontrado na casca níveis de HPAs de

3-6 vezes maior os níveis de HPAs. Houve também diferenças em queijos revestidos por ceras não comestíveis, que formaram uma espécie de barreira de contaminação, em que a parte comestível apresentou nível 14% maior de HPAs e 18 vezes maior de HPAs carcinogênicos, estes evidenciados pela lista da Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC).

Pesquisadores (Quadro 2) mostram que a presença de benzo[a]pireno está fortemente correlacionada com a soma dos cancerígenos HPAs, o que confirmou a aplicabilidade da sugestão União Europeia para usar essa substância como um indicador da fração de HPAs cancerígenos.

Quadro 2 Relação alimentos e HPAs

<b>Alimento</b>	<b>Concentração HPAs (<math>\Sigma</math>)</b>	<b>Autor</b>
Vegetais	11 $\mu\text{g.kg}^{-1}$	Ashraf e Salam (2012)
Café	0,814 $\mu\text{g.kg}^{-1}$	Tfouni et al. (2012)
Linguiça	98,48 $\mu\text{g.kg}^{-1}$	Lorenzo et al. (2011)
Óleo de soja	10,4 a 112,0 $\mu\text{g.kg}^{-1}$	Camargo et al. (2011)
Pescado	0,03 a 4,54 $\mu\text{g.kg}^{-1}$	Azeredo, Toledo e Camargo (2006)
Creme vegetal	4,1 a 7,1 $\mu\text{g.kg}^{-1}$	Camargo e Toledo (2000)
Margarina	1,7 a 3,9 $\mu\text{g.kg}^{-1}$	Camargo e Toledo (2000)
Maionese	1,0 a 21,7 $\mu\text{g.kg}^{-1}$	Camargo e Toledo (2000)
Queijo defumado (processo controlado)	0,11 $\mu\text{g.kg}^{-1}$	Suchanova et al. (2008)
Queijo defumado (caseiro)	1,11 $\mu\text{g.kg}^{-1}$	Suchanova et al. (2008)

Šimko (2005) faz uma revisão sobre os fatores que influenciam a eliminação de hidrocarbonetos policíclicos a partir de produtos defumados de carne com uso de defumação tradicional e aromatizante líquido para defumação, concluindo que o material utilizado para embalagem pode contribuir significativamente para a diminuição do teor de HPAs nesses produtos.



## 5 QUEIJO COALHO

O Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade (RTIQ) de Queijo de Coalho define o queijo como um produto de consistência semidura e elástica, com textura compacta e macia, podendo apresentar algumas olhaduras. Apresenta cor branco amarelada uniforme, sabor brando, ligeiramente ácido, podendo ser salgado, com aroma também ligeiramente ácido, que lembra massa de queijo coagulada (BRASIL, 2001).

Por ainda não apresentar um processo padronizado de fabricação, acaba se adequando à região e à forma de consumo adotada, apresentando, assim, diferenças quanto à composição físico-química, bem como características sensoriais. No Nordeste, por exemplo, o queijo de coalho é destinado tanto ao consumo *in natura* como assado. Já nos estados da Região Sudeste, São Paulo, Rio de Janeiro, Espírito Santo e Minas Gerais, o queijo de coalho é comercializado exclusivamente sob a forma de espeto para churrasco.

Dessa maneira, a queima do carvão pode provocar a formação de alguns compostos indesejáveis, como os HPAs. Compostos esses que gerados no processo de pirólise podem se depositar na superfície do queijo em questão, sendo uma ameaça à saúde dos consumidores.

Sendo o queijo coalho considerado um queijo semigordo ou gordo e os HPAs compostos também lipofílicos, há de se esperar uma grande afinidade entre eles, podendo favorecer a contaminação.

## REFERÊNCIAS

AIR POLLUTION ABATMENT REVIEW GROUP. **Report on the abatement of toxic organic micropollutants from stationary sources.** Oxfordshire, 1995. 254 p.

ANGERER, J.; MANNUSCHRECK, C.; GÜNDEL, J. Título do artigo. **International Archives of Occupational and Environmental Health**, Berlin, v. 70, p. 365, 1997.

AZEREDO, A.; TOLEDO, M. C.; CAMARGO, M. C. R. Determinação de benzo(a)pireno em pescados. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 1, jan./mar. 2006.

BARRON, L. J. R.; HIERRO, M. T. G.; SANTA-MARÍA, G. HPLC and GLC analysis of the triglyceride composition of bovine, ovine and caprine milk fat. **Journal of Dairy Research**, Kingdom, v. 57, p.517–526, 1990,

BAUM, E. Occurrence and surveillance of polycyclic aromatic hydrocarbons. **Journal Polycyclic Hydrocarbons and Cancer**. New York: Academic, v.1, p.45-70, 1978.

BENFORD, D.; DINOVI, M.; SETZER, R. W. Application of the margin-of-exposure (MoE) approach to substances in food that are genotoxic and carcinogenic e.g.: Benzo[a]pyrene and polycyclic aromatic hydrocarbons. **Food and Chemical Toxicology**, Amsterdam, n. 48, p. 42-48, 2010.

BETTIN, S. M.; FRANCO D. W. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) em aguardentes. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, n. 2. p. 234-238, 2005.

BIZERRIL, C. R. S. F.; PRIMO, P. B. S. **Peixes de águas interiores do Estado do Rio de Janeiro**. Rio de Janeiro: FEMAR-SEMADS, 2001. 471 p.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 02, de 15 de janeiro de 2007. Aprova o regulamento técnico sobre aditivos aromatizantes. **Diário Oficial [da] União**, Brasília, 17 jan. 2007.

BRASIL. Instrução Normativa nº 30 de 26 de junho de 2001. Aprova o regulamento técnico de identidade e qualidade de manteiga da terra, queijo de coalho e queijo de manteiga. **Diário Oficial [da] União**, Brasília, 16 jul. 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 518, de 25 de março de 2004. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, 26 mar. 2004.

BRASIL. Resolução nº 104 de 14 de maio de 1999. Aprova o Regulamento Técnico sobre Aditivos Aromatizantes/Aromas. **Diário Oficial [da] União**, Brasília, 14 maio 1999.

CAMARGO, M. C. R. et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons in Brazilian commercial soybean oils and dietary exposure. **Food Additives and Contaminants: Part B**, London, v. 4, n. 2, p. 152–159, June 2011.

CAMARGO, M. C. R.; TOLEDO, M. C. F. Avaliação da contaminação de diferentes grupos de alimentos por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. Braz. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 5, n. 76, p. 19–26, 2002.

CAMARGO, M. S. F. O.; TOLEDO, M. C. F. Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos em margarina, creme vegetal e maionese. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 20, n. 1, p. 51-55, abr. 2000.

CHADHAIN, S. M. et al. Microbial dioxygenase gene population shifts during polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation. **Applied And Environmental Microbiology**, Washington, v. 72, n. 6, p. 4078–4087, 2006.

COMBARIZA, J. E.; HAJOS, A. K. D.; WINSTON, G. W. Título do artigo. **Journal of Chemical Physics**, New York, v. 99, p. 14539, 1995.

CONDE, F. J. et al. Optimization of a sampling method to determine polycyclic aromatic hydrocarbons in smoke from incomplete biomass combustion. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 524, p. 287-294, 2004.

COSTA, A. F. **Avaliação da contaminação humana por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAHs): 1-hidroxipireno urinário**. 2001. 80 p. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Centro de estudos de Saúde do trabalhador e Ecologia Humana da Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública, Rio de Janeiro, 2001.

DABESTAN, R.; IVANOV, I. N. A compilation of physical, spectroscopic and photophysical properties of polycyclic aromatic hydrocarbons. **Photochemistry and Photobiology**, Oxford, v. 70, n. 1, p. 10-34, 1999.

EUROPEAN COMMISSION. **Commission of the European Communities**. Commission Regulation (EC) n° 208/2005 of 4 February 2005a amending Regulation (EC) n° 466/2001 as regards polycyclic aromatic hydrocarbons. Official Journal L034:3-5.

EUROPEAN COMMISSION. Health and consumer protection directorate-general. **Polycyclic aromatic hydrocarbons**: occurrence in foods, dietary exposure and health effects. Brussels, 2002.

ERIKSSON, M. et al. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons at low temperature under aerobic and nitrate-reducing conditions in enrichment cultures from Northern Soils. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, n. 1, p. 275–284, 2003.

EVANGELISTA, J. **Tecnologia de alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2005. 150 p.

FALCÓ, G. et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons in foods: human exposure through the diet in Catalonia, Spain. **Journal of Food Protect**, Des Moines, v. 66, n. 12, p. 2325-2331, 2003.

FERREIRA, A. S.; MENDES, A.; CRUZ, C. **Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs)**. Trabalho realizado no âmbito da disciplina de Toxicologia Mecânica (Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, Porto, 2008.

GAVA, A. J.; SILVA, C. A. B.; FRIAS, J. R. G. **Tecnologia de alimentos**: princípios e aplicações. São Paulo: Nobel, 2008. 551 p.

GONÇALVES, A. A.; PRENTICE-HERNÁNDEZ, C. Fumaça líquida: uma tecnologia para defumar pescado. **Boletim SBCTA**, São Paulo, v. 32, n. 2, p. 189-199, 1998.

GUILLEN, M. D.; SOPELANA, P. Polycyclic aromatic hydrocarbons in diverse foods. In: D’MELLO, J. P. (Ed.). **Food safety, contaminants and toxins**. Walingford: Cabi, 2003. p. 175-198.

HARVEY, R. G.; DUNNE, F. B. Multiple regions of metabolic activation of carcinogenic hydrocarbons. **Nature**, London, v. 273, p. 566, 1978.

HATULLA, T. et al. Use of liquid smoked flav ouring as an alternative to tradicional flue gas smoking of rainbow trout fillets (*Oncorhynchus mykiss*). **Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie**, Zurich, v. 34, p. 521-525, 2001.

IBANĚZ, F. C. et al. Changes in physicochemical properties and in content of nitrogen compounds with traditional smoking during the ripening of Idiazabal cheese. **Netherlands Milk and Dairy Journal**, Wageningen, v. 49, p. 167-175, 1995.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **Monographs on the evaluation of carcinogenic risk of chemicals to humans**. 2006.

Disponível em: <[http://monographs.iarc.fr/ENG/Meetings/92\\_pahs.pdf](http://monographs.iarc.fr/ENG/Meetings/92_pahs.pdf)>.

Acesso em: 18 fev. 2013.

JECFA. **Joint FAO/WHO Expert Committee on food additives**. Rome, 2005.

Disponível em: <[www.who.int/ipcs/food/jecfa/en/](http://www.who.int/ipcs/food/jecfa/en/)>. Acesso em: 18 fev. 2013.

LAASSEN, C. D. K. **Casarett & Doull's toxicology: the basic science of poisons**. New York: McGraw-Hill, 2001. 342 p.

LAGUNA, L. E. et al. **Processamento de queijo andino caprino maturado e defumado**. Sobral: Embrapa, 2009. (Comunicado Técnico, 105).

LIN, D.; TU, Y.; ZHU, L. Concentrations and health risk of polycyclic aromatic hydrocarbons in tea. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 43, p. 41-48, 2005.

LOPES, W. A.; ANDRADE, J. B. Fontes, formação, reatividade e quantificação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) na atmosfera. **Quimica Nova**, São Paulo, v. 19, n. 5, p. 497-516, 1996.

MANILAL, V. B.; ALEXANDER, M. Factors affecting the microbial degradation of phenanthrene in soil. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 35, p. 401-405, 1991.

McGRATH, T. E. et al. Formation of polycyclic aromatic hydrocarbons from tobacco: the link between low temperature residual solid (char) and PAH formation. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 45, p. 1039-1050, 2007.

MUTTI, A.; BERGAMASCHI, E. **Idrocarburi policiclici aromatici negli ambienti de vita e di lavoro: esposizione ed effetti.** Gargnano: ATTI, 1996. p. 213.

NÁJERA, A. I.; BARRON, L. J. R.; BARCINA, Y. Título do artigo. **Journal of Dairy Research**, London, v. 61, p. 281–288, 1990.

NÁJERA, A. I. et al. Influence of traditional smoking on the triglyceride composition during the ripening of Idiazabal cheese. **Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und –Forschung**, Berlin, v. 207, p. 197–201, 1998.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Polycyclic aromatic hydrocarbons: evaluation of sources and effects.** Washington, 1983.

PEREIRA NETTO, A. D. et al. Avaliação da contaminação humana por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos HPAs) e seus derivados nitrados (NPHAs): uma revisão metodológica. **Química Nova**, São Paulo, v. 23, n. 6, p. 765-73, 2000.

PERELLÓ, G. et al. Concentrations of polybrominated diphenyl ethers, hexachlorobezene and polycyclic aromatic hydrocarbons in various foodstuffs before and after cooking. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 47, p. 709-715, 2009.

PINTO NETTO, M. Defumadores semiartesanaís para pescado: considerações gerais. In: SEMINÁRIO SOBRE TECNOLOGIA DE SALGA E DEFUMAÇÃO DE PESCADO, 1., 1995, Campinas. **Anais...** Campinas: Ital, 1995. p. 33-42.

POTT, P. **Chirurgical observations relative to the cataract, the polypus of the nose, the cancer of the scrotum, the different kind of ruptures and the mortification of the toes and feet.** London: Clark & Collins, 1975. p. 63-68.

REY-SALGUEIRO, L. et al. Effects of toasting procedures on the levels of polycyclic aromatic hydrocarbons in toasted bread. **Food Chemistry**, Barking, v. 108, p. 607–615, 2008.

SILVA, I. S. **Biodegradação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos utilizando consórcios microbianos visando a biorremediação de solos contaminados**. 2007. 100 p. Tese (Doutorado em Ciências de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, 2007.

SILVA, M. **Fungos filamentosos isolados de sedimentos estuarinos que metabolizam hidrocarbonetos aromáticos policíclicos**. 2002. 90 p. Tese (Doutorado em Ciências de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, 2002.

ŠIMKO, P. Factors affecting elimination of polycyclic aromatic hydrocarbons from smoked meat foods and liquid smoke flavorings. **Molecular Nutrition & Food Research**, Weinheim, v. 49, p. 637-647, 2005.

SOUZA, M. L. R. et al. Defumação da Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) Inteira Eviscerada e Filé: Aspectos Referentes às características organolépticas, composição centesimal e perdas ocorridas no processamento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 33, n. 1, p. 27-26, 2004.

STANSBURY, K. H.; FLESHER, J. W.; GUPTA, R. C. **Chemical Research in Toxicology**, Washington, v. 7, p. 254, 1994.

STOLYHWO, A.; SIKORSKI, Z. E. Polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked fish: a critical review. **Food Chemistry**, Barking, v. 91, p. 303-311, 2005.

SUCHANOVA, M. et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked cheese. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Oxford, v. 88, p. 1307–1317, 2008.

TFOUNI, S. A. V. et al. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in cachaça by HPLC with fluorescence detection. **Food Chemistry**, Barking, v. 101, p. 334-338, 2007.

TFOUNI, S. A. V. et al. Effect of roasting on chlorogenic acids, caffeine and polycyclic aromatic hydrocarbons levels in two Coffea cultivars: Coffea arabica cv. Catuaí Amarelo IAC-62 and Coffea canephora cv. Apoatã IAC-2258. **International Journal of Food Science and Technology**, Malden, v. 47, p. 406-415, 2012.

VANROOIJ, J. G.; BODELIER-BADE, M. M.; JONGENELEN, F. J.  
Estimation of individual dermal and respiratory uptake of polycyclic aromatic hydrocarbons in 12 coke oven workers. **British Journal of Industrial Medicine**, London, v. 50, p. 623, 1993.

**CAPÍTULO 3 Avaliação das propriedades físico-químicas de queijos  
provolones defumados comerciais**

A ser submetido à Revista “Food Chemistry”

**Avaliação das propriedades físico-químicas de queijos provolones  
defumados comerciais**

Raniely de L. Fonseca Luz<sup>1</sup>, Creuza P. do A. Resende<sup>1</sup>, Monica C. Rojo  
Camargo<sup>2</sup>, Luiz R. de Abreu<sup>1\*</sup>

---

<sup>1</sup> Departamento de Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Lavras - UFLA,  
Campus Universitário, Cx. Postal: 37, 37200-000, Lavras, MG, Brasil.

<sup>2</sup> Centro de Ciência e Qualidade de Alimentos, Instituto de Tecnologia de Alimentos –  
ITAL, Av. Brasil, 2880, 13070-178 Campinas – SP, Brasil.

## RESUMO

A defumação é um método cuja finalidade é proporcionar características sensoriais desejáveis aos queijos. Objetivou-se avaliar os parâmetros físico-químicos de queijos defumados comerciais. As amostras foram analisadas quanto ao pH, acidez, proteína total, umidade, extrato seco total (EST), gordura e gordura no extrato seco (GES), segundo os métodos oficiais da AOAC (2005). Os valores de pH e proteínas totais diferiram significativamente em 80% das amostras (4,92 - 5,62 e 18,22 - 28,46, respectivamente). O teor de gordura diferiu significativamente em 70% das amostras e apresentou valores superiores aos encontrados por outros autores. A acidez diferiu em 60% das amostras variando, de 0,555 a 1,112%. Os resultados de umidade, extrato seco total e gordura no extrato seco diferiam significativamente em todas as amostras; contudo observa-se a falta de padronização quanto à fabricação do queijo provolone.

Palavras-Chave: Defumação. Queijo provolone. Propriedades físico-químicas.

## 1 INTRODUÇÃO

A defumação é uma técnica milenar de preservação de alimentos. Na atualidade, não é mais empregada somente para a conservação e, sim, como um processo por meio do qual o produto adquire particularidades sensoriais apreciadas pelos consumidores.

A ação conservadora dos produtos defumados ocorre devido ao efeito combinado da salga, cozimento, secagem e de certas substâncias presentes na fumaça, como fenóis, aldeídos e ácidos orgânicos (GAVA; SILVA; FRIAS, 2008). Com o processo, ocorre redução da atividade de água por desidratação e alteração do pH, pela ação dos compostos da fumaça, evitando-se, assim, a ação microbiológica e conseqüente aumento da vida útil do produto para consumo.

No Brasil, o queijo defumado mais comum é o provolone; porém, são encontradas outras variedades, como muçarela e ricota. Sabe-se que a defumação altera significativamente as características físico-químicas principalmente aliadas a processos de maturação.

O provolone não apresenta Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade (RTIQ); esse fato faz com que haja um descompasso na padronização de suas tecnologias de fabricação, acarretando em perdas na qualidade final do produto, o que pode levar a prejuízos econômicos, além de lesar os consumidores. Nesse propósito objetivou-se neste trabalho realizar uma caracterização físico-química de queijos provolones defumados encontrados no mercado de Lavras –MG.

## **2 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 Amostras**

Foram adquiridas oito amostras (A, B, C, D, E, F, G e H) de queijos provolones defumados recém fabricadas. As amostras foram coletadas em pontos distintos da cidade de São Paulo - SP, acondicionadas em caixas isotérmicas e encaminhadas imediatamente ao laboratório de Laticínios do Departamento de Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Lavras, para a realização das análises. As análises foram realizadas em lotes diferentes e em triplicatas.

### **2.2 Reagentes e soluções**

Para determinação da proteína total utilizaram-se as seguintes soluções e reagentes: solução de hidróxido de sódio 50% (m/v), preparada pela diluição de 500 g deste reagente (Vetec, 98% m/m), em 1000 mL de água destilada; solução de ácido clorídrico ( $0,02\text{mol.L}^{-1}$ ) obtida pela diluição de 1,68 mL desse reagente (Vetec, 36,5% v/v) em 1000 mL de água destilada; ácido bórico ( $0,1\text{mol.L}^{-1}$ ) preparado pela diluição de 6,30 g deste reagente (Synth, 95% m/m) em 1000mL de água destilada; sulfato de potássio PA (Vetec, 98% m/m), sulfato de cobre PA (Vetec, 98% m/m). Para determinação da gordura, utilizou-se ácido sulfúrico (Synth,  $d=1,820\text{g L}^{-1}$ , 98%, v/v), álcool isoamílico PA (Syth, 95%). Para a determinação da acidez, utilizou solução de hidróxido de sódio 10% (m/v), preparada pela diluição de 10 mL desses reagente (Vetec, 98% m/m) em 100 mL de água destilada.

### 2.3 Instrumentação

Para as leituras de pH, utilizou-se um pHmetro Quimis®, modelo Q400AS.

Na determinação de extrato seco total e umidade, utilizou-se estufa FANEM®, modelo 515.

Para determinação da proteína total, utilizou-se destilador de proteína Tecnal®, modelo TE 036/1.

### 2.4 Análise estatística

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC), com três repetições. As análises descritivas com médias relacionadas à composição físico-química dos queijos foram realizadas no programa estatístico SAS v. 8.2. Para efeito de comparação os resultados obtidos serão submetidos a análise de variância (ANOVA), e ao teste de *Tukey*, para identificação das diferenças, com nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ) (FERREIRA, 2009).

### 2.5 Caracterização físico-química dos queijos

Os parâmetros físico-químicos avaliados foram pH, acidez, proteína total, umidade, gordura, gordura no extrato seco (GES) e extrato seco total (EST), seguindo metodologia descrita por (AOAC, 2005). Os resultados de gordura no extrato seco (GES) foram obtidos pela equação 1:

$$\%GES = \frac{\%Gordura}{\%Extrato\ Seco\ Total} \quad \text{Equação 1}$$

Para os valores de umidade, utilizou-se a equação 2:

$$\% \textit{Umidade} = 100 - \% \textit{EST} \quad \text{Equação 2}$$

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados referentes aos valores de pH, acidez, proteína total, umidade, gordura, gordura no extrato seco e extrato seco total estão apresentados na Tabela 1, com ( $p < 0,05$ ) no teste de médias Tukey.

Tabela 1 Caracterização Físico-Química de Queijos

Amostra	pH	Acidez	Proteína Total	Umidade	Gordura	GES	EST
A	5,42 <sup>a</sup>	0,696 <sup>a</sup>	18,22 <sup>a</sup>	52,32 <sup>a</sup>	35,70 <sup>a</sup>	74,92 <sup>a</sup>	47,68 <sup>a</sup>
B	5,62 <sup>b</sup>	0,912 <sup>b</sup>	28,46 <sup>b</sup>	44,60 <sup>b</sup>	27,15 <sup>b</sup>	49,01 <sup>b</sup>	55,40 <sup>b</sup>
C	5,45 <sup>c</sup>	1,112 <sup>c</sup>	28,46 <sup>b</sup>	44,88 <sup>c</sup>	27,14 <sup>b</sup>	49,24 <sup>c</sup>	55,12 <sup>c</sup>
D	5,56 <sup>d</sup>	0,882 <sup>d</sup>	22,03 <sup>c</sup>	43,72 <sup>d</sup>	27,20 <sup>b</sup>	48,33 <sup>d</sup>	56,28 <sup>d</sup>
E	5,30 <sup>f</sup>	0,882 <sup>d</sup>	19,53 <sup>e</sup>	55,60 <sup>f</sup>	27,00 <sup>d</sup>	60,81 <sup>f</sup>	44,40 <sup>f</sup>
F	5,33 <sup>g</sup>	0,582 <sup>f</sup>	23,22 <sup>f</sup>	43,87 <sup>g</sup>	26,94 <sup>e</sup>	47,99 <sup>g</sup>	56,13 <sup>g</sup>
G	5,61 <sup>b</sup>	0,612 <sup>g</sup>	19,89 <sup>g</sup>	44,00 <sup>h</sup>	28,110 <sup>f</sup>	50,20 <sup>h</sup>	56,00 <sup>h</sup>
H	5,62 <sup>i</sup>	0,552 <sup>h</sup>	21,68 <sup>i</sup>	45,20 <sup>j</sup>	28,00 <sup>h</sup>	51,09 <sup>j</sup>	54,80 <sup>j</sup>

\* Média de triplicatas.

Médias seguidas de mesma letra, na coluna, são iguais entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Os valores de pH e os teores de proteínas totais diferiram significativamente em 80% das amostras, variando entre 4,92 a 5,92 e 18,22 a 28,46, respectivamente. Os resultados de pH foram acima do relatado por Furtado (2005).

As concentrações de gordura diferiram significativamente em 70% das amostras, as amostras frescas apresentaram maiores teores, assim como os resultados para gordura no extrato seco (GES).

A acidez diferiu em 60% das amostras, sendo que os valores encontrados ficaram de acordo com o relatado por Furtado (2005).

#### **4 CONCLUSÃO**

Ao se comparar os dados das análises físico-químicas, infere-se que há problemas na padronização quanto à tecnologia de fabricação do queijo provolone no Brasil. Essa falta de padronização reflete direta e indiretamente na qualidade do produto final, o que pode levar a prejuízos econômicos.

## **AGRADECIMENTOS**

À Capes, pela concessão de bolsa de estudo e à Fapemig, pelo suporte financeiro na execução do projeto.

## REFERÊNCIAS

A.O.A.C. Association Official Analysis Chemistry (2005). Official methods of analysis of AOAC international: food composition; additives, natural contaminants. Virginia: *Association Analytical Chemists*, Gaithersburg, Maryland, 18.ed., 2(33), 1-75.

Ferreira, D. F. (2009). *Sisvar software: versão 5.1*. Lavras: UFLA/DEX, software.

Furtado, M. M. (2005). *Quesos típicos de Latinoamérica*. Fonte Comunicações e Editora. 192 p.

Gava, A. J.; Silva, C. A. B.; Frias, J. R. G. (2008). *Tecnologia de alimentos: princípios e aplicações*. São Paulo: Nobel, 551p.

**CAPÍTULO 4 Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAS):  
identificação e quantificação em queijos defumados comerciais**

A ser submetido à Revista “Food Chemistry”

**Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs): Identificação e  
quantificação em queijos defumados comerciais.**

Raniely de L. Fonseca Luz<sup>1</sup>, Creuza P. do A. Resende<sup>1</sup>, Monica C. Rojo  
Camargo<sup>2</sup>, Luiz R. de Abreu<sup>1\*</sup>

---

<sup>1</sup> Departamento de Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Lavras - UFLA,  
Campus Universitário, Cx. Postal: 37, 37200-000, Lavras, MG, Brasil.

<sup>2</sup> Centro de Ciência e Qualidade de Alimentos, Instituto de Tecnologia de Alimentos –  
ITAL, Av. Brasil, 2880, 13070-178 Campinas – SP, Brasil.

## RESUMO

As concentrações de treze Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs): benzo(a)antraceno, criseno, 5-metilcriseno, benzo(j)fluoranteno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo[a]pireno, dibenzo(a,l)pireno, indeno(1,2,3-c,d)pireno, dibenzo(a,h)antraceno, dibenzo(a,e)pireno, dibenzo(a,i)pireno e dibenzo(a,h)pireno de dez amostras de queijos defumados foram determinadas. Os HPAs foram extraídos com solução de N, N-dimetilformamida-água (9:1, v/v) e cicloexano, purificados em cromatografia por coluna de sílica-gel e concentrados por evaporador rotatório, sob vácuo. Para mensurar as concentrações dos HPAs, utilizou-se Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) com detector de fluorescência (FLD). Os níveis de HPAs não foram dependentes do tipo de massa do queijo (fresca ou maturada). Com relação aos diferentes tipos de processo de defumação, há maior contaminação de queijos submetidos ao processo tradicional, comparado com o processo de defumação por fumaça líquida. Níveis relativamente altos foram encontrados para os compostos criseno e 5-metilcriseno ( $\Sigma = 1.308\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  e  $\Sigma = 1,568\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ).

Palavras-chave: Queijos defumados. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos HPAs. Saúde. HPLC-FL.

## 1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, pesquisas sobre os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos, (HPAs) em alimentos tem se tornado cada vez mais frequentes, dado o crescente interesse pelos alimentos seguros. Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos são uma classe de importantes compostos carcinogênicos gerados pela combustão incompleta de matéria orgânica, Rey-Salgueiro et al. (2008), Who, (2005); Caruso e Alaburda, (2008). Os alimentos são importantes fontes de contaminação por esses compostos, estando presentes em vegetais, frutas, produtos cárneos e lácteos, óleos, cereais, café e chás Ashraf e Salam (2012); Azeredo et al. (2006); Lorenzo et al. (2011), Suchanova et al. (2008), Camargo et al. (2011a); (2011b), Tfouni et al. (2012). As possíveis fontes de contaminação dos HPAs em alimentos são a contaminação do solo, bem como a poluição de água e ar WHO (1998 e 2005). A geração de HPAs em alimentos também pode ter origem na forma sob a qual ele é processado, como secagem e defumação, e as etapas de cozimento que utilizam altas temperaturas, tais como aquelas que envolvem ações de grelhar, assar e fritar (CHUNG et al. 2011).

Diversas agências e comitês, como o Programa Internacional de Química Segura, sigla em inglês (IPCS), Comitê Científico em Alimentos (SCF) e Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) concluíram que 15 HPAs (benzo(a)antraceno, ciclopenta(c,d)pireno, criseno, 5-metilcriseno, benzo(b)fluoranteno, benzo(j)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo[a]pireno, indeno(1,2,3-c,d)pireno, dibenzo(a,h)antraceno, benzo(g,h,i)perileno, dibenzo(a,l)pireno, dibenzo(a,e)pireno, dibenzo(a,i)pireno, dibenzo(a,h)pireno) demonstraram ser carcinogênicos e/ou mutagênicos aos seres humanos. Em 2006, o Codex Committee on Food Additives and Contaminants (CCFAC) elaboraram uma proposta de projeto como espécie de

Código de Boas Práticas, para a redução da contaminação de alimentos com HPAs submetidos a processos de defumação e secagem direta (WHO, 2008).

Além disso, a Comissão Europeia estabeleceu limites máximos para o benzo[a]pireno em diferentes grupos de alimentos, como óleos e gorduras [ $2,0 \mu\text{g.kg}^{-1}$  (peso fresco)], carnes defumadas e produtos defumados à base de carne [ $5,0 \mu\text{g.kg}^{-1}$  (peso fresco)] e fórmulas para lactentes e fórmulas de transição, incluindo leite para bebês e leite de transição [ $1,0 \mu\text{g.kg}^{-1}$  (peso fresco)], sendo o benzo[a]pireno eleito como composto marcador em pesquisas envolvendo HPAs.

No Brasil, a legislação vigente somente determina que os aromatizantes/aromas de fumaça não podem fornecer mais de  $0,03 \mu\text{g.kg}^{-1}$  de benzo[a]pireno no alimento final (BRASIL, 2007) e estabelece limite máximo de  $0,7 \mu\text{g.L}^{-1}$  de benzo[a]pireno em águas potáveis (BRASIL, 2004).

Os HPAs são moléculas que podem apresentar caracteres mutagênicos, teratogênicos e carcinogênicos. As atividades carcinogênicas e mutagênicas dos HPAs foram associadas ao grau de planaridade (BAUM, 1978). Em geral, HPAs planos são mais estáveis e menos reativos e biologicamente menos tóxicos. A substituição de ramificações metila ou outros grupos no sistema de anéis dos HPAs podem resultar em distorção da planaridade molecular que, às vezes, traduz-se em mais reatividade e carcinogenicidade.

Os processos analíticos envolvendo os HPAs em alimentos são variados, podendo se valer de técnicas de extração líquido-líquido ou sólido-líquido, com a utilização de solventes orgânicos ou empregando a técnica de extração em fase sólida (SPE), como o uso de cartuchos adequados. Já as técnicas cromatográficas, principalmente CG e CLAE, são ferramentas analíticas eficazes para se mensurar os HAPs (SIMKO, 2005).

O processo de defumação é antigo e foi utilizado durante muitos anos para conservar produtos cárneos e lácteos; contudo, atualmente tem sido

utilizado para conferir características organolépticas aos alimentos (SIMKO, 2005). Apesar de o queijo defumado ser muito popular em diversos países, incluindo o Brasil, existem poucos trabalhos que se centraram nos níveis de HPAs. Nesse contexto, objetivou-se neste estudo: identificar e quantificar a presença de HPAs em queijos defumados provenientes do mercado de São Paulo, SP e Lavras, MG; verificar se a influência da maturação dos queijos interfere na degradação de HPAs; comparar os resultados com a legislação da União Europeia.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Reagentes

Triton X-100 adquirido de CAQ<sup>®</sup>, (Brasil), tetrafosfato de sódio, obtido de ISOFAR<sup>®</sup> Ltda, (Brasil) álcool metílico, cicloexano, sílicagel 60 (s), sulfato de sódio anidro e N,Ndimetilformamida foram adquiridos por VETEC<sup>®</sup> Ltda, (Brasil). Acetonitrila adquirida de J.T. Baker<sup>®</sup> (Cidade do México, México). A água utilizada foi destilada e purificada em sistema Milli Q Millipore Corp. <sup>®</sup> (Bedford, MA, USA). Padrões de HPAs foram adquiridos da Supelco<sup>®</sup> Inc. (St. Louis, MO, EUA) (benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo[a]pireno, dibenzo(ah)antraceno e indeno(1,2,3-cd)pireno), Fluka<sup>®</sup> (Munique, Alemanha) (benzo(j)fluoranteno, dibenzo(al)pireno, dibenzo(ae)pireno e dibenzo(ah)pireno), Cambridge<sup>®</sup> Isotope Laboratories Inc. (Andover, MA, EUA) (5-metilcriseno) e Chemservice<sup>®</sup> Inc. (West Chester, PA, EUA) (dibenzo [ai] pireno).

### 2.2 Preparo de soluções

Utilizou-se detergente BDI, o qual foi preparado dissolvendo-se 30 g de Triton X-100 e 70 g de tetrafosfato de sódio (99,5% m/m), em 1000 mL de água destilada. A solução de sulfato de sódio 1% foi elaborada dissolvendo-se 1g de sulfato de sódio em 100 mL de água destilada.

### 2.3 Amostras

Foram coletadas peças de queijos defumados nos mercados das cidades de Lavras, Minas Gerais e São Paulo, no estado de São Paulo. As peças dos

queijos foram devidamente acondicionadas e transportadas para o setor de Laticínios da Universidade Federal de Lavras, onde foram separadas de acordo com o processo de defumação e tipos de queijo (Tabela 1). Em seguida, as peças foram submetidas ao processo de pesagem, medição de suas dimensões (Tabela 1). As peças de queijo, as quais foram classificadas como frescas foram trituradas e homogeneizadas tomando o cuidado de coletar as camadas superficiais do queijo como a casca, acondicionadas em recipientes e mantidas sob-refrigeração para posterior análises. As peças de queijo classificadas como maturadas, permaneceram por mais trinta dias em câmara BOD (Eletro Lab®, modelo EL 101/3), numa temperatura de 8 °C, posteriormente as peças foram trituradas e homogeneizadas tomando o cuidado de coletar as camadas superficiais do queijo como a casca, acondicionadas em recipientes e mantidas sob refrigeração para análises futuras.

Tabela 1 Características das amostras de queijos

	<b>Tipo queijo</b>	<b>Defumação</b>	<b>Peso</b>	<b>Dimensões (cm)</b>	<b>Tamanho casca (cm)</b>	<b>Forma dos queijos</b>
<b>A</b>	Provolone defumado fresco	FT	553,83g	9 x 4	0,2	Cilíndrica
<b>B</b>	Provolone defumado curado (trança)	FT	588,03g	13,5 x 7	0,3	Trança
<b>C</b>	Provolone defumado curado com ervas	FT	460,69g	13,6 x 3,5	0,5	Cilíndrica
<b>D</b>	Provolone defumado curado com alho	FT	387,95g	9 x 3	0,3	Cilíndrica
<b>E</b>	Ricota defumada	FL	364,94g	10,7 x 6,4	0,1	Cilíndrica
<b>F</b>	Provolone defumado desidratado em rodela	FL	254,44 g	(uma rodela) = 4,6 x 0,4	0,3	Cilíndrica
<b>G</b>	Provolone defumado curado	FT	716,64g	12 x 6,0	0,4	Cilíndrica
<b>H</b>	Provolone defumado curado (trança)	FL	608,55g	16,5 x 8	0,3	Trança
<b>I</b>	Muçarela com tomate seco e temperos defumada (trança)	FT	594,70g	17 x 7,5	0,2	Trança
<b>J</b>	Provolone defumado curado	FT	815,04g	20,5 x 5	0,7	Cilíndrica

FT= fumaça tradicional, FL= fumaça líquida

## 2.4 Análises hidrocarbonetos policíclicos aromáticos

### 2.4.1 Extração e *Clean-up*

Os procedimentos de extração e *clean-up* foram baseados pelos métodos descritos por Badolato et al. (2006) e Tfouni & Toledo (2007), com modificações.

A fase lipídica do queijo foi extraída pela técnica do detergente-BDI (ABREU, 1993). As amostras homogeneizadas (5g) foram transferidas para um balão volumétrico de 100 mL, juntamente com 10 mL de detergente-BDI. Após completa homogeneização, a mistura foi aquecida em banho-maria por 5 minutos, seguida de novo aquecimento por período adicional de 10 minutos. A mistura foi, então, novamente homogeneizada e centrifugada (centrifuga de Geber<sup>®</sup>), por 1 minuto, à 350 g. Para completa separação da gordura na parte superior do balão, adicionou-se metanol:água (1:1, v/v), até que a camada de gordura ficasse na parte média do gargalho do balão. A mistura foi então colocada em banho-maria a 70°C por 5 minutos. Após este período coletou-se a gordura com pipeta de Pasteur. A gordura foi transferida para pequenos frascos de vidro e devidamente identificada.

Após a extração da gordura, ela foi transferida para funil de separação e, assim, extraíram-se os HPAs com três alíquotas de N, N-dimetilformamida-água (9:1, v/v) (50, 25 e 25 mL). Em seguida, 100 mL de solução a 1% de sulfato de sódio foi adicionada ao extrato contido no funil de separação e re-extraído com 3 alíquotas de cicloexano (50, 35, 35mL).

A solução final foi seca com sulfato de sódio anidro, seguida da concentração em evaporador rotativo a 40 °C, para que o volume final fosse 5 mL. O extrato concentrado (5mL) foi então purificado por cromatografia de coluna sobre gel de sílica. A coluna de vidro (200 x 10 mm) foi empacotada

com 5 g de sílicagel (15% de água) e 1 g de sulfato de sódio anidro no topo. O extrato concentrado (5mL) foi aplicado ao topo da coluna e eluída com 85 mL de ciclo-hexano. Os primeiros 10 mL foram descartados, e uma fração de 10-85 mL foi novamente concentrada até cerca de 1 mL em evaporador rotativo a 40 ° C e seco sob um fluxo de nitrogênio. Finalmente, o resíduo foi dissolvido em 2 mL de acetonitrila, filtrado em um filtro de 0,45- $\mu$ m e analisados por CLAE com detecção por fluorescência.

#### **2.4.2 Análise HPLC**

As análises foram realizadas em um aparelho de HPLC Shimadzu® (Kyoto, Japão) equipado com uma bomba LC-20AT, um amostrador automático SIL-20AT (injeção de volume de 20  $\mu$ L), um forno de coluna CTO-20A e um RF-10A xl detector de fluorescência (comprimento de onda de excitação de 268 nm e emissão de comprimento de onda de 398 nm). Os dados foram adquiridos e processados com LC software solução. A Coluna C18 (Vydac 201 TP54, 250  $\cdot$  4,6 mm, tamanho da partícula 5  $\mu$ m, Vydac, Hesperia, CA, EUA) a 30°C. A fase móvel consistiu de acetonitrila 75% e 25% de água, a uma taxa de fluxo de 1 mL. min<sup>-1</sup>.

#### **2.4.3 Identificação e quantificação HPAs**

A identificação dos HAP foi realizada por comparação do tempo de retenção obtido pela injeção dos padrões nas mesmas condições. Os compostos foram quantificados por padrão externo. A solução-estoque padrão misto com HAP foi preparado em acetonitrila e armazenado a 4 °C, durante 3 meses. A partir desta solução foi utilizado o método de padrão externo para a quantificação. Injeções de soluções padrão de HPA em acetonitrilo foram

utilizados para construir as regressões lineares (relações de área de pico versus concentração HPA). Para estas finalidade, oito níveis de concentração que variam de 0,00025 para 0,0150  $\mu\text{g/mL}$  foram usados. O limite de detecção (LD) para cada HPA foi definido como a concentração do analito que produziu uma relação sinal-ruído.

## **2.5 Análises estatísticas**

Efetou-se a análise de variância (ANOVA) dos resultados e a comparação entre as médias foi realizada pelo teste de Tukey, utilizando o software Statistica (Statistica 5.5; Stat Soft Inc. Tulsa, OK, EUA), sendo considerado o nível de significância de  $p < 0,05$ .

### **3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **3.1 Identificação e quantificação dos HPAs**

As concentrações dos HPAs extraídos de amostras de queijos defumados estão apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2 Identificação e quantificação HPAs ( $\mu\text{g.kg}^{-1}$ )

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	MÉDIA
<b>B(a)A</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Chy</b>	2.309 <sup>a</sup>	1.112 <sup>b</sup>	2.26 <sup>c</sup>	1.997 <sup>d</sup>	0.534 <sup>e</sup>	1.301 <sup>f</sup>	1.017 <sup>g</sup>	1.136 <sup>h</sup>	1.339 <sup>i</sup>	0.846 <sup>j</sup>	1.308
<b>5MeChy</b>	2.265 <sup>a</sup>	1.343 <sup>b</sup>	1.897 <sup>c</sup>	2.491 <sup>d</sup>	0.404 <sup>e</sup>	1.812 <sup>f</sup>	1.501 <sup>g</sup>	1.646 <sup>h</sup>	1.964 <sup>i</sup>	1.15 <sup>j</sup>	1.568
<b>B(j)F</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>B(b)F</b>	0.719 <sup>a</sup>	0.385 <sup>b</sup>	0.319 <sup>c</sup>	0.662 <sup>d</sup>	0.062 <sup>e</sup>	0.027 <sup>f</sup>	0.269 <sup>g</sup>	0.438 <sup>h</sup>	0.303 <sup>i</sup>	0.106 <sup>j</sup>	0.315
<b>B(k)F</b>	0.206 <sup>a</sup>	0.083 <sup>b</sup>	0.052 <sup>c</sup>	0.281 <sup>d</sup>	0.068 <sup>e</sup>	0.042 <sup>f</sup>	0.021 <sup>g</sup>	0.08 <sup>h</sup>	0.024 <sup>g</sup>	0.016 <sup>j</sup>	0.08
<b>B[a]P</b>	0.278 <sup>a</sup>	0.11 <sup>b</sup>	0.077 <sup>c</sup>	0.073 <sup>d</sup>	0.01 <sup>e</sup>	0.049 <sup>f</sup>	0.065 <sup>g</sup>	0.118 <sup>b</sup>	0.062 <sup>g</sup>	0.035 <sup>j</sup>	0.08
<b>D(a,i)P</b>	0.027 <sup>a</sup>	0.307 <sup>b</sup>	0.067 <sup>c</sup>	0.052 <sup>d</sup>	0.028 <sup>e</sup>	0.044 <sup>f</sup>	0.042 <sup>f</sup>	0.048 <sup>f</sup>	0.061 <sup>c</sup>	0.024 <sup>e</sup>	0.06
<b>D(a,h)P</b>	0.068 <sup>a</sup>	0.8 <sup>b</sup>	0.119 <sup>c</sup>	0.91 <sup>d</sup>	0.164 <sup>e</sup>	0.075 <sup>f</sup>	0.069 <sup>g</sup>	0.082 <sup>h</sup>	0.086 <sup>h</sup>	0.055 <sup>j</sup>	0.225
<b>Indeno</b>	1.46 <sup>a</sup>	-	-	-	-	0.175 <sup>f</sup>	-	0.196 <sup>h</sup>	0.155 <sup>i</sup>	0.160 <sup>j</sup>	0.195
<b>D(a,e)P</b>	0.324 <sup>a</sup>	0.958 <sup>b</sup>	0.181 <sup>c</sup>	0.832 <sup>d</sup>	0.452 <sup>e</sup>	0.565 <sup>f</sup>	0.149 <sup>g</sup>	0.192 <sup>h</sup>	0.198 <sup>h</sup>	0.116 <sup>j</sup>	0.369
<b>D(A,i)P</b>	0.78 <sup>a</sup>	0.004 <sup>b</sup>	0.418 <sup>c</sup>	0.108 <sup>d</sup>	-	0.101 <sup>d</sup>	0.093 <sup>g</sup>	0.164 <sup>h</sup>	0.125 <sup>i</sup>	0.060 <sup>j</sup>	0.017
<b>D(a,h)P</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>TOTAL</b>	8.436	5.102	5.39	7.406	1.722	4.191	3.226	4.1	4.317	2.568	$\Sigma=46.458$

Médias seguidas de mesma letra, na linha, são iguais entre si pelo teste de Tukey ( $p<0,05$ ).

O método proposto foi utilizado para identificar simultaneamente 13 HPAs das amostras de queijos do mercado, sendo 3 compostos, benzo(a)antraceno (B(a)A), benzo(j) fluoranteno (B(j)F) e dibenzo(a,h)pireno (D(a,h)P) não identificados em nenhuma das amostras (Figura 1). Dos compostos identificados, está o benzo[a]pireno (B[a]P  $\Sigma = 0,08 \mu\text{g.kg}^{-1}$ ) composto marcador da presença de HPAs cancerígenos (Comissão Europeia, 2006).

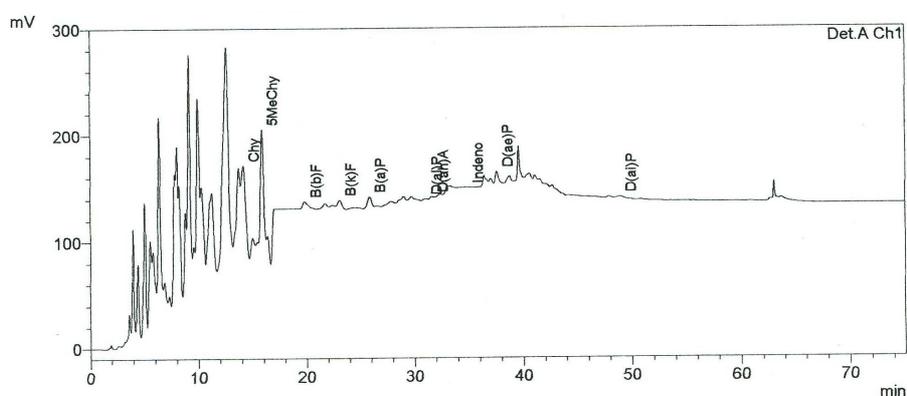


Figura 1 Cromatograma HPLC de uma das amostras de queijo.

Entre todas as amostras, destaca-se um alto índice dos compostos Criseno (Chy) e 5MetilCriseno (5MeChy), ( $\Sigma = 1.308 \mu\text{g.kg}^{-1}$  e  $\Sigma = 1.568 \mu\text{g.kg}^{-1}$ ) respectivamente, compostos cancerígenos que ultrapassaram os limites da legislação europeia (Comissão Europeia, 2006) para fórmulas para lactentes, incluindo leite para bebês. Há de se destacar a falta de legislação específica quanto às concentrações de HPAs para leite e derivados, o que dificulta um embasamento técnico preciso. Além de apresentarem propriedades cancerígenas, o (Chy) e o (5MeChy) possuem potenciais mutagênicos e teratogênicos. De Vos, (1990) também encontrou um alto índice de contaminação pelo (Chy) ( $36 \mu\text{g.kg}^{-1}$ ) quando avaliou amostras de doces e

gelatinas, fato que foi considerado surpreendente, já que até o momento nenhum desses produtos era suspeito de conter altos níveis de HAPs

Pesquisadores identificaram e quantificaram HPAs em vários produtos, como Silva et al, (2011), que avaliaram em rapadura ( $0.04 - 4.03 \mu\text{g.kg}^{-1}$ ), Lorenzo et al, (2011), em salsichas defumadas ( $100.14 \mu\text{g.kg}^{-1}$ ), Chung et al, (2011), que encontraram  $10,2\mu\text{g.kg}^{-1}$  para grelhados de carne suína e  $0,80 \mu\text{g.kg}^{-1}$  para grelhados de carne bovina.

Há de se observar uma discrepância entre os altos índices em carnes defumadas e produtos à base de carnes defumadas, quando se compara com as amostras de queijos. Entretanto, devem-se considerar diferenças na composição centesimal entre esses dois produtos, principalmente no teor de gordura.

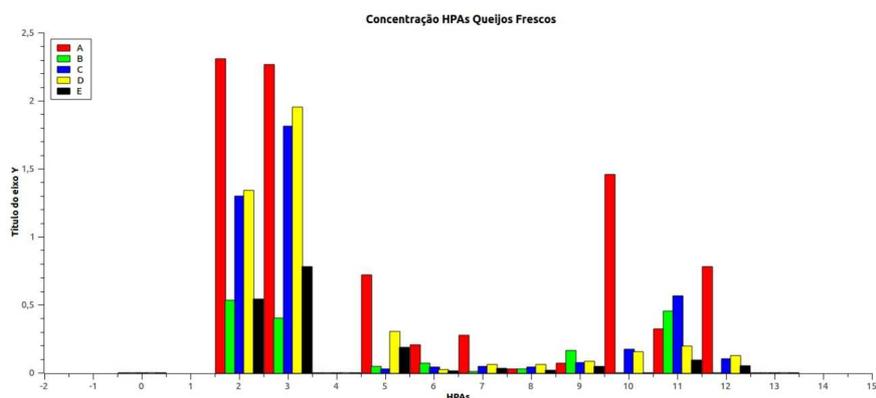
Avaliando a presença dos 15 HPAs listados pela união europeia (UE, 2005), Suchanova (2008) encontrou média de  $0,11 \mu\text{g.kg}^{-1}$  para queijos defumados sob processo industrial e teor 10 vezes maior para queijos defumados por processos caseiros. Algumas amostras (Tabela 2) apresentaram concentrações de alguns HPAs mais elevadas que as encontradas por esse autor. O que pode ser justificado pela diferença na metodologia utilizada, uma vez que, Suchanova, (2008) trabalhou com o queijo integral, podendo ter havido influência dos outros compostos do queijo no processo analítico, enquanto que os dados apresentados na (Tabela 2) originaram-se da análise dos HPAs a partir da gordura do queijo, já que os HPAs apresentam caráter lipofílico.

Naccari et al, (2011) avaliaram a presença de HPAs em leites submetidos a diferentes processos (cru, pasteurizado e esterilizados), nos quais foram identificados 8 HPAs [(Phe, Ant, Pyr, B(a)A, Chy, B(k)F, B[a]P e B(g, h.i)P]. Foi observada maior contaminação nos leites esterilizados e pasteurizados do que nos crus, provavelmente pela elevação da temperatura, que contribui significativamente para a formação desses compostos. Observou-se também que houve diferença nos teores dos HPAs em amostras de leites

integrals e desnatados, onde amostras de leites integrais ( $\Sigma=7.753$  ng/g de leite) continham mais HPAs do que as amostras de leites desnatados ( $\Sigma=5.941$  ng/g de leite). Esse resultado atesta o caráter lipofílico dos HPAs e fornece subsídios para a metodologia utilizada no trabalho, justificando a análise a partir da gordura do queijo, uma vez em que, a matriz estudada (queijo) é muito complexa, podendo influenciar o processo analítico.

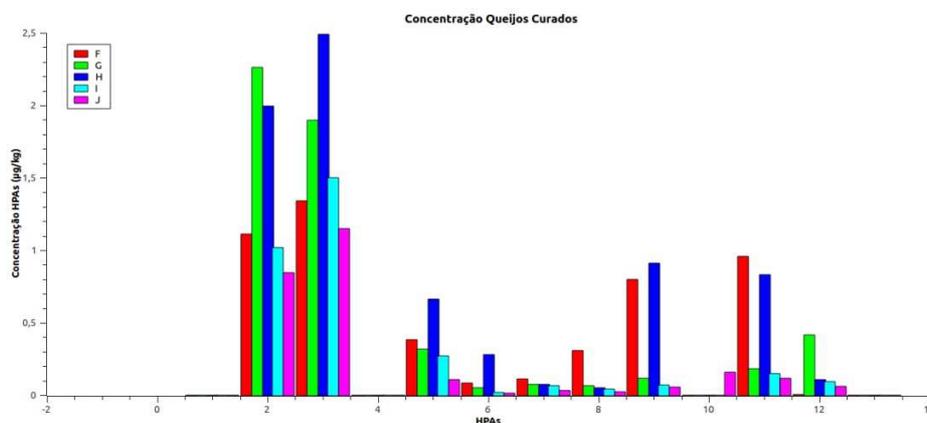
### 3.2 Relação HPAs em queijos maturados

Das amostras analisadas, têm-se queijos defumados frescos e queijos defumados maturados. Na Figura 2 e Figura 3 verifica-se a distribuição dos HPAs em queijos frescos e defumados.



Eixo X: 1: B[a]A, 2: Chy, 3: 5MeChy, 4: B(j)F, 5: B(b)F, 6: B(k)F, 7: B[a]P, 8: D(a,i)P, 9: D(a,h)P, 10: Indeno, 11: D(a,e)P, 12: (a,i)P e 13: D(a,h)P.

Figura 2 Relação de HPAs presentes em amostras de queijos frescos.



Eixo X: 1: B[a]A, 2: Chy, 3: 5MeChy, 4: B(j)F, 5: B(b)F, 6: B(k)F, 7: B[a]P, 8: D(a,i)P, 9: D(a,h)P, 10: Indeno, 11: D(a,e)P, 12: (a,i)P e 13: D(a,h)P.

Figura 3 Relação de HPAs presentes em amostras de queijos maturados.

Entre os queijos frescos e maturados, a distribuição dos HPAs não divergem, destacando-se a predominância dos compostos (Chy) e (5MeChy), indicando que não há degradação desses compostos durante o período de maturação.

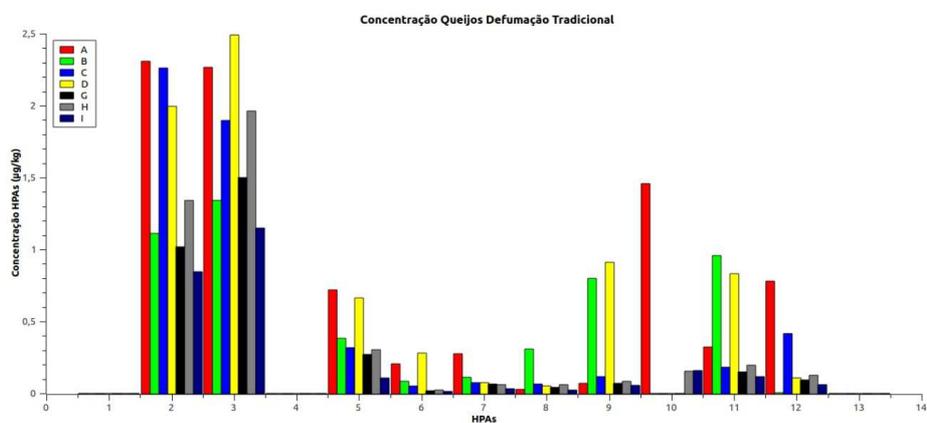
Destaca-se o alto índice de contaminação da amostra A -provolone e de forma cilíndrica- resultado relevante, uma vez que a forma, bem como a localização do queijo na câmara de defumação interfere na deposição dos HPAs sobre a peça do queijo. Roseiro et al. (2011), avaliando a influência do processamento de carne tradicional portuguesa (chouriço grosso) também chegou à conclusão que a contaminação dos HPAs era maior, dependendo da localização e forma dos produtos.

A amostra F destacou-se pelo elevado teor dos compostos D(a,h)A e D(a, e)P, compostos com alto índice de anéis condensados, o que dificulta sua biodegradação, conforme afirma Silva, (2011). O alto peso molecular também infere diretamente na forma prejudicial à saúde. Importante salientar que essa amostra refere-se ainda a queijo desidratado e em rodela. A desidratação pode ser um fator da elevada concentração dos HPAs, em razão do caráter lipofílico

dos contaminantes. A forma (em rodela) também é um fator importante e que gera o alto índice de contaminação.

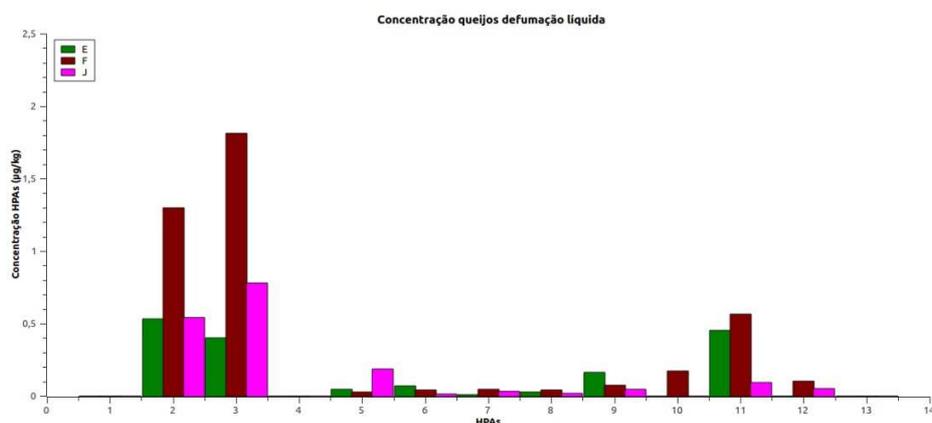
### 3.3 Relação HPAs em tipo de defumação

Na Figura 4 e na Figura 5 apresenta-se a distribuição dos HPAs, conforme o tipo de defumação dos queijos.



Eixo X: 1: B[a]A, 2: Chy, 3: 5MeChy, 4: B(j)F, 5: B(b)F, 6: B(k)F, 7: B[a]P, 8: D(a,i)P, 9: D(a,h)P, 10: Indeno, 11: D(a,e)P, 12: (a,i)P e 13: D(a,h)P.

Figura 4 Relação de HPAs dos queijos defumados sob processo tradicional.



Eixo X: 1: B[a]A, 2: Chy, 3: 5MeChy, 4: B(j)F, 5: B(b)F, 6: B(k)F, 7: B[a]P, 8: D(a,i)P, 9: D(a,h)P, 10: Indeno, 11: D(a,e)P, 12: (a,i)P e 13: D(a,h)P.

Figura 5 Relação de HPAs dos queijos defumados sob processo de defumação líquida.

Observa-se que em ambos os processos de defumação houve maior contaminação pelos compostos (Chy) e (5MeChy).

As amostras submetidas ao processo tradicional apresentaram-se mais contaminadas e com maior distribuição dos HPAs analisados, destacando-se as amostras A, B, C e D. Os aromatizantes são, em geral, extratos de fumaça filtrada, que são separados do material resinoso responsável pela formação dos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (STOLYHWO e SIKORSKI, 2005). Dessa forma, os aromatizantes de fumaça utilizados na obtenção da fumaça líquida passam previamente por processos de filtragens, retendo, conseqüentemente, parte dos HPAs.

Observa-se ainda que os índices de contaminação pelo processo tradicional de defumação podem acarretar em danos sérios à saúde dos consumidores, (INCA, 2011) uma vez que não há um controle efetivo da

formação, bem como a deposição dos HPAs nos produtos defumados, no caso, os queijos.

#### **4 CONCLUSÃO**

As amostras de queijos defumados encontram-se contaminadas por 10 dos 13 HPAs analisados ( $\Sigma=46.458\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ). Não houve relação significativa entre amostras de queijos de massa fresca e maturada, salvo destaque de algumas amostras, pelos seus altos índices de contaminação por fatores como o formato do queijo, por exemplo. Com relação aos diferentes tipos de processo de defumação, há maior contaminação de queijos submetidos ao processo tradicional, comparado ao processo de defumação por fumaça líquida.

## **AGRADECIMENTOS**

À Capes, pela concessão de bolsa de estudo, ao CNPq e à Fapemig, pelo suporte financeiro na execução do projeto.

## REFERÊNCIAS

- Abreu, L. R. (1993). *Factors affecting the biosynthesis of branched-chain fatty acids in milk fat*. 1993. 163 p. Thesis (Ds in Food Science) - University of Wisconsin, Madison.
- Ashraf, M. W. e Salam, A. (2012). Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Vegetables and Fruits Produced in Saudi Arabia. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 88, 543–547.
- Azeredo, A.; Toledo, M. C. de F. e Camargo, M. C. R. de (2006). Determinação de benzo(a)pireno em pescados. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 26,1 jan/mar.
- Badolato, E.S.G., Martins, M.S., Aued-Pimentel, S. et al.(2006) Sistematic study of benzo(a)pyrene in coffee samples. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 17, 989–993.
- Baum, E. J. (1978). *Polycyclic Hydrocarbons and Cancer*. New York: Academic. 245 p.
- Brasil (2007). Resolução RDC nº 2, *Diário Oficial da União*, 17 de janeiro, 2007.
- Brasil. (2004). Portaria MS nº 518 de 25 de março de 2004. *Diário Oficial da União*, 26 de março de 2004.
- Camargo, M. C. R.; Antonioli, P. R. e Vicente, E. (2011a). HPLC-FLD Simultaneous Determination of 13 Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Validation of an Analytical Procedure for Soybean Oils. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 22(7), 1354-1361.
- Camargo, M.C.R., Antonioli, P.R., Vicente, E. & Tfouni, S.A.V. (2011b). Polycyclic aromatic hydrocarbons in Brazilian soybean oils and dietary exposure. *Food Additives and Contaminants Part B*, 4, 152–159.
- Caruso, M. S. F. E Alaburda, J. (2008). Avaliação da contaminação humana por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (hpas) e seus derivados nitrados (nhpas): uma revisão metodológica. *Revista do Instituto Adolfo Lutz (Impr.)*, 67(1), 1-27.

Chung, S.Y.; Yettella, R. R.; Kim, J.S.; Kwon, K.; Kim, M. C. E Min, D. B. (2011). Effects of grilling and roasting on the levels of polycyclic aromatic hydrocarbons in beef and pork. *Food Chemistry*, 129, 1420–1426.

Comissão Europeia (2006). Regulamento (UE) No. 1881/2006 de 19 dezembro 2006 fixa os teores máximos de certos contaminantes presentes nos géneros alimentícios. *Official Journal of the European Communities* L 364:5.

De Vos, R. H., Van Dokkum, W., Schouten, A., & Jong-Berkhout, P. (1990). Polycyclic aromatic hydrocarbons in Dutch total diet samples (1984–1986). *Food and Chemical Toxicology*, 28, 263–268.

Instituto Nacional De Câncer José Alencar Gomes Da Silva (INCA). *Coordenação Geral de Ações Estratégicas. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativa 2012: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: Inca, 2011. 118 p.*

Lorenzo, J. M.; Purriños, L.; Bermudez, R.; Cobas, N. Figueiredo, M. e Fontán, M. C. G. (2011). Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in two Spanish traditional smoked sausage varieties: “Chorizo gallego” and “Chorizo de cebolla”. *Meat Science*, 89, 105–109.

Naccari, C.; Cristani, M.; Giofrè, F.; B, Ferrante, M.; Siracusa, L. E Trombetta, D. (2011). PAHs concentration in heat-treated milk samples. *Food Research International*, Essex, 44, 716–724.

Rey-Salgueiro, L., García-Falcón, M. S., Martínez-Carballo, E., & Simal-Gándara, J. (2008). Effects of toasting procedures on the levels of polycyclic aromatic hydrocarbons in toasted bread. *Food Chemistry*, 108, 607–615.

Roseiro, L.C.; Gomes, A. E Santos, C. (2011). Influence of processing in the prevalence of polycyclic aromatic hydrocarbons in a Portuguese traditional meat product. *Food and Chemical Toxicology*, Oxford, 49, 1340–1345.

Silva, F. S.; Cristale, J.; Ribeiro, M. L.; Marchi, M. R. R. de. (2011). Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in raw cane sugar (rapadura) in Brazil. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24, 346–350.

Simko, P. (2005). Factors affecting elimination of polycyclic aromatic hydrocarbons from smoked meat foods and liquid smoke flavorings. *Molecular Nutrition & Food Research*, 49, 637 – 647.

Stolyhwo, A.; Sikorski, Z. E. (2005). Polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked fish – a critical review. *Food Chemistry*, 91, 303-311.

Suchanova, M.; Hajslova, J.; Tomaniova, M.; Kocourek, V. e Babicka, L. Polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked cheese (2008). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88, 1307–1317.

Tfouni, S. A. V.; Serrate, C. S.; Carreiro, L. B.; Camargo, M. C. R.; Teles, C. R. A.; Cipolli, K. M. V. A. B. e Furlani, R. P. Z. (2012). Effect of roasting on chlorogenic acids, caffeine and polycyclic aromatic hydrocarbons levels in two *Coffea* cultivars: *Coffea arabica* cv. Catuaí Amarelo IAC-62 and *Coffea canephora* cv. Apoatã IAC-2258. *International Journal of Food Science and Technology*, 47, 406–415.

Tfouni, S.A.V. & Toledo, M.C.F. (2007). Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in cane sugar. *Food Control*, 18, 948–952.

Who – World Health Organization (1998). Selected non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environmental Health Criteria*, p. 202.

Who – World Health Organization (2005). *Summary and conclusions of the sixtyfourth meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*, p.47, Rome.

Who – World Health Organization (2008). Proposed draft code of practice for the reduction of contamination of food with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) from smoking and direct drying processes. Summary and conclusions of the thirty-first Joint FAO/WHO Food Standards Programme, *Codex Committee on Contaminants in foods*. Rome (Italy): FAO CX/CF 08/2/9.

**CAPÍTULO 5 Gradiente de migração de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAS) em queijos defumados comerciais**

A ser submetido à Revista “Food Chemistry”

**Gradiente de migração de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs)  
em queijos defumados comerciais**

Raniely de L. Fonseca Luz<sup>1\*</sup>, Creuza P. do A. Resende<sup>1</sup>, Monica C. Rojo  
Camargo<sup>2</sup>, Luiz R. de Abreu<sup>1</sup>

---

<sup>1</sup> Departamento de Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Lavras - UFLA, Campus Universitário, Cx. Postal: 37, 37200-000, Lavras, MG, Brasil.

<sup>2</sup> Centro de Ciência e Qualidade de Alimentos, Instituto de Tecnologia de Alimentos – ITAL, Av. Brasil, 2880, 13070-178 Campinas – SP, Brasil.

## RESUMO

O gradiente de migração de treze hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs): (benzo(a)antraceno, criseno, 5-metilcriseno, benzo(j)fluoranteno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo[a]pireno, dibenzo(a,l)pireno, indeno(1,2,3-c,d)pireno, dibenzo(a,h)antraceno, dibenzo(a,e)pireno, dibenzo(a,i)pireno e dibenzo(a,h)pireno) foi estudado na massa de queijos defumados sob fumaça líquida. Para isso, extraíram-se os HPAs pelos solventes cicloexano e N,N-dimetilformamida-água(9:1,v/v), purificando-os por cromatografia de coluna em sílica-gel, concentrando-os em evaporador rotatório, realizaram-se análise cromatográfica no sistema HPLC-FLD. Estes gradientes foram determinados medindo-se a área do queijo e subdividindo-o em partes, em direção ao seu centro. Níveis relativamente mais altos foram encontrados na casca dos queijos, em comparação com o interior da massa ( $\Sigma = 6.053, 0.981 \mu\text{g.kg}^{-1}$  respectivamente). Houve efetivo gradiente de migração dos HPAs da periferia para o centro dos queijos defumados; sendo que essa migração ocorreu no contrafluxo da gordura total do queijo.

Palavras-chave: Queijos defumados. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos HPAs. Gradiente de migração. Cromatografia.

## 1 INTRODUÇÃO

Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos, (HPAs), consistem em compostos caracterizados por possuírem dois ou mais anéis aromáticos condensados. Esses compostos apresentam ampla distribuição e são encontrados como constituintes em todos os compartimentos ambientais (WHO, 1998, 2005).

Acredita-se que, no mecanismo de formação dos HPAs, estejam envolvidos dois processos distintos: a pirólise e a pirossíntese. Em altas temperaturas, compostos orgânicos são convertidos em moléculas pequenas não estáveis (pirólise). Essas e outros radicais se recombinaem para produzir moléculas maiores e mais estáveis de HPAs (pirossíntese). Após a formação, os HPAs podem sofrer reações pirossintéticas, as quais originam estruturas com anéis altamente condensados (BETTIN; FRANCO, 2005). Sendo assim, a combustão incompleta de matéria orgânica acaba sendo uma das principais fontes, seja ela natural seja de origem antropológica.

Em alimentos, os HPAs podem estar presentes, seja pela poluição de solo, água ou ar, seja pelo processamento que este é submetido em processos de defumação, secagem, cozimentos etc (Akpambanga et al, 2009, Farhadian et al, 2010; Llobet, & Domingo, 2009).

A pesquisa de HPAs em alimentos aumentou significativamente nos últimos anos, sendo encontrados em diversos tipos de alimentos, como cereais, cafés, frutas, verduras, hortaliças, como em alimentos processados como queijos, produtos cárneos e alimentos semiprontos. Especificamente para queijo defumado, as pesquisas apenas envolvem a identificação e quantificação. Dessa forma, neste trabalho objetivou-se avaliar o gradiente de migração dos HPAs em queijos defumados em relação à sua massa, procurando compreender possíveis interações desses compostos com possíveis constituintes dos queijos.



## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Amostras

Foi escolhido um queijo provolone do Capítulo 3, que obteve um alto índice de contaminação por HPAs e que passou por processo de defumação tradicional. Em seguida, as peças de queijos foram submetidas ao processo de pesagem, medição de suas dimensões (Tabela 1). As peças coletadas foram subdivididas em três frações (casca, terço médio e interior) trituradas e homogeneizadas, acondicionadas em recipientes e mantidas sobrefrigeração para posteriores análises.

Tabela 1 Características dos queijos provolone defumado curado submetidos ao processo tradicional

Frações	Diâmetro (cm)	Tamanho casca (cm)
Total	8,3	0,7
Casca	1,3	0,7
Terço médio	3,3	-
Interior	3,7	-

### 2.2 Reagentes

Triton X-100 adquirido de CAQ<sup>®</sup>, (Brasil), tetrafosfato de sódio, obtido de ISO FAR<sup>®</sup> Ltda, (Brasil) álcool metílico, cicloexano, sílicagel 60 (s), sulfato de sódio anidro e N,Ndimetilformamida foram adquiridos por VETEC<sup>®</sup> Ltda, (Brasil). Acetonitrila adquirida de J.T. Baker<sup>®</sup> (Cidade do México, México). A água utilizada foi destilada e purificada em sistema Milli Q<sup>®</sup> Millipore Corp. (Bedford, MA, USA). Padrões de HPAs foram adquiridos da Supelco<sup>®</sup> Inc. (St. Louis, MO, EUA) (benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo[a]pireno, dibenzo(ah)antraceno e indeno(1,2,3-cd)

pireno), Fluka® (Munique, Alemanha) (benzo(j)fluoranteno, dibenzo(al)pireno, dibenzo(ae)pireno e dibenzo(ah)pireno), Cambridge® Isotope Laboratories Inc. (Andover, MA, EUA) (5-metilcriseno) e Chemservice® Inc. (West Chester, PA, EUA) (dibenzo [ai] pireno).

### 2.3 Preparo de soluções

Utilizou-se detergente BDI, o qual foi preparado dissolvendo-se 30 g de Triton X-100 e 70 g de tetrafosfato de sódio (99,5% m/m), em 1000 mL de água destilada. A solução de sulfato de sódio 1% foi elaborada dissolvendo-se 1g de sulfato de sódio em 100 mL de água destilada.

## 2.4 Métodos

### 2.4.1 Caracterização físico-química

Os parâmetros físico-químicos avaliados foram pH, acidez, proteína total, umidade, gordura, gordura no extrato seco (GES) e extrato seco total (EST), seguindo metodologia descrita por (AOAC, 2005). Os resultados de gordura no extrato seco (GES) foram obtidos pela equação 1:

$$\%GES = \frac{\%Gordura}{\%Extrato\ Seco\ Total} \quad \text{Equação 1}$$

Para os valores umidade, utilizou-se a equação 2:

$$\%Umidade = 100 - \%EST \quad \text{Equação 2}$$

## 2.4.2 Análises hidrocarbonetos policíclicos aromáticos

### 2.4.2.1 Extração e *Clean-up*

Os procedimentos de extração e *clean-up* foram baseados nos métodos descritos por Badolato et al. (2006) e Tfouni & Toledo (2007), com modificações.

A fase lipídica do queijo foi extraída pela técnica do detergente-BDI (ABREU, 1993). As amostras homogeneizadas (5g) foram transferidas para um balão volumétrico de 100 mL, juntamente com 10 mL de detergente-BDI. Após completa homogeneização, a mistura foi aquecida em banho-maria por 5 minutos, seguida de novo aquecimento por período adicional de 10 minutos. A mistura foi novamente homogeneizada e centrifugada (centrifuga de Geber®) por 1 minuto à 350 g. Para completa separação da gordura na parte superior do balão, adicionou-se metanol:água (1:1, v/v), até que a camada de gordura ficasse na parte média do gargalo do balão. A mistura foi colocada em banho-maria a 70 °C por 5 minutos. Após este período coletou-se a gordura com pipeta de Pasteur. A gordura foi então transferida para pequenos frascos de vidro e devidamente identificada.

Após a extração da gordura, esta foi transferida para funil de separação e, assim extrairam-se os HPAs com três alíquotas de N, N-dimetilformamida-água (9:1, v/v) (50, 25 e 25mL). Em seguida, 100 mL de solução a 1% de sulfato de sódio foram adicionados ao extrato contido no funil de separação e re-extraído com 3 alíquotas de cicloexano (50, 35, 35 mL).

A solução final foi seca com sulfato de sódio anidro, seguida da concentração em evaporador rotativo a 40 °C, para que o volume final fosse 5 mL. O extrato concentrado (5 mL) foi então purificado por cromatografia de coluna sobre gel de sílica. A coluna de vidro (200 x 10 mm) foi empacotada

com 5 g de sílicagel (15% de água) e 1 g de sulfato de sódio anidro no topo. O extrato concentrado (5mL) foi aplicado ao topo da coluna e eluída com 85 mL de cicloexano. Os primeiros 10 mL foram descartados, e uma fração de 10-85 mL foi novamente concentrada até cerca de 1 mL em evaporador rotativo a 40 °C e seco sob um fluxo de nitrogênio. Finalmente, o resíduo foi dissolvido em 2 mL de acetonitrila, filtrado em um filtro de 0,45- $\mu$ m e analisado por CLAE com detecção por fluorescência.

#### **2.4.2.2 Análise HPLC**

As análises foram realizadas utilizando um aparelho de HPLC Shimadzu (Kyoto, Japão) equipado com uma bomba LC-20AT, um amostrador automático SIL-20AT (injeção de volume de 20  $\mu$ L), um forno de coluna CTO-20A e um RF-10A xl detector de fluorescência (comprimento de onda de excitação 268 nm e emissão de comprimento de onda 398 nm). Os dados foram adquiridos e processados com LC software solução. A Coluna C18 (Vydac 201 TP54, 250  $\cdot$  4,6 mm, tamanho da partícula 5  $\mu$ m, Vydac, Hesperia, CA, EUA) a 30°C. A fase móvel consistiu de acetonitrila 75% e 25% de água, a uma taxa de fluxo de 1 mL min<sup>-1</sup>.

#### **2.4.2.3 Identificação e quantificação HPAs**

A identificação dos HAP foi realizada por comparação do tempo de retenção obtido pela injeção dos padrões nas mesmas condições. Os compostos foram quantificados por padrão externo. A solução-estoque padrão misto com HAP foi preparado em acetonitrila e armazenado a 4 °C, durante 3 meses. A partir dessa solução, foi utilizado o método de padrão externo para a quantificação. Injeções de soluções padrão de HPA em acetonitrilo foram

utilizados para construir as regressões lineares (relações de área de pico versus concentração HPA). Para essa finalidade, oito níveis de concentração que variam de 0,00025 para 0,0150 µg/mL) foram usados. O limite de detecção (LD) para cada HPA foi definida como a concentração do analito que produziu uma relação sinal-ruído.

#### 2.4.2.4 Relação do teor de Hpas pelo teor de gordura

Para o cálculo do teor de HPAs em relação ao teor de gordura utilizou-se equação 3:

$$\text{HPAs (gordura)} = \frac{\text{Teor HPA } (\mu\text{g/kg})}{\text{Teor Gordura } (\% \text{m/m})} \quad \text{Equação 3}$$

### 2.5 Análises estatísticas

Efetou-se a análise de variância (ANOVA) tanto para a caracterização físico-química, como para a identificação e quantificação dos HPAs nas frações dos queijos e a comparação entre as médias foi realizada pelo teste de Tukey, utilizando o software Statistica (Statistica® 5.5; Stat Soft Inc. Tulsa, OK, EUA), sendo considerado o nível de significância de  $p < 0,05$ .

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Caracterização físico-química

Os dados referentes à caracterização físico-química dos queijos estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 Caracterização Físico-Química de Queijos\*

	pH	Acidez	Proteína Total	Umidade	Gordura	GES	EST
<b>A</b>	5,62 <sup>a</sup>	0,552 <sup>a</sup>	21,68 <sup>a</sup>	45,20 <sup>a</sup>	28,00 <sup>a</sup>	51,09 <sup>a</sup>	54,80 <sup>a</sup>
<b>A1</b>	5,62 <sup>a</sup>	0,553 <sup>a</sup>	21,66 <sup>a</sup>	44,56 <sup>b</sup>	27,67 <sup>b</sup>	48,70 <sup>b</sup>	56,82 <sup>b</sup>
<b>A2</b>	5,60 <sup>a</sup>	0,550 <sup>a</sup>	21,66 <sup>a</sup>	45,21 <sup>a</sup>	27,45 <sup>c</sup>	50,50 <sup>c</sup>	54,35 <sup>c</sup>
<b>A3</b>	5,55 <sup>b</sup>	0,530 <sup>b</sup>	21,57 <sup>b</sup>	45,23 <sup>a</sup>	27,00 <sup>d</sup>	49,30 <sup>d</sup>	54,77 <sup>d</sup>

A = fração da amostra como todo, A1 = fração casca, A2 = fração terço médio, A3 = fração interior

\* Média de triplicatas.

Médias seguidas de mesma letra, na coluna, são iguais entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

No geral, as composições químicas estão dentro da legislação estabelecidas para o queijo tipo Provolone.

A amostra A3 para pH, acidez e proteína total diferiu significativamente para as demais amostras.

Para os valores de umidade, A1 diferiu significativamente das demais amostras, o que já era esperado, pois se trata da fração da casca. Os queijos duros, como o provolone são queijos que passam por um longo período de maturação, possuindo, assim, um menor teor de umidade.

Observa-se ainda que A1 apresenta maior teor de gordura que as outras frações (terço médio e interior), fato explicado pela difusão da gordura por questões de densidade para a casca somada a valores menores de umidade. Quanto ao teor de gordura, todas as amostras diferiram entre si, assim como os valores para gordura no extrato seco (GES).

### 3.2 Identificação e quantificação dos HPAs

As concentrações dos HPAs estão apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3 Identificação e quantificação HPAs ( $\mu\text{g.kg}^{-1}$ )

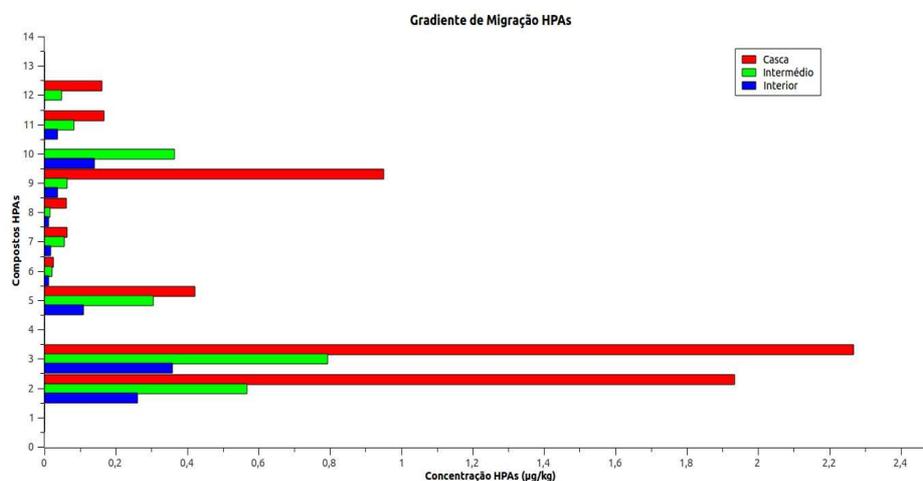
	A	A1	A2	A3	MÉDIA
<b>B(a)A</b>	-	-	-	-	-
<b>Chy</b>	0.846 <sup>a</sup>	1.935 <sup>b</sup>	0,0206 <sup>c</sup>	0.261 <sup>d</sup>	0.902
<b>5MeChy</b>	1.15 <sup>a</sup>	2.268 <sup>b</sup>	0.0290 <sup>c</sup>	0.359 <sup>d</sup>	1.143
<b>B(j)F</b>	-	-	-	-	-
<b>B(b)F</b>	0.106 <sup>a</sup>	0.422 <sup>b</sup>	0.0111 <sup>c</sup>	0.109 <sup>d</sup>	0.235
<b>B(k)F</b>	0.016 <sup>a</sup>	0.024 <sup>b</sup>	0.001 <sup>c</sup>	0.012 <sup>a</sup>	0.018
<b>B[a]P</b>	0.035 <sup>a</sup>	0.064 <sup>b</sup>	0.002 <sup>c</sup>	0.017 <sup>d</sup>	0.043
<b>D(a,i)P</b>	0.024 <sup>a</sup>	0.062 <sup>b</sup>	0.0005 <sup>c</sup>	0.011 <sup>d</sup>	0.028
<b>D(a,h)P</b>	0.055 <sup>a</sup>	0.95 <sup>b</sup>	0.0023 <sup>c</sup>	0.036 <sup>d</sup>	0.276
<b>Indeno</b>	0.160 <sup>a</sup>	-	0,013 <sup>c</sup>	0,14 <sup>a</sup>	0.222
<b>D(a,e)P</b>	0.116 <sup>a</sup>	0.167 <sup>b</sup>	0.003 <sup>c</sup>	0.036 <sup>d</sup>	0.100
<b>D(A,i)P</b>	0.060 <sup>a</sup>	0.161 <sup>b</sup>	0.0017 <sup>c</sup>	-	0.090
<b>D(a,h)P</b>	-	-	-	-	-
<b>TOTAL</b>	2.568	6.053	2.317	0.981	$\Sigma= 11.919$

Médias seguidas de mesma letra, na linha, são iguais entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

O método proposto foi utilizado para identificar simultaneamente 13 HPAs das amostras de queijos do mercado, dos quais 3 compostos, benzo(a)antraceno (B(a)A, benzo(j) fluoranteno (B(j)F e dibenzo(a,h)pireno (D(a,h)P, não foram identificados em nenhuma das amostras.

O benzo[a]pireno (B[a]P) com média de  $0,08 \mu\text{g.kg}^{-1}$ , composto marcador da presença de HPAs cancerígenos (Regulamento da Comissão, 2006), está presente em todas as frações, casca, terço médio e interior, analisadas. Destacam-se ainda o alto índice dos compostos Chy ( $0.902 \mu\text{g.kg}^{-1}$ ) e 5MeChy ( $1.143 \mu\text{g.kg}^{-1}$ ), compostos cancerígenos, também encontrados em destaque no Capítulo 2.

Na Figura 1 apresentam-se os dados relacionados ao gradiente de migração dos HPAs nas amostras.



Eixo Y: 1: B[a]A, 2: Chy, 3: 5MeChy, 4: B(j)F, 5: B(b)F, 6: B(k)F, 7: B[a]P, 8: D(a,i)P, 9: D(a,h)P, 10: Indeno, 11: D(a,e)P, 12: (a,i)P e 13: D(a,h)P.

Figura 1 Taxa de gradiente de migração dos HPAs em relação à massa dos queijos.

Observa-se que houve efetiva migração dos HPAs de todos os compostos identificados, sendo em ordem decrescente: na casca, no terço médio e interior ( $\Sigma = 6.053; 2.317; 0.981 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), respectivamente.

Na Tabela 4, estão apresentados os dados referentes aos teores de HPAs na gordura dos queijos.

Tabela 4 HPAs na gordura

	A	A1	A2	A3
<b>B(a)A</b>	-	-	-	-
<b>Chy</b>	0.0302 <sup>a</sup>	0.0699 <sup>b</sup>	0.0206 <sup>c</sup>	0.0097
<b>5MeChy</b>	0.0411 <sup>a</sup>	0.0820 <sup>b</sup>	0.0289 <sup>b</sup>	0.0133
<b>B(j)F</b>	-	-	-	-
<b>B(b)F</b>	0.0038 <sup>a</sup>	0.0152 <sup>b</sup>	0.0111 <sup>b</sup>	0.0040
<b>B(k)F</b>	0.0006 <sup>a</sup>	0.0009 <sup>a</sup>	0.0008 <sup>a</sup>	0.0004
<b>B(a)P</b>	0.0001 <sup>a</sup>	0.0002 <sup>a</sup>	0.0020 <sup>b</sup>	0.0006
<b>D(a,i)P</b>	0.0008 <sup>a</sup>	0.0022 <sup>b</sup>	0.0005 <sup>a</sup>	0.0004
<b>D(a,h)P</b>	0.0020 <sup>a</sup>	0.0343 <sup>b</sup>	0.0023 <sup>a</sup>	0.0013
<b>Indeno</b>	0.0057 <sup>a</sup>	-	0.0133 <sup>b</sup>	0.0052

“continua”

Tabela 4 “conclusão”

	<b>A</b>	<b>A1</b>	<b>A2</b>	<b>A3</b>
<b>D(a,e)P</b>	0.0041 <sup>a</sup>	0.0060 <sup>b</sup>	0.0030 <sup>b</sup>	0.0013
<b>D(A,i)P</b>	0.0021 <sup>a</sup>	0.0058 <sup>b</sup>	0.0017 <sup>b</sup>	-
<b>D(a,h)P</b>	-	-	-	-

Médias seguidas de mesma letra, na linha, são iguais entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Observa-se que houve migração dos HPAs da periferia da massa para o centro do queijo. A migração desses compostos hidrofóbicos, ocorreu inclusive no contrafluxo da gordura (Tabela1), já que houve migração da gordura do centro para a casca (Tabela1).

Ashraf e Salam (2012) avaliaram o teor, bem como distribuição de oito HPAs: (Ant, B(a)A, B(e)P, B(b)F, B(k)F, B(a)P, D(ah)A, B(ghi)P), nas cascas e núcleos de vegetais como frutas, raízes e tubérculos. As raízes de legumes, como batata e cenoura, apresentaram valores mais elevados ( $11 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), em comparação com os vegetais aéreos. Para os vegetais e frutas, todas as cascas foram consideradas mais contaminadas do que seus núcleos.

Suchanova et al, (2008) investigaram a ocorrência de 15 HPAs (Naph, Ace, Flt, Phe, Ant, Flt, Pyr B(a)A, Chr, B(b)F, B(k)F, B(a)P, DB(ah)A, B(ghi)P e I(1,2,3-cd)P) em queijos defumados italianos submetidos à defumação industrial e caseira. As concentrações dos HPAs encontradas em amostras defumadas sob processo industrial controlado estavam em nível de  $0,11 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ , ao passo que em queijos defumados caseiros, o teor de HPAs foi de até 10 vezes maior. Quantidades significativamente maiores de HPAs (até 3-6 vezes) foram encontradas nas camadas superficiais, em comparação com as partes internas das amostras.

Sendo assim, fica comprovado que a concentração dos HPAs tende a ser maior na superfície do material contaminado. Há de se destacar que a localização da peça no defumador, bem como a forma da peça em questão, afetam diretamente a concentração final, independentemente da origem da

contaminação (ambiental ou processamentos, como secagem, cozimento e defumação (Meudec, et al. 2006).

#### **4 CONCLUSÃO**

Houve efetivo gradiente de migração dos HPAs da periferia para o centro dos queijos defumados, sendo que essa migração ocorre no contrafluxo da gordura, a qual tende a migrar do interior para a periferia.

## **AGRADECIMENTOS**

À Capes, pela concessão de bolsa de estudo, e ao CNPq e à Fapemig, pelo suporte financeiro na execução do projeto.

## REFERÊNCIAS

- A.O.A.C. Association Official Analysis Chemistry (2005). Official methods of analysis of AOAC international: food composition; additives, natural contaminants. Virginia: *Association Analytical Chemists*, Gaithersburg, Maryland, 18.ed., 2(33), 1-75.
- Abreu, L. R. (1993). *Factors affecting the biosynthesis of branched-chain fatty acids in milk fat*. 1993. 163 p. Thesis (Ds in Food Science) - University of Wisconsin, Madison.
- Akpambanga, V. O. E., Purcarob, G., Lajidea, L., Amooa, I. A., Conteb, L. S., & Moretb, S. (2009). Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in commonly consumed Nigerian smoked/grilled fish and meat. *Food Additives and Contaminants*, 26(7), 1096-1103.
- Ashraf, M. W. e Salam, A. (2012). Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Vegetables and Fruits Produced in Saudi Arabia. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, New York, 88, 543–547.
- Badolato, E.S.G., Martins, M.S., Aued-Pimentel, S. et al.(2006) Sistematic study of benzo(a)pyrene in coffee samples. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 17, 989–993.
- Bettin, S. M.; Franco D. W. (2005). Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) em aguardentes. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 25, 2, 234-238.
- Farhadian, A., Jinap, S., Abas, F., & Sakar, Z. I. (2010). Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in grilled meat. *Food Control*, 21, 606-610.
- Llobet, J. M., Falcó, G., Bocio, A., & Domingo, J. L. (2006). Exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons of edible marine species in Catalonia, Spain. *Journal of Food Protection*, 69, 2493-2499.
- Meudec A, Dussauze J, Deslandes E, Poupart N (2006). Evidence for bioaccumulation of PAHs within internal shoot tissues by a halophytic plant artificially exposed to petroleum polluted sediments. *Chemosphere* 65, 3, 474–481

Regulamento da Comissão (UE) No. 1881/2006 de 19 dezembro 2006 (2006). Aprova níveis máximos de certos contaminantes em alimentos. Este Regulamento Refere a Comissão Reguladora (UE) No. 208/2005 de 4 fevereiro de 2005.

Suchanova, M.; Hajslova, J.; Tomaniova, M.; Kocourek, V. e Babicka, L. Polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked cheese (2008). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88, 1307–1317.

Tfouni, S.A.V. & Toledo, M.C.F. (2007). Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in cane sugar. *Food Control*, 18, 948–952.

Who – World Health Organization (1998). Selected non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environmental Health Criteria*, p. 202.

Who – World Health Organization (2005). Summary and conclusions of the sixtyfourth meeting of the Joint FAO/WHO *Expert Committee on Food Additives*, p.47, Rome.

**CAPÍTULO 6 Geração de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAS)  
em queijos submetidos à tosta em churrasqueira**

A ser submetido à Revista “Food Chemistry”

**Geração de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) em queijos  
submetidos a tosta em churrasqueira**

Raniely de L. Fonseca Luz<sup>1\*</sup>, Creuza P. do A. Resende<sup>1</sup>, Monica C. Rojo  
Camargo<sup>2</sup>, Luiz R. de Abreu<sup>1</sup>

---

<sup>1</sup> Departamento de Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Lavras - UFLA, Campus Universitário, Cx. Postal: 37, 37200-000, Lavras, MG, Brasil.

<sup>2</sup> Centro de Ciência e Qualidade de Alimentos, Instituto de Tecnologia de Alimentos – ITAL, Av. Brasil, 2880, 13070-178 Campinas – SP, Brasil.

## RESUMO

A geração de treze hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs:) (benzo(a)antraceno, criseno, 5-metilcriseno, benzo(j)fluoranteno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo[a]pireno, dibenzo(a,l)pireno, indeno(1,2,3-c,d)pireno, dibenzo(a,h)antraceno, dibenzo(a,e)pireno, dibenzo(a,i)pireno e dibenzo(a,h)pireno) em queijo coalho submetidos à tosta em churrasqueira convencional foi avaliada. Para isso extraiu-se os HPAs pelos solventes N,N-dimetilformamida-água(9:1,v/v) e cicloexano, purificou-os por cromatografia de coluna em sílica-gel e concentraram-se em evaporador rotatório. Realizou-se a análise cromatográfica no sistema HPLC-FLD. A tosta foi realizada em churrasqueira convencional, com o uso de carvão vegetal comercial. Não foram identificados os compostos benzo(a)antraceno [B(a)A], benzo(j)fluoranteno [B(j)F], Indeno(1,2,3-cd)pireno [indeno] e dibenzo(a,h)pireno [D(a,h)P]. Não houve contaminação acima dos limites permitidos, variando de 0.016 a 0.875  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ .

Palavras-chave: Queijos coalho. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos HPAs. Tosta churrasqueira. Cromatografia.

## 1 INTRODUÇÃO

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos são compostos amplamente distribuídos pelo ambiente. São gerados pela combustão incompleta de matéria orgânica. Após a formação, os HPAs podem sofrer reações pirossintéticas, as quais originam estruturas com anéis altamente condensados (BETTIN; FRANCO, 2005).

Nos últimos 10 anos, diversas agências e comitês, como o Programa Internacional de Química Segura, sigla em inglês (IPCS), Comitê Científico em Alimentos (SCF) e Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA), concluíram que 15 HPAs: (benzo(a)antraceno, ciclopenta(c,d)pireno, criseno, 5-metilcriseno, benzo(b)fluoranteno, benzo(j)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo[a]pireno, indeno(1,2,3-c,d)pireno, dibenzo(a,h)antraceno, benzo(g,h,i)perileno, dibenzo(a,l)pireno, dibenzo(a,e)pireno, dibenzo(a,i)pireno, dibenzo(a,h)pireno) demonstraram ser carcinogênicos e/ou mutagênicos aos seres humanos.

Em alimentos, os HPAs podem estar presentes seja pela poluição de solo, água ou ar, seja pelo processamento a que são submetidos, como defumação, secagem, cozimentos, etc (Akpambanga et al, 2009, Farhadian et al, 2010). A tosta de queijos em churrasqueira é uma forma potencial para a aquisição de HPAs. Nesse caso, deve-se considerar o crescente hábito de consumo de queijo-coalho no Brasil, o qual é normalmente submetido à tosta em churrasqueiras.

O queijo-coalho é um queijo típico brasileiro, com características específicas, como consistência semidura e elástica, textura compacta e macia, podendo apresentar algumas olhaduras. Apresenta cor branco amarelada uniforme, sabor brando, ligeiramente ácido, podendo ser salgado, com aroma,

também ligeiramente ácido, que lembra massa de queijo coagulada (BRASIL, 2001).

No Brasil, seu consumo está distribuído pelas Regiões Norte, Nordeste e Sudeste. Por ainda não apresentar um processo padronizado de fabricação, acaba se adequando à região e à forma de consumo adotada, apresentando, assim, diferenças quanto à composição físico-química, bem como características sensoriais. No Nordeste, por exemplo, o queijo de coalho é destinado tanto ao consumo in natura como assado. Já nos estados da Região Sudeste, o queijo-coalho é comercializado exclusivamente sob a forma de espeto para churrasco.

Dessa maneira objetivou-se neste trabalho avaliar a contaminação dos HPAs em queijos-coalho, assados em churrasqueira com carvão vegetal.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Amostras

Foram coletadas peças de queijos-coalho de três lotes diferentes (A1, A2 e A3) em triplicatas no mercado da cidade de Lavras, Minas Gerais. As peças dos queijos foram devidamente acondicionadas e transportadas para o setor de Laticínios da Universidade Federal de Lavras, Em seguida, as peças foram submetidas ao processo de pesagem, medição de suas dimensões e acondicionadas sobre refrigeração. Uma porção das peças coletadas foi triturada e homogeneizada, acondicionada em recipientes e mantida sobre refrigeração para posterior caracterização físico-química, sendo o restante das peças mantidas sobre refrigeração para determinação da formação dos HPAs

Os queijos encontravam-se na forma retangular, com dimensões médias de 12,05 x 2cm, em espeto. Cada espeto tinha peso médio de 56,08g.

### 2.2 Reagentes

Triton X-100 adquirido de CAQ<sup>®</sup>, (Brasil), tetrafosfato de sódio, obtido de ISO FAR<sup>®</sup> Ltda, (Brasil) álcool metílico, cicloexano, sílicagel 60 (s), sulfato de sódio anidro e N,Ndimetilformamida foram adquiridos por VETEC<sup>®</sup> Ltda, (Brasil). Acetonitrila adquirida de J.T. Baker<sup>®</sup> (Cidade do México, México). A água utilizada foi destilada e purificada em sistema Milli Q<sup>®</sup> Millipore Corp. (Bedford, MA, USA). Padrões de HPAs foram adquiridos da Supelco<sup>®</sup> Inc. (St. Louis, MO, EUA) (benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo[a]pireno, dibenzo(ah)antraceno e indeno(1,2,3-cd)pireno), Fluka<sup>®</sup> (Munique, Alemanha) (benzo(j)fluoranteno, dibenzo(al)pireno, dibenzo(ae)pireno e dibenzo(ah)pireno), Cambridge<sup>®</sup> Isotope Laboratories Inc.

(Andover, MA, EUA) (5-metilcriseno) e Chemservice® Inc. (West Chester, PA, EUA) (dibenzo [ai] pireno).

### 2.3 Preparo de soluções

Utilizou-se detergente BDI, o qual foi preparado dissolvendo-se 30g de Triton X-100 e 70g de tetrafosfato de sódio (99,5% m/m), em 1000 mL de água destilada. A solução de sulfato de sódio 1% foi elaborada dissolvendo-se 1g de sulfato de sódio em 100 mL de água destilada.

### 2.4 Métodos

#### 2.4.1 Caracterização físico-química

Os parâmetros físico-químicos avaliados foram pH, acidez, proteína total, umidade, gordura, gordura no extrato seco (GES) e extrato seco total (EST), seguindo metodologia descrita por (AOAC, 2005). Os resultados de gordura no extrato seco (GES) foram obtido pela equação 1.

$$\%GES = \frac{\%gordura}{\%Extrato\ Seco\ Total} \quad \text{Equação 1}$$

Para os valores umidade, utilizou-se a equação 2.

$$\%Umidade = 100 - \%EST \quad \text{Equação 2}$$

## 2.4.2 Análises hidrocarbonetos policíclicos aromáticos

### 2.4.2.1 Extração e *Clean-up*

Os procedimentos de extração e *clean-up* foram baseados pelos métodos descritos por Badolato et al. (2006) e Tfouni & Toledo (2007) com modificações.

A fase lipídica do queijo foi extraída pela técnica do detergente-BDI (ABREU, 1993). As amostras homogeneizadas (5 g) foram transferidas para um balão volumétrico de 100 mL, juntamente com 10mL de detergente-BDI. Após completa homogeneização a mistura foi aquecida em banho-maria por 5 minutos, seguida de novo aquecimento por período adicional de 10 minutos. A mistura foi então novamente homogeneizada e centrifugada (centrifuga de Geber) por 1 minuto, à 350 g. Para completa separação da gordura na parte superior do balão, adicionou-se metanol:água (1:1, v/v), até que a camada de gordura ficasse na parte média do gargalo do balão. A mistura foi então colocada em banho-maria a 70 °C por 5 minutos, após os quais coletou-se a gordura com pipeta de Pasteur. A gordura foi transferida para pequenos frascos de vidro e devidamente identificada.

Após a extração da gordura, essa foi transferida para funil de separação e assim extrairam-se os HPAs com três alíquotas de N, N-dimetilformamida-água (9:1, v/v) (50, 25 e 25mL). Em seguida, 100 mL de solução a 1% de sulfato de sódio foram adicionados ao extrato contido no funil de separação e re-extraído com 3 alíquotas de cicloexano (50, 35, 35mL).

A solução final foi seca com sulfato de sódio anidro, seguida da concentração em evaporador rotativo a 40 °C, para que o volume final fosse 5 mL. O extrato concentrado (5mL) foi então purificado por cromatografia de coluna sobre gel de sílica. A coluna de vidro (200 x 10 mm) foi empacotada

com 5 g de sílicagel (15% de água) e 1 g de sulfato de sódio anidro no topo. O extrato concentrado (5mL) foi aplicado ao topo da coluna e eluído com 85 mL de ciclo-hexano. Os primeiros 10 mL foram descartados, e uma fração de 10-85 mL foi novamente concentrada até cerca de 1 mL em evaporador rotativo a 40 ° C e seco sob um fluxo de nitrogênio. Finalmente, o resíduo foi dissolvido em 2 mL de acetonitrila, filtrado através de um filtro de 0,45- $\mu$ m e analisado por CLAE, com detecção por fluorescência.

#### **2.4.2.2 Análise HPLC**

As análises foram realizadas utilizando um aparelho de HPLC Shimadzu (Kyoto, Japão) equipado com uma bomba LC-20AT, um amostrador automático SIL-20AT (injeção de volume de 20  $\mu$ L), um forno de coluna CTO-20A e um RF-10A xl detector de fluorescência (comprimento de onda de 268 nm e emissão de comprimento de onda 368 nm). Os dados foram adquiridos e processados com LC software solução. A Coluna C18 (Vydac 201 TP54, 250  $\cdot$  4,6 mm, tamanho da partícula 5  $\mu$ m, Vydac, Hesperia, CA, EUA) a 30°C. A fase móvel consistiu de acetonitrila 75% e 25% de água, a uma taxa de fluxo de 1 mL min<sup>-1</sup>.

#### **2.4.2.3 Identificação e quantificação HPAs**

A identificação dos HAP foi realizada por comparação do tempo de retenção obtido pela injeção dos padrões nas mesmas condições. Os compostos foram quantificados por padrão externo. A solução-estoque padrão misto com HAP foi preparado em acetonitrila e armazenado a 4 °C, durante 3 meses. A partir dessa solução, foi utilizado o método de padrão externo para a quantificação. Injeções de soluções-padrão de HPA em acetonitrila foram

utilizadas para construir as regressões lineares (relações de área de pico versus concentração HPA). Para essa finalidade, oito níveis de concentração que variam de 0,00025 para 0,0150  $\mu\text{g/mL}$  foram usados. O limite de detecção (LD) para cada HPA foi definida como a concentração do analito que produziu uma relação sinal-ruído de três.

## **2.5 Análises estatísticas**

Efetuaram-se a análise de variância (ANOVA) dos resultados da caracterização físico química, bem como a identificação e a quantificação dos HPAs. A comparação entre as médias foi realizada pelo teste de Tukey, utilizando o software Statistica (Statistica 5.5; Stat Soft Inc. Tulsa, OK, EUA), sendo considerado o nível de significância de  $p < 0,05$ .

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Caracterização físico-química queijo-coalho

O queijo-coalho no Brasil não apresenta legislação específica quanto ao padrão de identidade e qualidade, resultando na falta de padronização em sua elaboração. Na Tabela 1 estão apresentados os resultados quanto à caracterização físico-química dos queijos.

Tabela 1 Caracterização Físico-Química Queijos

	pH	Acidez	Proteína Total	Umidade	Gordura	GES	EST
A1	6,30 <sup>a</sup>	0.126 <sup>a</sup>	23,82 <sup>a</sup>	46.83 <sup>a</sup>	13,00 <sup>a</sup>	24,45 <sup>a</sup>	53,17 <sup>a</sup>
A2	6,42 <sup>b</sup>	0.126 <sup>a</sup>	24,54 <sup>b</sup>	46,57 <sup>b</sup>	13,00 <sup>a</sup>	25,27 <sup>b</sup>	53,42 <sup>b</sup>
A3	6,28 <sup>a</sup>	0.126 <sup>a</sup>	23.89 <sup>a</sup>	46,45 <sup>b</sup>	14,00 <sup>b</sup>	26,15 <sup>c</sup>	53,54 <sup>b</sup>

\* Média de triplicatas.

Médias seguidas de mesma letra, na coluna, são iguais entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Os resultados para acidez não diferiram significativamente. A amostra A2 diferiu significativamente para as análises de pH e proteína total.

Para a análise de gordura, a amostra A3 diferiu das demais, ao passo que para o resultado de gordura no extrato seco, todas as amostras diferiram significativamente.

A amostra A1 diferiu significativamente para teores de umidade e extrato seco total.

Analisando os resultados da caracterização físico-química, observa-se a não padronização da tecnologia de fabricação do queijo-coalho, ressaltando que as amostras representam uma mesma marca. Diante este fato há de se perceber a fragilidade da fiscalização para o cumprimento dos parâmetros do Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade (RTIQ) específico para queijo coalho.

### 3.2 Identificação e quantificação dos HPAs

As concentrações dos HPAs estão apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2 Identificação e quantificação HPAs ( $\mu\text{g.kg}^{-1}$ )

	A1	A2	A3	MÉDIA
<b>B(a)A</b>	-	-	-	-
<b>Chy</b>	0.824 <sup>a</sup>	0.256 <sup>b</sup>	0.886 <sup>c</sup>	0.655
<b>5MeChy</b>	1.224 <sup>a</sup>	0.334 <sup>b</sup>	1.067 <sup>c</sup>	0.875
<b>B(j)F</b>	-	-	-	-
<b>B(b)F</b>	0.274 <sup>a</sup>	0.096 <sup>b</sup>	0.234 <sup>c</sup>	0.201
<b>B(k)F</b>	0.016 <sup>a</sup>	0.016 <sup>a</sup>	0.016 <sup>a</sup>	0.016
<b>B(a)P</b>	0.042 <sup>a</sup>	0.020 <sup>b</sup>	0.034 <sup>c</sup>	0.032
<b>D(a,i)P</b>	0.022 <sup>a</sup>	0.014 <sup>b</sup>	0.026 <sup>a</sup>	0.021
<b>D(a,h)P</b>	0.058 <sup>a</sup>	0.032 <sup>b</sup>	0.055 <sup>a</sup>	0.048
<b>Indeno</b>	-	-	-	-
<b>D(a,e)P</b>	0.134 <sup>a</sup>	0.050 <sup>b</sup>	0.112 <sup>c</sup>	0.099
<b>D(A,i)P</b>	0.050 <sup>a</sup>	0.050 <sup>a</sup>	0.052 <sup>a</sup>	0.051
<b>D(a,h)P</b>	-	-	-	-
<b>TOTAL</b>	2.644	0.868	2.482	$\Sigma= 5.994$

Médias seguidas de mesma letra, na linha, são iguais entre si pelo teste de Tukey ( $p<0,05$ ).

Os compostos B(a)A, B(j)F, Indeno e D(a,h)P não foram identificados. O método utilizado permitiu identificar e quantificar 9 compostos dispostos na Tabela 2, destacando-se o alto índice de Chy e 5MeChy. Resultado semelhante encontrados nos capítulos 2 e 3.

O Chy e 5MeChy são compostos cancerígenos, cuja incidência ocorre quando a temperatura de pirólise é alta (De Vos, 1990). Resultados semelhantes foram observados por Naccari, et al. (2011), quando avaliaram a presença de HPAs em leite submetidos a diferentes processamentos.

Com exceção do composto B(b)F, todos os demais compostos avaliados indicaram baixa contaminação (Figura 1), não atingindo os níveis da legislação europeia para fórmulas para lactentes, que incluem leite para bebês (Regulamento da Comissão, 2006).

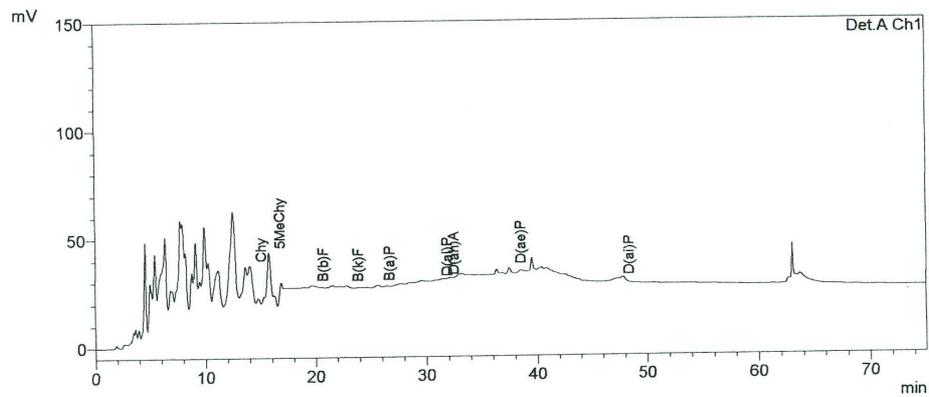


Figura 1 Cromatograma HPLC de uma das amostras de queijo.

Há de se ressaltar que a deposição dos HPAs gerados pela tosta pode ter sido afetada pela disposição dos queijos na chapa da churrasqueira e pela ausência de uniformidade para a exposição à fumaça.

#### **4 CONCLUSÃO**

Foi possível identificar e quantificar HPAs em queijos coalho submetidos à tosta em churrasqueira com carvão vegetal. Dos 13 compostos identificados pelo método utilizado, nove foram identificados e quantificados, destacando-se o Chy e 5-MeChy (0,655 e 0,875  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  respectivamente), embora não tendo atingido os limites propostos pela legislação europeia.

### **AGRADECIMENTOS**

À Capes, pela concessão de bolsa de estudo, ao CNPq e à Fapemig, pelo suporte financeiro na execução do projeto.

## REFERÊNCIAS

- Abreu, L. R. (1993). *Factors affecting the biosynthesis of branched-chain fatty acids in milk fat*. 1993. 163 p. Thesis (Ds in Food Science) - University of Wisconsin, Madison.
- Akpambanga, V. O. E., Purcarob, G., Lajidea, L., Amooa, I. A., Conteb, L. S., & Moretb, S. (2009). Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in commonly consumed Nigerian smoked/grilled fish and meat. *Food Additives and Contaminants*, 26(7), 1096-1103.
- A.O.A.C. Association Official Analysis Chemistry (2005). Official methods of analysis of AOAC international: food composition; additives, natural contaminants. Virginia: *Association Analytical Chemists*, Gaithersburg, Maryland, 18.ed., 2(33), 1-75.
- Badolato, E.S.G., Martins, M.S., Aued-Pimentel, S. et al.(2006) Systematic study of benzo(a)pyrene in coffee samples. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 17, 989–993.
- Bettin, S. M.; Franco D. W. (2005). Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) em aguardentes. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 25, 2, 234-238.
- BRASIL. Instrução Normativa nº 30, de 26 de junho de 2001. Aprova o regulamento técnico de identidade e qualidade de manteiga da terra, queijo de coalho e queijo de manteiga. *Diário Oficial [da] União*, Brasília, 16 jul. 2001.
- De Vos, R. H., Van Dokkum, W., Schouten, A., & Jong-Berkhout, P. (1990). Polycyclic aromatic hydrocarbons in Dutch total diet samples (1984–1986). *Food and Chemical Toxicology*, 28, 263–268.
- Farhadian, A., Jinap, S., Abas, F., & Sakar, Z. I. (2010). Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in grilled meat. *Food Control*, 21, 606-610.
- Naccari, C.; Cristani, M.; Giofrè, F.; B, Ferrante, M.; Siracusa, L. E Trombetta, D. (2011). PAHs concentration in heat-treated milk samples. *Food Research International*, 44, 716–724.
- Regulamento da Comissão (UE) No. 1881/2006 de 19 dezembro 2006 (2006). Aprova níveis máximos de certos contaminantes em alimentos. Este *Regulamento Refere a Comissão Reguladora (UE) No. 208/2005 de 4 fevereiro de 2005*.

Tfouni, S.A.V. & Toledo, M.C.F. (2007). Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in cane sugar. *Food Control*, 18, 948–952.

**CAPÍTULO 7 Consideração geral**

## 1 CONCLUSÃO GERAL

- a) Dos queijos analisados todos se apresentaram contaminados pela presença dos 10 dos 13 (HPAs) avaliados.
- b) Não houve relação significativa entre a presença dos HPAs e o tipo de massa dos queijos (fresca ou maturada).
- c) Houve maior contaminação pelos HPAs em queijos submetidos pelo processo de defumação tradicional em comparação aos queijos submetidos à defumação por fumaça líquida.
- d) Verificou-se o gradiente de migração dos HPAs da periferia para o centro dos queijos defumados, sendo que essa migração ocorre no contra fluxo da gordura, a qual tende a migrar do interior para a periferia.
- e) Foi possível identificar e quantificar HPAs em queijos coalho submetidos à tosta em churrasqueira com carvão vegetal, embora não tendo atingido os limites propostos pela legislação europeia.