



Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos: uma revisão sobre metodologias de análise e níveis de contaminação em produtos cárneos defumados

Polycyclic aromatic hydrocarbons: a review on the methodologies of the analysis and the levels of contamination in smoked meat products

RIALA6/1779

Letícia de Queiroz MOZANER^{1,2}, Adriana Palma de ALMEIDA¹, Simone Alves da SILVA^{1*}

*Endereço para correspondência: ¹Núcleo de Contaminantes Orgânicos, Centro de Contaminantes, Instituto Adolfo Lutz, Av. Dr. Arnaldo, 355, Cerqueira César, São Paulo, SP, Brasil, CEP: 01246-000. Tel: 11 3068 2921. E-mail: simone.silva@ial.sp.gov.br

²Programa de Aprimoramento Profissional (PAP) em Determinação de Contaminantes Químicos em Produtos e Materiais de Interesse à Saúde Pública, Instituto Adolfo Lutz, Secretaria de Saúde do Estado de São Paulo

Recebido: 20.09.2018 - Aceito para publicação: 06.08.2019

RESUMO

A defumação é um processo rotineiramente empregado nos alimentos como técnica de conservação, e uma maneira de proporcionar as características sensoriais específicas. Entretanto, o processo pode levar à formação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), que são compostos com dois ou mais anéis aromáticos condensados, alguns deles considerados carcinogênicos, mutagênicos e teratogênicos. Estudos em diversos países indicam que a contaminação de produtos cárneos defumados por diferentes HPAs é elevada e frequente, e desta maneira pode apresentar risco à saúde humana. O Brasil tem sido um dos maiores consumidores de carne no mundo, com tendência de aumentar o consumo de alimentos processados, e não é conhecida a real exposição da população aos HPAs pela ingestão de produtos cárneos defumados. Não há dados nacionais recentes quanto à contaminação destes alimentos com estes produtos. Considerando este panorama, o presente trabalho tem como objetivo realizar a revisão das principais metodologias analíticas, dos aspectos regulatórios e dos níveis de HPAs detectados em produtos cárneos defumados. Ademais, são apresentadas as maneiras de reduzir a contaminação dos alimentos por estes compostos.

Palavras-chave. hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, contaminantes, defumação, produtos cárneos, métodos de análise.

ABSTRACT

Smoking is a common process employed in food as a conservation technique, as well as to provide the specific sensory characteristics. However, the process can lead to the formation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), which are composed of two or more fused aromatic rings, and some of them are considered carcinogenic, mutagenic and teratogenic. Studies conducted in several countries indicate that contamination of smoked meat products by different PAHs is high and frequent, and it may cause a risk to human health. Although Brazil has been one of the largest consumers of meat in the world, with a trend to increase the consumption of processed foods, it has not known the real population exposure to PAHs by consuming the smoked meat products. There is no recent national data on the contamination of these foods. Considering this scenario, this study aimed at reviewing the main analytical methodologies, the regulatory aspects and the levels of PAHs found in the smoked meat products. In addition, the forms to reduce the contamination by these compounds are presented.

Keywords. polycyclic aromatic hydrocarbons, contaminants, smoking, meat products, methods of analysis.

INTRODUÇÃO

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) são substâncias formadas apenas por carbono e hidrogênio, que possuem na estrutura dois ou mais anéis aromáticos condensados¹. Tais substâncias são formadas a partir da combustão incompleta de matéria orgânica e podem ser originadas de fontes naturais ou antropogênicas, sendo a última a principal fonte de contaminação do ambiente e dos alimentos². Muitos deles já foram determinados em alimentos e são reconhecidos por organizações internacionais, como a *International Agency for Research on Cancer* (IARC) da Organização Mundial da Saúde, devido à alta toxicidade, sendo alguns classificados como carcinogênicos ou provavelmente carcinogênicos para humanos e animais^{3,4}. Estudos epidemiológicos com humanos e com animais de laboratório indicam que a exposição aos HPAs é um dos fatores responsáveis pelo aumento de câncer ao qual a população está exposta^{5,6}.

Os alimentos podem ser contaminados a partir da poluição ambiental ou de diferentes processos aos quais podem ser submetidos, especialmente a defumação. A contaminação pode estar relacionada ao contato do alimento com a fumaça produzida da queima incompleta da madeira, ou pela utilização do aroma de fumaça, usado com a intenção de dar características organolépticas específicas ao alimento defumado. Em produtos cárneos, a principal fonte de contaminação por HPAs tem sido relacionada à defumação, e alimentos como bacon, frango e linguiça apresentam maior quantidade desses compostos carcinogênicos⁷.

O Brasil está no *ranking* entre os maiores fabricantes de carnes no mundo, sendo o 2º maior produtor de carne bovina (10 milhões de toneladas) e o 4º de carne suína (3,7 milhões de toneladas)⁸. Além disso, segundo a Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF), o consumo alimentar médio *per capita* da carne bovina é de 63,2 g/dia, para carne suína de 8,5 g/dia, e o consumo médio de produtos cárneos embutidos (como linguiça, salsicha, mortadela e presunto) é de 7,9 g/dia, com pesquisas indicando uma tendência de aumento no consumo de alimentos processados e ultraprocessados^{8,9}.

Muitos estudos no exterior têm relatado quantidades elevadas de HPAs em vários produtos defumados. Portanto, este trabalho teve como objetivo realizar uma revisão de artigos publicados entre 2007 e 2017 sobre HPAs em carnes defumadas e derivados, abordando diferentes metodologias analíticas aplicadas para quantificá-los, avaliação da ocorrência desses contaminantes em alimentos analisados em diversos países e maneiras de reduzir a contaminação por esses compostos.

MATERIAL E MÉTODOS

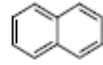
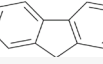
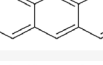
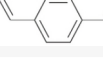
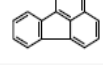
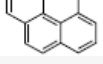
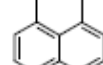
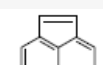

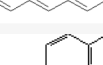
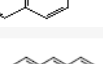
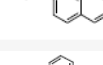
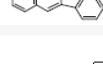
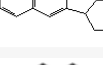
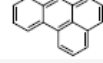
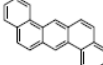
Para realizar a revisão, foram utilizadas as seguintes bases de dados: ScienceDirect, SibiUSP, PubMed, Biblioteca Virtual em Saúde (BVS), *Food Science and Technology Abstracts* (FSTA), Scielo, entre outras, usando os seguintes descritores e associações: “meat”, “sausage”, “smoked”, “polycyclic aromatic hydrocarbons” e “benzo(a)pyrene”. Foram selecionados artigos publicados entre 2007 e 2017. As publicações descritas neste trabalho com mais de 10 anos foram selecionadas considerando a relevância do artigo nesta área.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

HPA: formação e propriedades físico-químicas

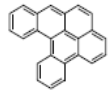
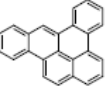
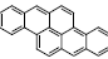
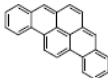
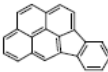
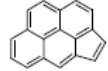

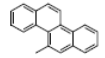
A **Tabela 1** apresenta os dados gerais (nome, abreviação, fórmula química, *CAS number*, massa molecular, estrutura e presença em lista das principais organizações internacionais) de alguns HPAs. Verifica-se que os HPAs são substâncias constituídas por anéis aromáticos condensados em arranjos lineares ou angulares, com duplas ligações conjugadas e, devido a esta característica, são persistentes no meio ambiente, de fácil disseminação e apresentam elevada toxicidade, na qual a lipofilicidade e toxicidade aumentam com o incremento da massa molecular. Já foram identificados mais de 100 compostos orgânicos com tais características, sendo estes pertencentes à classe de poluentes orgânicos persistentes (POPs) por serem tóxicos, persistentes, bioacumuláveis, e poderem causar efeitos negativos sobre a saúde e ao meio ambiente^{7,10}.

Tabela 1. Principais hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs)

HPAs	Abreviações	Fórmula Química	CAS number	Massa molar (g/mol)	Estrutura	Lista
Naftaleno	Naf	$C_{10}H_8$	91-20-3	128		EPA
Fluoreno	Flu	$C_{13}H_{10}$	86-73-7	166		EPA
Antraceno	Ant	$C_{14}H_{10}$	120-12-7	178		EPA
Fenantreno	Fen	$C_{14}H_{10}$	85-01-8	178		EPA
Fluoranteno	Flt	$C_{16}H_{10}$	206-44-0	202		EPA
Pireno	Pir	$C_{16}H_{10}$	129-00-0	202		EPA
Acenaftaleno	AcF	$C_{12}H_{10}$	83-32-9	154		EPA
Acenafetileno	Aci	$C_{12}H_8$	208-96-8	152		EPA
Benzo[a]antraceno	BaA	$C_{18}H_{12}$	56-55-3	228		EPA,SCF, CEC, EU
Criseno	Cri	$C_{18}H_{12}$	218-01-9	228		EPA, SCF, CEC, EU
Benzo[a]pireno	BaP	$C_{20}H_{12}$	50-32-8	252		EPA, SCF, CEC, EU
Benzo[b]fluoranteno	BbF	$C_{20}H_{12}$	205-99-2	252		EPA, SCF, CEC, EU
Benzo[k]fluoranteno	BkF	$C_{20}H_{12}$	207-08-09	252		EPA, SCF, EU
Benzo[g,h,i]perileno	BgP	$C_{22}H_{12}$	191-24-2	276		EPA, SCF
Dibenzo[a,h]antraceno	DaA	$C_{22}H_{14}$	53-70-3	278		EPA, SCF, EU
Benzo[j]fluoranteno	BjF	$C_{20}H_{12}$	205-82-3	252		SCF, EU

Continua na página 4/21

Continuação

HPAs	Abreviações	Fórmula Química	CAS number	Massa molar (g/mol)	Estrutura	Lista
Dibenzo[a,l]pireno	DlP	C ₂₄ H ₁₄	191-30-0	302		SCF, EU
Dibenzo[a,e]pireno	DeP	C ₂₄ H ₁₄	192-65-4	302		SCF, EU
Dibenzo[a,h]pireno	DhP	C ₂₄ H ₁₄	189-64-0	302		SCF, EU
Dibenzo[a,i]pireno	DiP	C ₂₄ H ₁₄	189-55-9	302		SCF, EU
Indeno [1,2,3-cd]pireno	IcP	C ₂₂ H ₁₂	193-39-5	276		EPA, SCF, EU
Ciclopenta [c,d]pireno	Cpp	C ₁₈ H ₁₀	27208-37-3	226		SCF, EU
Benzo[c]fluoreno	BcF	C ₁₇ H ₁₂	205-12-9	216		EU
5-metilcriseno	5mc	C ₁₈ H ₁₀	3697-24-3	242		SCF

Environmental Protection Agency (EPA), Scientific Committee on Food (SCF), European Union (EU): Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) e SCF, e Regulamento nº 835/2011 da Commission of the European Communities (CEC). Fontes: Lawal¹, Kim et al¹³, CEC³⁵ e Purcaro et al⁴²

A formação dos HPAs se dá a partir da combustão incompleta da matéria orgânica e é influenciada pela temperatura e pressão da queima, sendo a formação favorecida pela queima em temperaturas entre 500 e 900°C, principalmente acima de 700°C. Em elevadas temperaturas, a pirólise de compostos orgânicos produz fragmentos de moléculas e radicais livres que se combinam para dar origem aos HPAs⁷.

O mecanismo de formação dos HPAs não é ainda completamente conhecido, mas em temperaturas elevadas e baixas concentrações de oxigênio, compostos orgânicos de elevada massa molecular são fracionados em moléculas menores, contendo dois ou três anéis aromáticos e alguns radicais livres. Na pirossíntese, os HPAs e os radicais livres formados no processo anterior podem se reorganizar originando moléculas

maiores (contendo de quatro a seis anéis aromáticos) e mais estáveis⁷.

Toxicidade: mecanismos e efeitos causados por curta e longa exposição

Os primeiros indícios da carcinogenicidade dos HPAs foram relatados em 1775, quando foi observada uma maior incidência de câncer em limpadores de chaminés. Estudos posteriores conduziram à identificação de vários processos industriais e misturas complexas dotados de potencial mutagênico e/ou carcinogênico atribuído à presença destas substâncias, no qual a toxicidade varia de acordo com a estrutura¹¹.

A IARC é responsável pelo levantamento de pesquisas com o objetivo de identificar produtos químicos, misturas complexas, agentes físicos, biológicos e fatores de exposição que

apresentam risco de incremento de câncer, que são apresentadas na forma de monografias. Os produtos são classificados em grupos, de acordo com sua carcinogenicidade em humanos, sendo o Grupo 1 considerados carcinogênicos, o Grupo 2A prováveis carcinogênicos, o Grupo 2B possíveis carcinogênicos e o Grupo 3 não carcinogênicos. O único hidrocarboneto presente no Grupo 1 é o benzo[a]pireno, enquanto demais são alocados entre os Grupos 2A e 3^{3,4}.

A **Tabela 1** apresenta ainda a lista dos HPAs classificados como os contaminantes prioritários em diversas organizações e agências internacionais, como a *U.S. Environmental Protection Agency* (EPA), a *European Union* (EU), o *Scientific Committee on Food* (SCF) e a *Commission of the European Communities* (CEC). Há evidências que a mistura destes compostos é considerada mais carcinogênica para humanos¹².

O efeito causado para humanos e animais por tais contaminantes não depende apenas da estrutura do hidrocarboneto em questão, mas também do tempo e a forma de exposição. Quando ocorre o contato com tais compostos, em um curto prazo de exposição, foi relatado o comprometimento da função pulmonar em asmáticos e efeitos trombóticos em pessoas afetadas por doença cardíaca coronária, entretanto não há um conhecimento sobre a concentração e quais HPAs provocaram os sintomas. Exposições ocupacionais por curtos prazos a altos níveis de concentrações são conhecidas por resultar em sintomas como irritação ocular, náuseas, vômitos e diarreia. Já a exposição aos HPAs por longo prazo pode causar os efeitos carcinogênicos¹³.

Os HPAs são absorvidos rapidamente por meio da pele, por ingestão ou por inalação, e após serem absorvidos podem ser acumulados em vários órgãos, principalmente os que possuem maior porcentagem de lipídeos, como é o caso do fígado, trato gastrointestinal, rins, entre outros¹¹. Uma vez absorvidos pelo organismo, os hidrocarbonetos passam por processos com a intenção de diminuir a toxicidade do composto absorvido, mas a toxicidade pode ser aumentada devido à ativação dos metabólitos formados. Os HPAs sofrem metabolização por enzimas específicas formando metabólitos mais tóxicos que eles mesmos, já que estes podem se ligar ao DNA¹¹.

As principais vias de eliminação desses contaminantes após o metabolismo hepático são as fezes e urina, na qual o 1-hidroxipireno urinário e adutos de HPA-DNA são os biomarcadores mais comumente empregados em estudos de exposição aos HPAs. O 1-hidroxipireno foi introduzido como biomarcador para humanos, e já foi apresentado como avaliador por vários estudos¹⁴⁻¹⁶. É um biomarcador de fácil detecção, utilizado quando a avaliação da exposição externa é difícil e a coleta de sangue não é possível.

Adutos DNA-HPA também podem ser biomarcadores da exposição aos HPAs e do metabólito reativo final. Tais adutos podem ser encontrados em glóbulos brancos periféricos de adultos expostos aos HPAs. Entretanto, quantificar o aduto-DNA não é uma tarefa fácil, considerando que estão em concentrações muito baixas, a eficiência dos mecanismos biológicos de reparo, a diluição dos adutos devido a divisão celular e a dificuldade de amostragem do DNA humano, especialmente tendo-se em conta a grande variedade de órgãos-alvo dos diversos HPAs. Por isso, especial atenção tem sido dada aos estudos dos adutos formados nas reações entre os agentes carcinogênicos e proteínas, como indicadores dos níveis de reação com o DNA¹³.

Trabalhos publicados têm associado à ingestão diária de alimentos contaminados por HPAs ao risco de vários tipos de cânceres: colorretal, esôfago, laringe, pulmão, rim, pele e bexiga, e também à outras doenças não genotóxicas como diabetes e doenças cardiovasculares¹³.

Exposição humana aos HPAs

Os HPAs são facilmente disseminados no ar, solo, água e corpos aquáticos, e alguns foram identificados em altas concentrações nos alimentos e no meio ambiente¹³. A contaminação por HPAs ocorre principalmente pela combustão incompleta de combustíveis presentes nas fontes naturais e antropogênicas. As fontes naturais são limitadas por queimas naturais de florestas e erupções vulcânicas. Dentre as fontes antropogênicas, estão incluídos derramamento de petróleo, combustão de veículos, aviões a jato, incineração, queimadas, fumaça de cigarro, processos industriais, dentre outros². De acordo com Azeredo et al¹⁷, a fonte antropogênica é a

principal forma de contaminação dos alimentos e do meio ambiente.

O destino do contaminante irá depender das propriedades físico-químicas do HPA em questão e também das condições ambientais do local em que for emitido, geralmente os que possuem baixo peso molecular são encontrados na troposfera, enquanto que os de alta massa molecular são encontrados nas partículas presentes na atmosfera, já que estes são menos voláteis, entretanto a partição no ar e em partículas irá depender de suas características¹³.

Os HPAs ligados às partículas podem facilmente entrar em outros compartimentos ambientais a partir da sua deposição na biosfera terrestre, sendo então uma forma de contaminação dos alimentos. Solos também podem estar contaminados com HPAs, seja por deposição de partículas ou acidentes ambientais próximos, existindo a possibilidade de transferir esses contaminantes para as plantas por meio do sistema radicular e/ou fertilizantes, contaminando os alimentos vegetais, que são incorporados e transferidos ao longo da cadeia alimentar¹⁷.

Os ambientes marinhos também podem ser contaminados por HPAs pelo derramamento de petróleo ou outros efluentes derivados do carbono, por serem lipofílicos e não solúveis em água. Estes poluentes se depositam no sedimento ou também podem se acumular em tecidos adiposos de peixes e outros organismos marinhos, sendo outra maneira de exposição aos humanos¹⁸.

Contaminação em alimentos

Frutas e vegetais *in natura* podem ser contaminados de várias maneiras, considerando o fato dos HPAs estarem presentes na atmosfera, águas e solos. O material particulado contaminado pode se depositar na superfície destes alimentos, de forma mais específica na camada de cera superficial representando uma forma de exposição dos humanos aos HPAs¹⁷.

Os cereais também podem ser contaminados pela secagem dos grãos com gases de combustão, na qual a concentração de HPAs irá variar de acordo com o gás utilizado e as condições de queima. Além disso, Azeredo et al¹⁷ citam que solos contaminados também podem ser fonte de contaminação dos grãos.

Os óleos vegetais e gorduras são facilmente contaminados, já que os HPAs são compostos lipofílicos e dissolvidos nestes. De acordo com Silva et al¹⁹, as principais formas de contaminação são por absorção por plantas oleaginosas a partir do solo contaminado, deposição dos HPAs nas plantas, secagem direta das sementes com gases de combustão ou a partir de solventes a base de petróleo, usados na extração do óleo da semente.

No café, a torrefação dos grãos provoca a formação dos HPAs e cerca de 20-30% destes são transferidos para a bebida pelo método tradicional de preparo. Segundo Singh et al²⁰, o nível de contaminação por HPAs depende do tempo e grau de torrefação do café, no qual aqueles que utilizam um tempo maior e um grão mais torrado apresentam maiores níveis.

Bebidas alcoólicas, como cachaças, apresentam contaminação por HPAs no início de seu processamento, na queima da cana-de-açúcar durante a colheita, ou nas etapas finais, por meio de adição de caramelo (utilizado para a correção da coloração da bebida envelhecida) ou durante a maturação (envelhecimento) em tonéis de madeira cuja parte interior foi submetida à queima durante sua confecção²¹.

No grupo dos *fast-foods*, as pizzas são as mais contaminadas por BaP, principalmente se forem assadas no forno a lenha. Além de que outros ingredientes utilizados na fabricação de determinados alimentos podem ser fontes adicionais de contaminação por HPAs: a maionese, por exemplo, apresenta quantidade significativa de óleo de soja na composição, que pode ser uma forma de contaminação¹².

Nos alimentos de origem animal como carnes e peixes, o grau de contaminação por HPAs depende da quantidade de lipídeos do animal, metabolismo, estrutura corporal e textura, entre outros fatores que afetam na bioacumulação destes contaminantes por poluição ambiental¹¹. Também por meio de alimentação contaminada (rações, pastagens), os HPAs podem ser transferidos para tais produtos.

Segundo Garcia et al⁷, a exposição dos humanos pela ingestão de alimentos contaminados também pode ocorrer a partir de processos de preparação dos alimentos que envolvem a queima

incompleta da matéria orgânica, tais como grelhar, fritar, assar, entre outros.

Muitas variáveis devem ser consideradas para a formação destes compostos, tais como a posição do alimento em contato com o calor, a temperatura da queima, tempo do processo, fonte de calor, quantidade de gordura presente na carne, entre outros. Rose et al²² mostraram que o mais seguro é não deixar que a gordura do alimento entre em contato com a chama, e não expor o produto em altas temperaturas por tempo elevado. Alimentos mais gordurosos como bacon, carnes gordurosas e linguiças estão mais propensos à contaminação¹¹.

Rose et al²² analisaram alguns tipos de carnes de churrasco como bife de carne, frango, hambúrgueres e salsichas, e os HPAs foram encontrados em quase todas as amostras, algumas em níveis elevados, principalmente nos embutidos de carne suína e nos hambúrgueres assados na churrasqueira. Entretanto, embutidos de carne suína que estavam a uma distância menor da fonte de calor apresentaram níveis mais baixos, o que não era esperado pelos autores, e a justificativa dada foi em relação à textura da carne, ao teor de lipídeos, a composição da “capa”, que resultaram em uma menor absorção de HPAs nestas amostras.

No trabalho de Martorell et al²³, em que foram analisados os teores de HPAs em vários grupos de alimentos ingeridos no cotidiano da população de Catalônia, e estimada a contribuição de cada alimento para a ingestão diária total de HPAs dos indivíduos, verificou-se que carnes e derivados apresentaram os maiores índices de contaminação, com uma contribuição para a ingestão total de 49,2%, seguido por óleos e gorduras. Além disso, dentre as diversas categorias de alimentos estudadas entre 2007 e 2017, produtos cárneos defumados é um dos grupos com o maior número de publicações relacionadas²⁴.

Em suma, verifica-se que a exposição aos HPAs por meio dos alimentos pode ser significativa, o que coloca em risco a saúde da população, considerando a carcinogenicidade destes compostos.

Processo de defumação de alimentos

O processo de defumação é um método antigo de preparo, usado tradicionalmente em diversos alimentos como carne, peixe e queijo, com o objetivo de conferir um perfil organoléptico específico, além

de conservar o produto por mais tempo, uma vez que inativa enzimas e microrganismos que causam a degradação dos nutrientes^{24,25}.

No processo de defumação, ocorre a penetração de voláteis no alimento por meio da fumaça gerada pela queima de um material combustível²⁶ e a formação da cor e do aroma é função da interação das partículas da fumaça com o alimento. A quantidade de componentes depositados depende da temperatura, umidade, agitação e composição da fumaça²⁷.

De acordo com Ledesma et al²⁸, há diversas maneiras de defumação, nas quais variam a temperatura da defumação, o local de geração da fumaça e o combustível utilizado. Esses diferentes métodos podem ser classificados em dois tipos: direto (tradicional) e indireto (industrial).

No método tradicional, o alimento é disposto em prateleiras na mesma câmara em que a fumaça é gerada. A queima do material combustível pode ocorrer de duas formas, fumaça fria ou quente, sendo que na fumaça fria, após a geração da fumaça, o fogo não é mantido e, na fumaça quente, o fogo é continuamente alimentado para a produção de fumaça, que pode atingir temperaturas de 130°C²⁸.

No método industrial, a fumaça é gerada separadamente da câmara de defumação, a partir de diferentes métodos com condições mais controladas, por exemplo fricção, vapor de fumaça, fumaça fumegante e toque de fumaça²⁸.

Skaljic et al²⁹ avaliaram embutidos de carne suína defumados pelos dois diferentes métodos, tradicional e industrial, na qual foram alterados temperatura, tipo de madeira, umidade relativa e tempo de defumação, e os níveis mais elevados de HPAs foram encontrados em produtos defumados pelo método tradicional.

Com o objetivo de reduzir a contaminação dos alimentos por HPAs, técnicas alternativas estão sendo desenvolvidas para a defumação, que podem variar o fluxo de fumaça, a distância do alimento da fonte de queima, a temperatura utilizada, a densidade de fumaça, o gás de queima, entre outros. Segundo Alakali et al³⁰, a maioria dos fornos possui fluxo horizontal de fumaça e utilizam carvão ou biomassa como combustível. De acordo com os mesmos autores, são necessários fornos em que a densidade de fumaça não seja tão elevada e que

o consumo de combustível seja baixo, para que o aspecto desejado do alimento seja obtido em curto tempo e com melhor qualidade.

Vários tipos de materiais combustíveis podem ser utilizados para a produção da fumaça, como cascas de coco, espiga de milho, caroços de frutas, diferentes tipos de madeira (pinheiro, faia, carvalho) e carvão²⁸. A escolha do tipo de combustível a ser usado deve ser realizado com cautela, considerando que diferentes combustíveis podem gerar diferentes componentes na fumaça, especialmente os HPAs. Stumpe-Viksna et al³¹ avaliaram carnes defumadas com carvão e com dez diferentes tipos de madeira (macieira, amieiro, amieiro e *juniper maple*, abeto vermelho, aveleira, *plum*, álamo, cerejeira, romeira), e o uso da madeira de abeto vermelho resultou em concentrações de HPAs cerca de duas vezes superiores às concentrações encontradas com as madeiras de macieira e amieiro.

Uma alternativa para a defumação tradicional é o uso do aroma de fumaça, que oferece maior praticidade, pois é possível produzir produtos defumados com tempo reduzido e com quantidade menor de matéria-prima, além de ser possível controlar a concentração de aroma adicionado ao alimento. Esta é uma técnica bastante empregada pela indústria de alimentos. O aroma é proveniente da condensação da fumaça produzida pela queima controlada de serragem ou lascas de madeira, com quantidade mínima de oxigênio. Após a condensação, o líquido é refinado para retirar impurezas e compostos carcinogênicos (tais como os HPAs), e por fim é suavemente envelhecido, originando o produto final, que dá ao alimento características muito semelhantes ao da defumação tradicional²⁸.

Legislação para HPAs em alimentos

Em 2002, o SCF apresentou uma revisão sobre a toxicidade dos HPAs nos alimentos, e adotaram que o BaP seria o marcador da presença desses contaminantes. Em 2003, a legislação para alimentos da Comunidade Europeia estabeleceu valores máximos de BaP e BaA e as condições necessárias para comercializar aromas de fumaça utilizados para a preparação de alimentos defumados, bem como condições de produção, e procedimentos de avaliação dos aromas de fumaça³².

Os valores máximos de BaP e BaA estipulados para estes produtos foram de 10 µg/kg e 20 µg/kg, respectivamente. Em 2006, limites para BaP foram estabelecidos pela Comissão Europeia em alguns alimentos (óleos e gorduras, carnes e derivados de carnes defumados, peixes e crustáceos, moluscos bivalves, cereais processados, alimentos para bebês e alimentos dietéticos)³³

A partir de 2007, a *European Food Safety Authority* (EFSA) iniciou os estudos de reavaliação de marcadores de HPAs, em consequência de vários trabalhos apresentados entre os anos de 2005-2007, realizados em 18 países da União Europeia, na qual os resultados analíticos comprovaram a contaminação de vários alimentos por outros HPAs genotóxicos e tóxicos além do BaP. Assim, a soma dos 4 HPAs (BaP, BaA, BbF e Cri) ou a soma de 8 HPAs (BaP, BaA, BbF, BkF, Cri, BgP, IcP, DaA) foram estabelecidos como biomarcadores, além do BaP. Entretanto, comparando os resultados da soma de 8 HPAs e 4 HPAs, não houve diferença significativa entre os resultados, concluindo-se que a soma dos 4 HPAs já era suficiente para detectar a presença dos componentes prioritários³⁴.

Logo, a Comissão da Comunidade Europeia, com o Regulamento nº 835/2011³⁵, propôs novos limites máximos para o BaP e para a soma de 4 HPAs em diversos alimentos. Nesta legislação, ainda é apontado um valor separado para BaP, com a intenção de levantar dados para comparações futuras. O limite para BaP de 5,0 µg/kg e para os 4 HPAs de 30,0 µg/kg foi estabelecido para carne defumada e produtos a base de carne defumada, espadilhas defumadas, espadilhas defumadas em lata.

Este mesmo regulamento propôs, para carne defumada e produtos, que os valores fossem reduzidos gradativamente para BaP e para os 4 HPAs respectivamente para 2,0 µg/kg e 12,0 µg/kg, e estes limites deveriam prevalecer a partir de 2014. Entretanto, apesar da aplicação de boas práticas de defumação, certos países membros da União Europeia não conseguiram atingir os limites em produtos defumados pelo modo tradicional. Assim, os limites foram mantidos para os países e o prazo para redução foi prorrogado para 2017 pelo Regulamento nº 1327/2014³⁶.

No Brasil, há valores máximos estabelecidos para BaP para aromas de fumaça segundo a Resolução RDC nº 2/2007³⁷, a qual estabelece que estes produtos não devem transferir mais que 0,03 µg/kg de BaP ao alimento final. Há também limites máximos de BaP para água de consumo segundo Portaria nº 5/2017³⁸ (0,7 µg/L) e para óleo de bagaço de oliva, de acordo com a Resolução RDC nº 281/2003³⁹ (2 µg/kg).

Diferentes métodos para extração, limpeza e quantificação de HPAs em produtos cárneos defumados

Para que seja possível mensurar corretamente a quantidade de HPAs presente nas amostras, é necessário dispor de um método exato, preciso, seletivo, com boa reprodutibilidade e repetibilidade e com limites de detecção e quantificação que satisfaçam os níveis requeridos na legislação, sendo que quanto mais baixo forem estes limites, mais sensível deve ser o método.

Métodos de extração, limpeza e quantificação dos HPAs inovadores, com tempo e custo de análise reduzidos, vêm sendo desenvolvidos. A escolha da metodologia empregada depende da matriz, dos materiais e insumos disponíveis, do custo, entre outros fatores. A **Tabela 2** apresenta alguns métodos utilizados para extração, limpeza e quantificação de HPAs em produtos cárneos defumados, coletados da literatura científica. São empregados os métodos: saponificação a quente com solução metanólica de hidróxido de potássio (KOH) e extração líquido-líquido com ciclohexano para a extração em aroma de fumaça, carne e peixe defumado ou extração com ciclohexano em ultrassom em embutidos de carne suína, limpeza com sílica-SPE ou cromatografia clássica com C18 e DMSO, e quantificação em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detectores de fluorescência (FLD)/ultravioleta (UV) ou cromatografia gasosa (CG) acoplada ao espectrômetro de massas (MS)^{25,29,40-56}.

Tabela 2. Métodos utilizados para extração, limpeza e detecção dos HPAs

Referência	Ano	Tipo de alimento	Método de Extração	Método de Limpeza	Método de quantificação	LD (µg/kg)	LQ (µg/kg)
AOAC ⁴⁰	1974	Carnes, queijos, alimentos defumados, compostos dietéticos e bebidas	Saponificação a quente com solução etanólica de KOH e extração líquido-líquido com isoctano	Florisil-SPE	CCD-FLD/UV	-	0,5
Djinovic et al ⁴¹	2008	Presunto de carne bovina, presunto de porco, bacon com pele e sem pele, embutidos de carne suína	Extração acelerada por solvente a quente (ASE 200)	CPG e Sílica-SPE	Fast-CG/HRMS	0,001-0,077	-
Gómez-Ruiz et al ⁴³	2009	Embutidos de carne suína	Extração acelerada por solvente em elevada temperatura (ASE 300)	CPG e Sílica-SPE	CG-MS	-	-
Purcaro et al ⁴²	2009	Embutidos de carne suína, bacon defumado, carne de porco defumada e carne bovina defumada	Dois métodos usando n-hexano: digestão em micro-ondas e extração líquido-líquido	Sílica-SPE	CLAE-FLD	0,2-0,6	-
Farhadian et al ⁴⁴	2011	Carne bovina e frango	Saponificação com NaOH e adição de terra diatomáceas (refil extrelut)	Coluna Extrelut conectada ao PRS-SPE e Sílica-SPE	CLAE-FLD	0,01-0,03	0,04-0,1

Continua na página 10/21

Continuação

Referência	Ano	Tipo de alimento	Método de Extração	Método de Limpeza	Método de quantificação	LD (µg/kg)	LQ (µg/kg)
Roseiro et al ⁴⁵	2011	Chouriço grosso	Saponificação a quente com solução metanólica de KOH e extração líquido-líquido com n-hexano	Florisil-SPE	CLAE-FLD/UV	-	-
Chung et al ⁴⁶	2011	Presunto, bacon, embutidos de carne suína, frango grelhado e assado, carne bovina e suína	Saponificação a quente com solução de KOH (metanol:água 9:1, v/v) por 2h e após esse tempo adicionou-se n-hexano e água gelada. A mistura foi deixada <i>overnight</i>	Florisil-SPE	CLAE-FLD	0,003-0,2	-
Jahurul et al ⁴⁷	2013	Carnes e peixes	Saponificação com NaOH e adição de terra diatomáceas (refil extrelut)	Coluna Extrelut conectada ao PRS-SPE	CLAE-FLD	0,01-0,09	0,03-0,3
Kumosani et al ⁴⁸	2013	Peixe frito, frango frito e carne frita	Saponificação a quente com solução metanólica de KOH e extração líquido-líquido com ciclohexano, seguido por extração com N,N-dimetilformamida: água (9:1, v/v)	-	CLAE-FLD e confirmação por CG-MS	-	-
Skaljac et al ²⁹	2014	Embutidos de carne suína típico alemão	QuEChERS – uso de acetonitrila e sais de sulfato de magnésio e cloreto de sódio	QuEChERS (C18 + PSA)	CG-MS	0,3-0,6	-
Olatunji et al ⁴⁹	2014	Carne bovina, suína e filé de frango defumados	Saponificação a quente com solução metanólica de KOH e extração líquido-líquido com n-hexano:diclorometano (4:1, v/v)	Sílica-SPE	CG-FID	0,1-0,3	0,3-0,9
Chen et al ⁵⁰	2014	Diversas partes da carne (pele, gordura e parte magra) de porco defumadas	Digestão em microondas com acetonitrila e em seguida extração líquido-líquido com n-hexano	Cromatografia clássica com sílica e alumina	CG-MS	2,9-6,8	-
Surma et al ⁵¹	2014	Presunto de porco	QuEChERS- uso de acetato de etila e sais de sulfato de magnésio e cloreto de sódio	QuEChERS (PSA + C18)	CG-MS	0,0001-0,001	0,0003-0,0028
AOAC ⁵²	2014	Frutos do mar	Extração líquido-líquido com acetato de etila:água e uso de sulfato de magnésio e cloreto de sódio	Sílica-SPE	CG-MS	-	-
Ledesma et al ²⁵	2015	Chorizo (um defumado típico da espanha produzido com carne de porco, gordura de porco e especiarias, encapados em <i>casing</i> feitas do intestino do animal)	Extração usando ultrassom com n-hexano por 1 hora, seguida de extração líquido-líquido com n-hexano	Sílica-SPE	CG-MS	0,05	0,24

Continua na página 11/21

Continuação

Referência	Ano	Tipo de alimento	Método de Extração	Método de Limpeza	Método de quantificação	LD (µg/kg)	LQ (µg/kg)
Khorshid et al ⁵³	2015	Peixe tipo <i>Herring</i>	QuEChERS – uso de acetonitrila e sais de sulfato de magnésio e cloreto de sódio	Sílica-SPE	CG-MS	0,09-1,94	2,00
Chatterjee et al ⁵⁴	2016	Carne de peixe	QuEChERS- uso de acetonitrila e sais de sulfato de magnésio	PSA-C18 PSA-C18- CaCl ₂ PSA-C18- Florisil-CaCl ₂ - hexano	CG-MS/MS	0,001-0,004	0,002-0,013
Zachara et al ⁵⁵	2017	Peixe defumado, embutidos de carne suína, presunto defumado e tiras de frango defumado	Saponificação a quente com solução metanólica de KOH e extração líquido-líquido com ciclohexano	Cromatografia clássica com óxido de alumínio	CLAE-FLD	0,18	0,25
Lu et al ⁵⁶	2017	Produtos prontos para consumo, como fatias de frango, bacon, presunto defumado e embutidos de carne suína	Saponificação com NaOH e adição de terra diatomáceas (refil extrelut)	Coluna Extrelut conectada ao PRS-SPE e Sílica-gel	CLAE-FLD	0,06-0,08	0,12-0,16

Síglas: CCD-FLD/UV: Cromatografia em camada delgada acoplada com detector de fluorescência e detector ultravioleta, CLAE-FLD/UV: cromatografia líquida acoplada com detector de fluorescência e detector ultravioleta, CG-MS: Cromatografia gasosa acoplada com detector de massa, Fast-CG – HRMS: Cromatografia gasosa rápida acoplada a detector de massa de alta resolução, Fast-CG/MS: Cromatografia gasosa rápida acoplada a detector de massa, CG-MS/MS: Cromatografia gasosa acoplada com detector de massa tripló quadrupolo, CG-FID: Cromatografia gasosa com detector por ionização de chama, CPG: cromatografia de permeação em gel, Florisil-SPE: cartucho de extração em fase sólida empacotado com Florisil, Sílica-SPE: cartucho de extração em fase sólida empacotado com sílica, PRS-SPE: cartucho de troca iônica, PSA: amina primária secundária, C18: octadecilsilano

Para comprovar que o método é adequado para o fim proposto, permitindo obter resultados confiáveis nas análises laboratoriais, é sugerido que os laboratórios nacionais realizem a validação da metodologia analítica de acordo com o Guia do Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO), incluindo parâmetros de linearidade, seletividade, exatidão, precisão, limites de detecção e quantificação⁵⁷. Além disso, de acordo com Zelinkova e Wenzl⁵⁸, é possível também utilizar uma metodologia oficial, como as descritas pela *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC)^{40,52}.

O uso de materiais de referência certificados (MRC) tem sido uma exigência para comprovação de que a metodologia atende critérios de exatidão⁵⁷. Atualmente, existem disponíveis no mercado dois tipos de MRC de mexilhão oferecidos pelo *National Institute of Standards & Technology* (NIST), que apresentam como analitos os HPAs, SMR 1974 e SMR 2974a^{59,60}.

A AOAC⁴⁰ publicou o primeiro método oficial para determinação de BaP em diversas categorias de alimentos, como carne, alimentos defumados, queijos, compostos dietéticos e bebidas. No método utilizou-se saponificação com solução etanólica de hidróxido de potássio, seguido por uma etapa de partição entre isoctano, água e álcool etílico para a extração dos analitos da amostra. Após isso, realizou-se a purificação com cartucho de extração em fase sólida (SPE) florisil e extração líquido-líquido (ELL) com dimetilsulfóxido, na qual a fase orgânica foi separada. Os analitos foram quantificados por cromatografia em camada delgada com detecção no ultravioleta com confirmação em espectrofluorescência.

Grimmer e Bohnke⁶¹ foram um dos primeiros autores que propuseram metodologias para a determinação de HPAs em alimentos, incluindo dois grupos: (I) com alto teor proteico, como carne, peixe, aves e cereais e (II) óleos e gorduras. No grupo I, devido ao alto teor proteico das

amostras, foi necessária a saponificação dos produtos, na qual foi utilizado solução metanólica com hidróxido de potássio. A ELL foi realizada com metanol:água e ciclohexano, seguido por extração com dimetilformamida (DMF):água e a purificação foi realizada por cromatografia em sílica-gel seguida por cromatografia por exclusão de tamanho (Sephadex LH 20). Por fim, para a determinação e quantificação utilizou-se CG com detector de ionização de chama (FID). Para o grupo II, a etapa de saponificação não foi realizada, e a ELL foi feita apenas com DMF: água e ciclohexano.

O método AOAC 2014.08 é aplicado para determinação dos 16 HPAs em pescados e derivados, tais como molusco, camarão e peixe. Esta metodologia sugere a ELL com acetato de etila:água na presença de sulfato de magnésio e cloreto de sódio, utilizando o princípio do QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Rugged, Safe*). O extrato foi levado à purificação em cartuchos de SPE-sílica, e a determinação e quantificação realizada por cromatografia gasosa acoplada com detector de massa⁵².

Verifica-se que, com o decorrer dos anos, houve um avanço de tecnologias, com desenvolvimento de metodologias e preocupação com a sustentabilidade e meio ambiente. Assim, os métodos foram miniaturizados. Por exemplo, o método da AOAC, de 1974, utiliza cerca de um litro de iso-octano para a extração dos HPAs, e usava o benzeno para a eluição dos analitos, que é altamente tóxico⁴⁰. Grimmer e Bohnke⁶¹ realizavam a extração dos HPAs em funil de separação de dois litros com 800 mL de ciclohexano. Já nos métodos mais recentes, como o da AOAC⁵², utilizou-se cerca de 10 mL de acetato de etila, e a extração foi realizada em tubo de centrífuga de 50 mL. Portanto, é possível a determinação de vários HPAs (incluindo os 16 prioritários) com uma redução da quantidade dos reagentes e solventes, empregando produtos menos tóxicos.

Extração dos analitos

A **Tabela 2** apresenta um resumo das principais técnicas de extração para os HPAs, incluindo: saponificação a quente com solução metanólica de KOH e ELL com n-hexano ou iso-octano, digestão em micro-ondas com n-hexano, saponificação com hidróxido de sódio (NaOH) e adição de terras diatomáceas (refil extrelut),

QuEChERS (uso de acetonitrila e sais de sulfato de magnésio), entre outras⁴⁰⁻⁵⁶.

Para a determinação e quantificação dos HPAs é necessário realizar a extração dos analitos de interesse e remover os possíveis interferentes presentes na amostra. De acordo com Zelinkova e Wenzl⁵⁸, os lipídeos são as impurezas majoritárias em tecidos animais, sendo necessária a escolha de um método de extração que remova de forma eficiente os HPAs da matriz cárnea.

Um método de extração, frequentemente utilizado na literatura para cárneos, é a saponificação seguida de ELL com ciclohexano ou n-hexano^{42,45,62}. É um método eficaz, que apresenta recuperações elevadas e baixo custo. Uma vez que os HPAs tendem a ficar adsorvidos em componentes como proteínas e lipídeos, a adição de um composto alcalino com KOH é necessária, já que tais componentes não podem ser destruídos apenas na presença de álcool ou com elevação de temperatura. Então, a ELL solubiliza os HPAs livres na matriz e permite isolá-los⁶¹.

O QuEChERS é um método de extração que vêm sendo largamente estudado e utilizado nos últimos anos para HPAs, por ser rápido, usar pouca quantidade de solventes e gerar pequenas quantidades de resíduos⁶³. O QuEChERS tradicional foi inicialmente desenvolvido para extrair pesticidas de frutas e vegetais, ou seja, matrizes pouco gordurosas. Entretanto, várias adaptações (solventes, sais e fases dispersivas) do método vêm sendo realizadas para extrair analitos de matrizes gordurosas tais como peixes, frutas gordurosas, entre outros. O procedimento envolve partição líquido-líquido pela adição de acetonitrila e sais de sulfato de magnésio e cloreto de sódio, seguido pela etapa de limpeza utilizando um material dispersivo, sulfato de magnésio e água para remover os interferentes polares⁴².

O material Extrelut é outra inovação que está sendo amplamente utilizada como alternativa aos métodos tradicionais. Baseia-se em um material quimicamente inerte, composto por terras diatomáceas, vendido pré-embalado em cartuchos, no qual suas propriedades de superfície permitem que funcione como um suporte para a ELL de substâncias lipofílicas. Quando uma amostra aquosa é aplicada ao Extrelut, distribui-se como uma película fina ao longo da superfície e age como uma fase estacionária. A eluição de analitos

é realizada utilizando um solvente orgânico que é imiscível com água, por exemplo, éter dietílico, acetato de etila ou hidrocarbonetos halogenados⁶⁴.

Vários estudos mostram que os métodos mais recentes de extração, como o QuEChERS e a utilização do material Extrelut apresentam vantagens em relação à clássica ELL devido à maior praticidade, menor tempo, redução de reagentes e menor uso de vidrarias, além de resultados com recuperações e limites de detecção similares aos métodos tradicionais⁶⁵. Entretanto, esses novos métodos devem ser adaptados de acordo com cada matriz, por isso a escolha e a utilização dos mesmos deve ser criteriosa.

Limpeza e purificação dos analitos

A etapa de limpeza da amostra tem o intuito de retirar possíveis interferentes da análise, para que estes não interfiram na etapa de quantificação e separação dos analitos desejados.

Após a extração dos analitos da matriz carne e seus derivados, esta etapa é necessária para remover interferentes como ácidos graxos e trigliceróis⁵⁴. Segundo Purcaro et al⁴², a SPE é bastante utilizada pois apresenta elevada sensibilidade e é relativamente rápida. Existem vários adsorventes já empregados na análise de HPAs, sendo os principais: C18, florisil, sílica, estireno/divinilbenzeno (PS/DVB), ou uma mistura de C18-florisil. Na maioria dos trabalhos apresentados para produtos defumados (**Tabela 2**), a sílica foi usada como adsorvente, com a intenção de reter os interferentes (triacilgliceróis), e os HPAs foram eluídos com solventes como n-hexano ou diclorometano^{25,42,49,52,53}. Florisil como adsorvente foi empregado por Chung et al⁴⁶. De acordo com Purcaro et al⁴², quando amostras com alto teor de gordura são purificadas utilizando a sílica-SPE ou a florisil, obtém-se eficácia na remoção das impurezas, mas a recuperação é mais baixa com Florisil-SPE do que com a sílica.

Outra maneira de limpar os extratos é por cromatografia de permeação em gel (CPG), uma vez que, de acordo com Zelinkova e Wenzl⁵⁸, o CPG e o SPE constituem métodos prioritários para limpeza de extratos alimentares primários. O conceito de CPG é a separação a partir do tamanho das partículas (mais exatamente a massa molecular), o que confere simplicidade ao método. Existem vários géis de purificação, com diferentes tamanhos, e a amostra é eluída com solventes como diclorometano, n-hexano,

ciclohexano, acetato de etila, ou uma mistura deles⁵⁸. Geralmente, para retirar totalmente os interferentes da amostra, utiliza-se o CPG seguido de SPE, o que resulta em uma boa limpeza de diferentes matrizes, entretanto, a inclusão de diversas etapas de limpeza implica em maiores custos, uso de solventes, tempos de análise e possibilidade de perdas do analito durante o procedimento.

Determinação e quantificação dos analitos

A cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência e a cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas são as principais técnicas instrumentais utilizadas para a separação e quantificação dos HPAs presentes nos produtos cárneos e derivados (**Tabela 2**).

Nas análises por CLAE dos HPAs em produtos cárneos, o detector de fluorescência é o mais comum, que determina e quantifica a partir do fenômeno de fluorescência, gerando um espectro característico. A fluorescência é uma propriedade particular de cada hidrocarboneto, e depende da presença de um grupo fluoróforo. Cada analito é excitado e emite a energia em um comprimento de onda específico, a excitação ocorre nos comprimentos de 245-400 nm e a emissão de 280-550 nm⁶⁵.

Boa parte dos HPAs apresenta fluorescência, com exceção do Naf, Aci, Acf e Flu que, quando analisados por CLAE, são determinados usando o detector UV⁶⁶. Entretanto, o CLAE-FLD, em comparação com o CG-MS, apresenta limites de detecção superiores para todos os HPAs, uma vez que a sensibilidade desse método depende das propriedades de fluorescência, intrínsecas de cada substância⁶⁵.

A CG é utilizada para separação de compostos voláteis e termicamente estáveis, uma vez que a amostra deve ser volatilizada, e o gás utilizado como fase móvel, possibilita um rápido equilíbrio com a fase estacionária e então diminui o tempo de análise e oferece uma alta resolução. Os detectores mais utilizados na CG para análise de HPAs são o MS e o detector de ionização de chama. Com o CG-MS é possível obter baixos limites de detecção, sendo considerada uma técnica sensível e seletiva. Um aspecto crítico do CG-MS é a seleção do tipo de injetor, uma vez que é observada alta discriminação dos HPAs de alto peso molecular quando comparado com os de médio e baixo peso. Tal fato pode ser

causado por uma injeção com transferência desigual dos analitos na coluna, o que pode ser reduzido utilizando a técnica de injeção com temperatura programada de vaporização. A discriminação pode ser causada também devida forte interação desses analitos com a fase estacionária⁵⁸.

Várias análises em uma ampla faixa de matrizes complexas vêm sendo realizadas utilizando também CLAE-MS, mas o único modo de ionização que atinge seletividade e sensibilidade adequada aos HPAs é o de fotoionização a pressão atmosférica⁵⁸.

Levantamento da ocorrência de HPAs em alimentos defumados

Existe uma vasta gama de produtos defumados que são comercializados, e vários estudos mostraram que as concentrações de HPAs em diversos alimentos como bacon, carne de porco e embutidos de carne suína estão elevadas^{25,29,41-43,45,46,51,56}.

Na **Tabela 3** estão listadas as concentrações encontradas em amostras de carnes e derivados defumados (bovinos, suínos e pescados) de diversas referências para o BaP, os 4 HPAs prioritários, a soma destes e a soma de diversos HPAs analisados.

Tabela 3. Concentrações dos HPAs em diferentes produtos cárneos defumados

Referências	Ano	Produto	BaA (µg/kg)	Cri (µg/kg)	BbF (µg/kg)	BaP (µg/kg)	Σ4 HPAs (µg/kg)	Σtotal (µg/kg)
Bovinos								
Djinovic et al ⁴¹	2008	Presunto de carne bovina (defumado por 15 dias)	2,94	3,68	0,91	1,09	8,62	21,3 (16*) (BaA, Cri, BbF, BkF, BaP, IcP, DhP, BgP, DeP, DiP, DfP, 5mc, DaA, BcF, BjF, Cpp)
Purcaro et al ⁴²	2009	Carne bovina defumada	0,1	0,4	0,1	<LQ	0,2	10,3 (13*) (Flu, Flt, Fen, Ant, Pir, BaA, Cri, BbF, BkF, BaP, DhP, IcP, BgP)
Chung et al ⁴⁶	2011	Carne bovina	-	-	-	<LD	-	<LD
Olatunji et al ⁴⁹	2014	Carne bovina defumada	-	-	-	5,34	-	5,34 (1*) (BaP)
Suínos								
Camargo e Toledo ⁶⁹	2001	Bacon	0,44	<LD	0,36	0,44	1,24	10,29 (10*)
		Linguiça	0,61	<LD	0,41	0,12	0,65	3,72 (10*)
		Salsicha	<LD	<LD	0,26	0,32	0,58	3,96 (10*)
		Mortadela	<LD	<LD	0,14	0,10	0,24	1,52 (10*) (Flt, Pir, BaA, Cri, BeP, BbF, BkF, BaP, DaA, BgP)
Djinovic et al ⁴¹	2008	Presunto de porco	1,50	1,97	0,49	0,52	4,50	10,2 (16*)
		Bacon sem pele	2,87	3,60	0,91	1,40	8,42	22,7 (16*)
		Bacon com pele	1,45	1,92	0,50	0,55	4,42	12,2 (16*)
		Embutido de carne suína (<i>cajna</i>)	0,54	0,76	0,25	0,24	1,79	4,4 (16*)
		Embutido de carne suína (<i>sremska</i>)	1,36	2,11	0,33	0,33	4,13	10,5 (16*) (BaA, Cri, BbF, BkF, BaP, IcP, DhP, BgP, DeP, DiP, DfP, 5mc, DaA, BcF, BjF, Cpp)

Continua na página 15/21

Continuação

Referências	Ano	Produto	BaA (µg/kg)	Cri (µg/kg)	BbF (µg/kg)	BaP (µg/kg)	Σ4 HPAs (µg/kg)	Σtotal (µg/kg)
Purcaro et al ⁴²	2009	Embutido de carne suína	0,7	1,5	0,8	0,5	3,5	186,1 (13*)
		Bacon defumado	0,1	0,2	0,1	< LQ	0,4	7,8 (13*)
		Carne de porco defumada	< LQ	< LQ	0,1	< LD	0,1	5,1 (13*) (Flu, Flt, Fen, Ant, Pir, BaA, Cri, BbF, BkF, BaP, DhP, IcP, BgP)
Wretling et al ⁶⁷	2010	Presunto de porco	19,5	16,7	8,9	13,3	58,4	92,6 (15*)
		Bacon	15,6	17,8	6,1	9,36	48,9	91,6 (15*) (BjP, BgP, DaA, Ant, Pir, BaA, Cri, BbF, BkF, BaP, DhP, IcP, DeP, 5mc, Cpp)
Lorenzo et al ⁷⁰	2010	Embutidos de carne suína (Botillo)	0,5	0,9	0,4	0,4	2,2	29,4 (15*)
		Embutidos de carne suína (Androlla)	0,7	1,0	0,5	0,5	2,7	70,9 (15*) (Naf, Flu, Flt, Fen, Ant, Pir, BaA, Cri, BbF, BkF, BaP, DhP, IcP, BgP, DaA)
Roseiro et al ⁴⁵	2011	Chouriço grosso (cru)	0,79	0,6	0,55	0,26	2,20	244,34 (16*)
		Chouriço grosso (defumado por 40 dias)	17,98	19,48	3,48	3,53	87,37	3237,1 (16*) (Naf, Flu, Flt, Fen, Ant, AcF, Pir, BaA, Cri, BbF, BkF, BaP, DhP, IcP, BgP, DaA)
Chung et al ⁴⁶	2011	Embutido de carne suína	-	-	-	0,08	-	0,08 (1*)
		Presunto de porco	-	-	-	0,03	-	0,03 (1*) (BaP)
Skaljic et al ²⁹	2014	Embutido de carne suína (Petrovská Klábasa)	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	220 (13*) (Flu, Fen, Ant, AcF, Pir, BaA, Cri, BbF, BkF, BaP, IcP, BgP, DaA)
Surma et al ⁵¹	2014	Presunto de porco	< LD	0,0024	0,0015	0,0022	0,0061	0,026 (12*) (Flu, Fen, Ant, AcF, Pir, BaA, Cri, BbF, BkF, BaP, IcP, DaA)
Lu et al ⁵⁶	2017	Bacon	-	-	-	0,9	-	0,9 (1*)
		Embutido de carne suína	-	-	-	0,08	-	0,08 (1*) (BaP)
Pescados								
Wretling et al ⁶⁷	2010	Filé de peixe	182,5	168,9	64,1	75,5	491,0	1056,1 (15*) (BjP, BgP, DaA, Ant, Pir, BaA, Cri, BbF, BkF, BaP, DhP, IcP, DeP, 5mc, Cpp)

*Quantidade de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) analisados

Para as carnes bovinas, apenas o estudo de Olatunji et al⁴⁹ apresentou valor de BaP (5,34 µg/kg) acima do limite da legislação (2 µg/kg), os demais autores apresentaram valores de BaP e da soma dos 4 HPAs dentro dos limites permitidos.

Skaljic et al²⁹, Wretling et al⁶⁷ e Bogdanović et al⁶⁸ analisaram produtos suínos como bacon, embutidos de carne suína e presunto, e a maioria das amostras apresentaram concentrações abaixo do valor permitido para BaP e para a soma dos 4 HPAs. Entretanto para o BaP, o presunto (13,3 µg/kg) e o bacon (9,4 µg/kg) analisados por Wretling et al⁶⁷, e o chouriço após defumação de 40 dias (3,5 µg/kg) analisado por Roseiro et al⁴⁵ apresentaram concentrações acima do limite. A soma dos 4 HPAs também ultrapassou o valor permitido no presunto (58,4 µg/kg) e bacon (48,9 µg/kg) avaliados por Wretling et al⁶⁷, no chouriço após defumação de 40 dias (42,9 µg/kg) analisado por Roseiro et al⁴⁵. Dentre os HPAs analisados, o BaA e o Cri foram os mais frequentes e em concentrações mais elevadas (**Tabela 3**).

São poucos os trabalhos realizados com pescados defumados, mas os dados apresentados por Wretling et al⁶⁷ indicaram que os hidrocarbonetos que apresentaram maiores concentrações foram o BaA (182,5 µg/kg) e o Cri (168,9 µg/kg). A concentração média encontrada para BaP (75,5 µg/kg) está cerca de 35 vezes acima do permitido pela legislação (2 µg/kg), e a concentração para a soma dos 4 HPAs (491 µg/kg) também excedeu o limite estabelecido em 40 vezes (12 µg/kg).

Apesar das concentrações de BaP e a soma dos 4 HPAs estarem dentro do valor permitido pela legislação, a soma do total de HPAs analisados apresentaram valores superiores (**Tabela 3**). No embutido de carne suína analisado por Purcaro et al⁴², a soma de todos os HPAs (AcF, Flt, Naf, BaA, BbF, BaP, BkF, Cri, Aci, Ant, BgP, Flu, Fen, DaA, IcP, Pir) foi de 186,1 µg/kg em contraste com apenas 3,5 µg/kg da soma dos 4 HPAs. Da mesma forma, no embutido de carne suína analisado por Skaljic et al²⁹, o valor da soma total (Flu, Fen, Ant, AcF, Pir, BaA, Cri, BbF, BkF, BaP, IcP, BgP, DaA) foi 220 µg/kg enquanto a dos 4 HPAs apresentou-se abaixo do limite de detecção.

Outro fato a ser observado é que as amostras de bacon e presunto de porco analisadas na Suíça

por Wretling et al⁶⁷ estavam mais contaminadas que as analisadas por outros autores como Purcaro et al⁴², Chung et al⁴⁶, Lu et al⁵⁶. Possivelmente a maneira de defumação utilizada nesse país é um método tradicional, que combinado com o tipo de carne utilizado, contribuem para uma maior contaminação por HPAs.

Para prever o efeito do tempo de defumação do alimento na contaminação por HPAs, o trabalho de Roseiro et al⁴⁵ avaliou amostras de chouriço em diferentes dias de defumação (14, 22, 30 e 40). No 14º dia, a concentração de BaP foi de 0,68 µg/kg e a soma dos 4 HPAs prioritários de 6,35 µg/kg, já no 40º eram de 3,5 µg/kg e 42,9 µg/kg (acima dos valores permitidos pela legislação). Logo, pode-se concluir que quanto maior a duração da defumação, maior será a quantidade de HPAs presente.

No Brasil, não há estudos recentes sobre a ocorrência de HPAs em produtos cárneos defumados e derivados, e no único trabalho realizado por Camargo e Toledo⁶⁹ os valores de BaP e para a soma dos 4 HPAs em bacon, linguiça, salsicha e mortadela estavam todos abaixo do permitido pela legislação europeia. Entretanto, apresentou maior concentração de outros HPAs, sendo a soma dos HPAs analisados variando de 1,52-10,29 µg/kg.

Maneiras de reduzir a contaminação por HPAs em carnes defumadas e derivados

Apesar da ocorrência de contaminação por HPAs em carnes e derivados defumados, os benefícios da defumação para a prevenção da deterioração e contaminação biológica são relevantes, por isso a Comissão do *Codex Alimentarius* (CAC 68/2009) indicou as variáveis a serem controladas para minimizar a formação de HPAs nesse processo, dentre elas o método (direto ou indireto), o tipo de combustível, a temperatura empregada, o designer da câmara de defumação e a técnica utilizada para produção da fumaça²⁸.

Utilizando o método industrial (indireto) é possível reduzir a contaminação dos HPAs. Wretling et al⁶⁷ analisaram várias amostras de carnes defumadas e derivados e aquelas que foram defumadas pelo método indireto apresentaram valores de HPAs inferiores às defumadas pelo método tradicional.

O tipo de combustível influencia na quantidade de HPAs no alimento final, uma vez que estudos mostraram que a utilização de cascas de macieira e amieiro geraram menores quantidades de HPAs do que as que utilizaram madeira de abeto vermelho²⁸.

A contaminação por HPAs depende da temperatura usada na queima do combustível uma vez que, de acordo com Ledesma et al²⁵ (2015 *apud* Toth e Blaas, 1972), a quantidade de HPAs na fumaça durante a pirólise aumenta linearmente com o incremento da temperatura no intervalo de 400-1000 °C.

A distância e posição da carne ou derivado da fonte de fumaça também influenciam na quantidade de HPAs presentes. De acordo com Roseiro et al⁴⁵, a concentração diminui com o aumento da distância entre o alimento e a fonte.

Existem novas tecnologias para produção da fumaça de defumação utilizando método indireto. Foi observado que a técnica de fricção apresentou as menores concentrações de HPAs quando comparada com as outras técnicas, como fumaça fria, fumaça quente, por toque, entre outras Ledesma et al²⁸ (2016 *apud* Pohlmann et al, 2016).

O aroma de fumaça também pode ser uma alternativa para reduzir a contaminação por HPAs. Entretanto, deve-se considerar o tipo de madeira utilizada para produzir o aroma de fumaça uma vez que, no trabalho de Ledesma et al²⁸, o aroma produzido com madeira álamo (*Populus* spp.) apresentou concentrações elevadas de HPAs.

CONCLUSÃO

Vários métodos de extração, limpeza e quantificação de HPAs em produtos cárneos defumados e derivados são descritos na literatura. A escolha da metodologia empregada depende da matriz, dos materiais e insumos disponíveis, do custo, entre outros fatores, mas as etapas mais comuns na análise de HPAs em cárneos incluem: saponificação metanólica com KOH, seguida de ELL com n-hexano ou ciclohexano, limpeza com cartucho de extração de sílica e quantificação por cromatografia em CG-MS ou CLAE-FLD. No decorrer dos anos, verificou-se uma redução de insumos utilizados, como solventes, visando reduzir custos e tempo de análise, e é crescente a utilização

do QuEChERS considerando a praticidade e os inúmeros benefícios relacionados.

Em geral, as amostras de carnes defumadas apresentam valores dentro do limite estipulado pela legislação da Comunidade Europeia para BaP e a soma dos 4 HPAs, entretanto foram observados níveis elevados de HPAs em alguns grupos como produtos suínos e pescados. No Brasil, há poucos dados referentes a esses produtos e não há legislação específica para os mesmos, justificando a importância da realização de pesquisas sobre a ocorrência de HPAs nestes alimentos.

Como forma de reduzir a contaminação de produtos cárneos por HPAs, podem ser utilizados métodos indiretos na defumação, como a produção da fumaça por fricção, uso de combustíveis que formem menos HPAs, como cascas de macieiro e amieiro, ou a utilização de aromas de fumaça produzidos com estes materiais.

REFERÊNCIAS

1. Lawal AT. Polycyclic aromatic hydrocarbons. A review. *Cogent Environ Sci*. 2017;3(1):1339841. <https://doi.org/10.1080/23311843.2017.1339841>
2. Abdel-Shafy HI, Mansour MSM. A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: source, environmental impact, effect on human health and remediation. *Egypt J Petrol*. 2016;25(1):107-23. <https://doi.org/10.1016/j.ejpe.2015.03.011>
3. International Agency for Research on Cancer (IARC). Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans, overall evaluation of carcinogenicity. Some Non-heterocyclic Polycyclic aromatic hydrocarbons and some related exposures. V. 92. Lyon: IARC; 2010.
4. International Agency for Research on Cancer (IARC). Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans, overall evaluation of carcinogenicity. Chemical agents and related occupations. 100F. Lyon: IARC; 2012.
5. Purcaro G, Moret S, Conte LS. Overview on polycyclic aromatic hydrocarbons: occurrence, legislation and innovative determination in foods. *Talanta*, 2013;105:292-305. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2012.10.041>

6. Domingo JL, Nadal M. Human dietary exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of the scientific literature. *Food Chem Toxicol*. 2015;86:144-53. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2015.10.002>
7. Garcia LPA, Gonçalves BL, Scussel VM. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em alimentos: uma revisão. *PUBVET*. 2014;8(19):2292-450.
8. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA. EMBRAPA suínos e aves [Internet]. Santa Catarina, 2016. [acesso 2018 Ago 26]. Disponível em: <https://www.embrapa.br/suinos-e-aves/cias/estatisticas>
9. Pesquisa de orçamentos familiares 2008–2009: análise do consumo alimentar pessoal no Brasil/IBGE, Coordenação de Trabalho e Rendimento [Internet]. Rio de Janeiro (RJ): IBGE; 2011. [acesso 2018 Ago 26]. Disponível em: <https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv50063.pdf>
10. Morado CN. Avaliação da qualidade ambiental da bacia do rio Paraíba do Sul e reservatório do Funil, sudeste, Brasil, utilizando biomarcadores e bioindicadores em peixes. [dissertação de mestrado]. Rio de Janeiro: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro;2008. Disponível em: <https://tede.ufrjr.br/jspui/handle/tede/192>
11. Netto ADP, Moreira JC, Dias AEXO, Arbilla G, Ferreira LFV, Oliveira AS et al. Avaliação da contaminação humana por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) e seus derivados nitrados (NHPAs): uma revisão metodológica. *Quim Nova*. 2000;23(6):765-73. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422000000600010>
12. Villar-Navarro M, Martín-Valero MJ, Fernández-Torres RM, Callejón-Mochón M, Bello-López MA. Easy, fast and environmental friendly method for the simultaneous extraction of the 16 EPA PAHs using magnetic molecular imprinted. *J Chromatogr B*. 2017; 1044/1045:63-9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.12.009>
13. Kim KH, Jahan SA, Kabir E, Brown RJC. A review of airborne polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and their human health effects. *Environ Int*. 2013;60:71-80. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2013.07.019>
14. Strickland P, Kang D. Urinary 1-hydroxypyrene and other PAH metabolites as biomarkers of exposure to environmental PAH in air particulate matter. *Toxicol Lett*. 1999;108(2-3):191-9. [http://dx.doi.org/10.1016/S0378-4274\(99\)00089-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-4274(99)00089-2)
15. Tsai P, Shieh HY, Lee WJ, Lai SO. Characterization of PAHs in the atmosphere of carbon black manufacturing workplaces. *J Hazard Mater*. 2002;91(1-3):25-42. [http://dx.doi.org/10.1016/S0304-3894\(01\)00384-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0304-3894(01)00384-3)
16. Tsai PJ, Shih TS, Chen HL, Lee WJ, Lai CH, Liou SH. Assessing and predicting the exposures of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and their carcinogenic potencies from vehicle engine exhausts to highway toll station workers. *Atmos Environ*. 2004;38(2):333-43. <http://dx.doi.org/10.1016/j.atmosenv.2003.08.038>
17. Azeredo A, Toledo MCF, Camargo MCR. Determinação de benzo(a)pireno em pescados. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2006;26(1):89-93. <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612006000100015>
18. Azeredo M. Determinação de benzo(a)pireno em pescados comercializados em Campinas-SP. [dissertação de mestrado]. Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas;2001. Disponível em: <http://repositorio.unicamp.br/jspui/handle/REPOSIP/254999>
19. Silva SAD, Sampaio GR, Torres EAFDS. Optimization and validation of a method using UHPLC-fluorescence for the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in cold-pressed vegetable oils. *Food Chem*. 2017;221:809-14. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.11.098>
20. Singh L, Varshney JG, Agarwal T. Polycyclic aromatic hydrocarbons' formation and occurrence in processed food. *Food Chem*. 2016; 199:768-81. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.12.074>
21. Chávez IPA. Dos teores de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) em aguardentes acondicionadas em tonéis de carvalho. [dissertação de mestrado]. São Carlos (SP): Universidade de São Paulo;2015. Disponível em: <https://teses.usp.br/teses/disponiveis/75/75135/tde-16062015-092624/pt-br.php>
22. Rose M, Holland J, Dowding A, Petch S, White S, Fernandes A et al. Investigation into the formation of PAHs in foods prepared in the home to determine the effects of frying, grilling, barbecuing, toasting and roasting. *Food Chem Toxicol*. 2015;78:1-9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2014.12.018>

23. Martorell I, Perelló G, Martí-Cid R, Castell V, Llobet JM, Domingo JL. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in foods and estimated PAH intake by the population of Catalonia, Spain: temporal trend. *Environ Int*. 2010;36(5):424-32. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2010.03.003>
24. Sun Y, Wu S, Gong G. Trends of research on polycyclic aromatic hydrocarbons in food: a 20-year perspective from 1997 to 2017. *Trends Food Sci Technol*. 2019;83:86-98. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2018.11.015>
25. Ledesma E, Rendueles M, Díaz M. Spanish smoked meat products: benzo(a)pyrene (BaP) contamination and moisture. *J Food Compos Anal*. 2015;37:87-94. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfca.2014.09.004>
26. Ghasemzadeh-Mohammadi V, Mohammadi A, Hashemi M, Khaksar R, Haratian P. Microwave-assisted extraction and dispersive liquid-liquid microextraction followed by gas chromatography-mass spectrometry for isolation and determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked fish. *J Chromatogr A*. 2012;1237:30-6. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2012.02.078>
27. Silva JH. Aspectos tecnológicos relacionados à fabricação de bacon [trabalho de conclusão]. Porto Alegre (RS): Universidade Federal do Rio Grande Do Sul;2010. Disponível em: <https://lume.ufrgs.br/handle/10183/28414>
28. Ledesma E, Rendueles M, Díaz M. Contamination of meat products during smoking by polycyclic aromatic hydrocarbons: Processes and prevention. *Food Control*. 2016;60:64-87. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.07.016>
29. Skaljic S, Petrovic L, Tasic T, Lkonic P, Jokanovic M, Tomovic V et al. Influence of smoking in traditional and industrial conditions on colour and content of polycyclic aromatic hydrocarbons in dry fermented sausage “Petrovska klobasa” from Serbia. *Food Control*. 2014;40:12-8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.11.024>
30. Alakali JS, Adekoyeni OO, Alaka IC, Faasema J, Torvor T. Fabrication and performance evaluation of a hybrid fish smoking kiln. *J Food Process Preserv*. 2016;41:e12935. <https://doi.org/10.1111/jfpp.12935>
31. Stumpe-Viksna I, Bartkevics V, Kukare A, Morozovs A. Polycyclic aromatic hydrocarbons in meat smoked with different types of wood. *Food Chem*. 2008;110(3):794-7. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.03.004>
32. Commission of the European Communities. Commission Regulation (EC) N° 2065/2003 of the European Parliament and of the Council of 10 November 2003 on smoke flavourings used or intended for use in or on foods. *Official J Eur Union*. 2003;L309:1-8.
33. Commission of the European Communities. Regulation (EC) N° 1881/2006 of Commission of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Official J Eur Union*. 2006;L364:5-24.
34. European Food Safety Authority (EFSA). Scientific opinion of the panel on contaminants in the food chain on a request from the european commission on PAHs in food. *Eur Food Safety Authority J*. 2008; 724:1-114.
35. Commission of the European Communities. Regulation (EC) N° 835/2011 of Commission of 19 August 2011 amending Regulation (EC) No 1881/2006 as regards maximum levels for polycyclic aromatic hydrocarbons in foodstuffs. *Official J Eur Union*. 2011;L215:4-8.
36. Commission of the European Communities. Regulation (EC) N° 1327/2014 of Commission of 12 December 2014 amending Regulation (EC) No 1881/2006 s regards maximum levels of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in traditionally smoked meat and meat products and traditionally smoked fish and fishery products. *Official J Eur Union*. 2014;L358:13-4.
37. Ministério da Saúde (BR). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 2, de 15 de janeiro de 2007. Regulamento técnico sobre aditivos aromatizantes. *Diário Oficial da União, Brasília, DF*, 15 jan 2007. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/RDC_02_2007_COMP.pdf/c966caff-1c19-4a2f-87a6-05f7a09e940b
38. Ministério da Saúde (BR). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria de Consolidação nº 5, de 28 de setembro de 2017. Consolidação das normas sobre as ações e os serviços de saúde do Sistema Único de Saúde. *Diário Oficial da União, Brasília, DF*,

- 03 out 2017. Disponível em: <https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/marco/29/PRC-5-Portaria-de-Consolida----o-n---5--de-28-de-setembro-de-2017.pdf>
39. Ministério da Saúde (BR). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 281, de 06 de outubro de 2003. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 08 out. 2003. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/393845/Resolucao_RDC_n_281_de_06_de_outubro_de_2003.pdf/37e5b459-5f82-4a8b-8da7-ba29d4408174/
40. Association of Official Analytical Chemistry (AOAC). Official Methods of Analysis. AOAC 973.30. Polycyclic aromatic hydrocarbons and benzo[a]pyrene in food. 20th. Washington (DC): Association of Analytical Chemists;2015.
41. Djinic J, Popovic, A, Jira, W. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in different types of smoked meat products from Serbia. *Meat Sci*. 2008;80(2):449-56. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2008.01.008>
42. Purcaro G, Moret S, Conte LS. Optimisation of microwave assisted extraction (MAE) for polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) determination in smoked meat. *Meat Sci*. 2009;81(1):275-80. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2008.08.002>
43. Gómez-Ruiz JA, Cordeiro F, López P, Wenzl T. Optimisation and validation of programmed temperature vaporization (PTV) injection in solvent vent mode for the analysis of the 15+1 EU-priority PAHs by GC-MS. *Talanta*. 2009;80(2):643-50. <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2009.07.041>
44. Farhadian A, Jinap S, Hanifah HN, Zaidul IS. Effects of meat preheating and wrapping on the levels of polycyclic aromatic hydrocarbons in charcoal-grilled meat. *Food Chem*. 2011;124(1):141-6. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.05.116>
45. Roseiro LC, Gomes A, Santos C. Influence of processing in the prevalence of polycyclic aromatic hydrocarbons in a Portuguese traditional meat product. *Food Chem Toxicol*. 2011;49(6):1340-5. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2011.03.017>
46. Chung SY, Yettella RR, Kim JS, Kwon K, Kim MC, Min DB. Effects of grilling and roasting on the levels of polycyclic aromatic hydrocarbons in beef and pork. *Food Chem*. 2011;129(4):1420-6. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.05.092>
47. Jahurul MHA, Jinap S, Zaidul ISM, Sahena F, Farhadian A, Hajeb P. Determination of fluoranthene, benzo[b]fluoranthene and benzo[a]pyrene in meat and fish products and their intake by Malaysian. *Food Biosci*. 2013;1:73-80. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fbio.2013.03.006>
48. Kumosani TA, Moselhy SS, Asseri AM, Asser AH. Detection of polycyclic aromatic hydrocarbons in different types of processed foods. *Toxicol Ind Health*. 2013;29(3):300-4. <http://dx.doi.org/10.1177/0748233711433936>
49. Olatunji OS, Fatoki OS, Opeolu BO, Ximba BJ. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons [PAHs] in processed meat products using gas chromatography – Flame ionization detector. *Food Chem*. 2014;156:296-300. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.01.120>
50. Chen Y, Shen G, Su S, Shen H, Huang Y, Li T et al. Contamination and distribution of parent, nitrated, and oxygenated polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked meat. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2014;21(19):11521-30. <http://dx.doi.org/10.1007/s11356-014-3129-8>
51. Surma M, Sadowska-Rociek A, Cieslik E. The application of d-SPE in the QuEChERS method for the determination of PAHs in food of animal origin with GC-MS detection. *Eur Food Res Technol*. 2014;238(6):1029-36. <https://doi.org/10.1007/s00217-014-2181-4>
52. Association of Official Analytical Chemistry (AOAC). Official Methods of Analysis. AOAC 2014.08. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in Seafood. 20th. Washington (DC): Association of Analytical Chemists; 2015.
53. Khorshid M, Souaya ER, Hamzawy AH, Mohammed MN. QuEChERS Method followed by solid phase extraction method for gas chromatographic-mass spectrometric. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in fish. *Int J Anal Chem*. 2015;2015: ID 352610. <https://doi.org/10.1155/2015/352610>
54. Chatterjee NS, Utture S, Banerjee K, Shabeer TA, Kamble N, Mathew S et al. Multi-residue analysis of multiclass pesticides and polyaromatic

- hydrocarbons in fatty fish by gas chromatography tandem mass spectrometry and evaluation of matrix effect. *Food Chem*. 2016;196:1-8. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.09.014>
55. Zachara A, Galkowska D, Juszcak L. Contamination of smoked meat and fish products from Polish market with polycyclic aromatic hydrocarbons. *Food Control*. 2017;80:45-51. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.04.024>
56. Lu F, Kuhnle GK, Cheng Q. Heterocyclic amines and polycyclic aromatic hydrocarbons in commercial ready-to-eat meat products on UK market. *Food Control*. 2017;73(B):306-15. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.08.021>
57. Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO). Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos. DOQ-CGRE-008. Revisão 7, 2018. [acesso 2018 Ago 27]. Disponível em: http://www.inmetro.gov.br/credenciamento/organismos/doc_organismos.asp?tOrganismo=CalibEnsaio
58. Zelinkova Z, Wenzl T. The Occurrence of 16 EPA PAHs in food – a review. *Polycycl Aromat Compd*. 2015;35(2-4):248-84. <https://doi.org/10.1080/10406638.2014.918550>
59. National Institute of Standards and Technology (NIST). Standard Reference materials. SRM 1974. 2018. [acesso 2018 Ago 27]. Disponível em: https://www-s.nist.gov/srmors/view_detail.cfm?srm=1974
60. National Institute of Standards and Technology (NIST). Standard Reference materials. SRM 2974a. 2018. [acesso 2018 Ago 27]. Disponível em: https://www-s.nist.gov/srmors/view_detail.cfm?srm=2974a
61. Grimmer G, Bohnke H. Polycyclic aromatic hydrocarbon profile of high-protein foods, oils, and fats by gas chromatography. *J Assoc Off Anal Chem*. 1975;58(4):725-33.
62. Brasseur C, Brose F, Pirlot A, Douny C, Eppe G, Maghuin-Rogister G. Validation of the analytical procedure for the determination of polyaromatic hydrocarbons in smoke flavourings using high performance liquid chromatography coupled to an ultraviolet, diode array or fluorescence detector. *Accred Qual Assur*. 2007;12(10):535-42. <https://doi.org/10.1007/s00769-007-0295-0>
63. Kim L, Lee D, Cho HK, Choi SD. Review of the QuEChERS method for the analysis of organic pollutants: persistent organic pollutants, polycyclic aromatic hydrocarbons, and pharmaceuticals. *Trends Environ Anal Chem*. 2019;22:e00063. <https://doi.org/10.1016/j.teac.2019.e00063>
64. Part of avantor- VWR. Cromatografia, colunas-extração líquido-líquido Extrelut. [acesso 2018 Ago 27]. Disponível em: <https://pt.vwr.com/store/product/551127/extracao-liquido-liquido-extrelut-nt>
65. Kumar S, Negi S, Maiti P. Biological and analytical techniques used for detection of polyaromatic hydrocarbons. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2017;24(33):25810–27. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-0415-2>
66. Joseph M. HPLC detector options for the determination of polynuclear aromatic hydrocarbons. Varian Application Note. [acesso 2018 Ago 27]. Disponível em: <https://www.agilent.com/cs/library/applications/lc07.pdf>
67. Wretling S, Eriksson A, Eskhult GA, Larsson B. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in swedish smoked meat and fish. *J Food Compos Anal*. 2010;23(3):264-72. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2009.10.003>
68. Bogdanović T, Pleadin J, Petričević S, Listeš E, Sokolić D, Marković K et al. The occurrence of polycyclic aromatic hydrocarbons in fish and meat products of Croatia and dietary exposure. *J Food Compos Anal*. 2019;75:49-60. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2018.09.017>
69. Camargo RMC, Toledo MCF. Dietary polycyclic aromatic hydrocarbon intakes in some Brazilian metropolitan areas. *Rev Bras Toxicol*. 2001;14(2):23-30.
70. Lorenzo JM, Purriños L, Fontán MCG, Franco D. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in two spanish traditional smoked sausage varieties: “Androlla” and “Botillo”. *Meat Sci*. 2010;86(3):660-4. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2010.05.032>