

ESTUDO DA VIABILIDADE DO USO DA CROMATOGRAFIA GASOSA COM DETECÇÃO POR CAPTURA DE ELÉTRONS (GC-ECD) PARA ANÁLISE DE ACRILAMIDA EM ALIMENTOS

LÍVIA R. PEREIRA¹; EDUARDO VICENTE²; ADRIANA P. ARISSETO³

Nº 11208

RESUMO

A acrilamida, um provável carcinógeno humano, pode ser encontrada em diversos alimentos fritos, assados e torrados como resultado da reação entre o aminoácido asparagina e açúcares redutores. O objetivo deste projeto foi avaliar o potencial de aplicação da cromatografia gasosa com detecção por captura de elétrons (GC-ECD) para a determinação de acrilamida em alimentos de forma a disponibilizar uma técnica simples, rápida e de baixo custo em relação àquelas normalmente utilizadas que empregam espectrometria de massas. Para isso, diferentes condições cromatográficas, métodos de extração e procedimentos de derivatização foram testados de forma a definir os parâmetros ideais de análise. Resumidamente, a acrilamida é extraída do alimento com solução salina, o extrato obtido é desengordurado com hexano e, em seguida, derivatizado com bromato e brometo de potássio. O método mostrou aplicabilidade para diversas matrizes, como batata chips, biscoito salgado e café solúvel. Boa linearidade foi observada no intervalo de concentração de 0 a 500 ng/ml ($r^2 = 0,9958$). Limites de detecção e quantificação foram calculados em 1,8 e 6,0 µg/kg, respectivamente. Os coeficientes de variação estiveram entre 3,7 e 12,4% para repetibilidade e entre 9,4 e 21,9% para precisão intermediária. Entretanto, a recuperação média foi baixa, variando de 24 a 72%. A possibilidade de uso de padrão interno foi avaliada para corrigir a recuperação, mas nenhuma das substâncias testadas mostrou resultados satisfatórios. De maneira geral, a técnica de GC-ECD apresenta potencial para a análise de acrilamida em alimentos, mas o método requer ajustes para melhorar a recuperação.

¹ Bolsista CNPq: Graduação em Eng. de Alimentos, UNICAMP, Campinas-SP, liviarib@fea.unicamp.br.

² Colaborador: Pesquisador, CCQA/ITAL, Campinas-SP.

³ Orientadora: Pesquisadora, CCQA/ITAL, Campinas-SP.

ABSTRACT

Acrylamide, a probable human carcinogen, can be found in several fried, baked and roasted foods, as a result of the reaction between the amino acid asparagine and reducing sugars. The objective of this project was to evaluate the potential of application of the gas chromatography with electron capture detection (GC-ECD) for the determination of acrylamide in foods in order to provide a simple, fast and low cost technique compared to those normally used which employ mass spectrometry. For that, different chromatographic conditions, methods of extraction and derivatization procedures were tested in order to define the optimal analysis parameters. Briefly, acrylamide is extracted from food with saline solution. Then, the obtained extract is defatted with hexane and derivatized with potassium bromate and potassium bromide. The method demonstrated applicability to different matrices, such as potato chips, crackers and soluble coffee. Good linearity was observed over the concentration range from 0 to 500 ng/ml ($r^2 = 0.9958$). Detection and quantification limits were calculated at 1.8 and 6.0 µg/kg, respectively. The coefficients of variation were between 3.7 and 12.4% for repeatability and between 9.4 and 21.9% for within-laboratory precision. However, the average recovery was low, ranging from 24 to 72%. The possibility of using internal standard was evaluated to correct recovery, but the tested substances showed no satisfactory results. In general, the GC-ECD technique presents potential for the analysis of acrylamide in foods, but the method requires adjustments to improve recovery.

INTRODUÇÃO

A descoberta da presença de acrilamida em diversos alimentos fritos, torrados e assados, em abril de 2002 (TAREKE *et al.*, 2002), despertou preocupação na comunidade científica mundial devido aos potenciais riscos que sua ingestão poderia representar à saúde humana, uma vez que esta substância é classificada como um provável carcinógeno humano (IARC, 1994).

A maioria dos métodos analíticos disponíveis para a determinação de acrilamida em alimentos utiliza técnicas sofisticadas e de alto custo como a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) e a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial (LC-MS/MS), por serem capazes de oferecer sensibilidade e seletividade adequadas para este analito (WENZL *et al.*, 2007). A indisponibilidade destes equipamentos em muitos

laboratórios tem sido considerada um fator limitante para a obtenção de dados sobre a ocorrência de acrilamida, principalmente em países em desenvolvimento.

Tendo em vista a necessidade de um método analítico de menor custo, de forma que a maioria dos laboratórios pudesse implementar esta análise, ZHANG *et al.* (2006) relataram com sucesso o uso da cromatografia gasosa com detecção por captura de elétrons (GC-ECD) após derivatização da acrilamida com brometo e bromato de potássio. A utilização desta técnica foi posteriormente demonstrada em alguns estudos (ZHANG *et al.*, 2007; ZHU *et al.*, 2008).

Frente às evidências da possibilidade de utilização de GC-ECD para a determinação de acrilamida em alimentos e considerando que esta não é a técnica empregada na maioria dos trabalhos disponíveis na literatura, é importante que seu uso seja criteriosamente avaliado e que os resultados de trabalhos publicados anteriormente sejam corroborados por outros estudos. Assim, o objetivo deste projeto foi avaliar o potencial de aplicação da técnica de GC-ECD para a determinação de acrilamida em alimentos de forma a disponibilizar um método simples, rápido e de baixo custo para esta análise.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras

Três tipos de alimentos foram avaliados no presente estudo: batata frita ondulada (chips) sabor natural, biscoito salgado sabor presunto e café solúvel em pó. Os produtos foram selecionados em função dos dados disponíveis na literatura. As amostras foram adquiridas no comércio da cidade de Campinas-SP em outubro de 2010, homogeneizadas (se necessário) e armazenadas no refrigerador.

Reagentes e solventes

O padrão analítico de acrilamida (pureza 99%) foi adquirido da Sigma-Aldrich. Soluções de ácido sulfúrico 10%, bromato de potássio 0,1 M e tiosulfato de sódio 0,1 M foram obtidas da Dinâmica Química. Brometo de potássio, sulfato de sódio anidro e cloreto de sódio foram adquiridos da Synth e Vetec. Acetato de etila e hexano foram obtidos da Tedia. Trietilamina foi obtida da Acros Organics. Água foi purificada por osmose reversa (Gehaka).

Extração/limpeza

O procedimento de extração/limpeza foi feito com base no método descrito por ZHANG *et al.* (2006) com algumas modificações. Resumidamente, 2 g de amostra

foram pesados em um tubo de centrífuga de 50 ml onde foram adicionados 20 ml de solução de NaCl 2 M. Após agitação, a mistura foi centrifugada e o sobrenadante transferido para outro tubo de centrífuga de 50 ml. O extrato foi desengordurado com duas porções de 10 ml de hexano, transferido para um tubo graduado e o volume completado com solução de NaCl 2 M até 20 ml.

Derivatização

A derivatização foi feita com base no método descrito por NEMOTO *et al.* (2002). Após a extração e limpeza, o pH do extrato foi ajustado para <1 com ácido sulfúrico 10% e, em seguida, 10 g de brometo de potássio e 6 ml de bromato de potássio 0,1 M foram adicionados. A derivatização foi realizada a 4 °C durante 90 minutos, sendo a reação interrompida pela adição de 1 ml de tiosulfato de sódio 0,1 M. A acrilamida derivatizada foi extraída com duas porções de 10 ml de acetato de etila, o solvente foi então seco com sulfato de sódio, concentrado no rotaevaporador e evaporado em N₂ até 1 ml. Por fim, foram adicionados 100 µl de trietilamina antes da injeção de 2 µl no cromatógrafo gasoso.

Análise cromatográfica

Os experimentos foram conduzidos em um cromatógrafo a gás HP 6890 equipado com detector por captura de elétrons (Agilent Technologies). O injetor foi operado no modo *splitless*, a 250 °C. Nitrogênio foi utilizado como gás de arraste a uma vazão de 1 ml/min. A separação foi realizada em uma coluna capilar HP INNOWAX 60 m x 0,25 mm, *d_i* 0,25 µm (Agilent Technologies) e a seguinte programação de temperatura do forno foi aplicada: 50 °C (mantido por 1 min), 15 °C/min até 240 °C (mantido até o final da corrida). A temperatura do detector foi mantida em 250 °C.

Validação do método

O método foi avaliado de acordo com o documento de orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos DOQ-CGCRE-08 do Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO, 2007). A linearidade foi avaliada utilizando-se 6 pontos de calibração. Na ausência de uma matriz não contaminada, o limite de detecção (LOD) e o limite de quantificação (LOQ) foram determinados através de 7 replicatas do menor ponto da curva e calculados como 3 e 10 vezes o desvio padrão da resposta obtida, respectivamente. Repetibilidade, precisão intermediária e recuperação foram avaliadas para a amostra de batata chips em 3 níveis de fortificação (7 replicadas para cada nível).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Testes iniciais e definição das condições de análise

O primeiro objetivo deste trabalho foi verificar se a técnica de derivatização proposta por NEMOTO *et al.* (2002), realizada com bromato e brometo de potássio, produzia resultados satisfatórios. Para isso, padrões de acrilamida de diferentes concentrações foram derivatizados de acordo com o procedimento proposto e analisados por cromatografia gasosa com detecção por espectrometria de massas (GC-MS). A presença do pico da acrilamida derivatizada foi confirmada pelo seu espectro de massas, indicando que a reação é apropriada para a derivatização da acrilamida.

Os padrões derivatizados foram então injetados no GC-ECD. Duas colunas foram avaliadas: uma de característica polar (HP INNOWAX, polietileno glicol, Agilent Technologies) e outra de característica não polar (HP-5, 5% fenil - 95% polimetilsiloxano, Agilent Technologies). Os picos foram visualizados em ambas as colunas. Entretanto, a coluna polar se mostrou mais apropriada, apresentando pico definido e simétrico bem como tempo de retenção adequado (16,3 minutos).

Avaliação do método em amostras de alimentos

O procedimento descrito por NEMOTO *et al.* (2002), no qual a extração de acrilamida é realizada com água, foi inicialmente testado em amostras de café solúvel, batata chips e biscoito salgado. Os cromatogramas obtidos demonstraram a presença do pico da acrilamida derivatizada para as três amostras, indicando a aplicabilidade da técnica proposta. A **FIGURA 1** ilustra o cromatograma obtido para a amostra de batata chips.

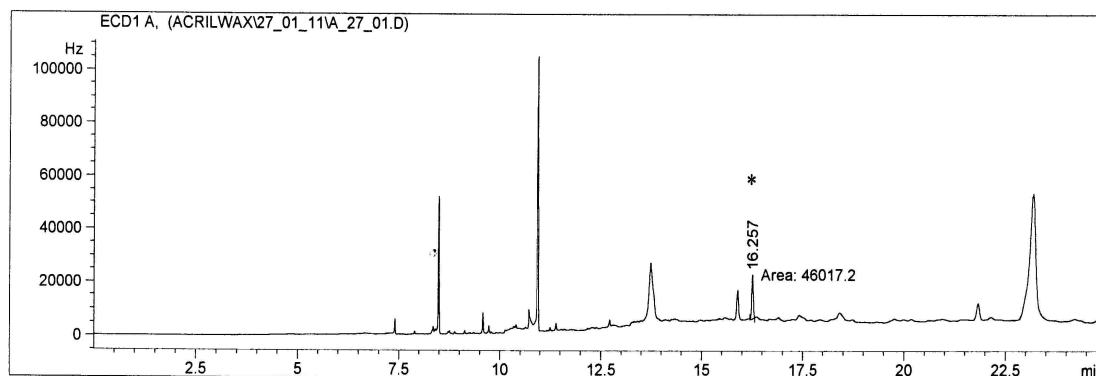


FIGURA 1. Cromatograma obtido para a amostra de batata chips (*pico da acrilamida derivatizada em 16,257 minutos).

As amostras de café solúvel, batata chips e biscoito salgado foram fortificadas com 125, 250 e 500 µg/kg de acrilamida antes da extração e avaliadas em relação à recuperação do analito, empregando-se uma curva de calibração previamente estabelecida com padrões de concentrações conhecidas (0-1000 ng/ml, $y = 750,77x - 12854$; $r^2 = 0,9991$). As taxas de recuperação obtidas variaram de 3 a 32% dependendo da matriz, indicando claramente a necessidade de modificação no método de extração.

Diferentes procedimentos foram avaliados na tentativa de melhorar a recuperação. Verificou-se que os melhores resultados (73% de recuperação) foram obtidos utilizando uma solução de NaCl 2 M para a extração de acrilamida, conforme sugerido por ZHANG *et al.* (2006). Esse aumento na recuperação observado com o uso de solução salina é provavelmente devido à desnaturação de proteínas e inibição do processo de emulsificação. Este procedimento foi então escolhido para ser avaliado em relação ao seu desempenho.

Validação do método

A **TABELA 1** apresenta os resultados obtidos nos experimentos de validação.

TABELA 1: Validação do método analítico para a análise de acrilamida.

Parâmetros			
Linearidade (r^2)	0 – 500 ng/ml (0,9958)		
LOD (n=7)	1,8 µg/kg		
LOQ (n=7)	6,0 µg/kg		
	Nível adicionado (µg/kg)	n	% (*)
Repetibilidade (CV)	10	7	11,5 (23,6)
	50	7	3,7 (23,0)
	250	7	12,4 (23,1)
Precisão intermediária (CV)	10	14	11,3 (23,3)
	50	14	9,4 (23,1)
	250	14	21,9 (22,4)
Recuperação	10	7	72
	50	7	43
	250	7	24

LOD: limite de detecção; LOQ: limite de quantificação; n: número de replicatas; CV: coeficiente de variação; *CV máximo recomendado, obtido pela equação de Horwitz: $CV = 2^{(1 - 0,5 \log C)}$, onde C = concentração do analito.

Boa linearidade foi obtida no intervalo de 0 a 500 ng/ml ($r^2 = 0,9958$). Os limites de detecção e quantificação obtidos demonstram o potencial da técnica de GC-ECD em apresentar alta sensibilidade. A repetibilidade e a precisão intermediária estiveram abaixo dos coeficientes de variação máximos recomendados e, portanto, são consideradas satisfatórias. Entretanto, as taxas de recuperação diminuíram com o aumento do nível de fortificação sendo que, para as concentrações de 50 e 250 µg/kg, esses valores encontram-se abaixo do que é normalmente recomendado, ou seja, entre 70 e 120% (EC, 2002).

Diante das baixas taxas de recuperação observadas para altas concentrações do analito, torna-se impossível o cálculo da concentração de acrilamida na amostra com confiabilidade. Uma maneira de solucionar esse problema seria fazer uso do método de padronização interna. Diferentes substâncias foram avaliadas para serem empregadas como padrão interno, entre elas metacrilamida, butiramida, ácido acrílico e acrilamida-C13. Porém, nenhuma delas mostrou potencial para ser utilizada. Isto sugere que o método escolhido, embora tenha apresentado linearidade, LOD, LOQ e precisão em níveis satisfatórios, possui limitações para a determinação quantitativa de acrilamida e necessita que sejam feitas modificações de forma a melhorar a recuperação para altas concentrações do analito.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos com a presente pesquisa mostram que a técnica de GC-ECD apresenta potencial para a análise de acrilamida em alimentos. O método mostrou aplicabilidade para diversas matrizes, boa linearidade, limites de detecção e quantificação adequados e precisão satisfatória. Entretanto, o método requer ajustes para melhorar a recuperação, de forma que a concentração de acrilamida no alimento possa ser determinada com confiabilidade.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPQ – PIBIC, pela bolsa concedida.

Ao CCQA – ITAL, pela oportunidade de estágio.

REFERÊNCIAS

EC (Commission Decision). Commission Decision 2002/657/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. **Official Journal of European Communities**, L 221:8-36.

IARC (International Agency for Research on Cancer). Acrylamide. In: IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, v. 60, 1994. Disponível em: <<http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol60/volume60.pdf>>. Acesso em: 05 de julho de 2011.

INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial). Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos DOQ-CGCRE-08. Revisão 2, Junho, 2007.

NEMOTO, S., TAKATSUKI, S., SASAKI, K., MAITANI, T. Determination of acrylamide in food by GC/MS using ^{13}C -labeled acrylamide as an internal standard. **Journal of the Food Hygienic Society of Japan**, v.46, n.2, p.371-376, 2002.

TAREKE, E., RYDBERG, P., KARLSSON, P., ERIKSSON, S., TÖRNQVIST, M. Analysis of acrylamide, a carcinogen formed in heated foodstuffs. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, n.17, p.4998-5006, 2002.

WENZL, T., LACHENMEIER, D. W., GÖKMEN, V. Analysis of heat-induced contaminants (acrylamide, chloropropanols and furan) in carbohydrate-rich food. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.389, p.119-137, 2007.

ZHANG, Y., DONG, Y., REN, Y., ZHANG, Y. Rapid determination of acrylamide contaminant in conventional fried foods by gas chromatography with electron capture detector. **Journal of Chromatography A**, v.1116, p.209–216, 2006.

ZHANG, Y., REN, Y., ZHAO, H., ZHANG, Y. Determination of acrylamide in Chinese traditional carbohydrate-rich foods using chromatography with micro-electron capture detector and isotope dilution liquid chromatography combined with electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v.584, p.322-332, 2007.

ZHU, Y., LI, G., DUAN, Y., CHEN, S., ZHANG, C., LI, Y. Application of the standard addition method for the determination of acrylamide in heated-processed starchy foods by gas chromatography with electron capture detector. **Food Chemistry**, v.109, p.899-908, 2008.