

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

**ESTUDO DO EFEITO DO PROCESSAMENTO NA
CONTAMINAÇÃO DE CANA-DE-AÇÚCAR E DERIVADOS POR
HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS**

SILVIA AMELIA VERDIANI TFOUNI

Engenheira de Alimentos

Mestre em Ciência de Alimentos

Profa. Dra. MARIA CECÍLIA DE FIGUEIREDO TOLEDO

Orientadora

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos
da Universidade Estadual de Campinas para obtenção
do título de Doutor em Ciência de Alimentos

Campinas – SP

2005

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. – UNICAMP

Tfouni, Silvia Amélia Verdiani
T319e Estudo do efeito do processamento na contaminação de cana-de-açúcar e derivados por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos / Silvia Amélia Verdiani Tfouni. – Campinas, SP: [s.n.], 2005.

Orientador: Maria Cecília de Figueiredo Toledo
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. 2. Cana-de-açúcar. 3. Processamento. 4. Açúcar. 5. Cachaça. I. Toledo, Maria Cecília de Figueiredo. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

Título em inglês: Study of the process effect on the contamination of sugar cane and its products by polycyclic aromatic hydrocarbons

Palavras-chave em inglês (Keywords): Polycyclic aromatic hydrocarbons, Sugar cane, Processing, Sugar, Cachaça

Titulação: Doutor em Ciências de Alimentos

Banca examinadora: Maria Cecília de Figueiredo Toledo

Mônica Cristiane Rojo de Camargo

Douglas Wagner Franco

Eduardo Vicente

João Ernesto de Carvalho

Antonio Marcos Pupin

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Maria Cecília de Figueiredo Toledo
(orientadora)

Dra. Mônica Cristiane Rojo de Camargo

Prof. Dr. Douglas Wagner Franco

Dr. Eduardo Vicente

Dr. João Ernesto de Carvalho

Dr. Antonio Marcos Pupin

Aos meus pais
Elia e Leda
Por tudo...

“Quem somos nós para falar de consequências,
se da fila interminável delas que incessantemente
vêm caminhando na nossa direção apenas
podemos ver a primeira.”

(José Saramago)

Agradecimentos

À Profa. Dra. Maria Cecília de Figueiredo Toledo pela orientação, incentivo, dedicação e aprendizado ao longo dos últimos anos;

à Usina São João e à Usina Jardest, pela imprescindível colaboração na realização deste trabalho. Agradeço em especial aos funcionários que me atenderam, Carlotti, Piteli, Wagner, Joel, Miguel, Paulo e Roberto, sempre muito atenciosos;

ao CNPq pela concessão de bolsa e taxa de bancada;

à Mônica C. R. de Camargo, Eduardo Vicente, Douglas W. Franco, João Ernesto de Carvalho, Marcos Pupin e Gil E. Serra pelas sugestões apresentadas para a redação final do trabalho;

ao Eduardo Vicente pelas análises no CG/MS, e à Karla Nery e à Natália Janzantti pelas tentativas;

ao meu irmão Fabio, sempre torcendo à distância;

aos amigos e colegas do Laboratório de Toxicologia pela amizade e companheirismo, em especial à Silvia Helena e à Rita.

às amigas Pricila, Adriana e Luzinha cuja amizade resiste ao tempo e à distância.

Sumário

Resumo Geral	1
Summary	2
Introdução Geral	3
Referências Bibliográficas	4
 Capítulo 1 – Revisão Bibliográfica	 7
1. Introdução	8
2. Fontes de obtenção de açúcar.....	8
2.1. Cana-de-açúcar	9
2.2. Mercado	9
2.3. Processamento	10
2.3.1. Colheita	10
2.3.2. Lavagem da cana e preparo para moagem	10
2.3.3. Moagem	11
2.3.4. Clarificação	11
2.3.5. Concentração	12
2.3.6. Turbinagem	13
2.3.7. Secagem	13
2.3.8. Acondicionamento (envase)	13
2.3.9. Refino	13
2.4. Tipos de açúcar	15
3. Cachaça	16
3.1. Mercado	16
4. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos – HPAs	17
4.1. Considerações gerais	17
4.2. Toxicidade	18
4.2.1. Metabolismo	19
4.3. HPAs em alimentos	20
4.3.1. HPAs em cana-de-açúcar e derivados	22

4.4. Métodos de análise	25
4.4.1. Extração	26
4.4.2. Determinação cromatográfica	26
4.5. Legislação	27
5. Referências bibliográficas	28

Capítulo 2 – Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in cane sugar	37
Abstract	38
1. Introduction	38
2. Material and methods	40
2.1. Standards and reagents	40
2.2. Samples	40
2.3. Extraction and clean up	40
2.4. HPLC	41
2.5. Quantification	41
2.6. Recovery study.....	42
3. Results and discussion	42
4. Conclusion	45
References	46

Capítulo 3 – Polycyclic aromatic hydrocarbons in cachaça by HPLC with fluorescence detection	51
Abstract	52
1. Introduction	52
2. Material and methods	54
2.1. Standards and reagents	54
2.2. Samples	54
2.3. Extraction and clean up	55
2.4. HPLC	55
2.5. Peak identity confirmation by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)	55

2.6. Quantification	56
2.7. Recovery study	57
3. Results and discussion	57
4. Conclusion	60
References	60

Capítulo 4 – Estudo do efeito do processamento na contaminação de cana-de-açúcar e derivados por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos

Resumo	66
Summary	66
1. Introdução	67
2. Materiais e métodos	70
2.1. Materiais	70
2.1.1. Amostras	70
2.1.2. Solventes e reagentes	71
2.2. Métodos	72
2.2.1. Extração e limpeza	72
2.2.2. Determinação cromatográfica	73
2.2.3. Recuperação	73
3. Resultados e discussão	74
4. Conclusões	80
5. Referências bibliográficas	80
Conclusão Geral	85

Anexos	87
Anexo 1 – Cromatograma por CLAE de padrões de HPAs	88
Anexo 2 – Cromatograma por CLAE de amostra de caldo misto	89
Anexo 3 – Cromatograma por CLAE de amostra de caldo decantado	90
Anexo 4 – Cromatograma por CLAE de amostra de lodo	91
Anexo 5 – Cromatograma por CLAE de amostra de xarope	92

Anexo 6 – Cromatograma por CLAE de amostra de “mel”	93
Anexo 7 – Cromatograma por CLAE de amostra de açúcar VHP	94
Anexo 8 – Cromatograma por CLAE de amostra de açúcar cristal (usina A) ...	95
Anexo 9 – Cromatograma por CLAE de amostra de açúcar mascavo	96
Anexo 10 – Cromatograma por CLAE de amostra de cachaça	97
Anexo 11 – Cromatograma por CG-MS referente aos padrões de HPAs	98
Anexo 12 – Cromatograma por CG-MS referente à amostra de cachaça	99
Anexo 13 – Espectro de massa do benzo(a)antraceno (biblioteca)	100
Anexo 14 – Espectro de massa do benzo(b)fluoranteno (biblioteca)	100
Anexo 15 – Espectro de massa do benzo(k)fluoranteno (biblioteca)	101
Anexo 14 – Espectro de massa do benzo(a)pireno (biblioteca)	101
Anexo 14 – Espectro de massa do dibenzo(a,h)antraceno (biblioteca)	102

Índice de tabelas e figuras

Capítulo 1 – Revisão Bibliográfica

Figura 1 – Fluxograma simplificado da produção de açúcar refinado	14
Figura 2 – Estruturas químicas de alguns HPAs	18
Tabela 1 – Níveis de benzo(a)pireno (B(a)P) reportados na literatura para alguns alimentos	22

Capítulo 2 – Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in cane sugar

Table 1 – Detection limit, recovery (R) and coefficient of variation (CV) of PAHs in sugar	42
Table 2 – Mean PAHs levels in cane sugar samples	43

Capítulo 3 – Polycyclic aromatic hydrocarbons in cachaça by HPLC with fluorescence detection

Table 1 – MS data acquisition parameters	56
Table 2 – Detection limit, mean recovery (R) and coefficient of variation (CV) of PAHs in cachaça	57
Table 3 – Levels of PAHs in cachaça from various Brazilian Federal States	59
Figure 1 – Mean values of summed PAHs in cachaça from different Brazilian Federal States	60

Capítulo 4 – Estudo do efeito do processamento na contaminação de cana-de-açúcar e derivados por hidrocarbonetos aromáticos policíclicos

Tabela 1 – Limites de detecção e quantificação dos HPAs estudados	74
Tabela 2 – Recuperação (R) e coeficiente de variação (CV) dos HPAs nas diversas matrizes	75
Tabela 3 – Teor de HPAs nos caldos de cana-de-açúcar colhida verde e queimada	75
Tabela 4 – Teor de HPAs nas diversas amostras coletadas nas usinas A e B	76
Figura 1 – Fluxograma simplificado da produção de açúcar cristal/VHP	77

Resumo Geral

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) são compostos formados a partir da queima incompleta de material orgânico e compreendem uma importante classe de contaminantes ambientais, muitos deles potencialmente carcinogênicos. No presente estudo amostras de diversos pontos do processo da indústria açucareira foram coletadas em duas usinas de açúcar e álcool do Estado de São Paulo e analisadas para a presença de cinco HPAs. As amostras de caldo misto, caldo decantado, xarope, massa de primeira, lodo, caldo filtrado, “mel” e açúcar (cristal e VHP) foram coletadas em três épocas distintas e analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detector de fluorescência quanto à presença de benzo(a)antraceno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno e dibenzo(ah)antraceno. Os resultados obtidos indicam que a prática da queima dos canaviais antes da colheita da cana é uma fonte de emissão de HPAs que podem ser transferidos para a cana-de-açúcar. A análise dos produtos intermediários do processamento da cana evidencia uma redução dos níveis de HPAs conforme a cana passa pelas diferentes etapas de processamento para a obtenção de açúcar, indicando um efeito positivo da clarificação, flotação e turbinagem na redução dos níveis desses compostos no produto final. De modo a gerar dados sobre a contaminação de subprodutos da indústria sucroalcooleira disponíveis comercialmente, foram analisadas 57 amostras de açúcar e 25 amostras de cachaça comercializadas na cidade de Campinas, SP. Os níveis da somatória dos HPAs analisados nas amostras de açúcar (cristal, refinado, mascavo, demerara e orgânico) variaram entre não detectado e 1,35 µg/kg e nas amostras de cachaça entre não detectado e 1,94 µg/L.

Palavras-chave: hidrocarboneto policíclicos aromáticos, cana-de-açúcar, processamento, açúcar, cachaça.

Summary

STUDY OF THE PROCESS EFFECT ON THE CONTAMINATION OF SUGAR CANE AND ITS PRODUCTS BY POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) constitute a large class of organic compounds formed during incomplete combustion or pyrolysis of organic matter. Many of these compounds are potentially carcinogenic. In the present study, samples of intermediary products of the cane sugar process were collected in 2 industries of the state of São Paulo and analysed for the presence of 5 PAHs. Samples of cane juice, clarified cane juice, syrup, mud, filtered cane juice, molasses and sugar (crystal and VHP) were collected in 3 different times of the year and analysed by high performance liquid chromatography (HPLC) with fluorescence detection for the presence of benz(a)anthracene, benzo(b)fluoranthene, benzo(k)fluoranthene, benzo(a)pyrene and dibenz(a,h)anthracene. Results indicate that the practice of burning sugar cane before harvest is a source of PAHs emission into the environment, and these compounds may be transferred to the sugar cane. Analysis of intermediary products of the process shows that PAHs levels decrease along the cane sugar process (cane juice, clarified cane juice, syrup and sugar). This indicates a positive effect of clarification, floatation and centrifugation steps on the PAHs levels reduction on the final product. In order to generate more data concerning sugar industry by-products, 57 samples of sugar and 25 samples of cachaça commercially available in the city of Campinas, SP, were analysed. The summed PAHs levels in different sugar samples (crystal sugar, refined sugar, demerara, brown and organic) ranged from not detected to 1.35 µg/kg, and in cachaça samples ranged from not detected to 1.94 µg/L.

Keywords: polycyclic aromatic hydrocarbons, sugar cane, processing, sugar, cachaça.

Introdução Geral

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) são compostos formados a partir da queima incompleta de material orgânico. Considerados importantes contaminantes ambientais amplamente distribuídos na natureza, os HPAs têm despertado interesse crescente no cenário internacional pelo fato de muitos deles serem genotóxicos e prováveis carcinógenos humanos (WHO, 1998).

A contaminação de alimentos por HPAs deve-se principalmente à poluição do ar e da água, à sua presença em solos terrestres e marinhos e a certos tipos de processamentos como defumação, torrefação e secagem direta com madeira (WHO, 1998). O Comitê Conjunto FAO/OMS de Peritos em Aditivos Alimentares (JECFA) recomendou, em 1991, a elaboração de estratégias por parte das indústria e dos consumidores, a fim de minimizar a exposição humana aos HPAs (WHO, 1991). Em sua 64^a reunião, o Comitê reavaliou os HPAs e concluiu que 13 compostos deste grupo são claramente carcinogênicos e genotóxicos e recomendou estratégias de forma a prevenir a contaminação de alimentos por HPAs (WHO, 2005).

A produção de açúcar no Brasil utiliza como matéria-prima a cana-de-açúcar, cuja colheita é geralmente feita após a queima dos canaviais. Este recurso pode resultar na contaminação da cana-de-açúcar por HPAs, com posterior transferência aos produtos derivados desta.

Ensaios realizados no Brasil por Serra *et al.* (1995), sobre a contaminação da cana-de-açúcar e derivados por HPAs recomendaram a importância e necessidade da realização de estudos complementares dirigidos aos diversos produtos intermediários e finais do processamento da cana-de-açúcar. Foi também evidenciado um efeito positivo do processo de refino na eliminação destes compostos.

Em pesquisa realizada por Camargo e Toledo (2002), o açúcar refinado se destacou quanto à presença de níveis elevados de 10 HPAs, dos quais 5 considerados carcinogênicos. Estimativas da ingestão diária destes compostos através da dieta identificaram os açúcares como o segundo grupo que mais

contribui para a ingestão diária de HPAs pela população brasileira, sendo responsáveis por 20% da ingestão de HPAs carcinogênicos (Camargo, 2001).

A literatura internacional não apresenta dados específicos sobre a contaminação de açúcar de cana por HPAs. Embora alguns autores tenham relatado a presença de benzo(a)pireno em açúcar e adoçantes (De Vos *et al.*, 1990) e em açúcar (Kazerouni, *et al.*, 2001), não está claramente identificado o produto ou alimento envolvido.

Esta pesquisa teve como objetivo analisar o caldo de cana-de-açúcar verde e queimada assim como os produtos intermediários e finais de seu processamento quanto à presença de benzo(a)antraceno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno e dibenzo(ah)antraceno. Através dos resultados gerados pretende-se elucidar se a prática de queima dos canaviais é responsável pela contaminação da cana e derivados, bem como identificar as etapas subsequentes do seu processamento que possam estar envolvidas com a eliminação e/ou redução dos níveis destes compostos.

O capítulo 1 deste trabalho apresenta uma revisão bibliográfica sobre o assunto. O artigo apresentado no capítulo 2 foi redigido de acordo com as normas da revista *Food Control*, o artigo do capítulo 3 de acordo com as normas da revista *Food and Chemical Toxicology* e o do capítulo 4 de acordo com as normas da revista *Ciência e Tecnologia de Alimentos*.

Referências Bibliográficas

- CAMARGO, M.C.R. *Avaliação da ingestão de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos através da dieta*. Campinas, 2001. 267p. Tese (Doutor em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- CAMARGO, M.C.R.; TOLEDO, M.C.F. Avaliação da contaminação de diferentes grupos de alimentos por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. *Brazilian Journal of Food Technology*, 5: 19-26, 2002.

- De VOS, R.H.; Van DOKKUM, W.; SCHOUTEN, A.; De JONG-BERKHOUT, P. Polycyclic aromatic hydrocarbons in Dutch total diet samples (1984-1986). *Food and Chemical Toxicology*, 28 (4): 263-268, 1990.
- KAZEROUNI, N.; SINHA, R.; CHE-HAN H.; GREENBERG, A.; ROTHMAN, N. Analysis of 200 food items for benzo[a]pyrene and estimation of its intake in an epidemiologic study. *Food Chemical Toxicology*, 39 (5), 423-436, 2001.
- SERRA, G.E.; PUPIN, A.M.; TOLEDO, M.C.F. Ensaios preliminares sobre a contaminação da cana-de-açúcar e derivados por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. *Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 29 (2): 134-137, 1995.
- WHO. Evaluation of certain food additives and contaminants (37th report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives). *Technical Report Series*, n.806, 1991.
- WHO. Selected non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environmental Health Criteria*, Geneva, n.202, 1998.
- WHO – World Health Organization. *Summary and conclusions of the sixty-fourth meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*. Rome, 47p, 2005.

Capítulo 1

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Revisão Bibliográfica

1. Introdução

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) constituem uma ampla classe de compostos formados a partir da queima incompleta de material orgânico e são considerados importantes contaminantes ambientais. Eles têm sido muito estudados nos últimos anos devido ao fato de muitos compostos desse grupo serem potencialmente carcinogênicos (WHO, 1998; WHO, 2005).

A contaminação de alimentos por HPAs deve-se principalmente à poluição do ar e da água, a sua presença em solos terrestres e marinhos, e a sua formação durante o processamento de alimentos envolvendo defumação, torrefação e secagem direta com madeira (WHO, 1998).

Em algumas áreas geográficas, incêndios florestais e vulcões são a principal fonte de emissão de HPAs no meio-ambiente (WHO, 1998). No Brasil, a produção de açúcar utiliza como matéria-prima a cana-de-açúcar, cuja colheita é feita geralmente após a queima dos canaviais. Este recurso é utilizado para eliminar a palha e a ponteira da cana e facilita a colheita manual, permitindo um maior acesso à cultura, dobrando a quantidade média de cana cortada por trabalhador. Além disso, protege os cortadores de cana de folhas afiadas, insetos e cobras e aumenta o teor de açúcar devido à evaporação da água (Serra *et al.*, 1995; Zamperlini *et al.*, 2000; Furtado, 2002; Godoi *et al.*, 2004). Em contrapartida, a queima dos canaviais pode resultar na contaminação da cana-de-açúcar por HPAs, com posterior transferência aos produtos derivados desta.

2. Fontes de obtenção de açúcar

De acordo com a Resolução CNNPA nº 12, de 30 de março de 1978 (Brasil, 1978) o açúcar é a sacarose obtida a partir de *Saccharum officinarum*, ou de *Beta alba*, L., por processos industriais adequados. O açúcar pode, portanto, ser obtido a partir de duas fontes: cana-de-açúcar e beterraba. O açúcar proveniente da beterraba é produzido principalmente nos países da Europa, que fornecem ao mercado europeu 16 milhões de toneladas de açúcar de beterraba por ano,

representando 90% do açúcar consumido localmente (EUFIC, 2005). O açúcar produzido no Brasil utiliza a cana-de-açúcar como matéria-prima e tem um custo de produção mais baixo do que aquele obtido da beterraba.

2.1. Cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar é originária do norte da Índia, de onde teria ido para a China e o Oriente Médio. Os árabes a levaram para o norte da África e para o sul da Europa, e os chineses a levaram para Java e Filipinas. Cristóvão Colombo introduziu-a na América espanhola, trazendo-a da Ilha da Madeira. A cultura começou em São Domingos, seguindo para Cuba, Antilhas e Estados Unidos (Martucci, 1983). No Brasil, a cultura da cana teve início em 1522 na capitania de São Vicente, com canas provenientes da Ilha da Madeira (Júnior & Borges, 1965).

A cana-de-açúcar pertence à família das Gramíneas, gênero *Saccharum* L., e possui um grande número de variedades. A fertilidade das sementes do gênero *Saccharum* foi descoberta em 1920, simultaneamente em Java e Barbados, possibilitando cruzamentos e hibridações visando a obtenção de novas variedades dotadas de resistência às doenças e pragas, e mais ricas em sacarose (Martucci, 1983).

2.2. Mercado

O agronegócio sucroalcooleiro brasileiro movimenta cerca de R\$ 40 bilhões por ano, o que corresponde a aproximadamente 2,35% do PIB nacional. O setor gera cerca de 3,6 milhões de empregos diretos e indiretos, envolvendo 72.000 agricultores (Procana, 2005).

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar e de açúcar, seguido pela Índia e Austrália. O Estado de São Paulo é responsável por mais de 60% da produção nacional de açúcar e álcool e por 70% das exportações. Em média, 55% da cana brasileira são convertidos em álcool e 45% em açúcar. Planta-se cana no Centro-Sul (Estados de São Paulo, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso e Paraná) e no Norte-Nordeste, o que permite dois períodos de safra: de

maio a novembro no Centro-Sul e de setembro a março no Norte-Nordeste. Produz-se, portanto, o ano todo (UNICA, 2005).

Na safra 2004/2005, as usinas brasileiras processaram 380 milhões de toneladas de cana-de-açúcar produzindo 24 milhões de toneladas de açúcar. O parque sucroalcooleiro brasileiro possui 304 indústrias em atividade, sendo 227 na região centro-sul e 77 na região norte-nordeste. A produção de açúcar brasileiro é destinada aos mercados interno e externo, e para o ano de 2005 está prevista a exportação de 14,3 milhões de toneladas de açúcar. Atualmente, a Rússia é o maior importador de açúcar brasileiro (Procana, 2005; UNICA, 2005).

O mercado interno, por sua vez, divide-se em doméstico e industrial. No primeiro prevalecem os açúcares cristal e refinado; no industrial, os açúcares demerara e líquido. O consumo brasileiro anual é de 52 kg per capita, enquanto a média mundial está em torno de 22 kg per capita (UNICA, 2005).

2.3. Processamento

O processamento da cana-de-açúcar para a produção de açúcar segue basicamente as etapas descritas a seguir (Martucci, 1983; Marafante, 1993; Masson, 1999; Mafra, 2004).

2.3.1. Colheita

A cana-de-açúcar pode ser colhida verde (crua) ou queimada (após a queima do canavial), manualmente ou mecanicamente, inteira ou picada. A quantidade de cana cortada não deve ser muito maior do que a capacidade de processamento da usina, uma vez que logo após o corte começa o processo de inversão da sacarose. A estocagem de cana deve ser feita no máximo por 2 dias, de forma a evitar a perda de açúcar por decomposição bacteriológica (UNICA, 2005).

2.3.2. Lavagem da cana e preparo para moagem

Ao chegar na usina a cana é analisada quanto ao teor de sacarose e segue para o processamento. Algumas usinas fazem uso de um sistema de lavagem da

cana antes da moagem, outras não. A cana é constituída por uma parte dura (casca e nós) que contém cerca de 15% do caldo e de uma parte mole (medula) que contém 85% do caldo. O preparo consiste em picar e desintegrar a cana, rompendo as células que contêm o caldo rico em açúcar. Essa operação facilita a extração do caldo pela moagem, aumentando a capacidade das moendas e produzindo um bagaço de maior aceitação à embebição. Para o preparo da cana pode ser utilizado um conjunto de facas rotativas ou um desfibrador, ou ambos trabalhando em conjunto.

2.3.3. Moagem

O caldo misto da cana é obtido pelo processo de esmagamento da cana-de-açúcar efetuado nas moendas. A cana desfibrada é submetida a sucessivas prensagens, nas quais se extrai 60% do caldo contido no interior das fibras. Os 40% restantes não são extraídos por simples prensagem, sendo necessário fazer a embebição do bagaço, ou seja, adiciona-se água ao bagaço, que penetra no interior das fibras, diluindo o caldo presente que é retirado no rolo subsequente.

O caldo de cana extraído nas moendas (caldo misto) contém materiais em suspensão, como areia e terra, que são removidos por peneiras.

2.3.4. Clarificação

O caldo de cana apresenta em sua composição diversos tipos de compostos como: colóides, proteínas, pectina, clorofila, antocianinas, gomas, entre outros. A clarificação consiste em um conjunto de operações cuja finalidade é retirar a maior quantidade de substâncias presentes no caldo que não seja a sacarose. A clarificação varia de acordo com tipo de açúcar que se deseja obter. Por exemplo, a usina pode produzir um açúcar bruto inferior que é enviado à refinaria e passa por um processo de flotação antes de ser introduzido no mercado, ou produzir um açúcar mais puro para aplicação direta na indústria alimentícia.

A clarificação do caldo envolve basicamente as etapas de sulfitação, calagem e adição de compostos poliméricos.

Sulfitação: Na etapa de sulfitação, adiciona-se SO_2 (dióxido de enxofre) ao caldo, o que diminui o pH do mesmo, que passa de 5,5 a 4,5. Com este valor de pH alguns colóides floculam, mas a ação não é aproveitada porque o caldo não é filtrado em seguida. O SO_2 é produzido na usina através da queima direta de enxofre.

Calagem: Logo após a sulfitação o caldo recebe leite de cal para neutralização do ácido sulfuroso, o pH sobe entre 7,0 e 7,2 e são formados os precipitados de sulfito de cálcio, entre outros. Estes precipitados são insolúveis e ao decantar arrastam os colóides que floculam nessa faixa de pH.

A adição de fosfatos ao caldo auxilia na eliminação do cálcio através da formação do fosfato de cálcio. Os fosfatos aumentam a floculação dos colóides e facilitam a decantação, resultando em um produto final de melhor qualidade e menos sujeito ao escurecimento.

O caldo é aquecido em tanques a temperaturas na faixa de 100°C a 105°C , sendo então adicionado de compostos poliméricos e, a seguir, ocorre a decantação. Obtido o caldo clarificado (ou decantado), este segue para a etapa de concentração. As impurezas resultantes do processo de decantação formam o lodo que, após passar por um processo de filtração, resulta no caldo filtrado, que retorna ao processamento na etapa de sulfitação; e na torta, que é enviada ao canal e utilizada como adubo.

2.3.5. Concentração

A concentração visa a remoção da maior parte da água contida no caldo e ocorre em duas fases: evaporação e cozimento.

Evaporação: Na evaporação o caldo é concentrado em evaporadores à vácuo até a consistência de xarope com 52 a 65° Brix. O xarope, antes de seguir para o cozimento, passa por uma etapa de flotação. Nessa etapa são adicionados

compostos poliméricos que auxiliam na limpeza do xarope, eliminando parte dos compostos não-açúcar restantes.

Cozimento: O xarope proveniente da flotação segue para os tanques de espera que alimentam os cozedores. O xarope é colocado no cozedor e concentrado até a supersaturação (85 a 95° Brix) e o aparecimento dos cristais. Continua-se a alimentação da massa supersaturada com xarope, os cristais vão crescendo e o volume final aumentando. Ao final, tem-se uma massa densa chamada massa cozida, que é uma mistura de cristais de sacarose e “mel”. Nesta etapa também podem ser utilizadas “sementes” para controlar o tamanho e a homogeneidade dos cristais.

2.3.6. Turbinagem

Para separar o açúcar do “mel” são utilizadas turbinas que fazem essa dissociação em apenas alguns minutos. Durante a turbinagem o açúcar é lavado para retirada do “mel” que recobre os cristais, obtendo-se um produto mais claro e de polarização mais alta.

2.3.7. Secagem

Os cristais são secos em evaporadores que utilizam ar quente em contracorrente. Na saída, o ar quente resfriado carrega pó de açúcar, que é lavado com água e dissolvido; essa água é usada na lavagem das turbinas.

2.3.8. Acondicionamento (envase)

Após a secagem, o açúcar é resfriado e acondicionado em sacos para armazenamento e posterior distribuição.

2.3.9. Refino

O açúcar cristal produzido nas usinas pode ser utilizado diretamente pelas indústrias ou seguir para as refinarias, onde é dissolvido em água e sofre novamente o processo de flotação até a obtenção do açúcar refinado.

Um fluxograma simplificado é apresentado na *Figura 1*.

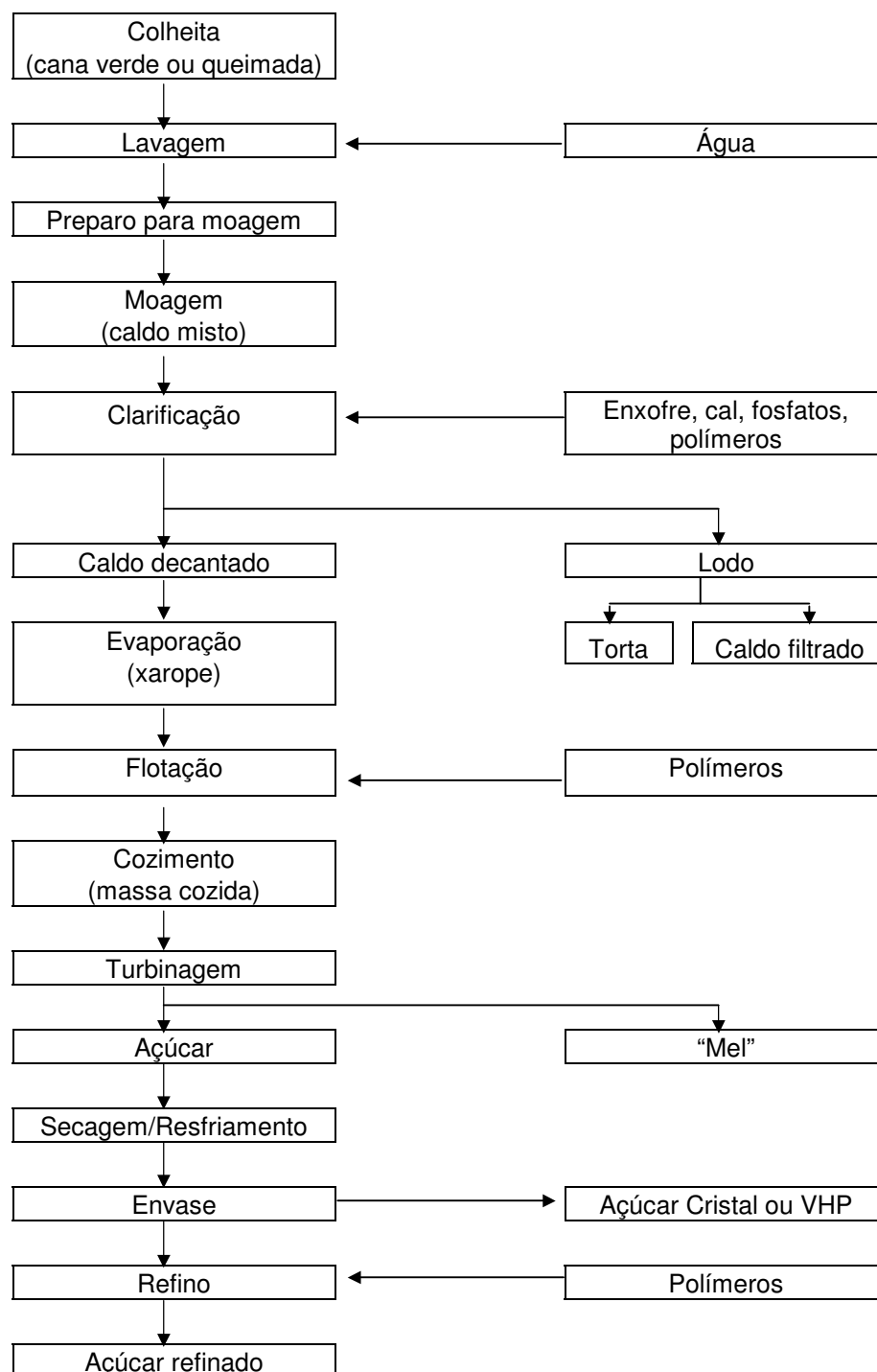


Figura 1 – Fluxograma simplificado da produção de açúcar refinado.

2.4. Tipos de açúcar

Os tipos de açúcar produzidos podem variar dependendo do tamanho dos cristais de sacarose, do grau de clarificação do açúcar, cor, teor de sólidos, nível de polarização do produto. A polarização é a porcentagem em peso de sacarose aparente contida em uma solução açucarada, determinada pelo desvio provocado pela solução no plano da luz polarizada.

Diversos tipos de açúcar são produzidos pelas usinas e refinarias, sendo que alguns estão disponíveis no comércio e outros não. São eles:

- **Açúcar Mascavo**

Obtido diretamente da concentração do caldo-de-cana recém extraído, eliminando-se a etapa de clarificação. Sua cor pode variar do dourado ao marrom escuro, em função da variedade e da estação do ano em que a cana é colhida.

- **Açúcar Demerara**

Possui coloração mais escura e é levemente mais úmido, pois conserva uma película de “mel” em volta dos cristais de sacarose.

- **Açúcar Cristal**

Açúcar obtido por fabricação direta nas Usinas. Pode ser comercializado desta forma ou enviado às refinarias para obtenção do açúcar refinado amorfo. A granulometria dos cristais pode variar de 0,6 a 0,7 mm.

- **Açúcar Refinado Amorfo**

Açúcar obtido através da dissolução do açúcar cristal, que passa novamente pela etapa de flotação. Possui uma granulometria menor que a do açúcar cristal (0,1 a 0,2 mm). Disponível comercialmente, é o mais utilizado no consumo doméstico.

- **Açúcar de Confeiteiro**

Possui grânulos bem finos, cristalinos.

- **Açúcar Orgânico**

Seu processamento segue os princípios internacionais da agricultura orgânica, que exclui o uso de fertilizantes sintéticos e agrotóxicos, além de utilizar cana-de-açúcar verde como matéria-prima.

- **Açúcar VHP (very high polarization) e VVHP (very very high polarization)**

Açúcar obtido por fabricação direta nas usinas, este açúcar é utilizado como matéria-prima nas refinarias, sendo também um produto de exportação. A diferença entre o açúcar VHP e VVHP está na polarização mínima destes produtos, 99% e 99,6%, respectivamente.

3. Cachaça

De acordo com o Decreto nº 4.851 do Ministério da Agricultura, de 2 de outubro de 2003, as aguardentes são obtidas através do rebaixamento do teor alcoólico do destilado alcoólico simples, ou pela destilação do mosto fermentado. Na prática, a aguardente de cana é obtida a partir do destilado alcoólico simples de cana-de-açúcar ou pela destilação do mosto fermentado de cana-de-açúcar e possui graduação alcoólica de 38 a 54% em volume, a 20°C, podendo ser adicionada de açúcares em até seis gramas por litro. A cachaça, por sua vez, é uma denominação típica e exclusiva da aguardente de cana produzida no Brasil (Brasil, 2003).

3.1. Mercado

A produção brasileira de cachaça atinge cerca de 1,3 bilhão de litros anuais, gerando uma receita próxima de US\$ 500 milhões e empregando 450 mil pessoas. A cachaça é produzida em todas as regiões brasileiras, sendo a maior parte nos Estados de São Paulo, Pernambuco, Ceará, Rio de Janeiro, Goiás e Minas Gerais. Estima-se que haja perto de 30 mil produtores, a maioria produzindo pequenos volumes comercializados localmente (PBDAC, 2005).

A cachaça é a bebida destilada mais consumida no país e ocupa o segundo lugar entre as bebidas alcoólicas, ficando atrás somente da cerveja. O consumo

brasileiro garante à cachaça o terceiro lugar entre os destilados mais consumidos no mundo, perdendo para a vodka e o soju. O volume das exportações de cachaça aumentou bastante nos últimos anos, passando de 1,3 milhão de litros em 1998 para 14,8 milhões de litros em 2002. O Paraguai e a Alemanha são os maiores importadores, representando 28% e 23% das exportações brasileiras do produto, respectivamente (PBDAC, 2005).

4. Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos – HPAs

4.1. Considerações gerais

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos são a maior classe conhecida de carcinógenos ambientais, podendo ser encontrados na água, ar, solo e, conseqüentemente, em alimentos (Bartle, 1991). São compostos formados durante a combustão incompleta de material orgânico, como em processos de queima de madeira e óleos combustíveis (Howard & Fazio, 1980). As mais importantes fontes de emissão de HPAs na atmosfera são: queima de carvão, produção de alumínio, ferro e aço, aquecimento doméstico e residencial (utilização de forno à lenha e lareiras); tráfego de veículos; incêndios florestais; incineração de resíduos (WHO, 1998).

Durante estes processos tanto a quantidade quanto a composição dos HPAs produzidos variam em função de fatores como as condições de reação, temperatura e quantidade de ar (Gomaa *et al.*, 1993), sendo a formação de HPAs favorecida pela queima da matéria orgânica em temperaturas variando de 500 a 900°C, principalmente acima de 700°C (Bartle, 1991). Acredita-se que a combustão envolva dois processos principais: a pirólise (decomposição dos compostos de alta massa molar em estruturas menores, a maioria radicais livres) e a pirossíntese (os compostos formados durante a pirólise se recombina para formar estruturas relativamente estáveis, entre elas os HPAs).

Os HPAs são compostos orgânicos fluorescentes. São formados por dois ou mais anéis aromáticos fundidos, podendo ou não conter grupos substituintes ligados (Fazio & Howard, 1983; WHO, 1998; Debastani & Ivanov, 1999). A

anelação pode ser linear (onde os anéis estão em uma linha reta, como no caso do antraceno) ou angular (onde os anéis estão localizados em linhas retas diferentes, sempre com um ângulo de 120° entre elas, como é o caso do criseno) (Figura 2). Os HPAs são sólidos à temperatura ambiente e altamente lipofílicos, apresentando elevada solubilidade em solventes orgânicos e uma baixa solubilidade em água, que tende a diminuir com o aumento da massa molecular. Quimicamente inertes, os HPAs no ambiente estão sujeitos a reações de fotodecomposição e reações com óxidos de nitrogênio, ácido nítrico, óxidos de enxofre, ácido sulfúrico, ozônio e radicais hidroxil (Andelman & Suess, 1970; WHO, 1998). A solubilidade em água pode aumentar sensivelmente na presença de outros compostos orgânicos e de detergentes aniônicos, facilitando a passagem dos HPAs tanto para o meio ambiente quanto para a cadeia alimentar (Lo & Sandi, 1978). Mais de 100 HPAs já foram caracterizados na natureza (Chen *et al.*, 1996; Dabestani & Ivanov, 1999).

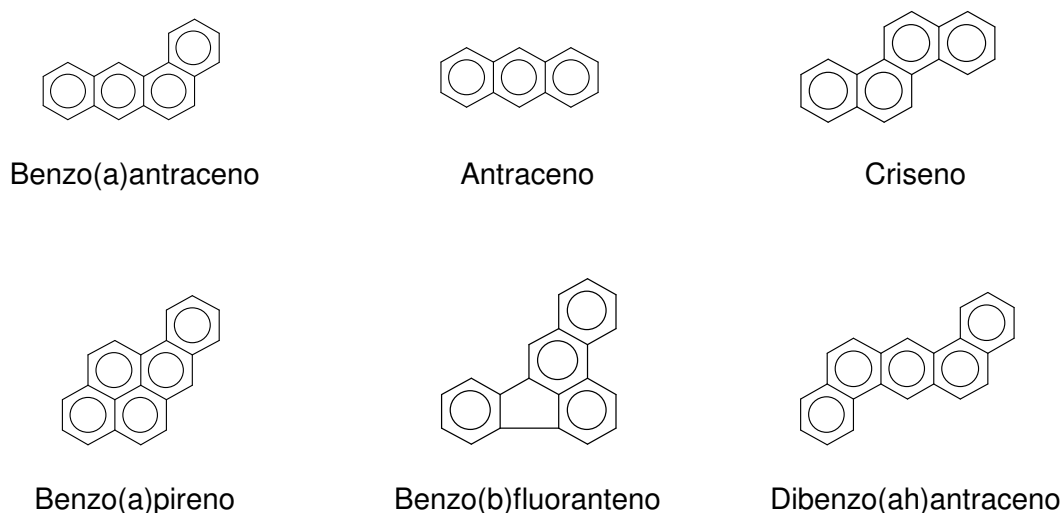


Figura 2 – Estruturas químicas de alguns HPAs

4.2. Toxicidade

Os HPAs são substâncias potencialmente carcinogênicas que pertencem à classe dos pró-carcinogênicos, necessitando, portanto, de ativação metabólica para formar o carcinógeno ativo (Lo & Sandi, 1978; Bartle, 1991).

Em avaliação conduzida pelo IARC (International Agency for Research of Cancer), 3 HPAs foram incluídos no grupo 2A, ou seja, os compostos são considerados prováveis carcinógenos ao homem. Outros 11 HPAs foram incluídos no grupo 2B, onde os compostos são considerados possivelmente carcinogênicos ao homem (IARC, 1983).

O JECFA (Comitê Conjunto FAO/OMS de Peritos em Aditivos Alimentares) durante sua 64^a reunião, avaliou o grupo dos HPAs e concluiu que 13 desses compostos são claramente carcinogênicos e genotóxicos: benzo(a)antraceno, benzo(b)fluoranteno, benzo(j)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, criseno, dibenzo(ah)antraceno, dibenzo(ae)pireno, dibenzo(ah)pireno, dibenzo(ai)pireno, dibenzo(al)pireno, indeno (1,2,3 cd-pireno) e 5-metilcriseno (WHO, 2005). Desses, o benzo(a)pireno é o mais conhecido e tem sido muito estudado nos últimos anos (Grasso, 1984; Von Szentpaly & Shamovsky, 1995).

4.2.1. Metabolismo

Os HPAs são absorvidos através dos pulmões, trato gastro-intestinal e pela pele. São largamente distribuídos pelo organismo através de qualquer rota e são encontrados em praticamente todos os órgãos internos, principalmente naqueles ricos em lipídeos. O metabolismo dos HPAs é complexo. Em geral são convertidos em epóxidos e estes posteriormente convertidos em fenóis, dióis e trióis que podem ser conjugados com ácido sulfúrico ou glucorônico ou com glutatona. Embora a maior parte do metabolismo resulte em detoxificação, alguns HPAs são ativados formando espécies DNA-ligantes, principalmente diol epóxidos, que podem dar início a um processo de carcinogênese. Os HPAs podem produzir tumores tanto no local de contato quanto em local distante deste, e o potencial carcinogênico do composto pode variar de acordo com a rota de exposição (WHO, 1998).

As estimativas de risco associado aos HPAs e suas misturas são feitas com base em estimativas de exposição e em resultados de estudos epidemiológicos (WHO, 1998).

4.3. HPAs em alimentos

A presença de HPAs em alimentos deve-se principalmente à sua formação durante certos tipos de processamentos como defumação, torrefação e secagem direta com madeira, à poluição do ar e da água, além de sua presença em solos terrestres e marinhos (WHO, 1998). Existem muitos estudos sobre a ocorrência de HPAs em diversos tipos de alimentos, incluindo óleos vegetais, margarinas, maionese, produtos lácteos, frutas, vegetais, produtos defumados, chás, café, cereais, água, alimentos de origem marinha, alimentos grelhados entre outros (Grimmer & Böhnke, 1975; Lawrence & Weber, 1984; Birkholz *et al.*, 1988; Touminen *et al.* 1988; De Vos *et al.* 1990; Serra *et al.*, 1995; Chen *et al.* 1996; Kayali-Sayadi *et al.* 1996; Toledo & Camargo, 1998; Garcia-Falcón *et al.*, 1999; Camargo & Toledo, 2000; Camargo & Toledo, 2002a; Camargo & Toledo, 2002b; Simko, 2002; Camargo & Toledo, 2003; Kishikawa *et al.* 2003; Yabiku *et al.* 2003, Garcia-Falcón *et al.*, 2005; Lin *et al.*, 2005).

No caso dos óleos vegetais, a presença desses compostos é atribuída à etapa de secagem dos grãos, sendo a secagem à lenha a técnica que mais contribui para a formação dos compostos e sua presença no produto final. Embora a desodorização reduza os teores de HPAs, seu efeito não é substancial, sendo necessário o controle do óleo bruto ou a utilização de carvão ativo para remoção dos HPAs (Dennis *et al.*, 1991; Camargo & Toledo, 1998).

A ocorrência de HPAs em frutas e vegetais se deve principalmente à poluição ambiental. Neste caso, o material particulado se deposita na superfície destes, onde são concentrados pela camada de cera através de adsorção superficial (WHO, 1998; Camargo & Toledo, 2002c). O nível de contaminação depende da localização da plantação e da área de superfície do alimento exposta à contaminação. As plantações situadas próximas a rodovias dão origem a produtos com maiores teores de HPAs (Camargo & Toledo, 2002a).

A contaminação de cereais se dá de maneira análoga à de frutas e vegetais, sendo a área de cultivo um fator muito importante. Outra via de contaminação dos grãos é a secagem dos mesmos pela aplicação de gases de

combustão, com os teores de HPAs variando em função do tipo de combustível utilizado e das condições de sua queima (Camargo & Toledo, 2002b).

Em produtos defumados os HPAs são formados pela queima da madeira utilizada no processo. A maior concentração de HPAs nesses produtos se dá imediatamente após a defumação, após o que a concentração diminui devido à decomposição na presença de luz e à interação com outros compostos. Os HPAs podem penetrar no alimento, onde ficam protegidos da luz e do oxigênio; depois de algum tempo, a concentração se estabiliza em um valor constante (Simko, 2002).

A contaminação do café ocorre no processo de torrefação dos grãos. Quando se prepara a bebida no modo tradicional (café coado em processo direto), 20 a 30% dos HPAs presentes no pó de café são extraídos para a bebida; entretanto, quando o pó de café é fervido juntamente com a água antes da filtração, forma-se um complexo HPA-caféina que facilita a passagem dos hidrocarbonetos para a bebida, resultando em um café com maiores níveis de HPAs (Kruijff *et al.*, 1987; Camargo & Toledo, 2002b).

O chá geralmente apresenta níveis superiores de HPAs em relação ao café torrado; no entanto, apenas uma pequena quantidade é transferida para a bebida durante a infusão. A contaminação do chá se dá devido à poluição ambiental aliada à secagem direta das folhas de chá (Camargo & Toledo, 2002b; Camargo & Toledo, 2002c).

A presença de HPAs nos produtos de origem marinha se deve principalmente à contaminação ambiental que ocorre através de derramamento ou vazamento de óleo, efluentes industriais, ou de deposição de HPAs da atmosfera. Esses compostos são absorvidos e acumulados por organismos marinhos. Em geral, os peixes apresentam maior capacidade de metabolizar os HPAs, apresentando menor acúmulo nos tecidos. Os moluscos, por sua vez, tendem a apresentar maiores níveis de HPAs pois são incapazes de metabolizá-los e excretá-los (Phillips, 1999; Camargo & Toledo, 2002c).

Quando alimentos são preparados em contato com a chama, como acontece com as carnes de churrasco, a gordura da carne pinga sobre o fogo,

sofre pirólise e então retorna à carne na forma de fumaça, carregando os HPAs que contaminam a carne. Quanto maior o teor de gordura da carne, maior a quantidade de HPAs presente no produto (Phillips, 1999; Camargo & Toledo, 2002c).

A tabela 1 apresenta a faixa dos níveis de benzo(a)pireno disponíveis na literatura para alguns tipos de alimentos.

Tabela 1 - Níveis de benzo(a)pireno (B(a)P) reportados na literatura para alguns alimentos.

Alimento	B(a)P (µg/kg)
Alimentos defumados	nd – 66,90
Alface	0,1 – 31,7
Óleo de oliva	nd – 164,4
Óleo de soja	nd – 42,90
Óleo de girassol	nd – 8,0
Óleo de milho	1,51 – 58,9
Peixes e frutos do mar	<0,005 – 4,54

Fonte: Camargo e Toledo (2002c).

4.3.1. HPAs em cana-de-açúcar e derivados

A colheita de cana-de-açúcar verde tem se expandido no Estado de São Paulo nos últimos anos. Na região de Ribeirão Preto cerca de 70% dos 900 hectares de cana plantada são de áreas mecanizáveis (onde a declividade do terreno é menor que 12%, permitindo a utilização de máquinas para o corte da cana), sendo que 31% da área total de plantio foram colhidas mecanicamente em 2000 (Governo, 2001). No presente, 30% da cana-de-açúcar são colhidas mecanicamente nos principais Estados produtores da região Centro-Sul (Procana, 2005). Para a colheita mecânica da cana-de-açúcar são utilizados modelos de colhedoras para cana picada ou inteira, sendo que muitos desses modelos são destinados à colheita de cana queimada, existindo também alguns modelos para a colheita da cana verde (Tanaka, 1996; Pagnano, 1997). A colheita manual está normalmente associada à queima, que facilita o corte da planta e evita problemas

para os cortadores de cana, como possíveis picadas de cobra (UNICA, 2005). Apesar do aumento da colheita mecanizada no Brasil, a colheita da cana-de-açúcar ainda utiliza a queima dos canaviais como recurso.

O governo do Estado de São Paulo, através da Lei Estadual n.º 11.241 de 2002, regulamentou a colheita da cana, estabelecendo prazos de até 30 anos para o fim das queimadas no Estado. Nas áreas mecanizáveis, a queima deve ser eliminada, a cada cinco anos, em 20%, 30%, 50%, 80% e 100% em relação à área cortada; dessa maneira, o fim das queimadas se dará em 2021. Nas áreas não mecanizáveis, a eliminação terá um prazo maior, sendo também a cada cinco anos, porém com percentuais de áreas queimadas em relação às cortadas mais brandos, resultando no fim das queimas em 2031 (GESP, 2002).

A prática da queima dos canaviais antes da colheita introduz partículas de palhicho queimado na atmosfera, assim como inúmeros compostos potencialmente tóxicos, entre eles os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs). Estes compostos podem contaminar a cana-de-açúcar e, conseqüentemente, os produtos obtidos de seu processamento (Serra *et al.* 1995, Zamperlini *et al.* 2000, Godoi *et al.* 2004).

Em estudo realizado por Santos *et al.* (2002), bagaço e folhas de duas diferentes variedades de cana-de-açúcar foram queimadas sob fogo controlado e amostras de fumaça foram coletadas em filtros e analisadas quanto à presença de 15 HPAs. Na fumaça do bagaço foram encontrados 7 dos 15 HPAs estudados, com níveis variando de 6,49 a 37,17 ng/m³. Nas amostras referentes às folhas foram encontrados de 9 a 10 dos 15 HPAs estudados, com níveis variando de 2,26 a 368,79 ng/m³.

Em pesquisa realizada em Araraquara, SP, material particulado foi coletado no campus da UNESP, por 10 dias, durante o período de colheita da cana-de-açúcar, em agosto de 2002. As amostras foram analisadas quanto à presença de 17 HPAs. A soma dos HPAs analisados variou de 13,4 a 94,0 ng/m³, com média de 49,3 ng/m³. Os HPAs que mais se destacaram foram o indeno(1,2,3-cd)pireno e o benzo(ghi)pirileno, com 8,7 e 8,5 ng/m³ respectivamente. A concentração média de benzo(a)pireno encontrada no estudo (1,9 ng/m³) foi maior do que a

encontrada no ar na cidade de Londres (Godoi *et al.*, 2004). Em um trabalho semelhante realizado em Campo dos Goytacazes, RJ, foram coletadas amostras de aerossol no período de um ano em três pontos da cidade. As amostras foram analisadas quanto à presença de 16 HPAs e a somatória deles variou durante o ano sendo que os maiores valores foram encontrados durante o inverno: 179,6; 336,17 e 354 ng/m³, dependendo do local de coleta das amostras. Os pesquisadores suspeitam de uma possível relação entre a queima dos canaviais e os altos índices de HPAs nas amostras coletadas no inverno (Azevedo *et al.*, 2002).

Um estudo realizado em São José do Rio Preto, SP, avaliou a exposição ocupacional à queima da cana-de-açúcar e seus efeitos genotóxicos. Foram investigados 42 trabalhadores rurais da região de Catanduva e um grupo controle de trabalhadores da região urbana (todos não-fumantes). Amostras de urina destes trabalhadores foram coletadas nos períodos de safra e entressafra da cana-de-açúcar. Os resultados mostraram que oito amostras de urina dos cortadores de cana foram mutagênicas ou apresentaram traços de mutagenicidade. A autora relata que os cortadores de cana estão significativamente mais expostos aos HPAs e a compostos mutagênicos no período de safra do que no período de entressafra ou em comparação ao grupo controle (Bosso, 2004).

Em pesquisa sobre a contaminação de cana-de-açúcar e derivados por HPAs foram analisadas diversas amostras (cana crua, cana queimada, caldo misto, caldo sulfitado, açúcar mascavo, açúcar demerara, açúcar cristal, açúcar refinado e aguardente) quanto à presença de benzo(a)pireno, benzo(a)antraceno, fenantreno e naftaleno (Serra *et al.*, 1995). Entre as amostras de cana crua, cana queimada, caldo misto e caldo decantado, os HPAs só foram detectados na cana queimada, com níveis de HPAs totais variando de 0,10 a 1,55 µg/kg. Entre os produtos processados (açúcares e aguardente), o único que não apresentou contaminação foi o açúcar refinado, sendo que os níveis de HPAs totais nos demais variaram de 0,76 a 10,15 µg/kg. Os autores relataram um efeito positivo do processo de refino na eliminação destes compostos e recomendaram a realização

de estudos detalhados e dirigidos para os diversos produtos intermediários e finais do processamento de açúcar, evidenciando ainda a necessidade de incluir outros HPAs no estudo.

Camargo e Toledo (2002a) determinaram os níveis de HPAs em 9 amostras de açúcar refinado adquiridas no comércio. As amostras estavam contaminadas com 5 dos 10 HPAs analisados, em níveis médios individuais variando de 0,09 a 9,29 $\mu\text{g/kg}$, sendo que a soma dos 5 HPAs encontrados foi de 15,44 $\mu\text{g/kg}$. Na avaliação da exposição diária a estes compostos através da dieta, os açúcares foram o segundo grupo que mais contribuiu para a ingestão dos 10 HPAs pela população brasileira (0,95 $\mu\text{g/pessoa/dia}$), sendo também responsáveis por 20% da ingestão diária dos HPAs carcinogênicos avaliados (Camargo, 2001).

A literatura internacional não apresenta dados sobre a contaminação de açúcar de cana por HPAs. Existem alguns trabalhos que reportam a presença de benzo(a)pireno em açúcar, mas não é especificado a que tipo de açúcar se refere exatamente. Kazerouni *et al.* (2001) determinaram 0,15 $\mu\text{g/kg}$ em açúcar e De Vos *et al.* (1990) reportaram um nível médio 0,15 $\mu\text{g/kg}$ e um nível máximo de 0,4 $\mu\text{g/kg}$ para o grupo de açúcar e adoçantes.

Em estudo realizado na USP de São Carlos sobre a presença de HPAs em aguardentes, 28 amostras de cachaça foram analisadas quanto ao teor de 16 HPAs. As médias variaram de 0,9 $\mu\text{g/L}$ (benzo(a)antraceno) a 9,0 $\mu\text{g/L}$ (naftaleno). O mesmo estudo comparou os teores de HPAs nas bebidas produzidas a partir de cana-de-açúcar queimada e não-queimada, e os resultados indicaram maior teor de HPAs nas aguardentes que utilizaram cana-de-açúcar queimada no seu processamento (Bettin, 2001; Bettin & Franco, 2005).

4.4. Métodos de análise

Existem diversos métodos para determinação de HPAs em alimentos e estes envolvem, usualmente, etapas de saponificação, extração com solventes, concentração do extrato, purificação e determinação.

4.4.1. Extração

A escolha do método para a extração depende principalmente da matriz do alimento. Óleos e gorduras se dissolvem facilmente em solventes apolares, podendo ser submetidos diretamente a uma partição líquido-líquido (Larsson, 1986). Alimentos com alto teor de proteínas necessitam de uma etapa prévia de saponificação, que pode aumentar em até 60% a quantidade de HPAs extraídos dessas matrizes (Grimmer & Bohnke, 1975).

Os solventes orgânicos mais utilizados na extração são cicloexano, isoctano, hexano e triclorofluoretano (Grimmer & Bohnke, 1975; Dennis *et al.*, 1983; Grimmer & Jacob, 1987; Garcia-Falcón *et al.*, 1999; Camargo, 2001).

Muitos autores baseiam os seus métodos de extração naquele proposto por Grimmer e Bohnke (1975) que envolve as etapas de saponificação, extração com cicloexano, partição líquido-líquido com N,N-dimetilformamida-água (9:1, v/v) e limpeza em coluna de vidro empacotada com sílica-gel. Adaptações do método original têm sido utilizadas para determinação dos HPAs em diferentes tipos de alimentos (Dennis *et al.*, 1983; Lawrence & Weber, 1984; Larsson, 1986; De Vos *et al.*, 1990; Speer *et al.*, 1990; Serra *et al.*, 1995; Husain *et al.*, 1997; Toledo & Camargo, 1998; Garcia-Falcón *et al.*, 1999; Camargo & Toledo, 2000; Camargo & Toledo, 2002a; Camargo & Toledo, 2002b; Camargo & Toledo, 2003).

4.4.2. Determinação cromatográfica

Vários métodos analíticos têm sido descritos para a determinação de HPAs, entre eles a cromatografia em camada delgada (Grimmer & Hildebrandt, 1972; Kazerouni *et al.*, 2001), a cromatografia gasosa (CG) e a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Ao se fazer uso da cromatografia gasosa, em geral emprega-se uma coluna capilar. Entre os detectores são usados o de ionização de chama, o de captura de elétrons e o de fotoionização (Bartle, 1991). Outra opção é a cromatografia gasosa capilar acoplada ao espectrômetro de massas (CG-MS), que apresenta alta sensibilidade e resolução, permitindo também a identificação e confirmação de identidade dos diferentes hidrocarbonetos na amostra (Bartle, 1991). Este método

tem sido empregado por diversos autores, em várias matrizes (Grimmer & Bohnke, 1975; Speer *et al.*, 1990; Nyman *et al.*, 1993; Husain *et al.*, 1997).

A cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fluorescência tem sido amplamente utilizada na determinação de HPAs em alimentos (Dennis *et al.*, 1983; De Vos *et al.*, 1990; Serra *et al.*, 1995; Kayali-Sayadi *et al.*, 1996; Pupin & Toledo, 1996; Toledo & Camargo, 1998; Garcia-Falcón *et al.*, 1999; Camargo & Toledo, 2000; Camargo & Toledo, 2002a; Camargo & Toledo, 2002b; Weibhaar, 2002; Camargo & Toledo, 2003; Kishikawa *et al.*, 2003; Lage-Yusty & Coritzo-Daviña, 2005). Esta técnica apresenta inúmeras vantagens sobre as outras, principalmente na determinação simultânea de vários HPAs. Entre as vantagens obtidas são citadas: sensibilidade, alta especificidade do detector de fluorescência, determinação dos HPAs de alta massa molar que apresentam baixa volatilidade e limite de detecção na ordem de ng/kg (Bartle, 1991; WHO, 1998). Entre as colunas, a de fase reversa (C18) polimérica tem se mostrado muito eficiente na separação dos HPAs. Estudos realizados com 16 HPAs mostram que a coluna C18 polimérica separa todos os compostos, enquanto que na monomérica os pares de isômeros criseno e benzo(a)antraceno, benzo(ghi)pirileno e indeno(1,2,3-cd)pireno, benzo(b)fluoranteno e benzo(k)fluoranteno não são bem resolvidos (Wise *et al.*, 1993). A fase móvel utilizada é normalmente uma mistura de acetonitrila ou metanol com água (Lawrence & Weber, 1984; Kicinski *et al.*, 1989; Bartle, 1991; Chen *et al.*, 1996).

4.5. Legislação

No âmbito do Codex Alimentarius tem sido manifestada por inúmeros países a necessidade de se estabelecer limites para HPAs em alimentos, sendo este tema considerado prioritário dentro do Comitê do Codex para Aditivos Alimentares e Contaminantes (CCFAC).

No Brasil, a legislação vigente determina que os aromatizantes/aromas de fumaça não poderão resultar em mais de 0,03 µg/kg de benzo(a)pireno no alimento final. Para fins de controle analítico, esse valor será determinado a partir do benzo(a)pireno presente no aromatizante/aroma de fumaça utilizado e da dose

deste último no alimento/produto pronto para o consumo (Brasil, 1999). A portaria nº 36 de 19 de janeiro de 1990 estabelece o limite máximo de 0,01 µg/L de benzo(a)pireno em águas potáveis (Brasil, 1990).

A Comissão da Comunidade Européia, em fevereiro de 2005, estabeleceu níveis máximos para benzo(a)pireno em alguns alimentos como: peixes, óleos e gorduras (2,0 µg/kg), crustáceos, carnes e peixes defumados (5,0 µg/kg), moluscos bivalves (10,0 µg/kg) e alimentos infantis (1,0 µg/kg) (CEC, 2005).

5. Referências Bibliográficas

- Andelman, J.B.; Suess, M.J. Polynuclear aromatic hydrocarbons in the water environment. *Bulletin World Health Organization*, 43: 479-508, 1970.
- Azevedo, D.A., Santos, C.T.M., Neto, F.R.A. Identification and seasonal variation of atmospheric organic pollutants in Campos dos Goytacazes, Brazil. *Atmospheric Environment*, 36: 2383-2395, 2002.
- Bartle, K.D. Analysis and occurrence of polycyclic aromatic hydrocarbons in food. In: CREASER, C. & PURCHASE, R. (Eds) *Food contaminants: sources and surveillance*. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 1991. Cap.3, p.41-60.
- Bettin, S.M. *Da presença de cetonas, compostos fenólicos e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) em aguardentes*. São Carlos, 2001. 193p. Tese (Doutor em Ciências (Química Analítica)) – Instituto de Química, Universidade de São Paulo.
- Bettin, S.M.; Franco, D.W. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) em aguardentes. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 25 (2): 234-238, 2005.
- Birkholz, D.A., Coutts, R.T.; Hurdey, S.E. Determination of polycyclic aromatic compounds in fish tissue. *Journal of Chromatography*, 449: 251-260, 1988.
- Bosso, R.M.V. *Investigação de biomarcadores de suscetibilidade e de exposição ambiental em indivíduos ocupacionalmente expostos à queima de canaviais*. São José do Rio Preto, 2004. 106p. Tese (Doutor em Genética) – Instituto de

Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista (UNESP).

Brasil. *Resolução CNNPA nº 12*, publicada no Diário Oficial da União, 24 de julho, 1978.

Brasil. *Portaria MS/GM nº 36*, publicada no Diário Oficial da União, 23 de janeiro, 1990.

Brasil. *Resolução nº 104*, publicada no Diário Oficial da União, 17 de maio, 1999.

Brasil. *Decreto nº 4851*, publicado no Diário Oficial da União, 03 de outubro, 2003.

Camargo, M.C.R. *Avaliação da ingestão de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos através da dieta*. Campinas, 2001. 267p. Tese (Doutor em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

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

Camargo, M.C.R.; Toledo, M.C.F. Chá-mate e café como fontes de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAS) na dieta da população de Campinas. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 22 (1): 49-53, 2002b.

Camargo, M.C.R.; Toledo, M.C.F. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos – uma revisão. *Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 36 (1): 69-78, 2002c.

Camargo, M.C.R.; Toledo, M.C.F. Polycyclic aromatic hydrocarbons in Brazilian vegetables and fruits. *Food Control*, 14 (1), 49-53, 2003.

Camargo, M.S.F.O.; Toledo, M.C.F. Efeito do processamento na contaminação de óleo refinado de milho por benzo(a)pireno. *Brazilian Journal of Food Technology*, 1 (1,2): 97-106, 1998.

Camargo, M.S.F.O.; Toledo, M.C.F. Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos em margarina, creme vegetal e maionese. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 20 (1): 51-55, 2000.

- CEC – The Commission of the European Communities. *Commission Regulation (EC) No 208/2005 of 4 February 2005*. Official Journal of European Union, 8.2.2005.
- Chen, B.H.; Wang, C.Y.; Chiu, C.P. Evaluation of analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in meat products by liquid chromatography. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 44 (8): 2244-2251, 1996.
- Dabestani, R.; Ivanov, I.N. Invited review – A compilation of physical, spectroscopic and photophysical properties of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Photochemistry and Photobiology*, 70 (1): 10-34, 1999.
- De Vos, R.H.; Van Dokkum, W.; Schouten, A.; De Jong-Berkhout, P. Polycyclic aromatic hydrocarbons in Dutch total diet samples (1984-1986). *Food and Chemical Toxicology*, 28 (4): 263-268, 1990.
- Dennis, M.J.; Massey, R.C.; McWeeny, D. J. Knowles, M.E. Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in the UK total diets. *Food and Chemical Toxicology*, 21 (5): 569-574, 1983.
- Dennis, M.J.; Massey, R.C.; Cripps, G.; Venn, I.; Howarth, N.; Lee, G. Factors affecting the polycyclic aromatic hydrocarbon content of cereals, fats and other food products. *Food Additives and Contaminants*, 8 (4): 517-530, 1991.
- EUFI – The European food information council. [internet]. Disponível em: <http://www.eufic.org/gb/food/pag/food29/food294.htm>. Acesso em abril de 2005.
- Fazio, T.; Howard, J.W. Polycyclic aromatic hydrocarbons in foods. In: Bjørseth, A. (Ed) *Handbook of polycyclic aromatic hydrocarbons*. New York: Marcel Dekker, 1983. Cap. 11, v.1, p.461-505.
- Furtado, F. Mecanização da colheita da cana traz benefício ambiental. *Ciência Hoje* on-line (29/04/02). [internet]. Disponível em <http://cienciahoje.uol.com.br/controlPanel/materia/view/1382>. Acessado em 05 de abril de 2005.
- García-Falcón, M.S.; González-Amigo, S.; Lage-Yusty, M.A.; Simal-Lozano, J. Determination of benzo(a)pyrene in some Spanish commercial smoked products by HPLC-FL. *Food Additives and Contaminants*, 16 (1): 9-14, 1999.

- Garcia-Falcón, M.S.; Cancho-Grande, B.; Simal-Lozano. Minimal clean-up and rapid determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in instant coffee. *Food Chemistry*, 90 (4): 643-647, 2005.
- GESP – Governo do Estado de São Paulo. Lei Estadual nº 11.241, de 19 de setembro de 2002. Publicada no DOE em 20 de setembro de 2002.
- Godoi, A.F.L.; Ravindra, K.; Godoi, R.H.M.; Andrade, S.J.; Santiago-Silva, M.; Vaeck, L.C.; Grieken, R.V. Fast chromatographic determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in aerosol samples from sugar cane burning. *Journal of Chromatography A*, 1027: 49-53, 2004.
- Gomma, E.A.; Gray, J.I.; Rabie, S.; Lopez-Bote, C.; Booren, A.M. Polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked food product and commercial liquid smoke flavourings. *Food Additives and Contaminants*, 10 (5): 503-521, 1993.
- GOVERNO proíbe queimada de cana em SP. *Folha de São Paulo*, São Paulo, 13 maio 2001. Folha Ribeirão, p.C1.
- Grasso, P. Carcinogens in food. In: Searle, E. (Ed) *Chemical carcinogens*. Washington DC: American Chemical Society, 1984. v.2, p.1205-1239.
- Grimmer, G.; Bohnke, H. Polycyclic aromatic hydrocarbons profile of high protein foods, oil and fats by gas chromatography. *Journal of Association of Official Analytical Chemists*, 58 (4): 724-733, 1975.
- Grimmer, G.; Hildebrandt, A. Concentration and estimation of 14 polycyclic aromatic hydrocarbons at low levels in high-protein foods, oils and fats. *Journal of Official Analytical Chemists*, 55 (3): 631-635, 1972.
- Grimmer, G.; Jacob, J. Recommended method for the gas chromatographic profile analysis of polycyclic hydrocarbons in smoked foods. *Pure and Applied Chemistry*, 59 (12): 1729-1734, 1987.
- Howard, J.W.; Fazio, T. Review of polycyclic aromatic hydrocarbons in foods. *Journal of Association of Official Analytical Chemists*, 63 (5): 1077-1104, 1980.
- Husain, A.; Naeemi, E.; Dashti, B.; Al-Omirah, H.; Al-Zenki, S. Polycyclic aromatic hydrocarbons in food products originating from locally reared animals in Kuwait. *Food Additives and Contaminants*, 14 (3): 295-299, 1997.

- IARC. International Agency for Research of Cancer. Polynuclear aromatic compounds. *IARC Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemical to humans*. Part 1, Chemical, Environmental and Experimental Data, v.32, December, Lyon, France, 1983.
- Júnior, J.L.; Borges, J.M. *Açúcar de cana*. Viçosa: Imprensa Universitária Universidade Rural do Estado de Minas Gerais, 1965.
- Kayali-Sayadi, M.N.; Rubio-Barroso, S.; Beceiro-Roldan, C.; Polo-Diez, L.M. Rapid determination of PAHs in drinking water samples using solid-phase extraction and HPLC with programmed fluorescence detection. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 19 (19): 3135-3146, 1996.
- Kazerouni, N.; Sinha, R.; Hsu, C.H.; Greenberg, A.; Rothman, N. Analysis of 200 food items for benzo(a)pyrene and estimation of its intake in an epidemiologic study. *Food and Chemical Toxicology*, 39 (5): 426-436, 2001.
- Kicinski, H.G.; Adamek, S.; Kettrup, A. Trace enrichment and HPLC analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in environmental samples, using solid phase extraction in connection with UV/VIS diode array and fluorescence detection. *Chromatographia*, 28 (3/4): 203-208, 1989.
- Kishikawa, N.; Wada, M.; Kuroda, N.; Akiyama, S.; Nakashima, K. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in milk samples by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatograph B*, 789: 257-264, 2003.
- Kruijf, N.; Schouten, T.; Van Der Stegen, G.H.D. Rapid determination of benzo(a)pyrene in roasted coffee and coffee brew by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 35 (4): 545-549, 1987.
- Lage-Yusty, M.A.; Coritzo-Daviña, J.L. Supercritical fluid extraction and high-performance liquid chromatography-fluorescence detection method for polycyclic aromatic hydrocarbons investigation in vegetable oil. *Food Control*, 16 (1): 59-64, 2005.

- Larsson, B.K. *Polycyclic aromatic hydrocarbons in Swedish food – Aspects on analysis, occurrence and intake*. Doctoral thesis, Swedish University of Agricultural Sciences, 1986.
- Lawrence, J.F. Weber, D.F. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in Canadian samples of processed vegetables and dairy products by liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 32 (4): 794-797, 1984.
- Lin, D.; Tu, Y.; Zhu, L. Concentrations and health risk of polycyclic aromatic hydrocarbons in tea. *Food and Chemical toxicology*, 43 (1): 41-48, 2005.
- Lo, M.; Sandi, E. Polycyclic aromatic hydrocarbons (polynuclears) in foods. *Residue Review*, 69: 35-56, 1978.
- Mafra, P.H. *Sulfitação do caldo de cana-de-açúcar e aspectos ambientais decorrentes – ênfase às emissões de dióxido de enxofre*. Belo Horizonte: P.H. Mafra, 2004. 159p.
- Marafante, L.J. *Tecnologia da fabricação do álcool e do açúcar*. São Paulo: Ícone Editora Ltda., 1993. 148p.
- Martucci, E.T. *Tecnologia do açúcar de cana*. Campinas: Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia, 1983. 164p.
- Masson, N.P.M. *Caracterização das fontes poluidoras na fase industrial de uma usina de açúcar e álcool e proposição de melhorias*. Campinas, 1999. 52p. Monografia (Especialização em Gestão Ambiental) – Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).
- Nyman, P.J.; Perfetti, A.G.; Joe, F.L.; Diachenko, G.W. Comparison of two clean-up methodologies for the gas chromatographic/mass spectrometric determination of low nanogram/gram levels of polynuclear aromatic hydrocarbons in seafood. *Food Additives and Contaminants*, 10 (5): 489-501, 1993.
- Pagnano, N. B. *Despalhador inercial de facas oscilantes para cana-de-açúcar (Saccharum spp)*. Campinas, 1997. 78p. Dissertação (Mestre em Engenharia Agrícola) – Faculdade de Engenharia Agrícola, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

- PBDAC – Programa Brasileiro de Desenvolvimento da Cachaça [internet]. Disponível em: <http://www.abrabe.org.br/>. Acesso em abril de 2005.
- Phillips, D.H. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the diet. *Mutation Research*, 443: 139-147, 1999.
- Procana – Ligado no dia a dia do setor [internet]. Disponível em: <http://www.procana.com.br/Conteudo/Conheca%20o%20Setor.asp>. Acesso em abril de 2005.
- Pupin, A.M.; Toldeo, M.C.F. Benzo(a)pyrene in Brazilian vegetables oils. *Food Additives and Contaminants*, 55 (2): 185-188, 1996.
- Santos, C.Y.M.; Azevedo, D.A.; Aquino Neto, F.R.A. Selected organic compounds from biomass burning found in the atmospheric particulate matter over sugarcane plantation areas. *Atmospheric Environment*, 36: 3009-3019, 2002.
- Serra, G.E.; Pupin, A.M.; Toledo, M.C.F. Ensaios preliminares sobre a contaminação da cana-de-açúcar e derivados por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. *Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 29 (2): 134-137, 1995.
- Simko, P. Review - Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked meat products and smoke flavouring food additives. *Journal of Chromatography B*, 770: 3-18, 2002.
- Speer, K.; Steeg, E.; Hortsmann, P.; Kuhn, T.; Montag, A. Determination and distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in native vegetable oils, smoked fish products, mussels and oysters, and bream from the river Elbe. *Journal of High Resolution Chromatography*, 13: 104-111, 1990.
- Tanaka, F. O. *Despalhe de colmos de cana-de-açúcar inteira (Saccharum spp) por rolos oscilantes com diferencial de velocidades*. Campinas, 1996. 166p. Dissertação (Mestre em Engenharia Agrícola) – Faculdade de Engenharia Agrícola, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).
- Toledo, M.C.F.; Camargo, M.S.F.O. Benzo(a)pireno em óleos de milho produzidos e comercializados no Brasil. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 18 (1): 73-76, 1998.

- Tuominen, J.P.; Pyssalo, H.S.; Sauri, M. Cereal products as a source of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 36: 118-120, 1988.
- UNICA – União da Agroindústria Canavieira de São Paulo [internet]. Disponível em: http://www.unica.com.br/pages/unica_perfil1.asp. Acessado em abril de 2005.
- Von Szentpaly, L.; Shamovsky, I. L. Molecular mechanics explanation for the stereochemical and shape selectivity of B-DNA for “bay-region” carcinogens. *Molecular Pharmacology*, 47 (3): 624-629, 1995.
- Weibhaar, R. Rapid determination of heavy polycyclic aromatic hydrocarbons in edible fats and oils. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 104 (5): 282-285, 2002.
- WHO. Evaluation of certain food additives and contaminants (37th report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives). *Technical Report Series*, n.806, 1991.
- WHO. Selected non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environmental Health Criteria*, Geneva, n.202, 1998.
- WHO – World Health Organization. *Summary and conclusions of the sixty-fourth meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*. Rome, 47p, 2005.
- Wise, S.A.; Sander, L.C.; May, W.E. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons by chromatography. *Journal of Chromatography*, 642: 329-349, 1993.
- Yabiku, H.Y.; Martins, M.; Takahashi, M.Y. Levels of benzo(a)pyrene and others of polycyclic aromatic hydrocarbons in liquid smoke flavour and some smoked foods. *Food Additives and Contaminants*, 10 (4): 339-405, 1993.
- Zamperlini, G.C.M.; Santiago-Silva, M.; Vilegas, W. Solid-phase extraction of sugar cane soot extract for analysis by gas chromatography with flame ionisation and mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A*, 889: 281-286, 2000.

Capítulo 2

DETERMINATION OF POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS IN CANE SUGAR

Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in cane sugar

Abstract

Different brands and types of commercial cane sugar available on the Brazilian market were analysed for 5 polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by HPLC-FL. PAHs were detected in 57% of the samples at levels ranging from not detected to 1.35 µg/kg. The most representative PAH was benz(a)anthracene, found in 51% of the analysed samples, while dibenz(a,h)anthracene was not detected. The results indicate that the practice of burning sugar cane before harvest may be responsible for the presence of PAHs in commercial cane sugar and suggests that the levels of PAHs residues in the final product depend on the amount of burnt sugar cane being processed and on the steps involved in the sugar refining process.

Keywords: PAH, sugar cane, HPLC

1. Introduction

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) constitute a large class of organic compounds containing two or more fused aromatic rings. Hundreds of individuals PAHs may be formed during incomplete combustion or pyrolysis of organic matter (WHO, 2005). They occur as contaminants in different food categories such as dairy products, vegetables, fruits, oils, cereals and smoked meat (De Vos, Van Dokkum, Schouten & Jong-Berkhout, 1990, Simko, 2002, Camargo & Toledo, 2002, Camargo & Toledo, 2003). The sources of PAHs in food are mainly from environmental pollution and from food processing (drying, smoking) and cooking (roasting, grilling, frying) (WHO, 1998, WHO, 2005).

PAHs have attracted most attention because of the carcinogenic potential presented by some of them. In the 64th Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) the Committee reviewed all information relevant to the toxicology, epidemiology, intake assessment, analytical methodology, formation, fate and occurrence of PAHs in food. Overall, the Committee concluded that 13

PAHs were clearly carcinogenic and genotoxic, including the five selected for this study: benz(a)anthracene, benzo(b)fluoranthene, benzo(k)fluoranthene, benzo(a)pyrene and dibenz(a,h)anthracene. The Committee decided to apply a surrogate approach to the evaluation, in which benzo(a)pyrene was used as a marker of exposure to, and effect of, the 13 genotoxic and carcinogenic PAHs. The conclusion of the Committee was that the estimated intakes of PAHs were of low concern for human health. The JECFA also recommended the Codex Committee on Food Additives and Contaminant to consider developing appropriate source directed measures to reduce the contamination with PAHs during drying and smoking processing (CAC, 2005, WHO, 2005).

Brazil is the world largest sugar producer: in the 2004/2005 season 380 million tons of sugar cane were processed, producing 24 million tons of sugar (Procana, 2005). At harvesting season the crops are usually burnt in order to facilitate manual harvest and to increase the sugar content by weight due to water evaporation (Zamperlini, Santiago-Silva & Vilegas, 2000). Studies conducted in Brazil suggest that sugar cane burning is an important source of PAHs emission (Santos, Azevedo & Neto, 2002, Azevedo, Santos & Neto, 2002, Godoi *et al.*, 2004) and has been associated to the presence of this contaminants in burnt sugar cane and its by-products (Serra, Pupin & Toledo, 1995).

There are various analytical methods used for the determination of PAH in several food matrices (Speer, Steeg, Horstmann, Kühn & Montag, 1990, Nyman, Perfetti, Joe-Jr & Diachenko, 1993, Chen, Wang & Chiu, 1996, Garcia-Falcón, González-Amigo, Lage-Yusty & Simal-Lozano, 1999, Welbhaar, 2002, Camargo & Toledo, 2003). The most common analytical procedure is high performance liquid chromatography (HPLC) with fluorescence detection, which has been used widely in many laboratories (Lawrence & Weber, 1984, Garcia-Falcón *et al.*, 1999, Camargo & Toledo, 2003, Kishikawa, Wada, Kuroda, Akiyama & Nakashima, 2003).

The objective of the present study was to determine the levels of 5 PAHs (benz(a)anthracene, benzo(b)fluoranthene, benzo(k)fluoranthene, benzo(a)pyrene and dibenz(a,h)anthracene) in different brands and batches of commercial cane

sugar available in the Brazilian market. The sugars analysed were: brown, demerara, organic, white crystal sugar (0.6 to 0.7 mm granules size) and refined white sugar (0.1 to 0.2 mm granules size).

2. Material and Methods

2.1. Standards and Reagents

PAHs standards were purchased from Aldrich Chemical Co. (benzo(b)fluoranthene, benzo(k)fluoranthene, benzo(a)pyrene) and Supelco, Inc. (benz(a)anthracene and dibenz(a,h)anthracene). Cyclohexane and N,N-dimethylformamide (HPLC grade) were from Tedia Company Inc. Acetonitrile (HPLC grade) and anhydrous sodium sulfate were from J.T Baker. The silica gel used (70-230 mesh, ASTM) was obtained from Merck AS Chemical Industries. Water was obtained from a Millipore Milli-Q water purification system.

2.2. Samples

Different brands and batches of commercial cane sugar were purchased at supermarkets in the cities of Campinas and Ribeirão Preto (SP, Brazil) in the year 2003. The following 57 samples were analysed: 15 samples of refined white sugar (3 batches of 5 brands), 9 samples of white crystal sugar (3 batches of 3 brands), 3 samples of demerara sugar (3 batches of 1 brand), 12 samples of brown sugar (3 batches of 4 brands) and 18 samples of organic sugar (3 batches of 6 brands). All samples were analysed in duplicate.

2.3. Extraction and clean up

Extraction and clean up procedures were based on the method described by Speer *et al* (1990).

A volume of 100 ml of cyclohexane was added to 25 g sample of sugar and homogenised in a high-speed homogeniser (Turratec TF-102, Tecnal, Brazil) for 1 min. The mixture was then stirred on a mechanical shaker for 30 min. The material was filtered and transferred into a 500 ml separating funnel and extracted with

three aliquots of N,N-dimethylformamide-water (9:1, v/v) (50, 25 and 25 ml). Then, a 100 ml of a 1% sodium sulfate solution was added to the combined extract, and re-extracted with 50, 35 and 35 ml aliquots of cyclohexane. The combined solution was washed twice with 40 ml of water, dried with anhydrous sodium sulfate and concentrated on a rotary evaporator to 5 ml at 40°C.

The concentrated extract (5 ml) was purified by column chromatography on silica gel. A glass column (200 x 10 mm i.d.) was packed with 5 g deactivated silica gel (15% water) and 2.5 g anhydrous sodium sulfate on the top. The 5 ml extract was applied to the top of the column and eluted with 85 ml cyclohexane. The first 10 ml was discarded and the 10-85 ml fraction was concentrated to about 1 ml on a rotary evaporator at 40°C, and dried under a flow of nitrogen. Finally the residue was dissolved in 2 ml acetonitrile.

2.4. HPLC

The analysis was carried out using a Waters HPLC apparatus equipped with a 600 Controller pump, a in-line degasser, 717 plus autosampler and a 474 fluorescence detector (excitation wavelength 290 nm and emission wavelength 430 nm). A C18 column (Vydac 201 TP54, 250 x 4.6 mm, 5µm particle size) at 30°C was used and the mobile phase consisted of 75% acetonitrile and 25% water at a flow rate of 1 ml min⁻¹. The injection volume was 30µl. Peaks were identified by comparing the retention time with that of the standard and by co-chromatography.

2.5. Quantification

The external standard plot method was used. Duplicate injections of 30µl PAHs standard solutions were used to construct linear regressions lines (peak area ratios versus PAH concentration). Limits of detection for each PAH (expressed as µg/kg) were calculated as three times the standard deviation at lowest level of measurement, following Taylor guidelines (1987).

2.6. Recovery study

Recovery experiments were carried out by spiking samples of refined, crystal and brown sugar with three different concentrations of PAHs standard solution ranging from 0.3 to 3.0 µg/kg. The spiked samples as well as the unspiked controls were analysed in duplicate. Recoveries were calculated from the differences in total amounts between the spiked and unspiked samples. The repeatability of the method was evaluated through the coefficients of variation (CV) associated to measurements of each PAH performed during recovery tests.

3. Results and Discussion

The mean recovery, CV and detection limits for benz(a)anthracene (B(a)A), benzo(b)fluoranthene (B(b)F), benzo(k)fluoranthene (B(k)F), benzo(a)pyrene (B(a)P) and dibenz(a,h)anthracene (D(ah)A) are presented in Table 1. Recoveries obtained for different PAH ranged from 74.1 to 85.9% and CV ranged from 5 to 22.3%. These results are considered satisfactory for determinations at µg/kg levels (Horwitz, Kamps & Boyer, 1980, Jenke, 1996).

Table 1- Detection limit, recovery (R) and coefficient of variation (CV) of PAHs in different types of sugar

PAH	detection limit (µg/kg)	Refined sugar		Crystal sugar		Brown sugar	
		R* (%)	CV (%)	R* (%)	CV (%)	R* (%)	CV (%)
B(a)A	0.03	79.7	14.2	84.0	22.3	85.3	7.6
B(b)F	0.01	80.1	16.8	81.5	16.3	82.3	18.8
B(k)F	0.01	74.1	5.0	85.3	7.8	77.8	9.2
B(a)P	0.06	75.4	20.0	85.9	10.4	76.2	18.8
D(ah)A	0.17	77.2	11.2	82.4	16.2	80.3	3.4

*Mean recovery of three different concentrations

B(a)A: benz(a)anthracene, B(b)F: benzo(b)fluoranthene, B(k)F: benzo(k)fluoranthene, B(a)P: benzo(a)pyrene, D(a,h)A: dibenz(a,h)anthracene

Table 2 shows the levels of PAHs determined in different types of cane sugar. The reported values were not corrected for recovery. PAHs were detected in 57% of the analysed samples with summed levels ranging from not detected to 1.35 µg/kg. The most representative PAH was benz(a)anthracene, found in 51% of

the sugar samples, while dibenz(a,h)anthracene was not detected in any analysed sample.

Table 2 Mean PAHs levels in cane sugar samples.

Sample	Mean Concentration of PAHs (µg/kg)*					Σ PAHs
	(range)					
B(a)A	B(b)F	B(k)F	B(a)P	D(ah)A		
Refined sugar (<i>n</i> = 15)	0.019 (nd – 0.076)	0.078 (nd – 1.036)	nd	0.015 (nd – 0.082)	nd	0.113 (nd – 1.147)
Demerara sugar (<i>n</i> = 3)	nd	0.018 (nd – 0.037)	nd	0.044 (nd – 0.071)	nd	0.062 (0.017 – 0.108)
Crystal sugar (<i>n</i> = 9)	0.313 (0.072 – 0.754)	0.210 (0.099 – 0.291)	0.011 (nd – 0.027)	0.295 (0.140 – 0.406)	nd	0.829 (nd – 1.351)
Brown sugar (<i>n</i> = 12)	0.134 (nd – 0.495)	0.109 (nd – 0.249)	0.036 (nd – 0.094)	0.134 (nd – 0.314)	nd	0.413 (nd – 1.110)
Organic sugar (<i>n</i> = 18) ^a	0.104 (nd – 0.552)	0.046 (nd – 0.263)	0.002 (nd – 0.016)	0.062 (nd – 0.378)	nd	0.214 (nd – 1.175)

^a All organic sugar (brown, demerara and refined) were included

nd – not detected (detection limits on table 1)

* Mean values were calculated assuming nd as zero

B(a)A: benz(a)anthracene, B(b)F: benzo(b)fluoranthene, B(k)F: benzo(k)fluoranthene, B(a)P: benzo(a)pyrene, D(a,h)A: dibenz(a,h)anthracene

There was a significant variation in summed PAHs levels when comparing different types of sugar and different brands and batches of the same sugar. This variation could be related to two factors: 1) differences in processing: white sugar (refined and crystal) is submitted to a clarification and a floatation steps during processing, which is believed to decrease PAHs levels in the final product (Serra, Pupin & Toledo, 1995), whereas brown sugar is not clarified and the natural molasses are left in; 2) differences on the type of sugar cane (burnt or not burnt) used in the process: nowadays 30% of the sugar cane cultivated in the main Brazilian producer areas is mechanical harvested without prior burning (ProCana, 2005). As the sugar refining industries do not usually control the proportion of burnt and not burnt sugar cane they process, this means that the sugar cane that is

continuously fed into the process line may be burnt, not burnt or a mixture of both in different proportions.

In a study conducted by Camargo and Toledo (2002) in Brazil, the mean summed level of the same 5 PAHs in 9 samples of commercial refined white sugar was 6.15 µg/kg, of which dibenz(a,h)anthracene contributed with 5.17 µg/kg. In the present study, the levels of the 5 PAHs in the same foodstuff were relatively lower and dibenz(a,h)anthracene was not detected in any sample thus illustrating the differences mentioned before, and also suggesting seasonal variations.

Crystal sugar was the one that presented the highest mean level of summed PAHs (0.83 µg/kg); this type of sugar is submitted to only one floatation process, which can explain the higher levels when comparing with refined white sugar that is submitted to floatation twice. When comparing the crystal sugar PAHs levels with those of demerara and brown sugar, so far the only plausible explanation for the higher levels in the former is the use of a relatively higher amount of burnt sugar cane as raw material.

Surprisingly, PAHs were detected in 33% of the organic sugar samples, which should be produced only from not burnt sugar cane. An explanation for that could be the inappropriate use of burnt sugar cane on the process. Another explanation could be the deposition of airborne particles containing PAHs on the sugar cane fields due to environmental pollution, in a way similar to the contamination of raw fruits and vegetables (WHO, 1998, Camargo & Toledo 2003).

There is not much data available in the literature concerning the PAH content in sugar and the available data do not clearly state to which sugar product the level applies. Studies by Kazerouni, Sinha, Che-Han, Greenberg and Rothman (2001) determined 0.15 µg B(a)P/kg sugar, and De Vos *et al.* (1990) reported for sugar and sweets a mean value of 0.15 µg B(a)P/kg and a maximum value of 0.4 µg B(a)P/kg. These levels are relatively higher than the ones found for refined sugar in this study. Serra *et al.* (1995), in a preliminary study regarding cane sugar contamination by B(a)P, reported levels similar to those found in the present study: 0.15 µg/kg for brown sugar and 0.29 µg/kg for crystal sugar. Although B(A)P was

not detected in refined sugar samples at the time, this could be due to differences in the detection limit (0.10 µg/kg against 0.06 µg/kg in the present study).

According to the JECFA evaluation (WHO, 2005), sugar was not included among the major foods containing higher concentrations of PAHs. Analytical data used by the Committee in the evaluation was provided by different countries which may or not consume or produce cane sugar. In certain countries, specially in Europe, beet sugar is mostly consumed. Nevertheless, cane sugar may contain PAHs, as shown in this study, and could contribute significantly to the daily intake of PAHs if the consumption of sugar is high. In Brazil for ex., where the per capita mean consumption of cane sugar is estimated to be approximately 58 kg/year (Genebra, 2004), cane sugar may represent an important source of PAHs in the diet.

4. Conclusion

The results indicate that the practice of burning sugar cane before harvest may result in the presence of PAHs in cane sugar and suggests that the processing of sugar cane may influence the levels of these contaminant in the final product. In Brazil, there is already an effort from the São Paulo State Government to reduce the practice of cane burning: a State Regulation in force predicts a gradual elimination of the practice in the State in a period of 20 to 25 years (GESP, 2002). A more detailed study is currently underway to clarify the role of sugar cane burning and its subsequent processing in the content of PAHs in sugar cane by products. Thus, it is recommended that appropriate sugar cane harvesting practices be addressed in any document to be developed by CCFAC (Codex Committee on Food Additives and Contaminants) on source directed measures aimed to reduce food contamination with PAHs.

References

Azevedo, D.A., Santos, C.T.M., & Neto, F.R.A. (2002). Identification and seasonal variation of atmospheric organic pollutants in Campos dos Goytacazes, Brazil. *Atmospheric Environment*, 36, 2383-2395.

CAC – Codex Alimentarius Comition. (2005). CX/FAC/05/37/4 - Action required as a result of changes in acceptable daily intake (ADI) status and other toxicological recommendations. The Hague, 6p.

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

Camargo, M.C.R., & Toledo, M.C.F. (2003). Polycyclic aromatic hydrocarbons in Brazilian vegetables and fruits. *Food Control*, 14(1), 49-53.

Chen, B.H., Wang, C.Y. & Chiu, C.P. (1996). Evaluation of analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in meat products by liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(8), 2244-2251.

De Vos, R.H., Van Dokkum, W., Schouten, A. & Jong-Berkhout, P. (1990). Polycyclic aromatic hydrocarbons in Dutch total diet samples (1984-1986). *Food and Chemical Toxicology*, 28(4), 263-268.

Garcia-Falcón, M.S., González-Amigo, M.A., Lage-Yusty, M.A., & Simal-Lozano, J. (1999). Determination of benzo(a)pyrene in some Spanish commercial smoked products by HPLC-FL. *Food Additives and Contaminants*, 16(1), 9-14.

Genebra, A.M. de. (2004). Campanha global tenta reduzir o consumo de açúcar. *Valor Econômico*, 02 março 2004. Agronegócios.

GESP – Governo do Estado de São Paulo. (2002). Lei nº 11.241, de 19 de setembro de 2002. *Diário Oficial do Estado de São Paulo*, v.112, n.180, seção 1, p.2.

Godoi, A.F.L., Ravindra, K., Godoi, R.H.M., Andrade, S.J., Santiago-Silva, M., Vaeck, L.C. & Grieken, R.V. (2004). Fast chromatographic determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in aerosol samples from sugar cane burning. *Journal of Chromatography A*, 1027, 49-53.

Horwitz, W.; Kamps, L.R., & Boyer, K.W. (1980). Quality Assurance in the analyses of foods for trace constituents. *Journal of the Association of Analytical Chemistry*, 63(6), 1344-1354.

Jenke, D. (1996). Chromatographic method validation: A review of current practices and procedures. II. Guidelines for primary validation parameters. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 19(5), 737-757.

Kazerouni, N., Sinha, R., Che-Han Hsu, Greenberg, A., & Rothman, N. (2001). Analysis of 200 food items for benzo[a]pyrene and estimation of its intake in an epidemiologic study. *Food Chemical Toxicology*, 39(5), 423-436.

Kishikawa, N., Wada, M., Kuroda, N., Akiyama, S., & Nakashima, K. (2003). Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in milk samples by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography B*, 789, 257-264.

Lawrence, J.F, & Weber, D.F. (1984). Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in Canadian samples of processed vegetables and dairy products by liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 32(4), 794-797.

Nyman, P.J., Perfatti, G.A., Joe-Jr, F.L., & Diachenko, G.W. (1993). Comparison of two clean-up methodologies for the gas chromatographic/mass spectrometric determination of low nanogram/gram levels of polynuclear aromatic hydrocarbons in seafood. *Food Additives and Contaminants*, 10(5), 489-501.

ProCana – Ligado no dia a dia do setor [internet]. Available from: http://www.canaweb.com.br/conteudo/noticia.asp?id_materia=9118. Accessed 2005 March 30.

Santos, C.Y.M., Azevedo, & D.A., Neto, F.R.A. (2002). Selected organic compounds from biomass burning found in the atmospheric particulate matter over sugarcane plantation areas. *Atmospheric Environment*, 36, 3009-3019.

Serra, G.E, Pupin, A.M., & Toledo, M.C.F. (1995). Ensaios preliminares sobre a contaminação da cana-de-açúcar e derivados por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. *Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 29(2), 134-137.

Simko, P. (2002). Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked meat products and smoke flavouring food additives. *Journal of Chromatography B*, 770, 3-18.

Speer, K., Steeg, E., Horstmann, P., Kuhn, T., & Montag, A. (1990). Determination and distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in native vegetable oils, smoke fish products, mussels and oysters, and bream from the river Elbe. *Journal of High Resolution Chromatography*, 13(2), 104-111.

Taylor, J.K. (1987). *Quality assurance of chemical measurements*. Chelsea: Lewis Publishers Inc.

Welbhaar, R. (2002). Rapid determination of heavy polycyclic aromatic hydrocarbons in edible fats and oils. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 104(5), 282-285.

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

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

Zamperlini, G.C.M., Santiago-Silva, M., & Vilegas, W. (2000). Solid-phase extraction of sugar cane soot extract for analysis by gas chromatography with flame ionisation and mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A*, 889, 281-286.

Capítulo 3

DETERMINATION OF POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS IN CACHAÇA BY HPLC WITH FLUORESCENCE DETECTION

Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in cachaça by HPLC with fluorescence detection

Abstract

Cachaça is a distilled alcoholic beverage obtained from sugar cane fermentation. In this study, 25 brands of cachaça commercially available in Brazil were analysed for the presence of 5 PAHs (benz(a)anthracene, benzo(b)fluoranthene, benzo(k)fluoranthene, benzo(a)pyrene and dibenz(a,h)anthracene). The methodology involved liquid-liquid extraction with cyclohexane and dimethylformamide-water (9:1, v/v), clean up on silica gel column and determination by high performance liquid chromatography using fluorescence detection. PAHs peak identity was confirmed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). Variable levels of summed PAHs were detected in the analysed samples, ranging from not detected to 1.94 µg/L. The results confirm the presence of PAHs in cachaça and suggest that contaminated sugar cane may be the source of PAHs in sugar cane spirits.

Keywords: Polycyclic aromatic hydrocarbon, sugar cane spirits, cachaça, HPLC, GC-MS

1. Introduction

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) constitute a large class of organic compounds containing two or more fused aromatic rings. During incomplete combustion or pyrolysis of organic matter, hundreds of these substances may be released in the environment. PAHs have been found as contaminants in different food categories such as dairy products, vegetables, fruits, oils, coffee, tea, cereals and smoked meat (Kruijf *et al.*, 1987; De Vos *et al.*, 1990; Pupin and Toledo, 1996; Kazerouni *et al.*, 2001; Simko, 2002; Camargo and Toledo, 2002; Camargo and Toledo, 2003; Lin *et al.*, 2005). Their presence in food originate mainly from processing and cooking (smoking, roasting, baking, frying). Foods can also be

contaminated by environmental PAHs that are present in the air (by deposition), soil (by transfer) and water (by deposition and transfer) (WHO, 1998; WHO 2005).

PAHs have attracted most attention because of their carcinogenic potential. During its 64th meeting the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) reviewed all information relevant to the toxicology, epidemiology, intake assessment, analytical methodology, formation, fate and occurrence of PAHs in food. Overall, the Committee concluded that 13 PAHs were clearly carcinogenic and genotoxic, including the five selected for this study: benz(a)anthracene, benzo(b)fluoranthene, benzo(k)fluoranthene, benzo(a)pyrene and dibenz(a,h)anthracene (WHO, 2005).

Cachaça is the denomination of a typical Brazilian distilled alcoholic beverage produced from fermented sugar cane juice (Cardoso *et al.*, 2004). In the year of 2002, 1.3 billion litres of cachaça were produced, of which 14.8 million litres were exported. This spirit is the second alcoholic beverage most consumed in the country and the third most consumed in the world. There are almost 30 thousand cachaça producers in Brazil and over 5 thousand cachaça brands available in the market (PBDAC, 2005).

At harvesting season, most sugar cane plantation is burnt in order to facilitate manual harvest and to protect rural workers from sharp leaves, insects and poisonous snakes (Zamperlini *et al.*, 2000; Godoi *et al.*, 2004). Studies conducted in Brazil have shown that sugar cane burning is an important source of PAHs emission and could be responsible for the presence of these contaminants in burned sugar cane and its by-products (Serra *et al.*, 1995; Azevedo *et al.*, 2002; Santos *et al.*, 2002; Godoi *et al.*, 2004). In recent study by Bosso (2004), urine samples from rural workers responsible for sugar cane manual harvest were analysed. The author reported that, during harvesting season, these rural workers are significantly more exposed to PAHs than during non-harvesting period and than a control group.

The Brazilian regulation regarding maximum levels (ML) of PAHs in food refers only to benzo(a)pyrene in liquid smoke (ML = 0.03µg/kg of the final product) and drinkable water (ML = 0,01 µg/L) (Brasil, 1990). The European Union has

recently established maximum level of benzo(a)pyrene in different foodstuff such as oils and fats (2.0 µg/kg), smoked meat, crustaceans (5.0µg/kg), bivalve molluscs (10.0µg/kg) and infants and baby foods (1.0µg/kg) (CEC, 2005).

The objective of the present study was to determine the levels of 5 PAHs (benz(a)anthracene, benzo(b)fluoranthene, benzo(k)fluoranthene, benzo(a)pyrene and dibenz(a,h)anthracene) in different brands of cachaça commercially available in the Brazilian market. This beverage has not so far been considered a source of exposure to PAH in the diet.

2. Material and methods

2.1. Standards and reagents

PAHs standards were purchased from Supelco Inc. (benz(a)anthracene and dibenz(a,h)anthracene) and Aldrich Chemical Co. (benzo(b)fluoranthene, benzo(k)fluoranthene, benzo(a)pyrene). Cyclohexane and N,N-dimethylformamide (HPLC grade) were purchased from Tedia Company Inc.. Acetonitrile (HPLC grade) and anhydrous sodium sulfate were purchased from J.T. Baker, silica gel (70-230 mesh, ASTM) from Merck AS Chemical Industries. Water was obtained from a Millipore Milli-Q water purification system.

2.2. Samples

Different brands of cachaça (25 samples) were purchased from supermarkets and cachaça stores in the city of Campinas, State of São Paulo (SP), in the years of 2004 and 2005. The chosen brands were those reported as the most consumed in the region of SP and were produced in 7 different states of the country. The collected samples were analysed in duplicate.

2.3. Extraction and clean up

Extraction and clean up procedures were based on the method described by Speer *et al.* (1990).

A 20 ml volume of the sample was transferred into a 500 ml separating funnel and PAHs were successively extracted with three aliquots of cyclohexane (50, 35 and 35 ml) and the combined solution with three aliquots of N,N-dimethylformamide-water (9:1, v/v) (50, 25 and 25 ml). Subsequently 100 ml of a 1% sodium sulfate solution was added and re-extracted with 50, 35 and 35 ml aliquots of cyclohexane. The combined extract was washed twice with 40 ml of water, dried with anhydrous sodium sulfate and concentrated on a rotary evaporator to 5 ml at 40°C.

The concentrated extract (5 ml) was purified by column chromatography on silica gel. A glass column (200 x 10 mm i.d.) was packed with 5 g deactivated silica gel (15% water) and 2.5 g anhydrous sodium sulfate on the top. The 5 ml extract was applied to the top of the column and eluted with 85 ml cyclohexane. The first 10 ml was discarded and the 10–85 ml fraction was concentrated to about 1 ml on a rotary evaporator at 40°C, and dried under a flow of nitrogen. The residue was then dissolved in 2 ml acetonitrile and analysed by HPLC with fluorescence detection and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS).

2.4. HPLC

The analysis was carried out using a Waters HPLC apparatus equipped with a Model 600 Controller pump, an in-line degasser, a Model 717 plus autosampler, a Model 474 fluorescence detector (excitation wavelength 290 nm and emission wavelength 430 nm) and a Millennium 32 data processor. For separation, a C18 column (Vydac 201 TP54, 250 x 4.6 mm, 5µm particle size) stable at 30°C was used. The mobile phase consisted of 75% acetonitrile and 25% water at a flow rate of 1 ml min⁻¹. The injection volume was 30 µL.

2.5. Peak identity confirmation by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)

Peaks were identified by comparing the retention time with that of the standard and by GC-MS. The identification of PAHs was conducted on a Hewlett-Packard (HP) 6890 gas chromatograph interfaced with a HP 5973 mass

spectrometer selective detector equipped with an autosampler HP 7683 and a Gerstel PTV injector. The analysis were performed by electron ionization (70 eV) and data were acquired in the single-ion monitoring mode (SIM). A HP5-MS fused capillary column (30m x 0.25mm i.d., 0.25µm film coated with 95% methyl-5% phenylpolysiloxane) and helium carrier at flow rate of 1.0 mL/min were used in the separation. The PTV temperature program was as follows: 120°C, hold for 0.05 min, 500°C/min to 300°C, hold for 5 min. Injections of 1µL were performed in the splitless mode and split valve was opened after 2 min. The GC oven temperature was programmed from 120°C to 280°C at a rate of 5°C/min with a 26 min final hold. Sample peaks were identified based on retention times on target ion chromatograms and in relative abundance of the qualifiers ions selected for each PAH in comparison with PAHs standards. The MS acquisition parameters are summarised in table 1.

Table 1 – MS data acquisition parameters

PAH	Retention time (min)	Ions monitored*
B(a)A	26.3	114, 150, 226, 228
B(k)F	31.2	126, 224, 252, 253
B(b)F	31.3	126, 224, 252, 252
B(a)P	32.5	126, 224, 250, 252
D(ah)A	38.5	139, 250, 276, 278

* Compounds were identified based on the relative abundance of the qualifiers ions selected.

B(a)A: benz(a)anthracene, B(b)F: benzo(b)fluoranthene, B(k)F: benzo(k)fluoranthene, B(a)P: benzo(a)pyrene, D(a,h)A: dibenz(a,h)anthracene

2.6. Quantification

The external standard plot method was used for quantification. Duplicate HPLC injections of 30µl PAHs standard solutions were used to construct linear regressions lines (peak area ratios versus PAH concentration). The detection limit for each PAH was calculated following Taylor (1987) guidelines.

2.7. Recovery study

Recovery experiments were carried out by spiking samples of cachaça with three different concentrations of PAHs standard solution ranging from 0.6 to 3.0 µg/L. The spiked samples as well as the unspiked controls were analysed in duplicate. Recoveries were calculated from the differences in total amounts of each PAH between the spiked and unspiked samples. The repeatability of the method was evaluated through the coefficients of variation (CV) associated to measurements of each PAH performed during recovery tests.

3. Results and Discussion

The mean recovery, CV and detection limits for benz(a)anthracene (B(a)A), benzo(b)fluoranthene (B(b)F), benzo(k)fluoranthene (B(k)F), benzo(a)pyrene (B(a)P) and dibenz(a,h)anthracene (D(ah)A) are presented in table 2. Recoveries obtained for different PAH ranged from 70.0 to 96.7% and the CV ranged from 11.5 to 21.3%. These results are satisfactory for determinations at µg/L levels (Horwitz *et al.*, 1980; Jenke, 1996). Results reported for PAHs were not corrected for recovery.

Table 2 – Detection limit, mean recovery (R) and coefficient of variation (CV) of PAHs in cachaça.

PAH	Detection Limit (µg/L)	R* (%)	CV (%)
B(a)A	0.007	70.7	14.1
B(b)F	0.007	80.2	12.6
B(k)F	0.006	96.7	12.0
B(a)P	0.011	74.5	11.5
D(ah)A	0.090	70.0	21.3

*Average of three different concentrations.

B(a)A: benz(a)anthracene, B(b)F: benzo(b)fluoranthene, B(k)F: benzo(k)fluoranthene, B(a)P: benzo(a)pyrene, D(a,h)A: dibenz(a,h)anthracene

Table 3 shows the levels of PAHs determined in different brands of cachaça and their respective producer state. Benz(a)anthracene and benzo(b)fluoranthene were the most representatives PAHs, detected in 96% of the analysed samples, while dibenz(a,h)anthracene was detected in 28% of the samples. Only one

cachaça sample was not contaminated with any of the 5 PAHs. Mean levels of summed PAHs were within the range of not detected to 1.94 µg/L. Samples of cachaça produced in the state of Ceará presented the highest mean levels of summed PAHs and the narrowest range of values (figure 1). The wider variation in the levels of PAHs observed among samples of cachaça from the other states could be related to different processing or differences on the type of sugar cane (burnt or not burnt) used in the process. Nowadays 30% of the sugar cane cultivated in the main Brazilian producer areas are mechanical harvested without prior burning (ProCana, 2005). Other possible sources of contamination are: 1) the contact of the product with coal tar: the use of reservoirs coated with coal tar to store cachaça may result in the transfer of PAHs from the tar to the beverage; 2) some cachaça brands have added sugar: the sugar used can be contaminated with PAHs, resulting in their presence in the final product (Camargo & Toledo, 2002; Bettin, 2005; Tfouni & Toledo, 2005).

There is not much data available in the literature concerning PAHs content in cachaça or any other sugar cane spirit. Serra *et al.* (1995), analysed two samples of cachaça for the presence of B(a)P and B(a)A and reported levels of contamination similar to those found in the present study: 0.27 and 0.40 µg/L for B(a)P and 0.49 and 0.50 µg/L for B(a)A. In another study, 30 cachaça samples were analysed for the presence of 16 PAHs (Bettin, 2001; Bettin & Franco, 2005). For the same 5 PAHs, the reported levels ranged from not detected (nd) to 5.0 µg/L (B(a)A), nd-9.0 µg/L (B(b)F), nd-9.0 µg/L (B(k)F), nd-6.0 µg/L (B(a)P) and nd-5.0 µg/L (D(ah)A). The authors also reported that cachaça produced from burnt sugar cane had higher PAHs levels than those processed from not burnt sugar cane. In the present study, the levels of the 5 PAHs in cachaça were relatively lower than the ones reported by Bettin (2001), which are at present the only known published data on the occurrence of PAHs in cachaça in Brazil.

Taking into consideration the various origins of the cachaça available in the Brazilian market, a more comprehensive study is needed in order to generate data that better reflect the extremely variety of cachaça available (over 5000 brands) as well as the influence of the different manufacture processes used by producers.

Table 3 – Levels of PAHs in cachaça from various Brazilian Federal States.

Sample	State	Mean Concentration of PAHs (µg/L) (SD)					Σ PAHs
		B(a)A	B(b)F	B(k)F	B(a)P	D(a,h)A	
1	SP	0.30 (0.02)	0.45 (0.02)	nd	0.21 (0.03)	nd	0.96
2		0.32 (0.09)	0.30 (0.02)	0.01 (0.00)	0.16 (0.01)	nd	0.78
3		0.28 (0.03)	0.49 (0.10)	nd	0.23 (0.01)	0.21 (0.06)	1.21
4		0.38 (0.01)	0.49 (0.03)	0.05 (0.01)	0.30 (0.02)	0.38 (0.06)	1.59
5		0.10 (0.02)	0.03 (0.01)	nd	0.02 (0.00)	nd	0.15
6		nd	nd	nd	nd	nd	---
7		0.04 (0.00)	0.03 (0.00)	nd	nd	nd	0.07
8	CE	0.35 (0.05)	0.75 (0.06)	0.02 (0.01)	0.36 (0.03)	0.43 (0.25)	1.91
9		0.23 (0.00)	0.63 (0.02)	nd	0.32 (0.01)	0.60 (0.02)	1.78
10		0.39 (0.01)	0.83 (0.11)	0.02 (0.00)	0.35 (0.01)	0.34 (0.17)	1.94
11	PE	0.11 (0.00)	0.23 (0.02)	nd	0.09 (0.03)	nd	0.43
12		0.09 (0.00)	0.05 (0.01)	0.04 (0.00)	0.07 (0.00)	nd	0.25
13		0.21 (0.01)	0.60 (0.05)	0.28 (0.02)	0.15 (0.00)	0.17 (0.05)	1.41
14		0.08 (0.00)	0.07 (0.00)	0.05 (0.00)	0.10 (0.00)	nd	0.30
15		0.07 (0.01)	0.07 (0.00)	0.05 (0.00)	0.10 (0.00)	nd	0.28
16	MG	0.02 (0.00)	0.53 (0.00)	nd	0.03 (0.00)	nd	0.10
17		0.11 (0.00)	0.05 (0.01)	0.05 (0.00)	0.08 (0.00)	nd	0.29
18		0.06 (0.00)	0.02 (0.00)	0.04 (0.00)	0.07 (0.00)	nd	0.20
19		0.05 (0.01)	0.04 (0.01)	0.05 (0.01)	0.08 (0.01)	nd	0.21
20		0.15 (0.01)	0.08 (0.01)	0.06 (0.00)	0.09 (0.00)	nd	0.38
21	PR	0.46 (0.02)	0.49 (0.01)	0.06 (0.00)	0.29 (0.00)	0.14 (0.04)	1.44
22		0.05 (0.00)	0.02 (0.00)	0.04 (0.03)	0.07 (0.00)	nd	0.17
23		0.12 (0.00)	0.07 (0.00)	0.04 (0.00)	0.08 (0.00)	nd	0.31
24	SC	0.12 (0.00)	0.07 (0.00)	0.05 (0.00)	0.09 (0.00)	nd	0.32
25	RS	0.04 (0.01)	0.02 (0.00)	0.02 (0.00)	0.07 (0.00)	nd	0.15

nd – not detected (detection limits on table 2).

SD – standard deviation

SP – São Paulo, CE – Ceará, PE – Pernambuco, MG – Minas Gerais, PR – Paraná, SC – Santa Catarina, RS – Rio Grande do Sul.

B(a)A: benz(a)anthracene, B(b)F: benzo(b)fluoranthene, B(k)F: benzo(k)fluoranthene, B(a)P: benzo(a)pyrene, D(a,h)A: dibenz(a,h)anthracene

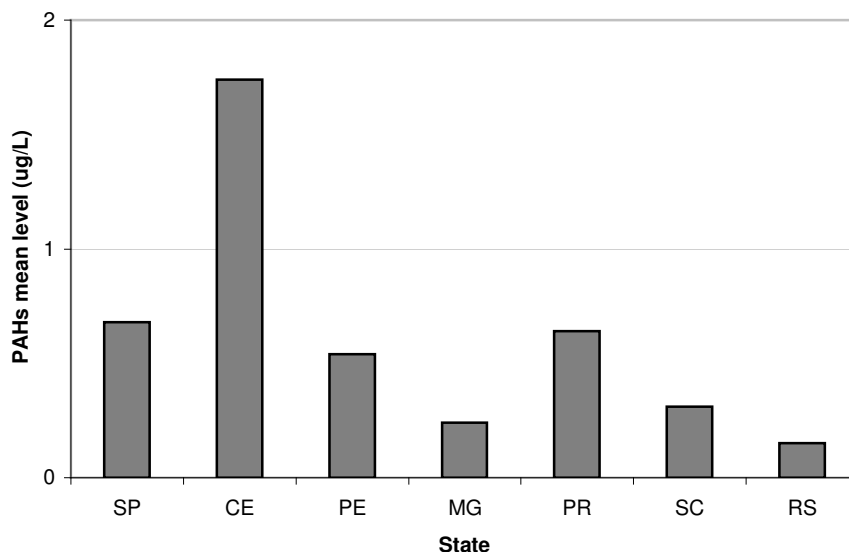


Figure 1 – Mean values of summed PAHs in cachaca from different Brazilian Federal States.

SP – São Paulo, CE – Ceará, PE – Pernambuco, MG – Minas Gerais, PR – Paraná, SC – Santa Catarina, RS – Rio Grande do Sul.

4. Conclusion

Results from previous and the present study confirm the presence of PAHs in sugar cane by-products and suggests that the practice of burning sugar cane before harvest may be the source of contamination. In Brazil, there has been an effort of the São Paulo State Government to reduce the practice of sugar cane burning: a State Regulation in force predicts a gradual elimination of the practice in the State in a period of 20 to 25 years (GESp, 2002).

Taking into consideration the carcinogenic potential of PAHs any measure directed to the reduction of these contaminants in the environment and in the diet is highly desirable and should be strongly stimulated.

References

Azevedo, D.A., Santos, C.T.M. and Neto, F.R.A. (2002) Identification and seasonal variation of atmospheric organic pollutants in Campos dos Goytacazes, Brazil. *Atmos. Environ.*, 36, 2383-2395.

Bettin, S.M. (2001) Da presença de cetonas, compostos fenólicos e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) em aguardentes. 193p. São Carlos: Tese (Doutor em Ciências (Química Analítica)) – Instituto de Química, Universidade de São Paulo.

Bettin, S.M.; Franco, D.W. (2005) Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) em aguardentes. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, 25 (2): 234-238.

Bosso, R.M.V. (2004) Investigação de biomarcadores de suscetibilidade e de exposição ambiental em indivíduos ocupacionalmente expostos à queima de canaviais. 106p. São José do Rio Preto: Tese (Doutor em Genética) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista (UNESP).

Brasil. Portaria MS/GM nº 36, publicada no Diário Oficial da União, 23 de janeiro, 1990.

Camargo, M.C.R. and Toledo, M.C.F. (2002) Avaliação da contaminação de diferentes grupos de alimentos por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. *Braz. J. Food Technol.*, 5: 19-26.

Camargo, M.C.R. and Toledo, M.C.F. (2003) Polycyclic aromatic hydrocarbons in Brazilian vegetables and fruits. *Food Control*, 14 (1), 49-53.

Cardoso, D.R.; Andrade-Sobrinho, L.G.; Leite-Neto, A.F.; Reche, R.V.; Isique, W.D.; Ferreira, M.M.C.; Lima-Neto, B.S. and Franco, D.W. (2004) Comparison between cachaça and rum using pattern recognition methods. *J. Agr. Food Chem.*, 52 (11): 3429-3433.

CEC – The Commission of the European Communities. Commission Regulation (EC) No 208/2005 of 4 February 2005. Official Journal of European Union, 8.2.2005.

De Vos, R.H., Van Dokkum, W., Schouten, A. and Jong-Berkhout, P. (1990) Polycyclic aromatic hydrocarbons in Dutch total diet samples (1984-1986). Food Chem. Toxicol., 28 (4), 263-268.

GESP – Governo do Estado de São Paulo. (2002) Lei n° 11.241, de 19 de setembro de 2002. Diário Oficial do Estado de São Paulo, v.112, n.180, seção 1, p.2.

Godoi, A.F.L., Ravindra, K., Godoi, R.H.M., Andrade, S.J., Santiago-Silva, M., Vaeck, L.C. and Grieken, R.V. (2004) Fast chromatographic determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in aerosol samples from sugar cane burning. J. Chromatogr. A, 1027, 49-53.

Horwitz, W.; Kamps, L.R. and Boyer, K.W. (1980) Quality Assurance in the analyses of foods for trace constituents. J. A.O.A.C., 63 (6), 1344-1354.

Jenke, D. (1996) Chromatographic method validation: A review of current practices and procedures. II. Guidelines for primary validation parameters. J. Liq. Chromatogr. R. T., 19 (5), 737-757.

Kazerouni, N., Sinha, R., Che-Han Hsu, Greenberg, A. and Rothman, N. (2001) Analysis of 200 food items for benzo[a]pyrene and estimation of its intake in an epidemiologic study. Food Chem. Toxicol., 39 (5), 423-436.

Kruijf, N.; Schouten, T. and Van Der Stegen, G.H.D. (1987) Rapid determination of benzo(a)pyrene in roasted coffee and coffee brew by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. J. Agr. Food Chem., 35 (4): 545-549.

Lin, D.; Tu, Y. and Zhu, L. (2005) Concentrations and health risk of polycyclic aromatic hydrocarbons in tea. *Food Chem. Toxicol.*, 43 (1): 41-48.

PBDAC – Programa Brasileiro de Desenvolvimento da Cachaça [internet]. Available from: <http://www.abrabe.org.br>. Accessed 2005 March 30.

ProCana – Ligado no dia a dia do setor [internet]. Available from: http://www.canaweb.com.br/conteudo/noticia.asp?id_materia=9118. Accessed 2005 March 30.

Pupin, A.M.; Toldeo, M.C.F. (1996) Benzo(a)pyrene in Brazilian vegetables oils. *Food Addit. Contam.*, 55 (2), 185-188.

Santos, C.Y.M., Azevedo, D.A. and Neto, F.R.A. (2002) Selected organic compounds from biomass burning found in the atmospheric particulate matter over sugarcane plantation areas. *Atmos. Environ.*, 36, 3009-3019.

Serra, G.E, Pupin, A.M. and Toledo, M.C.F. (1995) Ensaios preliminares sobre a contaminação da cana-de-açúcar e derivados por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. *Bol SBCTA*, 29 (2), 134-137.

Simko, P. (2002) Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked meat products and smoke flavouring food additives. *J. Chromatogr. B*, 770, 3-18.

Speer, K., Steeg, E., Horstmann, P., Kuhn, T. and Montag, A. (1990) Determination and distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in native vegetable oils, smoke fish products, mussels and oysters, and bream from the river Elbe. *J. High Res. Chromatog.*, 13 (2), 104-111.

Taylor, J.K. (1987) Quality assurance of chemical measurements. Chelsea: Lewis Publishers Inc.

Tfouni, S.A.V.; Toledo, M.C.F. (2005) Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in cane sugar. Food Control, submitted for publication.

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

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

Zamperlini, G.C.M., Santiago-Silva, M. and Vilegas, W. (2000) Solid-phase extraction of sugar cane soot extract for analysis by gas chromatography with flame ionisation and mass spectrometric detection. J. Chromatogr. A, 889, 281-286.

Capítulo 4

ESTUDO DO EFEITO DO PROCESSAMENTO NA CONTAMINAÇÃO DE CANA-DE-AÇÚCAR E DERIVADOS POR HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS

Estudo do efeito do processamento na contaminação de cana-de-açúcar e derivados por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos

RESUMO

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) são compostos formados a partir da queima incompleta de material orgânico e compreendem uma importante classe de contaminantes ambientais, muitos deles comprovadamente carcinogênicos. No presente estudo amostras de caldo de cana-de-açúcar colhida verde e cana colhida queimada e produtos intermediários e finais do processo de obtenção do açúcar de cana foram analisados para a presença de 5 HPAs carcinogênicos. Para a análise dos compostos foi utilizada a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detector de fluorescência. Os resultados obtidos evidenciaram a presença de HPAs em níveis relativamente maiores nos caldos obtidos da cana queimada, o que confirma que a queima dos canaviais é fonte de emissão de HPAs que podem ser transferidos para a cana-de-açúcar. A análise dos produtos intermediários do processamento da cana evidenciou uma redução dos níveis de HPAs conforme a cana-de-açúcar passa pelas diferentes etapas de processamento para obtenção de açúcar (caldo misto, caldo decantado, xarope, massa de primeira e açúcar), indicando um efeito positivo das etapas de clarificação, flotação e turbinagem na redução dos níveis desses compostos no produto final.

Palavras-chave: hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, cana-de-açúcar, processamento, CLAE.

SUMMARY

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) constitute a large class of environment contaminants formed during incomplete combustion or pyrolysis of organic matter. Many of these compounds are considered clearly carcinogenic and genotoxic. In the present study, samples of sugar cane juice (produced with burnt and not burnt sugar cane), intermediary products and by-products of the cane sugar industry

were analysed for the presence of 5 PAHs. The analysis were carried out by HPLC with fluorescence detection. Results show relatively higher levels of PAHs in cane juice from burnt sugar cane samples. This confirm that the practice of burning sugar cane before harvest is a source of PAHs emission in the environment which may be transferred to the sugar cane. Analysis of intermediary products of the process shows a decrease in the levels of PAHs along the cane sugar process (cane juice, clarified cane juice, syrup and sugar). This indicates a positive effect of clarification, floatation and centrifugation steps on the PAHs levels reduction on the final product.

Keywords: polycyclic aromatic hydrocarbons, sugar cane, processing, HPLC.

1 – INTRODUÇÃO

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) constituem uma ampla classe de compostos formados a partir da queima incompleta de material orgânico e são considerados importantes contaminantes ambientais. Estes compostos têm sido muito estudados nos últimos anos devido ao fato de muitos deles serem potencialmente carcinogênicos [35, 36]. O JECFA (Comitê Conjunto FAO/OMS de Peritos em Aditivos Alimentares), durante sua 64^a reunião, realizada em 2005, avaliou toxicologicamente o grupo dos HPAs e concluiu que 13 desses compostos são claramente carcinogênicos e genotóxicos, incluindo os 5 selecionados para o presente estudo [36].

A presença de HPAs em alimentos se deve principalmente à sua formação durante certos tipos de processamentos como defumação, torrefação e secagem direta com madeira, à poluição do ar e da água e à sua presença em solos terrestres e marinhos [35]. Assim, os HPAs têm sido encontrados nas mais diferentes categorias de alimentos, incluindo produtos como óleos vegetais, margarinas, maionese, produtos lácteos, frutas, vegetais, produtos defumados, chá, café, açúcar, cereais, água, alimentos de origem marinha, alimentos grelhados, entre outros. Os estudos publicados reportam a presença de diferentes HPAs em variados níveis de contaminação, indicando que não há um perfil padrão

de contaminação por estes compostos [3, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 13, 15, 18, 19, 20, 26, 27, 32, 37].

No Brasil, a produção de açúcar utiliza como matéria-prima a cana-de-açúcar, cuja colheita é feita principalmente após a queima dos canaviais. Este recurso é utilizado para eliminar a palha e a ponteira da cana e facilitar a colheita manual, permitindo um maior acesso à cultura. Além disso, protege os cortadores de cana de folhas afiadas, insetos e cobras e aumenta o teor de açúcar devido à evaporação da água [12, 14, 26, 38]. Ao mesmo tempo, a prática da queima dos canaviais antes da colheita introduz partículas de palhiço queimado na atmosfera, assim como inúmeros compostos potencialmente tóxicos, entre eles os HPAs. Estes compostos podem contaminar a cana-de-açúcar e, conseqüentemente, os produtos obtidos de seu processamento [1, 14, 25, 26, 38].

O Brasil é o maior produtor mundial de cana e de açúcar, seguido pela Índia e a Austrália. O período de safra da cana é de maio a novembro na região Centro-Sul, e de setembro a março na Norte-Nordeste. Assim, produz-se cana no país o ano todo [33]. Na safra 2004/2005, as usinas do país processaram 380 milhões de toneladas de cana-de-açúcar produzindo 24 milhões de toneladas de açúcar destinadas aos mercados interno e externo. No ano de 2005 está prevista a exportação de 14,3 milhões de toneladas de açúcar. Atualmente, a Rússia é o maior importador de açúcar brasileiro [24, 33].

O processamento da cana-de-açúcar para a produção de açúcar segue basicamente as seguintes etapas [21, 22, 23]:

- Colheita: a cana-de-açúcar pode ser colhida verde (sem queimar) ou queimada, manualmente ou mecanicamente, inteira ou picada;
- Lavagem da cana (opcional) e preparo para moagem;
- Moagem: formação do caldo misto;
- Clarificação: limpeza do caldo. Envolve basicamente as etapas de sulfitação (adiciona-se SO_2 (dióxido de enxofre) ao caldo), calagem (o caldo recebe leite de cal) e adição de compostos poliméricos. O caldo é aquecido e ocorre decantação e conseqüente formação do caldo clarificado (ou decantado) que

segue para a etapa de concentração. As impurezas são concentradas em um lodo que passa por um processo de filtração formando o caldo filtrado e a torta;

- Evaporação: etapa de concentração do caldo com formação do xarope;
- Flotação: etapa de limpeza com adição de compostos poliméricos;
- Cozimento: etapa de concentração com formação da massa cozida (mistura de sacarose e “mel”);
- Turbinagem: o açúcar é separado do “mel” em turbinas;
- Secagem/Resfriamento;
- Acondicionamento (envase);
- Refino: o açúcar cristal produzido nas usinas pode ser utilizado diretamente pelas indústrias ou seguir para as refinarias, onde é dissolvido em água e sofre novamente todo o processo de flotação até a obtenção do açúcar refinado.

Os tipos de açúcar produzidos pelas usinas variam dependendo do tamanho dos cristais de sacarose, do grau de clarificação do açúcar e da polarização, entre outros, conforme exemplificado a seguir:

- Açúcar cristal

Pode ser comercializado dessa forma ou enviado às refinarias para obtenção do açúcar refinado amorfo. A granulometria dos cristais pode variar de 0,6 a 0,7 mm.

- Açúcar VHP (very high polarization) e VVHP (very very high polarization)

Este açúcar é utilizado como matéria-prima nas refinarias, sendo também um produto de exportação. A diferença entre o açúcar VHP e VVHP está na polarização mínima destes produtos, 99% e 99,6% respectivamente.

A literatura internacional não apresenta dados específicos sobre a contaminação de cana-de-açúcar ou de açúcar de cana por HPAs. No Brasil, ensaios preliminares sobre a presença de HPAs em cana-de-açúcar e derivados recomendaram a realização de estudos detalhados e dirigidos para os diversos produtos intermediários e finais do processamento da cana-de-açúcar [26]. Pesquisa mais recentemente conduzida por Camargo [5] identificou a presença de

HPAs em açúcar de cana, sendo este alimento considerado a segunda maior fonte de ingestão destes contaminantes pela população brasileira.

Em 1991, o JECFA recomendou a elaboração de estratégias por parte das indústria e dos consumidores a fim de minimizar a exposição humana aos HPAs [34] e em 2005 recomendou algumas práticas para redução dos níveis de HPAs em alimentos durante processos de secagem e defumação. No presente, está sendo elaborado no âmbito do Codex Alimentarius um Código de Prática para a redução da contaminação de alimentos por HPAs [36].

Em vista desta realidade, torna-se importante o estudo dos processos de obtenção do açúcar de cana identificando-se os prováveis pontos de contaminação, desde a colheita da cana até a obtenção do produto final. Também é necessário que seja estudada a influência de cada etapa do processamento da cana no nível inicial de contaminação, de forma a identificar as etapas que possam estar envolvidas com a eliminação e/ou redução dos níveis destes compostos e possibilitar que sejam recomendadas práticas que reduzam a presença de HPAs no produto final.

Desta forma, o objetivo do presente estudo é analisar o caldo de cana-de-açúcar verde e queimada e produtos intermediários e finais do processo de obtenção do açúcar de cana quanto à presença dos seguintes HPAs: benzo(a)antraceno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno e dibenzo(ah)antraceno.

2 – MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 – Materiais

2.1.1 – Amostras

Duas usinas de açúcar e álcool do Estado de São Paulo colaboraram com o estudo fornecendo as amostras necessárias, que foram coletadas em 3 safras distintas (2003, 2004 e 2005). Uma das usinas produz açúcar cristal branco como produto final (usina A) e a outra produz açúcar VHP (usina B).

O estudo foi conduzido em duas etapas. Em estudo preliminar, realizado para se delinear o plano de amostragem e conduzido junto à usina A no ano de 2003, foram coletadas amostras nos seguintes pontos do processamento: caldo misto, caldo sulfitado, caldo caleado, caldo decantado, xarope, massa de primeira e açúcar cristal. A coleta dessas amostras foi feita em 3 momentos de um mesmo dia de modo a verificar a existência de variação diária.

Ao se verificar que não houve variação nos teores de HPAs durante um mesmo dia foi estabelecido um plano de coleta. Foram feitas 3 coletas de amostras durante a safra de 2004 (nos meses de junho, setembro e novembro) em vários pontos do processamento. Foram coletadas amostras dos seguintes produtos: caldo misto, caldo decantado, xarope e massa cozida. Foram coletadas adicionalmente em uma das usinas, em épocas diferentes, 5 amostras de caldo de cana-de-açúcar colhida verde e queimada. As usinas também forneceram 6 amostras, coletadas em diferentes épocas do ano de 2004, do seu produto final (açúcar cristal e açúcar VHP). Adicionalmente, na safra de 2005 foram coletadas apenas amostras de lodo, caldo filtrado e “mel”, os quais, no decorrer da pesquisa, foram identificados como importantes para interpretação dos resultados que estavam sendo obtidos.

Todas as amostras foram analisadas quanto à presença dos seguintes HPAs: benzo(a)antraceno (B(a)A), benzo(b)fluoranteno (B(b)F), benzo(k)fluoranteno (B(k)F), benzo(a)pireno (B(a)P) e dibenzo(ah)antraceno (D(ah)A).

2.1.2 – Solventes e reagentes

Os padrões de B(a)A e D(ah)A foram adquiridos da Supelco Inc. e os demais foram obtidos da Aldrich Chemical Co. Os solventes e reagentes utilizados foram acetonitrila grau cromatográfico (JT Baker); cicloexano e dimetilformamida grau cromatográfico (Tedia Company Inc.); sulfato de sódio anidro e sílica gel 60 (70-230 mesh, ASTM) da Merck AS Chemical Industries. A água utilizada foi obtida através de um sistema de purificação Milli-Q (Millipore Co.).

2.2 – Métodos

2.2.1 – Extração e limpeza

A metodologia utilizada para extração dos HPAs foi baseada nos métodos de Speer *et al.* [28] e Grimmer e Bohnke [15]. O método de extração utilizado variou de acordo com a amostra analisada, conforme descrito a seguir:

Lodo, caldo filtrado, “mel” e massa de primeira

As amostras foram homogeneizadas e pesadas (25g) em erlenmeyer, adicionaram-se 100 mL de hidróxido de potássio metanólico (2 mol/L), agitou-se por 60 min e deixou-se em descanso por uma noite. O material foi filtrado em funil de Buchner, transferido para um funil de separação e extraído com 2 porções de 100 ml de cicloexano. Juntaram-se as porções de cicloexano e lavou-se a fase orgânica primeiramente com 100ml de metanol-água (1:1, v/v) e a seguir com 100 ml de água.

Caldo misto, caldo decantado e xarope

As amostras foram homogeneizadas, pesadas (25g) e transferidas para um funil de separação. O material foi extraído com 3 porções de cicloexano (50, 35 e 35 mL) e os extratos foram combinados.

Açúcar

Às amostras homogeneizadas e pesadas (25g) foram adicionados 100 mL de cicloexano, a mistura foi homogeneizada por 1 min em um homogeneizador Turrtec TF-102 (Tecnal) e a seguir foi deixada sob agitação por 60 min. O material foi filtrado e transferido para um funil de separação.

Para todas as amostras, após a etapa descrita acima, os HPAs foram extraídos sucessivamente do cicloexano com 3 porções de dimetilformamida-água (9:1, v/v) (50, 25 e 25 mL). Adicionaram-se ao extrato combinado 100 mL de solução aquosa de sulfato de sódio 1% e este foi re-extraído com 3 porções de

cicloexano (50, 35 e 35 mL). Em seguida foi feita uma lavagem com água, sendo a água residual removida com sulfato de sódio anidro. O extrato foi então concentrado à vácuo em um evaporador rotativo a 40°C.

Para a limpeza dos extratos foi utilizada uma coluna de vidro empacotada com sílica gel (desativada com 15% água) e eluição do extrato com cicloexano. O volume foi recolhido em um balão de fundo redondo, concentrado em evaporador rotativo, seco sobre fluxo de nitrogênio e suspenso em 2 mL de acetonitrila para posterior injeção no cromatógrafo.

2.2.2 – Determinação cromatográfica

A análise dos HPAs foi feita por cromatografia líquida de alta eficiência. Foi utilizado um sistema cromatográfico Waters composto de bomba quaternária modelo 600, degaseificador em linha, injetor automático modelo 717 e detector de fluorescência 474. Os dados foram adquiridos e processados através do software Millennium 32. Para a separação dos compostos foi empregada uma coluna C18 polimérica (Vydac 201 TP54, 25cm, 4,6mm d.i., partículas de 5µm, estabilizada a 30°C) e fase móvel composta por acetonitrila-água (75:25, v/v) a um fluxo de 1mL/min. A detecção foi feita em comprimentos de onda de 290 nm (excitação) e 430 nm (emissão). O volume de injeção foi de 30 µL. Para a quantificação foi utilizado o método de padronização externa. A identidade dos compostos foi confirmada através da comparação dos tempos de retenção dos picos das amostras com os dos padrões e de co-cromatografia.

2.2.3 – Recuperação

Foram realizados testes de recuperação nas diferentes matrizes analisadas. As amostras foram fortificadas com soluções padrão de HPAs em 3 diferentes concentrações. Os níveis de HPAs adicionados variaram de 0,3 a 3,0 µg/kg nas amostras de açúcar cristal, caldo misto, caldo decantado, xarope e massa de primeira e de 3,0 a 20,0 µg/kg nas amostras de lodo, caldo filtrado e “mel”. As análises foram feitas em duplicata e os níveis de recuperação foram calculados a partir da diferença na concentração de HPAs entre as amostras fortificadas e não

fortificadas. A repetibilidade do método foi avaliada através do coeficiente de variação (CV) associado às medidas de cada HPA durante os testes de recuperação. Os limites de detecção foram calculados de acordo com Taylor [29], onde a concentração mínima de um analito medida é declarada com 95% ou 99% de confiança de que é maior que zero.

3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

As tabelas 1 e 2 mostram os resultados dos testes de recuperação, seus respectivos coeficientes de variação, e os limites de detecção para os 5 HPAs estudados, nas diversas matrizes analisadas. Os valores médios de recuperação obtidos ficaram acima de 60,0%, com um coeficiente de variação máximo de 31,2%, valores que estão dentro dos limites aceitos para análise de contaminantes em níveis de $\mu\text{g/kg}$ [16, 17].

Tabela 1 – Limites de detecção dos HPAs estudados.

HPA	Limite de detecção ($\mu\text{g/kg}$)
Benzo(a)antraceno	0,006
Benzo(b)fluoranteno	0,006
Benzo(k)fluoranteno	0,005
Benzo(a)pireno	0,009
Dibenzo(ah)antraceno	0,007

A tabela 3 apresenta os teores de HPAs nas amostras de caldo de cana colhida verde e queimada. Esses caldos apresentaram uma média da somatória dos HPAs estudados de 0,32 $\mu\text{g/kg}$ e 1,32 $\mu\text{g/kg}$, respectivamente. A maior concentração de HPAs nos caldos obtidos de cana queimada evidencia que a queima dos canaviais é uma fonte de contaminação do caldo de cana e, conseqüentemente, do açúcar produzido a partir deste. Hipótese semelhante foi sugerida por Serra *et al.* [26], que encontraram em cana queimada níveis de HPAs de 1,55 $\mu\text{g/kg}$ (somatória dos níveis de benzo(a)pireno, benzo(a)antraceno, fenantreno e naftaleno).

Tabela 2 – Recuperação (R) e coeficiente de variação (CV) dos HPAs nas diversas matrizes.

	HPA									
	B(a)A		B(b)F		B(k)F		B(a)P		D(ah)A	
	R (%)*	CV (%)	R (%)*	CV (%)	R (%)*	CV (%)	R (%)*	CV (%)	R (%)*	CV (%)
Açúcar cristal	84,0	22,3	81,5	16,3	85,3	7,8	85,9	10,4	82,4	16,2
Caldo misto	80,8	9,6	74,9	7,4	75,0	10,6	81,6	7,9	63,4	9,6
Caldo decantado	80,0	10,6	90,4	21,2	81,1	15,8	89,6	17,8	69,6	12,5
Xarope	91,0	3,1	97,6	3,7	95,6	7,9	89,3	2,3	88,7	2,9
Massa de primeira	60,1	23,0	70,0	31,3	60,0	17,2	61,1	31,0	62,1	28,7
Lodo	60,0	0,9	71,85	31,2	65,4	1,2	60,4	7,4	60,1	27,2
Caldo filtrado	75,5	20,1	72,4	30,0	65,3	9,2	71,2	16,1	61,4	11,9
“mel”	80,4	7,6	99,4	6,5	60,5	13,0	60,0	30,5	95,6	20,9

* Média de 3 concentrações diferentes.

B(a)A: benzo(a)antraceno, B(b)F: benzo(b)fluoranteno, B(k)F: benzo(k)fluoranteno, B(a)P: benzo(a)pireno, D(a,h)A: dibenzo(a,h)antraceno

Tabela 3 – Teor de HPAs nos caldos de cana-de-açúcar colhida verde e queimada.

HPA	Concentração média de HPAs (µg/kg) ^a (faixa)	
	Caldo de cana-de-açúcar verde	Caldo de cana-de-açúcar queimada
B(a)A	0,08 (0,04 – 0,15)	0,32 (0,10 – 0,83)
B(b)F	0,06 (0,04 – 0,11)	0,27 (0,09 – 0,61)
B(k)F	0,05 (0,04 – 0,08)	0,17 (0,08 – 0,35)
B(a)P	0,11 (0,07 – 0,18)	0,38 (0,14 – 0,83)
D(ah)A	0,03 (nd – 0,04)	0,17 (0,05 – 0,42)
Σ HPAs	0,32 (0,19 – 0,61)	1,32 (0,44 – 3,05)

^a Média de 5 amostras coletadas (analisadas em duplicata)

nd – abaixo dos limites de detecção da tabela 1.

B(a)A: benzo(a)antraceno, B(b)F: benzo(b)fluoranteno, B(k)F: benzo(k)fluoranteno, B(a)P: benzo(a)pireno, D(a,h)A: dibenzo(a,h)antraceno

Os teores de HPAs encontrados nas amostras fornecidas pelas usinas A e B, referentes aos produtos intermediários e finais do processamento da cana-de-açúcar, estão apresentados na tabela 4. Na figura 1, apresenta-se um fluxograma simplificado da fabricação de açúcar, identificando-se as etapas amostradas.

Tabela 4 – Teor de HPAs nas diversas amostras coletadas nas usinas A e B.

Concentração média de HPAs (µg/kg) ^a (faixa)							
	n	B(a)A	B(b)F	B(k)F	B(a)P	D(a,h)A	Σ HPAs
Caldo misto A	3	0,26 (0,07 – 0,51)	0,18 (0,05 – 0,39)	0,09 (0,05 – 0,15)	0,26 (0,09 – 0,51)	0,06 (0,04 – 0,09)	0,86 (0,30 – 1,65)
Caldo misto B	3	0,83 (0,67 – 1,07)	0,68 (0,54 – 0,82)	0,37 (0,34 – 0,42)	0,94 (0,78 – 1,05)	0,43 (0,30 – 0,59)	3,25 (2,65 – 3,63)
Caldo decantado A	3	0,12 (0,06 – 0,16)	0,04 (nd – 0,07)	0,02 (nd – 0,05)	0,08 (nd – 0,14)	0,01 (nd – 0,03)	0,26 (0,16 – 0,36)
Caldo decantado B	3	0,39 (0,11 – 0,83)	0,34 (0,11 – 0,69)	0,19 (0,08 – 0,35)	0,48 (0,15 – 0,96)	0,18 (0,06 – 0,38)	1,53 (0,45 – 3,21)
Lodo A	1	6,39	6,42	3,27	7,91	4,11	28,10
Lodo B	1	7,76	12,97	4,03	8,51	2,24	35,51
Caldo filtrado A	1	29,31	31,59	15,70	37,78	20,32	134,70
Caldo filtrado B	1	1,47	2,55	0,98	2,27	1,00	8,27
Xarope A	3	0,03 (nd – 0,03)	0,05 (0,03 – 0,06)	0,02 (nd – 0,05)	0,11 (0,09 – 0,12)	0,03 (0,01 – 0,05)	0,23 (0,17 – 0,32)
Xarope B	3	0,21 (0,11 – 0,37)	0,31 (0,14 – 0,51)	0,18 (0,10 – 0,27)	0,43 (0,20 – 0,71)	0,23 (0,09 – 0,42)	1,36 (0,63 – 2,28)
Massa de primeira A	3	0,02 (nd – 0,04)	0,01 (nd – 0,02)	0,01 (nd – 0,03)	0,03 (0,01 – 0,06)	nd	0,07 (0,01 – 0,16)
Massa de primeira B	3	0,12 (0,04 – 0,25)	0,19 (0,06 – 0,41)	0,12 (0,06 – 0,23)	0,25 (0,11 – 0,48)	0,15 (0,04 – 0,33)	0,83 (0,31 – 1,70)
“Mel” A	1	0,56	1,00	0,53	1,39	0,80	4,28
“Mel” B	1	3,14	5,27	2,68	6,54	4,22	21,85
Açúcar cristal A	6	nd	nd	nd	nd	nd	---
Açúcar VHP B	6	0,05 (0,02 – 0,07)	0,08 (0,07 – 0,10)	0,05 (0,01 – 0,07)	0,13 (0,11 – 0,17)	0,05 (0,04 – 0,08)	0,36 (0,27 – 0,48)

^a Média de n amostras coletadas em diferentes épocas do ano (analisadas em duplicata)

nd – não detectado (abaixo dos limites de detecção da tabela 1).

B(a)A: benzo(a)antraceno, B(b)F: benzo(b)fluoranteno, B(k)F: benzo(k)fluoranteno, B(a)P: benzo(a)pireno, D(a,h)A: dibenzo(a,h)antraceno

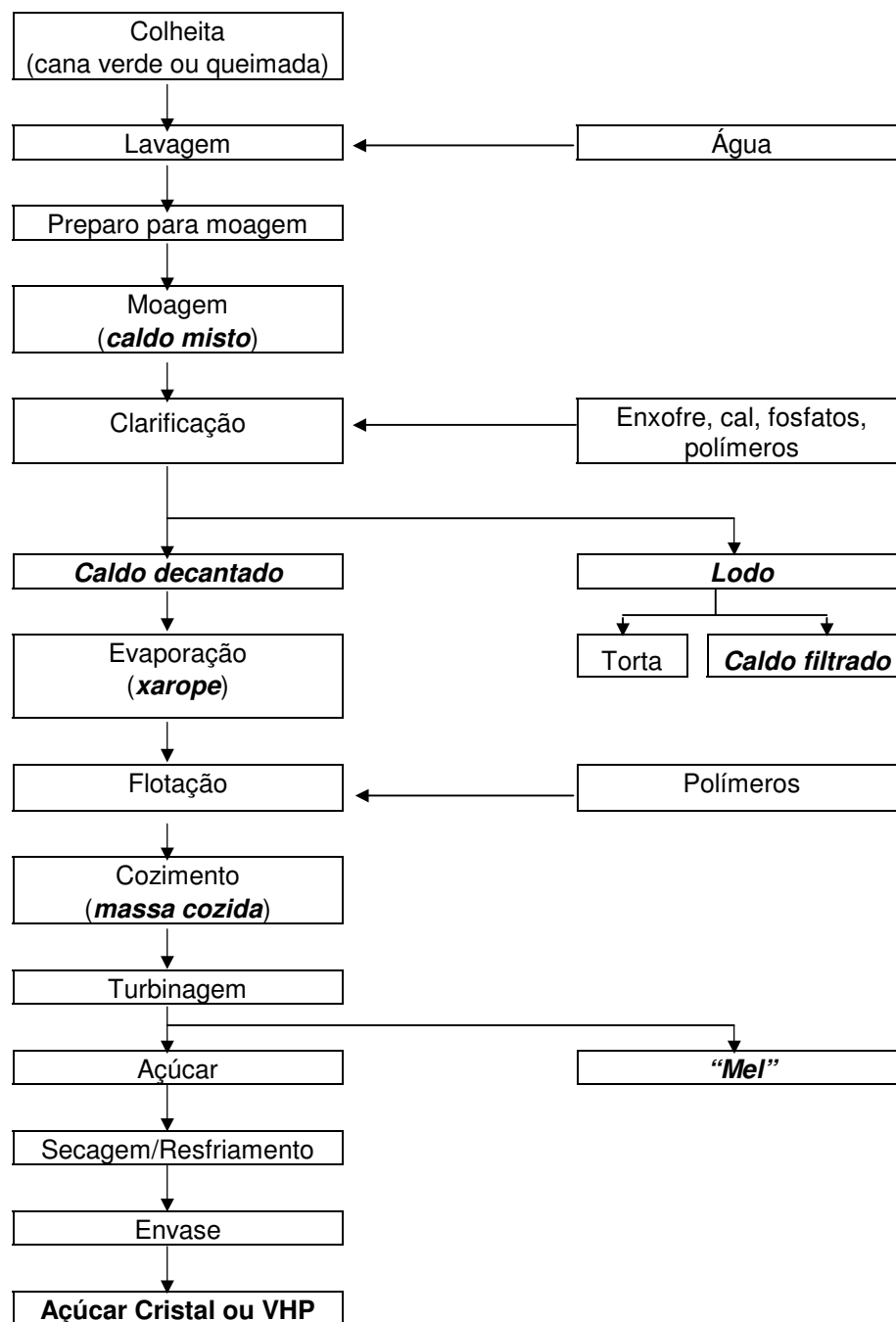


Figura 1 – Fluxograma simplificado da produção de açúcar cristal/VHP. As etapas em negrito são aquelas onde as amostras foram coletadas e analisadas.

Analisando-se os dados da tabela 4 e o esquema do processamento apresentado na figura 1, pode-se observar que nas amostras das duas usinas os níveis de HPAs encontrados foram reduzidos ao longo do processo (caldo misto,

caldo decantado, xarope, massa de primeira e açúcar), indicando um efeito positivo do processamento na eliminação dos contaminantes.

Apesar de o caldo misto da usina B apresentar uma contaminação inicial quatro vezes maior do que o da usina A, a redução nos níveis de HPAs no decorrer do processo ocorreu em ambas as usinas. Considerando-se a etapa de clarificação, os níveis médios da somatória de HPAs presentes no caldo misto foram reduzidos em 52% (usina B) e 70 % (usina A). O mesmo ocorreu nas etapas de flotação e turbinagem, onde a redução nos níveis de HPAs do xarope para a massa de primeira foi de 39% (usina B) e 70% (usina A), e a redução nos níveis de HPAs da massa de primeira para o açúcar foi de 43% (usina B) e 100% (usina A)

O fato de a redução nos níveis de contaminação ter sido maior no processamento da usina A provavelmente deve-se ao fato de que esta usina, por ser produtora de açúcar cristal, faz uso de etapas de clarificação e flotação mais rigorosas (adição de maior quantidades de agentes clarificantes) do que a usina B, que é produtora de açúcar VHP. De qualquer forma, em ambos os processos ocorreu uma redução considerável na contaminação (de 89 a 100%). O açúcar VHP apresentou uma média da somatória dos HPAs de 0,36 µg/kg, enquanto que no açúcar cristal não foi detectada a presença dos HPAs nas amostras coletadas ao longo do ano de 2004. Isso reforça a teoria de um efeito positivo das etapas de clarificação e flotação na redução da contaminação de açúcar por HPAs. Essa possibilidade já havia sido considerada em trabalhos anteriores onde a contaminação do açúcar refinado (que é submetido a dois processos de flotação) foi menor do que a de outros tipos de açúcar como o mascavo e o açúcar cristal comercial [26, 30].

Ao se verificar que a clarificação e a turbinagem são importantes na eliminação dos HPAs, decidiu-se analisar os produtos residuais dessas etapas a fim de se verificar se houve transferência de HPAs para os mesmos. Para tanto, foram analisadas amostras de lodo e caldo filtrado (produtos da decantação) e “mel” (produto da turbinagem) coletadas junto às duas usinas no ano de 2005. Conforme apresentado na tabela 4, foram encontrados altos teores de HPAs

nessas amostras, evidenciando uma transferência dos HPAs para esses resíduos, novamente reforçando a teoria de que as etapas de clarificação e turbinagem levam a uma diminuição nos níveis de HPAs no produto final (açúcar).

Entre os resíduos do processo, o caldo filtrado e o “mel” retornam ao processamento para obtenção do açúcar. A torta, por sua vez, segue para os canaviais para ser utilizada como adubo. Apesar de este resíduo ter sido analisado no presente trabalho, a recuperação foi baixa (30%), e portanto os níveis encontrados não foram apresentados na tabela 4 e tampouco considerados na discussão. Entretanto, tendo em vista os resultados encontrados para o lodo e o caldo filtrado, é de se esperar que a torta também apresente níveis elevados de HPAs. A presença de HPAs na torta pode levar à contaminação do solo onde ela será adicionada representando assim uma fonte adicional de contaminação para as culturas que venham a ser cultivadas no local.

Originalmente o objetivo do trabalho era estudar isoladamente o processo de produção do açúcar a partir de cana verde e a partir de cana queimada. Entretanto, devido ao fato de o processo ser contínuo e a introdução da cana na moenda ocorrer de forma misturada (cana verde e queimada), conforme a chegada dos caminhões nas usinas, não foi possível analisar o processo dessa forma. Como a quantidade de cana queimada utilizada no processamento de um determinado produto é uma variável de difícil controle, isso pode explicar os diferentes níveis de HPAs encontrados em vários trabalhos a respeito da contaminação de produtos derivados da cana-de-açúcar, como açúcares e cachaças [2, 7, 30, 31].

Apesar de existirem outras possíveis fontes de contaminação além da queima da cana (como por exemplo a água de lavagem da cana, a água de lavagem dos gases, a solda utilizada nas moendas e as incrustações de caldo nos trocadores de calor que queimam devido às altas temperaturas), o presente estudo evidenciou que o caldo, ao passar pelas etapas de clarificação, flotação e turbinagem tem os seus níveis de HPAs reduzidos, o que demonstra a eficiência dessas etapas na redução da contaminação no produto final.

4 – CONCLUSÕES

Os resultados indicam que a prática da queima dos canaviais pode levar à contaminação do caldo de cana-de-açúcar por HPAs. Entretanto, a contaminação do caldo não significa que o produto final venha a apresentar níveis semelhantes de contaminação, uma vez que as diversas etapas de limpeza a que o caldo é submetido para obtenção do produto final (açúcar) são eficazes na redução e/ou eliminação desses contaminantes.

A literatura relata que outros produtos derivados de cana-de-açúcar, como cachaça, melado, açúcar refinado, açúcar mascavo e açúcar demerara também apresentam níveis variados de HPAs, e que os cortadores de cana estão altamente expostos aos HPAs no período de safra, devido à queima dos canaviais [2, 4, 7, 30, 31], identificando assim a necessidade de que seja conduzida uma avaliação integrada do risco à saúde humana por exposição aos HPAs originados na queima dos canaviais.

Para tanto, recomenda-se que os níveis de HPAs nos produtos derivados da cana, assim como no solo utilizado para o cultivo e no sangue e/ou urina dos trabalhadores rurais, sejam monitorados de modo a possibilitar ações que venham a reduzir a exposição humana a compostos com potencial carcinogênico.

5 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] AZEVEDO, D.A., SANTOS, C.T.M., NETO, F.R.A. Identification and seasonal variation of atmospheric organic pollutants in Campos dos Goytacazes, Brazil. **Atmospheric Environment**, v. 36, p. 2383-2395, 2002.
- [2] BETTIN, S.M.; FRANCO, D.W. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) em aguardentes. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 2, p. 234-238, 2005.
- [3] BIRKHOLZ, D.A., COUTTS, R.T.; HRUDEY, S.E. Determination of polycyclic aromatic compounds in fish tissue. **Journal of Chromatography**, v. 449, p. 251-260, 1988.
- [4] BOSSO, R.M.V. **Investigação de biomarcadores de suscetibilidade e de exposição ambiental em indivíduos ocupacionalmente expostos à**

- queima de canaviais**. São José do Rio Preto, 2004. 106p. Tese (Doutor em Genética) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista (UNESP).
- [5] CAMARGO, M. C. R. **Avaliação da ingestão de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos através da dieta**. Campinas, 2001. 267p. Tese (Doutor em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- [6] CAMARGO, M.S.F.O.; TOLEDO, M.C.F. Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos em margarina, creme vegetal e maionese. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 20, n. 1, p. 51-55, 2000.
- [7] CAMARGO, M.C.R.; TOLEDO, M.C.F. Avaliação da contaminação de diferentes grupos de alimentos por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 5, p. 19-26, 2002a.
- [8] CAMARGO, M.C.R.; TOLEDO, M.C.F. Chá-mate e café como fontes de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAS) na dieta da população de Campinas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 22, n. 1, p. 49-53, 2002b.
- [9] CAMARGO, M.C.R.; TOLEDO, M.C.F. Polycyclic aromatic hydrocarbons in Brazilian vegetables and fruits. **Food Control**, v. 14, n. 1, p. 49-53, 2003.
- [10] CHEN, B. H.; WANG, C. Y.; CHIU, C. P. Evaluation of analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in meat products by liquid chromatography. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 44, n. 8, p. 2244-2251, 1996.
- [11] De VOS, R.H.; Van DOKKUM, W.; SCHOUTEN, A.; De JONG-BERKHOUT, P. Polycyclic aromatic hydrocarbons in Dutch total diet samples (1984-1986). **Food and Chemical Toxicology**, v. 28, n. 4, p. 263-268, 1990.
- [12] FURTADO, F. Mecanização da colheita da cana traz benefício ambiental. *Ciência Hoje on-line* (29/04/02). [internet]. Disponível em <http://cienciahoje.uol.com.br/controlPanel/materia/view/1382>. Acessado em 05 de abril de 2005.
- [13] GARCIA-FALCÓN, M.S.; GONZÁLEZ-AMIGO, S.; LAGE-YUSTY, M.A.; SIMAL-LOZANO, J. Determination of benzo(a)pyrene in some Spanish

- commercial smoked products by HPLC-FL. **Food Additives and Contaminants**, v. 16, n. 1, p. 9-14, 1999.
- [14] GODOI, A.F.L.; RAVINDRA, K.; GODOI, R.H.M.; ANDRARDE, S.J.; SANTIAGO-SILVA, M.; VAECK, L.C.; GRIEKEN, R.V. Fast chromatographic determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in aerosol samples from sugar cane burning. **Journal of Chromatography A**, v. 1027, p. 49-53, 2004.
- [15] GRIMMER, G.; BOHNKE, H. Polycyclic aromatic hydrocarbons profile of high protein foods, oil and fats by gas chromatography. **Journal of Association of Official Analytical Chemists**, v. 58, n. 4, p. 724-733, 1975.
- [16] HORWITZ, W.; KAMPS, L.R.; BOYER, K.W. Quality Assurance in the analyses of foods for trace constituents. **Journal of the Association of Analytical Chemistry**, v. 63, n. 6, p. 1344-1354, 1980.
- [17] JENKE, D. Chromatographic method validation: A review of current practices and procedures. II. Guidelines for primary validation parameters. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 19, n. 5, p. 737-757, 1996.
- [18] KAYALI-SAYADI, M.N.; RUBIO-BARROSO, S.; BECEIRO-ROLDAN, C.; POLO-DIEZ, L.M. Rapid determination of PAHs in drinking water samples using solid-phase extraction and HPLC with programmed fluorescence detection. **Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies**, v. 19, n. 19, p. 3135-3146, 1996.
- [19] KISHIKAWA, N.; WADA, M.; KURODA, N.; AKIYAMA, S.; NAKASHIMA, K. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in milk samples by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of Chromatography B**, v. 789, p. 257-264, 2003.
- [20] LAWRENCE, J.F. WEBER, D.F. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in Canadian samples of processed vegetables and dairy products by liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 32, n. 4, p. 794-797, 1984.

- [21] MARAFANTE, L.J. **Tecnologia da fabricação do álcool e do açúcar**. São Paulo: Ícone Editora Ltda.,1993.
- [22] MARTUCCI, E. T. **Tecnologia do açúcar de cana**. Campinas: Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia, 1983.
- [23] MASSON, N. P. M. **Caracterização das fontes poluidoras na fase industrial de uma usina de açúcar e álcool e proposição de melhorias**. Campinas, 1999. 52p. Monografia (Especialização em Gestão Ambiental) – Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas.
- [24] PROCANA – Ligado no dia a dia do setor [internet]. Disponível em: <http://www.procana.com.br/Conteudo/Conheca%20o%20Setor.asp>. Acesso em abril de 2005.
- [25] SANTOS, C.Y.M.; AZEVEDO, D.A.; AQUINO NETO, F.R.A. Selected organic compounds from biomass burning found in the atmospheric particulate matter over sugarcane plantation areas. **Atmospheric Environment**, v. 36, p. 3009-3019, 2002.
- [26] SERRA, G. E.; PUPIN, A. M.; TOLEDO, M. C. F. Ensaios preliminares sobre a contaminação da cana-de-açúcar e derivados por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 2, p. 134-137, 1995.
- [27] SIMKO, P. Review - Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked meat products and smoke flavouring food additives. **Journal of Chromatography B**, v. 770, p. 3-18, 2002.
- [28] SPEER, K.; STEEG, E.; HORTSMANN, P.; KUHN, T.; MONTAG, A. Determination and distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in native vegetable oils, smoked fish products, mussels and oysters, and bream from the river Elbe. **Journal of High Resolution Chromatography**, v. 13, p. 104-111, 1990.
- [29] TAYLOR, J.K. **Quality assurance of chemical measurements**. Chelsea: Lewis Publishers Inc., 1987.

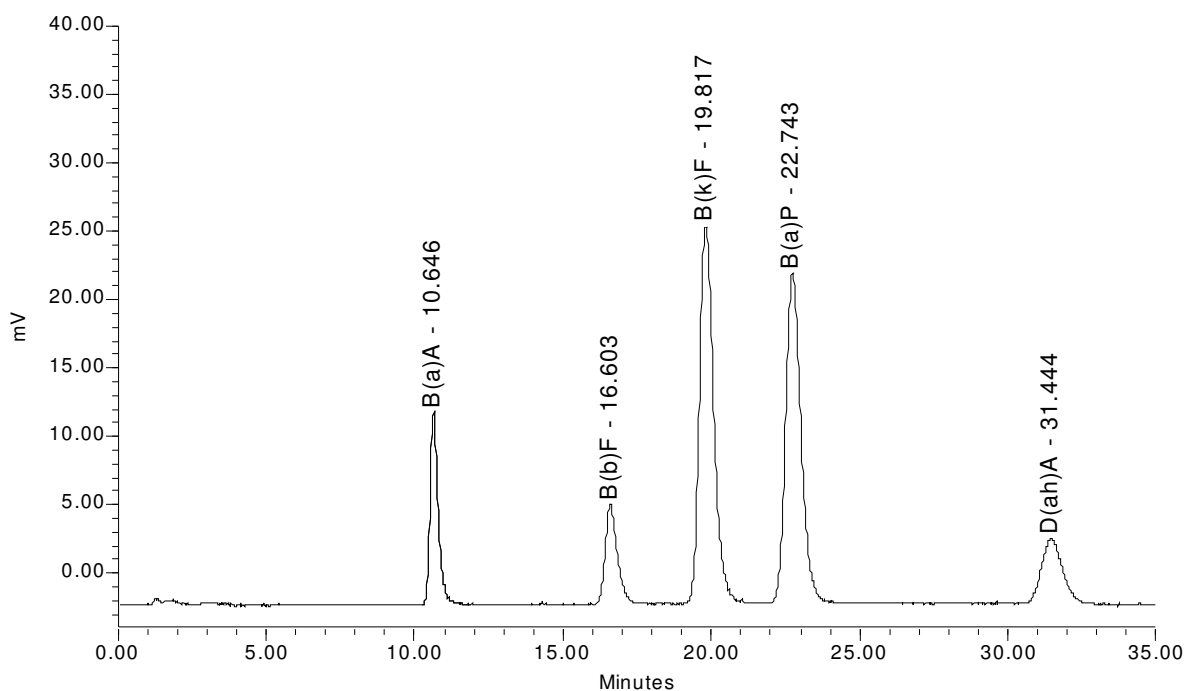
- [30] TFOUNI, S.A.V.; TOLEDO, M.C.F. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in cane sugar. **Food Control**, submetido para publicação, 2005a.
- [31] TFOUNI, S.A.V.; TOLEDO, M.C.F. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in cachaça by HPLC with fluorescence detection. **Food and Chemical Toxicology**, submetido para publicação, 2005b.
- [32] TOLEDO, M.C.F.; CAMARGO, M.S.F.O. Benzo(a)pireno em óleos de milho produzidos e comercializados no Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 18, n. 1, p. 73-76, 1998.
- [33] UNICA – União da Agroindústria Canavieira de São Paulo [internet]. Disponível em: http://www.unica.com.br/pages/unica_perfil1.asp. Acessado em abril de 2005.
- [34] WHO. Toxicological evaluation of certain food additives and contaminants (37th report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives). **Technical Report Series**, n. 28, 1991.
- [35] WHO. Selected non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons. **Environmental Health Criteria**, Geneva, n.202, 1998.
- [36] WHO – World Health Organization. **Summary and conclusions of the sixty-fourth meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives**. Rome, 47p, 2005.
- [37] YABIKU, H.Y.; MARTINS, M.; TAKAHASHI, M.Y. Levels of benzo(a)pyrene and others of polycyclic aromatic hydrocarbons in liquid smoke flavour and some smoked foods. **Food Additives and Contaminants**, v. 10, n. 4, p. 339-405, 1993.
- [38] ZAMPERLINI, G.C.M.; SANTIAGO-SILVA, M.; VILEGAS, W. Solid-phase extraction of sugar cane soot extract for analysis by gas chromatography with flame ionisation and mass spectrometric detection. **Journal of Chromatography A**, v. 889, p. 281-286, 2000.

Conclusão geral

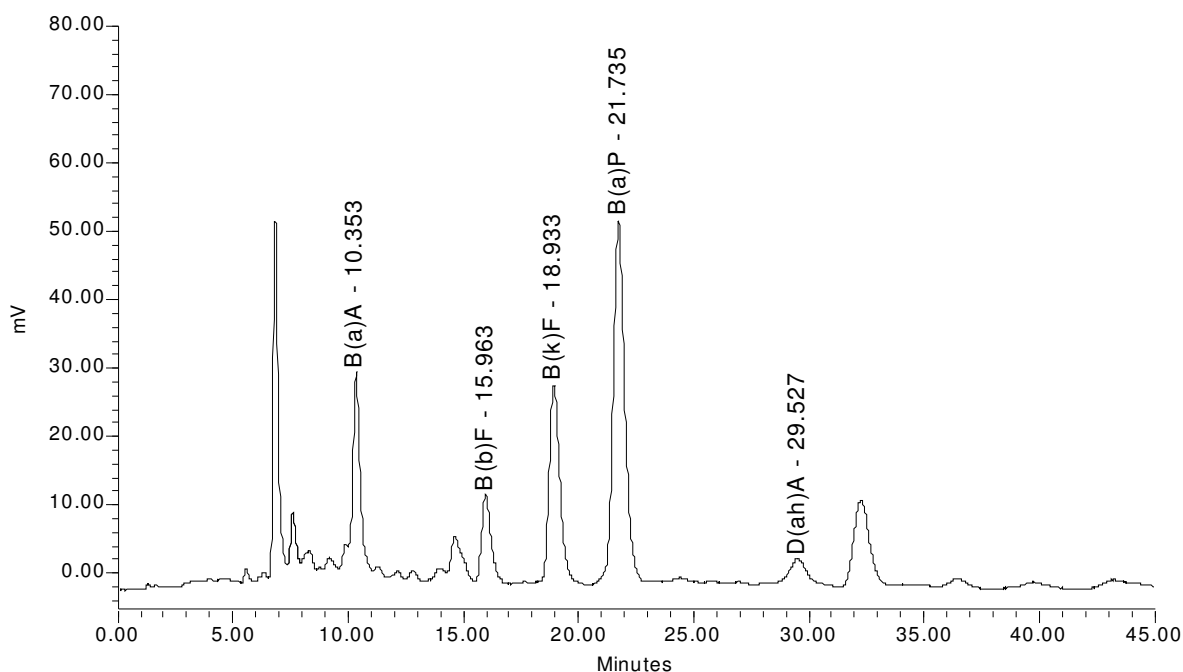
Conclusão Geral

Os resultados do presente estudo evidenciam a presença de HPAs, em níveis variáveis, nos diversos produtos intermediários e finais do processamento da cana-de-açúcar, confirmando assim que a prática da queima dos canaviais pode levar à contaminação do caldo de cana-de-açúcar por HPAs. Observou-se também que as diversas etapas de limpeza a que o caldo é submetido para obtenção do produto final (açúcar) são eficazes na redução e/ou eliminação desses contaminantes, reduzindo assim a contaminação do açúcar. Tendo em vista a exposição ocupacional dos cortadores de cana aos HPAs, foi identificada a necessidade de que seja conduzida uma avaliação integrada do risco à saúde humana por exposição aos HPAs originados na queima dos canaviais. Para tanto, recomenda-se que os níveis de HPAs nos produtos derivados da cana, assim como no solo utilizado para o cultivo e no sangue e/ou urina dos trabalhadores rurais, sejam monitorados de modo a possibilitar ações que venham a reduzir a exposição humana a esses compostos. Considerando-se o potencial carcinogênico apresentado por eles, qualquer medida direcionada à redução desses contaminantes no meio ambiente e na dieta é altamente desejável e deve ser estimulada.

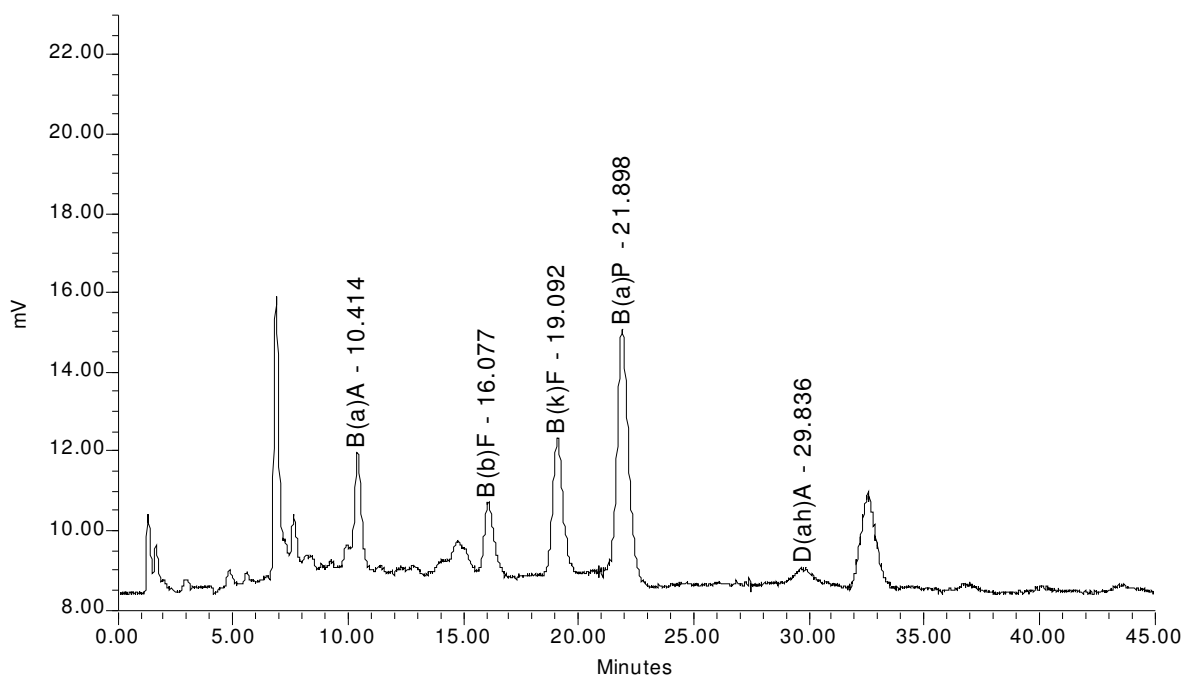
Anexos



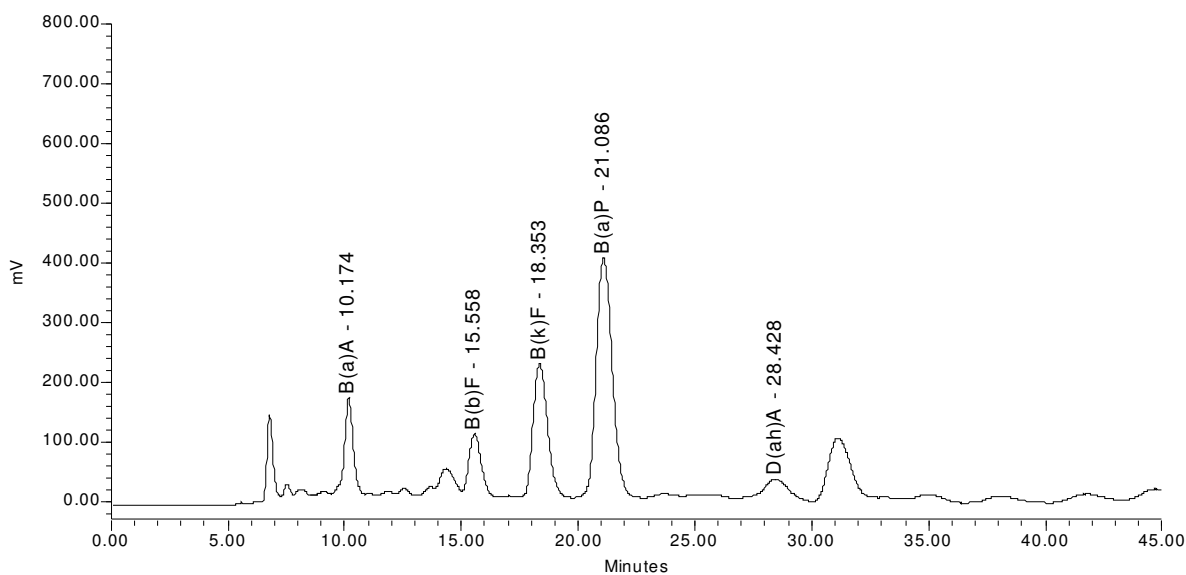
Anexo 1 – Cromatograma por CLAE de padrões de HPAs. Condições de análise: fase móvel acetonitrila:água (75:25, v/v), vazão 1 ml/min, coluna C18 (Vydac 201 TP54), detecção por fluorescência a 290 nm (excitação) e 430 nm (emissão). B(a)A: benzo(a)antraceno, B(b)F: benzo(b)fluoranteno, B(k)F: benzo(k)fluoranteno, B(a)P: benzo(a)pireno, D(ah)A: dibenzo(ah)antraceno.



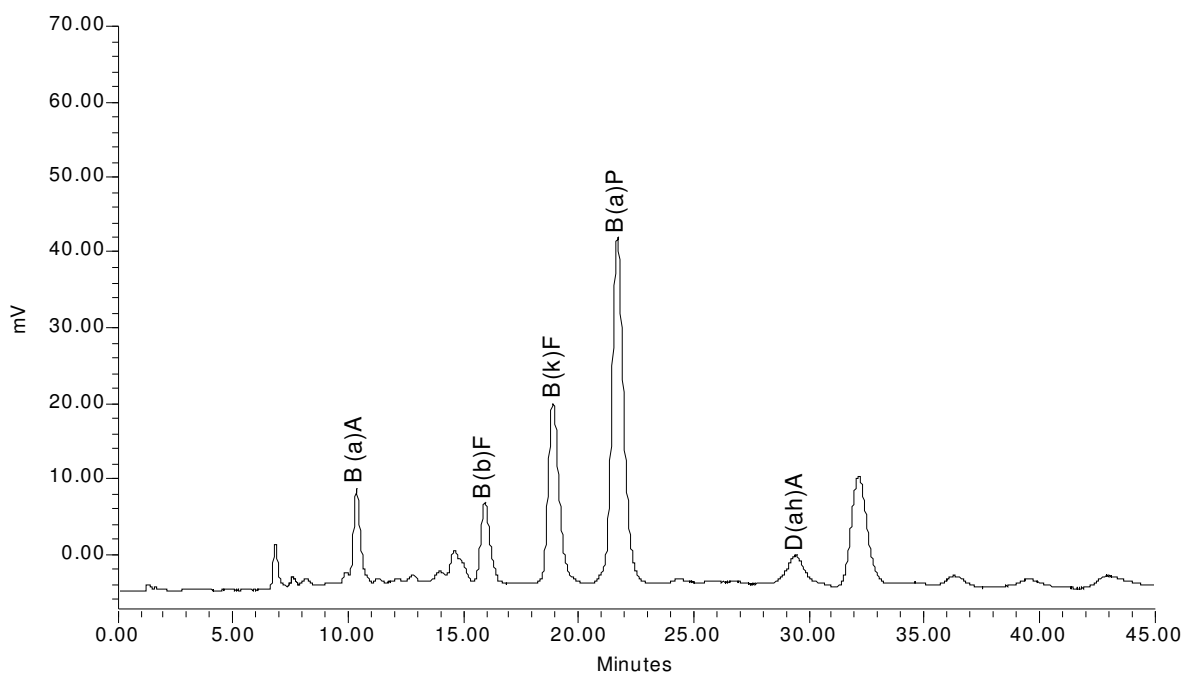
Anexo 2 – Cromatograma por CLAE de amostra de caldo misto. Condições de análise: fase móvel acetonitrila:água (75:25, v/v), vazão 1 ml/min, coluna C18 (Vydac 201 TP54), detecção por fluorescência a 290 nm (excitação) e 430 nm (emissão). B(a)A: benzo(a)antraceno, B(b)F: benzo(b)fluoranteno, B(k)F: benzo(k)fluoranteno, B(a)P: benzo(a)pireno, D(ah)A: dibenzo(ah)antraceno.



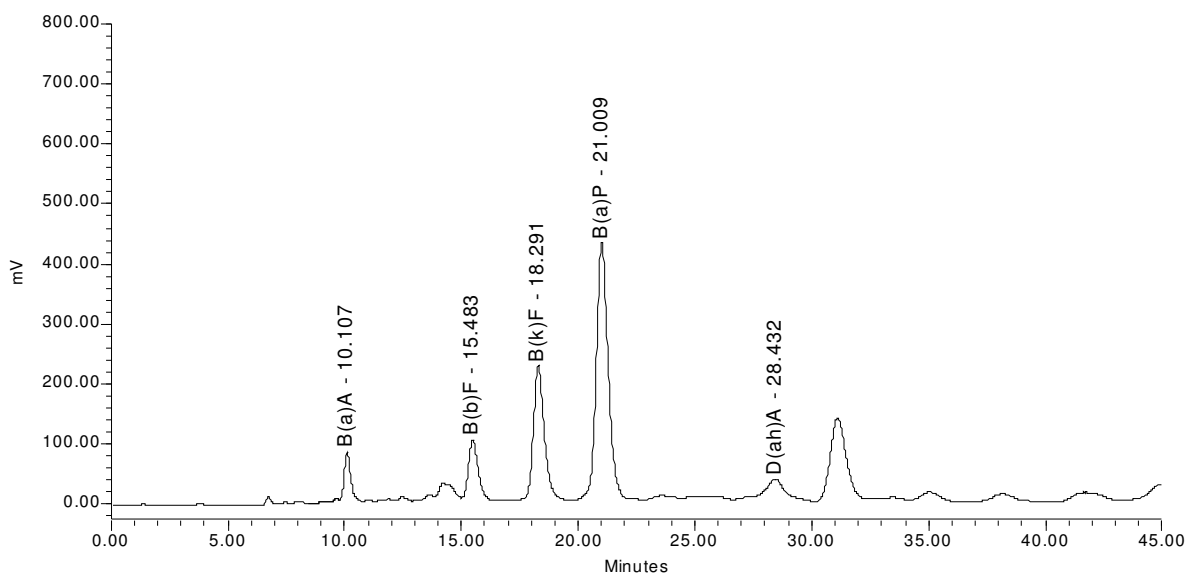
Anexo 3 – Cromatograma por CLAE de amostra de caldo decantado. Condições de análise: fase móvel acetonitrila:água (75:25, v/v), vazão 1 ml/min, coluna C18 (Vydac 201 TP54), detecção por fluorescência a 290 nm (excitação) e 430 nm (emissão). B(a)A: benzo(a)antraceno, B(b)F: benzo(b)fluoranteno, B(k)F: benzo(k)fluoranteno, B(a)P: benzo(a)pireno, D(ah)A: dibenzo(ah)antraceno.



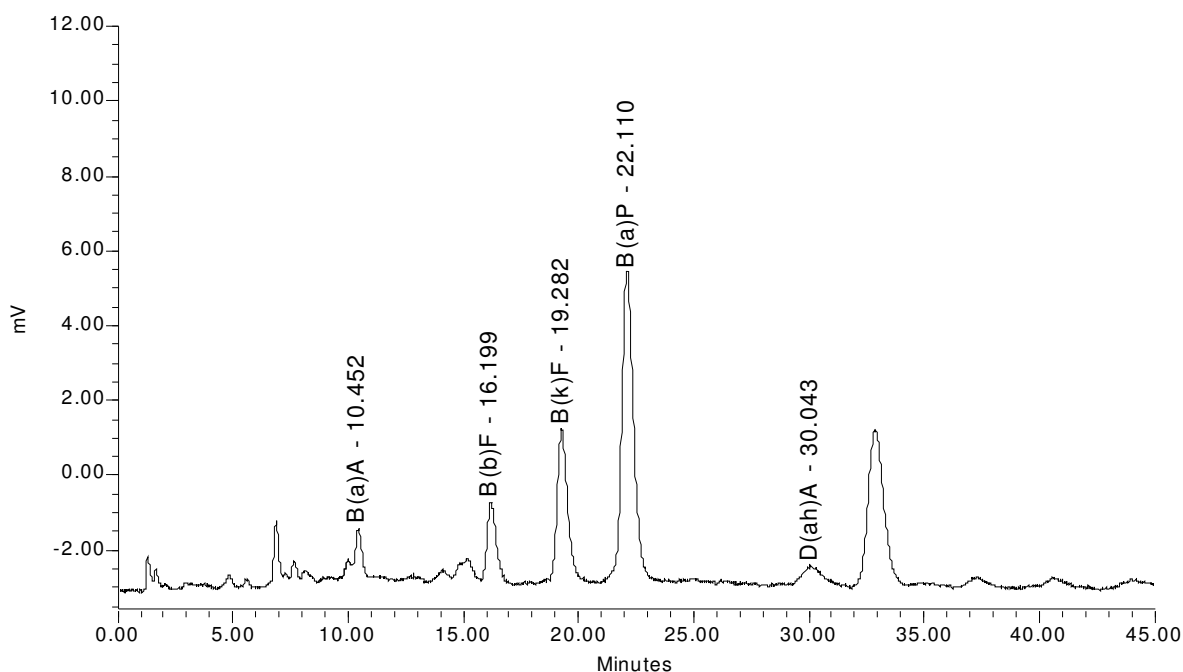
Anexo 4 – Cromatograma por CLAE de amostra de lodo. Condições de análise: fase móvel acetonitrila:água (75:25, v/v), vazão 1 ml/min, coluna C18 (Vydac 201 TP54), detecção por fluorescência a 290 nm (excitação) e 430 nm (emissão). B(a)A: benzo(a)antraceno, B(b)F: benzo(b)fluoranteno, B(k)F: benzo(k)fluoranteno, B(a)P: benzo(a)pireno, D(ah)A: dibenzo(ah)antraceno.



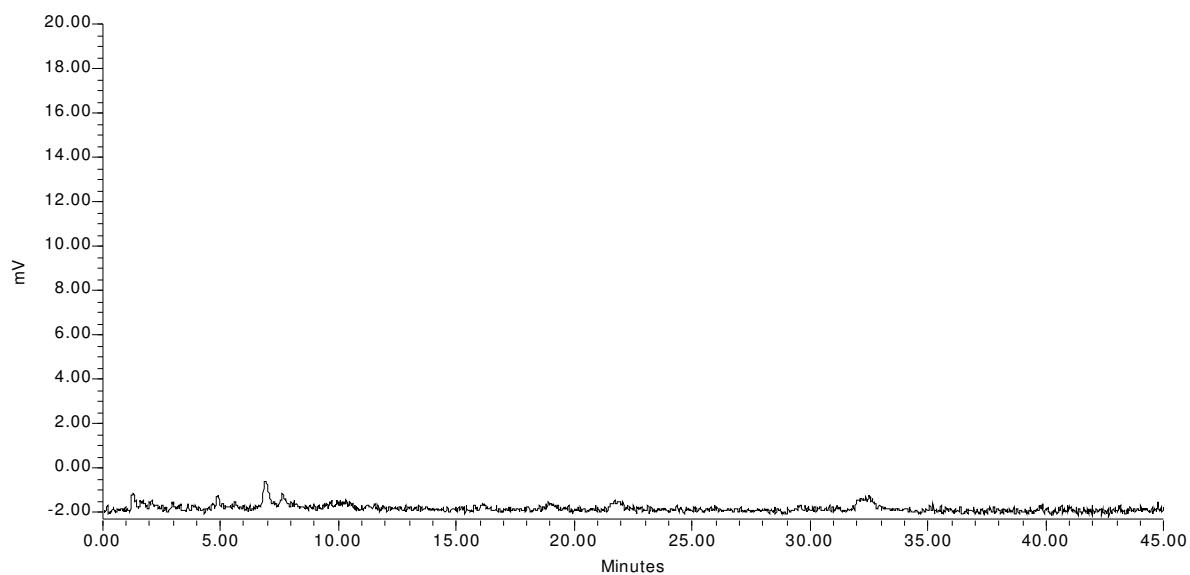
Anexo 5 – Cromatograma por CLAE de amostra de xarope. Condições de análise: fase móvel acetonitrila:água (75:25, v/v), vazão 1 ml/min, coluna C18 (Vydac 201 TP54), detecção por fluorescência a 290 nm (excitação) e 430 nm (emissão). B(a)A: benzo(a)antraceno, B(b)F: benzo(b)fluoranteno, B(k)F: benzo(k)fluoranteno, B(a)P: benzo(a)pireno, D(ah)A: dibenzo(ah)antraceno.



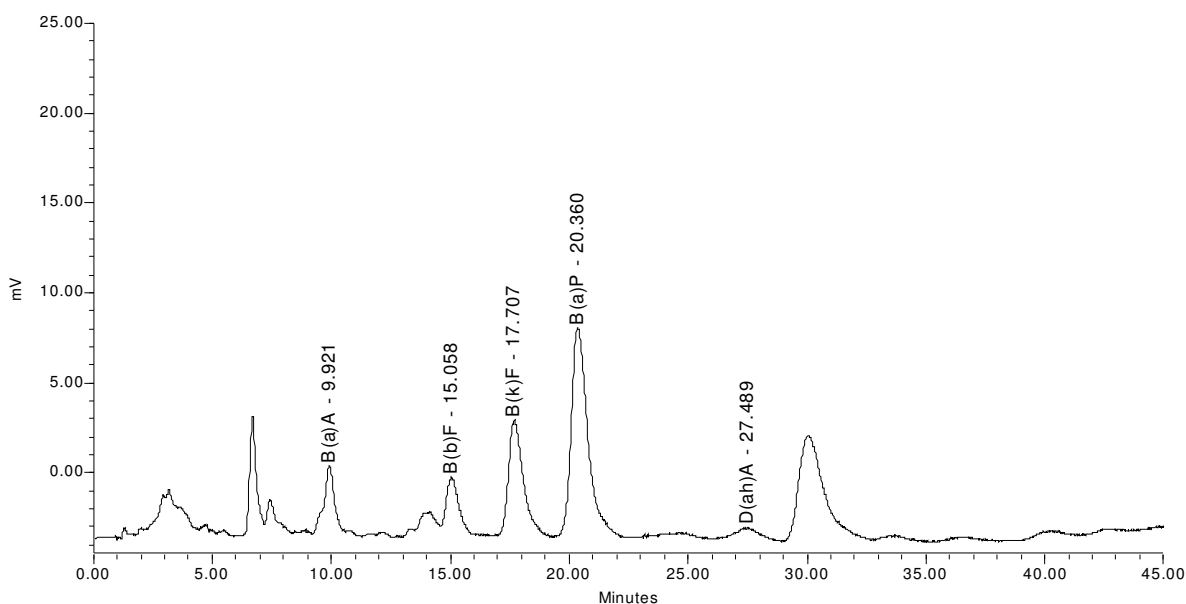
Anexo 6 – Cromatograma por CLAE de amostra de “mel”. Condições de análise: fase móvel acetonitrila:água (75:25, v/v), vazão 1 ml/min, coluna C18 (Vydac 201 TP54), detecção por fluorescência a 290 nm (excitação) e 430 nm (emissão). B(a)A: benzo(a)antraceno, B(b)F: benzo(b)fluoranteno, B(k)F: benzo(k)fluoranteno, B(a)P: benzo(a)pireno, D(ah)A: dibenzo(ah)antraceno.



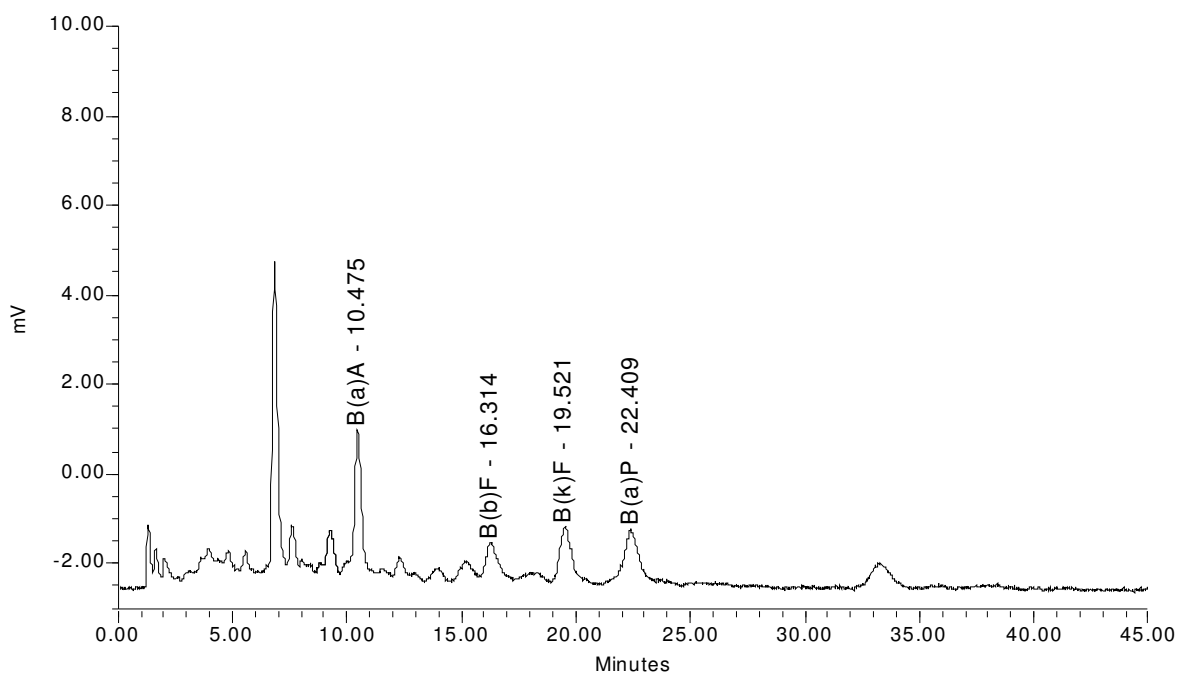
Anexo 7 – Cromatograma por CLAE de amostra de açúcar VHP. Condições de análise: fase móvel acetonitrila:água (75:25, v/v), vazão 1 ml/min, coluna C18 (Vydac 201 TP54), detecção por fluorescência a 290 nm (excitação) e 430 nm (emissão). B(a)A: benzo(a)antraceno, B(b)F: benzo(b)fluoranteno, B(k)F: benzo(k)fluoranteno, B(a)P: benzo(a)pireno, D(ah)A: dibenzo(ah)antraceno.



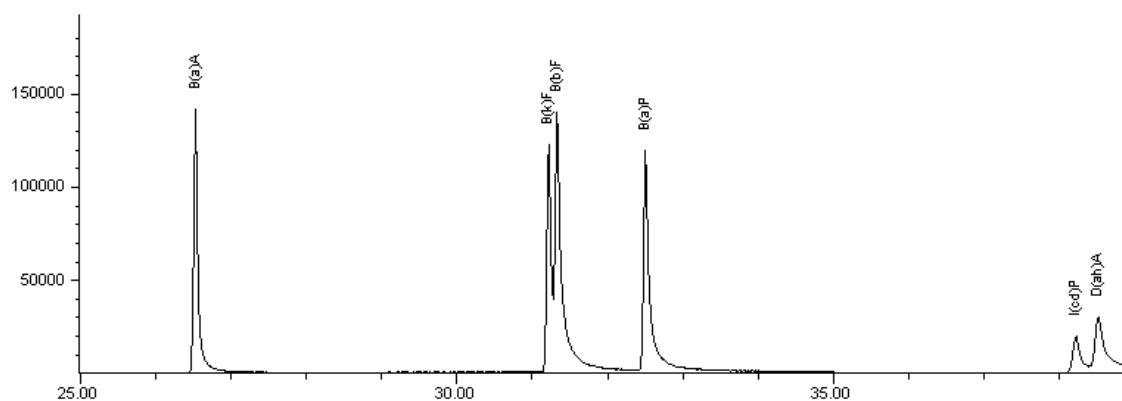
Anexo 8 – Cromatograma por CLAE de amostra de açúcar cristal (usina A). Condições de análise: fase móvel acetonitrila:água (75:25, v/v), vazão 1 ml/min, coluna C18 (Vydac 201 TP54), detecção por fluorescência a 290 nm (excitação) e 430 nm (emissão).



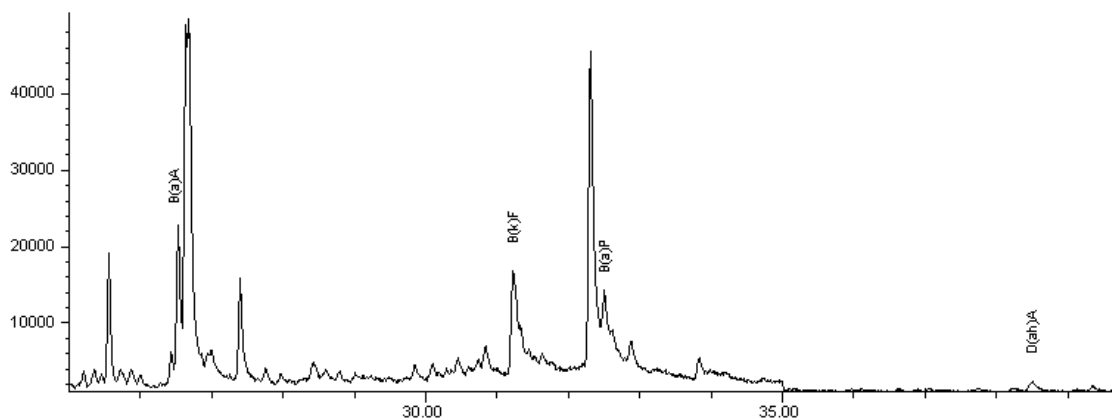
Anexo 9 – Cromatograma por CLAE de amostra de açúcar mascavo. Condições de análise: fase móvel acetonitrila:água (75:25, v/v), vazão 1 ml/min, coluna C18 (Vydac 201 TP54), detecção por fluorescência a 290 nm (excitação) e 430 nm (emissão). B(a)A: benzo(a)antraceno, B(b)F: benzo(b)fluoranteno, B(k)F: benzo(k)fluoranteno, B(a)P: benzo(a)pireno, D(ah)A: dibenzo(ah)antraceno.



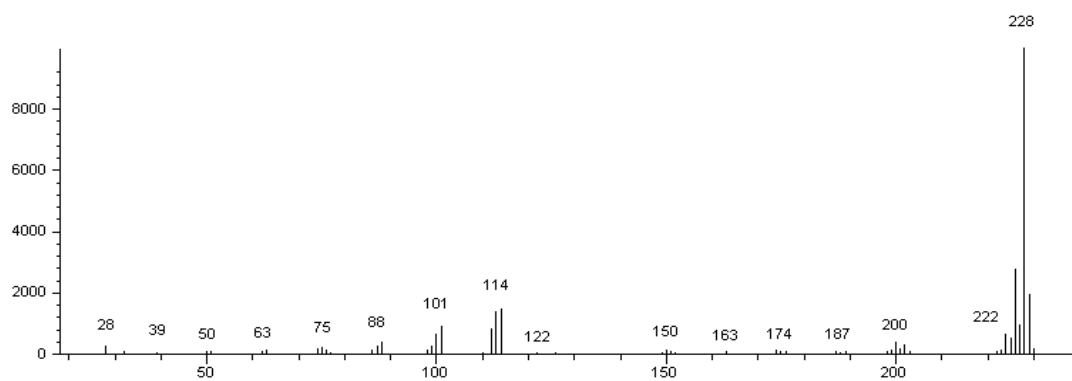
Anexo 10 – Cromatograma por CLAE de amostra de cachaça. Condições de análise: fase móvel acetonitrila:água (75:25, v/v), vazão 1 ml/min, coluna C18 (Vydac 201 TP54), detecção por fluorescência a 290 nm (excitação) e 430 nm (emissão). B(a)A: benzo(a)antraceno, B(b)F: benzo(b)fluoranteno, B(k)F: benzo(k)fluoranteno, B(a)P: benzo(a)pireno.



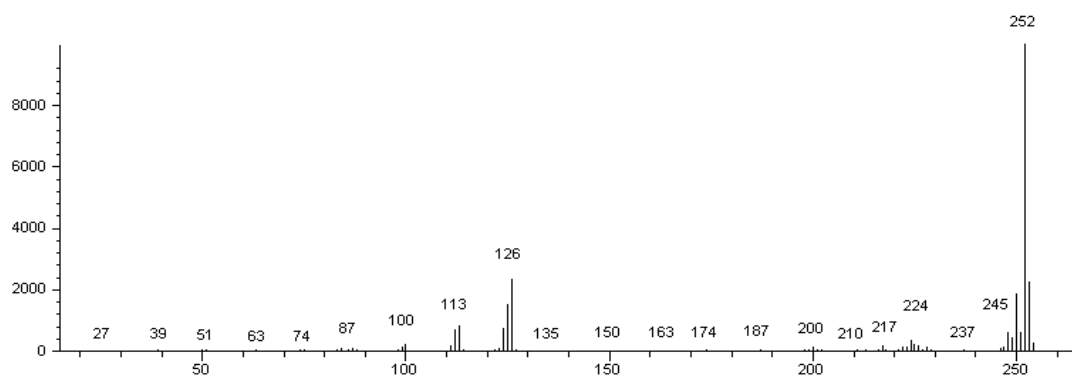
Anexo 11 – Cromatograma por CG-MS referente aos padrões de HPAs. Condições cromatográficas: coluna: HP5-MS (30 m x 0,25 mm d.i., 0,25 µm); vazão: 1,0 mL/min; volume de injeção: 1 µL (splitless); condições do injetor: temperatura inicial de 120°C, espera de 0,05 min, aquecimento de 500°C/min até 300°C; condições da coluna: temperatura inicial de 120°C, aquecimento de 5°C até 280°C, mantida por 26 min. B(a)A: benzo(a)antraceno, B(b)F: benzo(b)fluoranteno, B(k)F: benzo(k)fluoranteno, B(a)P: benzo(a)pireno, I(cd)P: indeno (1,2,3-cd)pireno, D(ah)A: dibenzo(ah)antraceno.



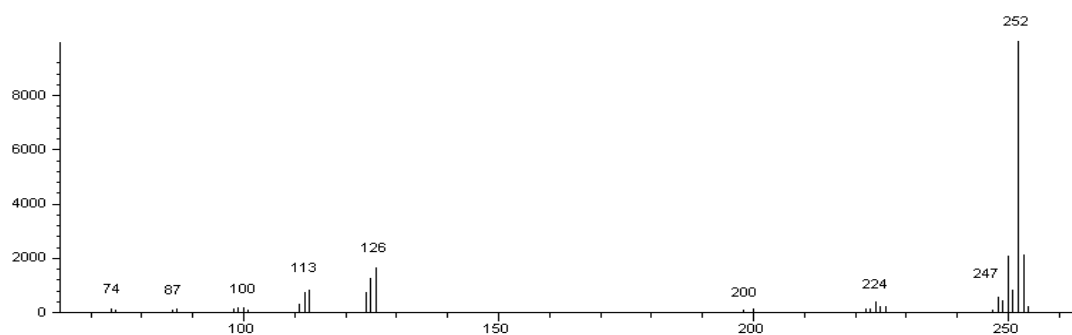
Anexo 12 – Cromatograma por CG-MS referente à amostra de cachaça. Condições cromatográficas: coluna: HP5-MS (30 m x 0,25 mm d.i., 0,25 μ m); vazão: 1,0 mL/min; volume de injeção: 1 μ L (splitless); condições do injetor: temperatura inicial de 120°C, espera de 0,05 min, aquecimento de 500°C/min até 300°C; condições da coluna: temperatura inicial de 120°C, aquecimento de 5°C até 280°C, mantida por 26 min. B(a)A: benzo(a)antraceno, B(k)F: benzo(k)fluoranteno, B(a)P: benzo(a)pireno, D(ah)A: dibenzo(ah)antraceno.



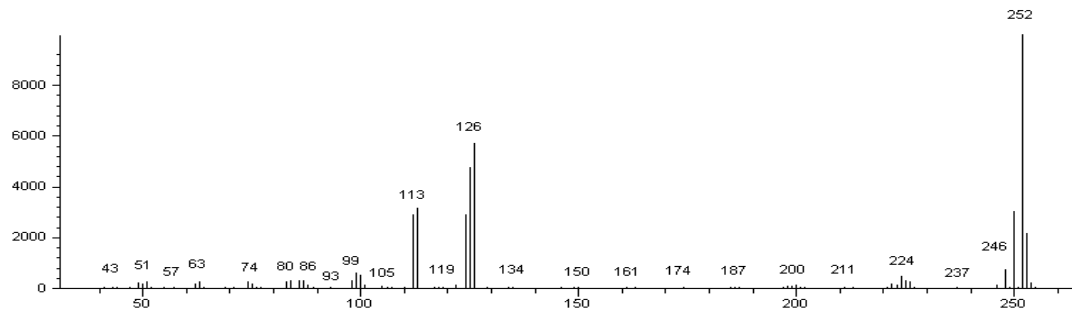
Anexo 13 – Espectro de massa do benzo(a)antraceno (biblioteca).



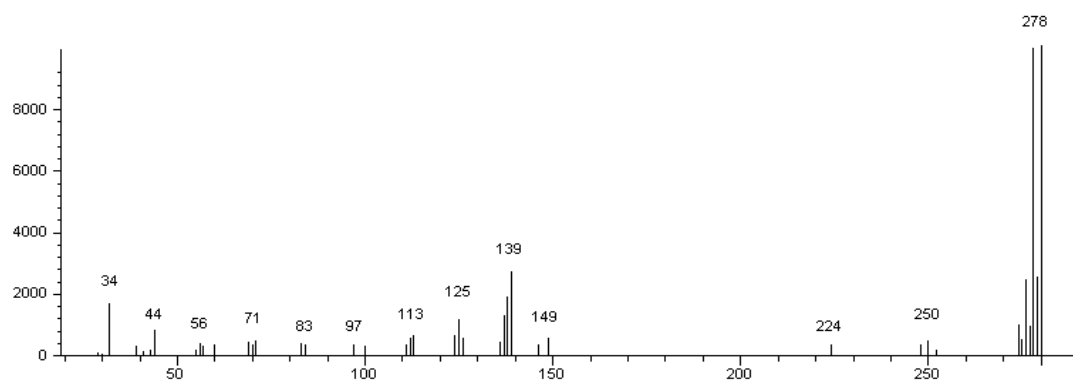
Anexo 14 – Espectro de massa do benzo(b)fluoranteno (biblioteca).



Anexo 15 – Espectro de massa do benzo(k)fluoranteno (biblioteca).



Anexo 16 – Espectro de massa do benzo(a)pireno (biblioteca).



Anexo 17 – Espectro de massa do dibenzo(a,h)antraceno (biblioteca).