



ANÁLISE DE CONTAMINANTES DE PROCESSAMENTO EM ALIMENTOS INFANTIS

Carolina dos Santos Silva Peres ¹; Rafaela Prata ²; Helena Teixeira Godoy ³

¹ Graduada em Engenharia de Alimentos - FEA/Unicamp; e-mail: c165776@dac.unicamp.br

² Doutoranda em Ciência dos Alimentos - FEA/Unicamp; e-mail: pratarafaela@hotmail.com

³ Professora Dra. do Departamento de Ciências dos Alimentos FEA/Unicamp; e-mail: helenatg@unicamp.br

1. RESUMO

A ocorrência de compostos tóxicos formados durante o processamento térmico nos alimentos tem recebido especial atenção de pesquisadores e autoridades regulatórias do mundo todo nos últimos anos, devido a toxicidade, dos altos níveis detectados e da ampla distribuição destes compostos em diversas categorias de alimentos. Dentre esses contaminantes, destacam-se os derivados furânicos 5-hidroxi-2,5-dimetil-3(2H)-furanona (HDMF) e 4-hidroxi-2,5-dimetil-3(2H)-furanona (HDMF). Este estudo teve como objetivo atender aos requisitos analíticos para a análise simultânea de HMF e HDMF, combinando um preparo de amostra simplificado a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

2. INTRODUÇÃO

Alimentos infantis à base de frutas, vegetais ou carne, popularmente conhecidos como papinhas, são amplamente comercializados e consumidos devido, principalmente, à sua facilidade tanto de utilização, quanto de consumo. Esses alimentos são fonte de nutrientes essenciais para o primeiro estágio de crescimento, como vitaminas e minerais. Entretanto, durante o seu processamento, são expostos a altas temperaturas, como a da esterilização, podendo levar a formação de compostos potencialmente tóxicos.

Os derivados furânicos, 5-hidroxi-2,5-dimetil-3(2H)-furanona (HMF) e 4-hidroxi-2,5-dimetil-3(2H)-furanona (HDMF), são alguns dos compostos tóxicos formados durante o processamento térmico dos alimentos.

Resultados positivos para testes de genotoxicidade têm atraído atenção para os níveis destes compostos em alimentos. Evidências de genotoxicidade foram obtidas *in vitro* e *in vivo* para o composto HDMF (EFSA, 2011), a qual estaria associado a geração de espécies reativas de oxigênio, contribuindo para um aumento do estresse oxidativo celular e indução de dano ao DNA (HIRAMOTO et al., 1996; HIRAMOTO et al., 1998; YAMASHITA et al., 1998; EFSA, 2011). Além disso, para o HMF demonstraram a biotransformação do HMF em 5-sulfoximetilfurfural, resultando em um intermediário altamente reativo que pode interagir com macromoléculas celulares como DNA, RNA e proteínas, promovendo danos estruturais e efeitos genotóxicos e mutagênicos (TEIXIDO et al., 2008; MONIEN et al., 2012).

3. OBJETIVOS

Determinar a presença de contaminantes de processamento (HMF e HDMF) em alimentos infantis, empregando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).



4. METODOLOGIA

4.1 Reagentes e soluções padrão

Foram utilizados os padrões analíticos de 4-hidroxi-2,5-dimetil-3(2h)-furanona (pureza > 99,8%) e 5-hidroximetilfurfural (98%). Todas as soluções padrão foram armazenadas a 4°C e protegidas da luz. Também foram utilizados acetonitrila, hexano, água deionizada e filtros de seringa de PVDF (tamanho de poro de 0,2 µm, 13mm i.d.).

4.2 Amostragem

Um total de 15 amostras de alimentos infantis à base de frutas, foram adquiridas na cidade de Campinas-SP, no período de setembro à outubro de 2019. As amostras foram coletadas aleatoriamente em supermercados e todas foram mantidas em sua embalagem original, a -22 °C até o momento da análise. As amostras foram classificadas em 2 diferentes categorias: amostras de alimentos infantis industrializados e caseiros.

4.3 Análise Simultânea de HMF e HDMF

4.3.1 Preparo de Amostra

Para o preparo, 5 g de amostra foram pesados e adicionados de 5 mL de acetonitrila. A mistura foi agitada durante 1 min e foram adicionados 5 mL de hexano. A mistura foi agitada novamente por 1 min, seguida por centrifugação a 5000 rpm por 15 min. A fase superior, composta por hexano, foi removida e a fase inferior, composta por acetonitrila, foi transferida para um balão volumétrico de 50 mL. O resíduo da amostra foi reextraído com 5 mL de acetonitrila e 5 mL de hexano nas mesmas condições. Em seguida, os extratos combinados foram completados com água deionizada até o volume de 50 mL. Antes da análise por CLAE-DAD, os extratos foram filtrados através de um filtro de seringa de 0,2 µm de PVDF.

4.3.2 Análise cromatográfica

O sistema de cromatografia líquida de alta eficiência empregado foi o Agilent 1260 Infinity Quaternary com detector de arranjo de diodos (DAD). A separação cromatográfica foi realizada em uma coluna de fase reservada (100mm x 4,6mm d.i., tamanho de partícula de 3,5 µm; Eclipse mais C18 Agilent) que foi mantida a 30°C. A fase móvel consistiu em água deionizada (A) e acetonitrila (B), e o gradiente de eluição empregado foi o seguinte: 0–6 min, 5% de B; 6,1–9 min, 100% de B; 9,1–14 min, 5% B, a uma vazão de 1 mL min⁻¹, resultando em um tempo total de execução de 14 min. O DAD foi definido no comprimento de onda de 284 nm, e o volume de injeção estava entre 1 e 100 µL de acordo com a concentração de HMF e HDMF do extrato da amostra.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Preparo de amostra

Devido ao caráter lipofílico dos derivados furânicos e à complexidade das matrizes de alimentos infantis, a acetonitrila foi escolhida como solvente de extração. Uma comparação entre a abordagem do preparo de amostra baseado na diluição do extrato com água deionizada e a



limpeza do extrato utilizando a técnica de extração em fase sólida dispersiva (d-SPE) com os adsorventes PSA, C18 e CGB é mostrada na Fig. 1.

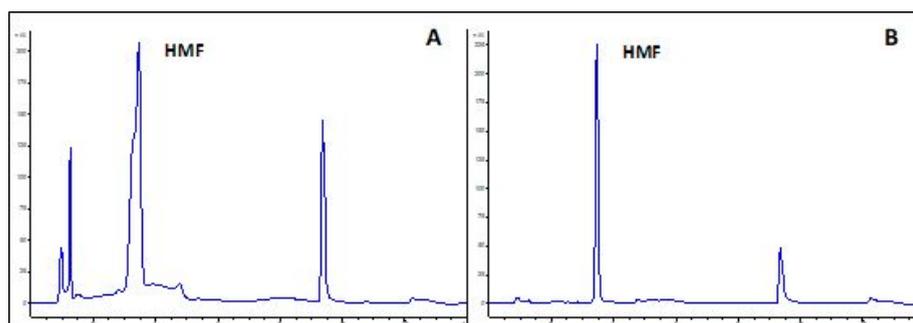


Figura 1. Avaliação da eficiência da limpeza: (A) cromatogramas de CLAE-DAD dos extratos de alimentos infantis à base de ameixa contaminados naturalmente com HMF ($343,1 \mu\text{g g}^{-1}$) após limpeza d-SPE com os adsorventes PSA, C18 e CGB e (B) após a abordagem de diluir o extrato com água deionizada.

Uma grande detectabilidade foi alcançada utilizando CLAE-DAD ajustado a 284 nm para os dois procedimentos estudados, mas a etapa de apenas diluir com água deionizada resultou em uma melhor forma de pico, além de ser eficiente para a remoção completa de um composto da matriz co-extraído no tempo de retenção de 1,2 min. Assim, apenas o preparo de amostra utilizando a diluição do extrato obtido com água deionizada foi validado e aplicado nas amostras de alimentos infantis à base de frutas.

5.2 Características de desempenho do método

O método desenvolvido foi verificado através do procedimento de validação, utilizando uma amostra representativa. Os alimentos infantis à base de frutas foram representados por uma amostra de purê de mamão e laranja.

A seletividade do método foi avaliada baseando-se em sua capacidade de determinar com precisão HMF e HDMF na presença de co-extrativos da matriz com comportamentos semelhantes. Observou-se separação completa do HMF no tempo de retenção (t_r) = 3,5 min e HDMF com t_r = 5,8 min, frente a todos os possíveis co-extrativos da matriz.

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) podem ser observados na tabela 1. Linearidade adequada foi verificada para calibrações baseadas em solventes e matrizes com coeficientes de determinação (R^2) superiores a 0,9997 em todos os casos. A eficiência de extração do método desenvolvido foi verificada através de experimentos de recuperação e os resultados podem ser encontrados na Tabela 1.

De acordo com os requisitos para métodos quantitativos de análise declarados pela Decisão 2002/657/CE da Comissão, recuperações dentro da faixa de 80–110% são aceitáveis para amostras com picos de níveis $\geq 10 \mu\text{g kg}^{-1}$ (Comissão Européia, 2002).

A precisão, expressa em termos de desvio padrão relativo (RSD%), foi avaliada em condições de repetibilidade e reprodutibilidade intralaboratorial. Sob condições de repetibilidade, a precisão foi estimada em seis réplicas independentes com valores de RSD variando de 1 a 6%.

**Tabela 1.** Características de desempenho do método para a determinação de HMF e HDMF.

	Linearidade, R ² Solvente (correspondente à matriz)	LD (µg g ⁻¹)	LQ (µg g ⁻¹)	Nível (µg g ⁻¹)	%R (n=6)	Precisão (RSD%)
						Repetibilidade, n=6 (Reprodutibilidade intralaboratorial, n=12)
HMF	0,9999 (0,9999)	0,1	0,2	0,2	91	3 (2)
				10	101	2 (2)
				25	100	1 (4)
HDMF	0,9999 (0,9997)	0,25	0,5	0,5	103	6 (5)
				10	104	5 (5)
				25	102	4 (5)

LD: limite de detecção; LQ: limite de quantificação; R²: coeficiente de determinação; %R: porcentagem de recuperação; RSD: desvio padrão relativo.

Sob condições de reprodutibilidade intralaboratorial, um total de seis repetições independentes foi analisado em dois dias diferentes, totalizando doze repetições para cada nível, cujos valores de RSD variaram entre 2 e 5%. Os valores de precisão resultantes foram consistentes com os critérios de validação (Comissão Europeia, 2002). Foi observado um efeito de matriz baixo (EM% <6,7%) para todos os compostos.

5.3 Análise simultânea de HMF e DHMF

Foram analisadas 15 amostras de alimentos infantis à base de frutas com diferentes composições disponíveis no comércio local (tabela 2).

Tabela 2. Teor de derivados furânicos em alimentos infantis.

Alimento infantil ^a	Média ± desvio padrão (µg g ⁻¹) ^b	
	HMF	HDMF
Ameixa	343,1 ± 3,55	n.d.
Ameixa, banana e batata doce	97,70 ± 1,30	n.d.
Banana e goiaba ^c	5,38 ± 0,13	4,59 ± 0,22
Banana orgânica	1,47 ± 0,04	n.d.
Frutas amarelas e semente de chia	1,00 ± 0,10	0,78 ± 0,14
Maçã	7,97 ± 0,01	n.d.
Maçã e aveia	1,33 ± 0,01	<LOQ
Maçã, pêra, canela e aveia	8,58 ± 0,63	n.d.
Mamão, banana e maçã ^c	0,33 ± 0,00	n.d.



Manga e maçã	7,22 ± 0,09	0,64 ± 0,03
Manga, maçã e cenoura	5,00 ± 0,19	n.d.
Morango e pêra ^c	n.d.	n.d.
Morango, framboesa e maçã	2,38 ± 0,15	2,12 ± 0,17
Pêra	10,22 ± 0,08	0,75 ± 0,02
Uva e banana orgânicos	3,88 ± 0,02	0,72 ± 0,02

^a Principais ingredientes; ^b Resultado médio da triplicata (n=3); ^c alimento infantil caseiro; n.d.: não detectado.

De forma geral, os alimentos infantis comerciais apresentaram níveis mais elevados em comparação com os produtos caseiros. O que pode ser explicado pela diferença no processamento térmico aplicado. Os alimentos industrializados comerciais são submetidos aos tratamentos térmicos de aquecimento em recipientes fechados e dada a volatilidade dos analitos, estes podem ser eliminado durante o cozimento, implicando em menor concentração.

6. CONCLUSÕES

No presente trabalho, uma abordagem simplificada de preparo de amostra combinada com CLAE-DAD foi aplicada com sucesso para a determinação simultânea de 5-hidroximetilfurfural (HMF) e 4-hidroxi-2,5-dimetil-3(2H)-furanona (HDMF) em diferentes tipos de alimentos infantis à base de frutas. Características de desempenho adequadas, foram apresentadas. Além disso, obteve-se um baixo consumo de solventes orgânicos e curto tempo de extração, permitindo a extração de diferentes analitos em baixos níveis de concentrações.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Comissão Europeia, 2002. Decisão (2002/657/CE) da Comissão, de 12 de agosto de 2002, que aplica a Diretiva 96/23/CE do Conselho, relativa ao desempenho dos métodos analíticos e à interpretação dos resultados. *Fora. J. Eur. Comunidades*.
- EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY – EFSA. Panel on food contact materials, enzymes, flavourings and processing aids (cef). Scientific Opinion on Flavouring Group Evaluation 220, Revision 1 (FGE. 220Rev1): alpha, beta-Unsaturated ketones and precursors from chemical subgroup 4.4 of FGE. 19: 3 (2H)- Furanones. *EFSA Journal*, v.9, n.3, p.1841, 2011.
- HIRAMOTO, K.; ASO-O, R.; NI-IYAMA, H.; HIKAGE, S.; KATO, T.; KIKUGAWA, K. DNA strand break by 2, 5-dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone, a fragrant compound in various foodstuffs. **Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects**, v.359, n.1, p.17-24, 1996.
- HIRAMOTO, K.; KATO, T.; TAKAHASHI, Y.; YUGI, K.; KIKUGAWA, K. Absorption and induction of micronucleated peripheral reticulocytes in mice after oral administration of fragrant hydroxyfuranones generated in the Maillard reaction. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v.415, n.1, p.79-83, 1998.
- MONIEN, B. H.; ENGST, W.; BARKNOWITZ, G.; SEIDEL, A.; GLATT, H. Mutagenicity of 5-hydroxymethylfurfural in V79 cells expressing human SULT1A1: identification and mass spectrometric quantification of DNA adducts formed. **Chemical research in toxicology**, v.25, n.7, p.1484-1492, 2012.
- TEIXIDO, E.; MOYANO, E.; SANTOS, F. J.; GALCERAN, M. T. Liquid chromatography multi-stage mass spectrometry for the analysis of 5-hydroxymethylfurfural in foods. **Journal of Chromatography A**, v.1185, n.1, p.102-108, 2008.