

Determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em vinhos finos por SPE CG-EM

Julião Freitas Martinez¹, Monise Ellen Alves Silva² & Pedro José Sanches Filho²

¹ Enólogo, Mestre em Biotecnologia pela Universidade Federal do Paraná – Palotina, Palotina/PR, Brasil

² Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Sul-Rio-Grandense – Campus Pelotas, Pelotas/RS, Brasil

Correspondência: Julião Freitas Martinez, Enólogo, Mestre em Biotecnologia pela Universidade Federal do Paraná – Palotina, Palotina/RS, Brasil. E-mail: juliao.enologia@gmail.com

Recebido: Outubro 10, 2022

Aceito: Novembro 16, 2022

Publicado: Novembro 20, 2022

Resumo

Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) compreendem uma grande classe de compostos orgânicos constituídos por átomos de carbono e hidrogênio, as moléculas de HPAs têm pelo menos dois anéis aromáticos. Os HPAs são formados pela combustão incompleta da matéria orgânica e podem ser encontrados em uma ampla gama de matrizes, e o consumo alimentar geralmente é a principal forma de exposição. Logo essas espécies têm gerado grande interesse, devido a sua capacidade cancerígena e mutagênica a saúde humana. HPAs foram detectados em uma ampla gama de amostras de produtos alimentares, e bebidas. Nos vinhos, os HPAs são transferidos durante o contato com os barris de carvalho. Várias técnicas analíticas têm sido usadas para determinar os níveis de HPAs em bebidas alcoólicas. Em função de suas determinações analíticas, combinam etapas de pré-concentração e clean up com análises por cromatografia gasosa acoplada com espectrometria de massa (CG-EM). Logo o objetivo deste trabalho é determinar os níveis de HPAs em vinhos combinando extração em fase sólida – SPE e cromatografia gasosa acoplada com espectrometria de massa – CG-EM. No geral, os níveis de HPAs encontrados nos vinhos analisados foram relativamente baixos. Os valores totais de HPAs variam de $2,30 \mu\text{g L}^{-1} \pm 6,2\%$ a $13,16 \mu\text{g L}^{-1} \pm 2,3\%$. Os compostos majoritários em todas as amostras foram benzo[a]antraceno, seguido pelo Criseno, Pireno, Fluoranteno, Antraceno e Fenantreno.

Palavras-chave: HPAs, vinhos, SPE, GC-MS.

Abstract

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) comprise a large class of organic compounds consisting of carbon and hydrogen atoms, PAH molecules have at least two aromatic rings. PAHs are formed by the incomplete combustion of organic matter and can be found in a wide range of matrices, and food consumption is usually the main form of exposure. Soon these species have generated great interest, due to their carcinogenic and mutagenic capacity to human health. PAHs have been detected in a wide range of food and beverage samples. In wines, PAHs are transferred during contact with oak barrels. Various analytical techniques have been used to determine PAH levels in alcoholic beverages. Depending on their analytical determinations, they combine pre-concentration and clean up steps with analyzes by gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS). Therefore, the objective of this work is to determine the levels of HPAs in wines combining solid phase extraction – SPE and gas chromatography coupled with mass spectrometry – GC-MS. Overall, the levels of PAHs found in the analyzed wines were relatively low. Total PAH values range from $2.30 \mu\text{g L}^{-1} \pm 6.2\%$ to $13.16 \mu\text{g L}^{-1} \pm 2.3\%$. The major compounds in all samples were benzo[a]anthracene, followed by Chrysene, Pyrene, Fluoranthene, Anthracene and Phenanthrene.

Keywords: HPAs, wines, SPE, GC-MS.

Resumen

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH) comprenden una gran clase de compuestos orgánicos que consisten en átomos de carbono e hidrógeno, las moléculas de PAH tienen al menos dos anillos aromáticos. Los PAH se forman por la combustión incompleta de materia orgánica y se pueden encontrar en una amplia gama de matrizes, siendo el consumo de alimentos la principal forma de exposición. Pronto estas especies han generado

gran interés, debido a su capacidad cancerígena y mutagénica para la salud humana. Los PAH se han detectado en una amplia gama de muestras de alimentos y bebidas. En los vinos, los PAH se transfieren durante el contacto con las barricas de roble. Se han utilizado varias técnicas analíticas para determinar los niveles de PAH en bebidas alcohólicas. En función de sus determinaciones analíticas, combinan pasos de preconcentración y limpieza con análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS). Por tanto, el objetivo de este trabajo es determinar los niveles de HPAs en vinos combinando extracción en fase sólida – SPE y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas – GC-MS. En general, los niveles de HAP encontrados en los vinos analizados fueron relativamente bajos. Los valores de PAH total oscilan entre $2,30 \mu\text{g L}^{-1} \pm 6,2\%$ y $13,16 \mu\text{g L}^{-1} \pm 2,3\%$. Los principales compuestos en todas las muestras fueron benzo[a]antraceno, seguido de criseno, pireno, fluoranteno, antraceno y fenantreno.

Palabras clave: HAPs, vinos, SPE, GC-MS.

1. Introdução

De acordo com Hartzell et al. (2018) os hidrocarbonetos estão listados como alguns dos principais contaminantes ambientais. Este grupo de compostos, estão presentes na constituição da matéria orgânica de origem tanto vegetal quanto animal e perfazem uma fração expressiva na composição do petróleo e seus derivados (Oliveira et al., 2014). Dentro das classes dos hidrocarbonetos destacam-se os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), compostos de grande importância ambiental devido ao seu potencial tóxico e sua ampla distribuição, sendo referidos por diversos órgãos de controle ambiental, como contaminantes prioritários a serem monitorados, como indica a *United States Environmental Protection Agency* (USEPA, 1995; Martin et al., 2015). São compostos orgânicos que possuem átomos de carbono e hidrogênio, com pelo menos dois anéis aromáticos (Plaza-Bolaños et al., 2010).

A exposição humana aos HPAs pode ocorrer por diferentes vias como: inalação, ingestão, ou absorção cutânea, sendo o consumo alimentar a principal via de exposição a estes compostos. Dada a importância desta via de contaminação, vários estudos têm avaliado HPAs em alimentos, tais como: alimentos gordurosos (García-Falcón et al., 2000), água potável (Lawal, 2017; Rey-Salgueiro et al., 2004), café (García-Falcón et al., 2005), pães (Rey-Salgueiro et al., 2008), alimentos enlatados (Rey-Salgueiro et al., 2009), e bebidas (Cacho et al., 2016; Caruso e Alaburda, 2008; Garcia, 2014; Sing et al., 2016).

Normalmente são formados durante o processamento dos alimentos como: defumar, assar ou fritar. No entanto, vegetais *in natura*, podem ser contaminados pela deposição de partículas transportadas pelo ar (Sanchez Filho, et al., 2021, Silva et al., 2021) ou pelo crescimento em solo contaminado (European Commission, 2002). A ocorrência destes compostos nos alimentos é influenciada pelas mesmas características físico-químicas que determinam sua absorção e distribuição na biota.

Os HPAs presentes em algumas bebidas (Chinnici, et al., 2007; Da Porto, et al., 2006), podem estar relacionados, portanto, tanto ao cultivo da matéria prima, como durante seu processamento. Estudos relatam que em vinhos, os HPAs podem ser transferidos através do contato com os barris de carvalho, pois os processos tradicionais de aquecimento associados à produção de barris resultam na formação de vários HPAs na madeira (Chatonnet e Escobessa, 2007).

A Agência Francesa de Segurança Sanitária Alimentar (*Agence française de sécurité sanitaire des aliments*-AFSSA) definiu como níveis seguros até $0,2 \mu\text{g L}^{-1}$ para soma dos seis HPAs benzo[a]pireno, benzo[b]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno, benzo[ghi]perileno, indeno[1,2,3-cd]pireno e fluorenteno e para a Benzo[a]pireno de $0,01 \mu\text{g L}^{-1}$ para água potável e em bebidas alcoólicas (AFSSA, 2006).

Sendo uma classe com centenas de compostos, é imprescindível seu monitoramento, a *Contaminants in the Food Chain* (CONTAM) juntamente com a *European Food Safety Authority* (EFSA) atribuíram como indicadores dos níveis de HPAs em alimentos o Criseno, Benzo[a]antraceno, Benzo[b]fluoranteno e o Benzo[a]pireno, sendo esses compostos definidos como os HPAs 4 (EFSA, 2008).

No Brasil, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), ainda não estabeleceu limites para a maioria dos alimentos possíveis de contaminação por HPAs. A ANVISA na Resolução nº 2/2007 determinou limite para benzo[a]pireno para alimentos que passaram por processo de defumação de $0,03 \mu\text{g kg}^{-1}$ e a Portaria nº 2.914/2011, estabeleceu um limite de $0,7 \mu\text{g L}^{-1}$ para água envasada e gelo (ANVISA, 2005, 2007).

Em função dos níveis de concentração da interferência da matriz, suas determinações analíticas, combinam-se etapas de pré-concentração e *clean-up* combinando principalmente técnicas como extração em fase sólida (do inglês *solid phase extraction*-SPE) e análises por cromatografia gasosa acoplada com espectrometria de massas

(CG-EM) (do inglês *gas chromatography coupled with mass spectrometry* GC-MS) (Caruso e Alaburda, 2009; Chatonnet e Escobessa, 2007; Rodil, Schellin, e Popp, 2007). Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, considerados neste trabalho, serão os 16 compostos prioritários segundo a EPA (*Environmental Protection Agency*) que correspondem ao: naftaleno, acenaftileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo[a]antraceno, criseno, benzo[b]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno, benzo[a]pireno, indeno[1,2,3-cd]pireno, dibenzo[a,h]antraceno, benzo[g,h,i]perileno em função de suas comprovadas características mutagênicas e carcinogênicas.

Logo o objetivo deste trabalho foi determinar os níveis de HPAs em vinhos combinando a extração em fase sólida - SPE e cromatografia gasosa acoplada com espectrometria de massa (CG-EM).

2. Material e Métodos

Amostras

Foram selecionadas quatro amostras de vinhos: V1TPB, V2BPB, V3TPB e V4TPB, adquiridos aleatoriamente em estabelecimentos locais, com prioridade aos vinhos finos envelhecidos em barricas de carvalho.

Reagentes

Para determinação dos HPAs duas misturas de padrões (MP) convencionais foram usados neste estudo. A primeira mistura (MP1) consiste em 16 HPAs (1-Naftaleno-Naf, 2-Acenaftileno-Acl, 3-Acenafteno-Ace, 4-Fluoreno-Fl, 5-Fenantreno-Fen, 6-Antraceno-An, 7-Fluoranteno-Flu, 8-Pireno-Pir, 9-Benzo(a)Antraceno-B(a)A, 10-Criseno-ChR, 11-Benzo(b)Fluoranteno-B(b)F, 12-Benzo(k)Fluoranteno-B(k)F, 13-Benzo(a)Pireno-P(a)P, 14-Benzo(g,h,i)Perileno-BghiP, 15-Dibenzo(a,h)Antraceno-DahA, 16-Indeno(1,2,3-cd)Pireno-IP a 2000 mg L⁻¹ adquirido da Supelco (Bellefonte, PA, EUA). A segunda mistura (MP2) refere-se aos HPAs deuterados (Naftaleno - D8, Acenafteno - D10, Fenantreno-D10, Criseno - D12, Perileno - D12), a 2000 mg L⁻¹ adquirido da Supelco (Sulpeco park, Bellefonte, PA, EUA).

Análise Cromatográfica CG-EM

A alíquota de 1,0 µL de cada extrato (em triplicata) foi injetada automaticamente (Shimadzu AOC-20i Auto Injector) em modo splitless em um sistema CG-EM (Shimadzu ultra-QP 2010). As condições cromatográficas são mostradas na (Tabela 1). A quantificação dos HPAs foi realizada em modo SI (*single ion monitoring*). A identificação dos compostos foi baseada no tempo de retenção de cada analito em comparação com os da mistura padrão (1) e m/z correspondentes a cada composto. As condições cromatográficas foram definidas a partir dos estudos de Sanches Filho et al. (2021).

Otimização do método cromatográfico

Para avaliação do método cromatográfico, foram construídas curvas de calibração preparadas a partir de padrões que compreendem 16 HPAs diluídos com diclorometano (P.A – ACS). Os parâmetros analíticos analisados foram linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ).

A curva de calibração para os 16 HPAs variou de 10,0 a 200 µg L⁻¹, que compreende cinco pontos diferentes. Cada ponto representa a média de três medições independentes da área. A identificação do composto foi baseada na comparação com o tempo de retenção dos padrões analisados nas mesmas condições das amostras e pelo uso dos íons (m/z) descritos na (Tabela 2).

Cada processo foi acompanhado por análises em branco a partir das quais o limite de detecção foi calculado usando três vezes o desvio padrão do sinal do branco, enquanto, o limite de quantificação, 10 vezes o desvio padrão (método recomendado pela IUPAC) divididos pelo coeficiente angular de cada curva analítica. A precisão do método cromatográfico foi desenvolvida repetindo 11 vezes a análise padrão de 50 µg L⁻¹. A exatidão foi avaliada por meio do erro relativo, sendo este a diferença entre o valor encontrado a partir das curvas analíticas para o padrão de 100 µg L⁻¹ e o valor correto (100 µg L⁻¹).

Tabela 1. Dados das amostras de vinho fino, adquiridas no mercado local.

Amostras	TIPO	Local de Produção	Passagem por Barrica	Teor Alcoólico (%)	Processo	Uva
V1TPB	Vinho tinto	RS	Sim	13	Leve permanência em barricas de carvalho norte-americano durante 6 meses	Cabernet Sauvignon
V2BPB	Vinho Branco	RS	Sim	12	Produto amadureceu em barricas de carvalho durante 6 meses	Chardonnay
V3TPB	Vinho Tinto	RS	Sim	12	Estagiou em barricas de carvalho francês e americano 6 a 8 meses	Cabernet Sauvignon
V4TPB	Vinho Tinto	RS	Sim	12	Estagiou em barricas de carvalho 6 meses	Cabernet Sauvignon

Fonte: Autores, 2022.

Tabela 2. Condições cromatográficas para a determinação de HPAs em amostras de vinhos finos.

Parâmetro	Especificação
Coluna	OV-5ms coluna (30m x 0,25 mm d.i. x 0,25 µm espessura de filme (J & W Scientific, Folson, CA, USA)
Modo de injeção	Splitless
Temperatura do injetor	280 °C
Temperatura da interface	280 °C
Ionização	Elétron-Impacto (EI) em 70 Ev
Gás de transporte/fluxo	Hélio (99,999%) 1,0 mL min ⁻¹)
Temperatura do forno (F2)	Temperatura inicial 100°C (5 min), 10°C/min, 60°C - 4°C /min, 300°C(15min).
Íons Monitorados (modo SIM) HPAs	m/z: 128, 152, 154, 166, 178, 202, 228, 252, 276, 278
HPAs Deuterados	m/z 136, 164, 188, 240, 264

Fonte: Autores, 2022.

Extração em Fase Sólida SPE C18

O volume da infusão foi fixado em 200 mL para cada amostra. Os 200 mL da amostra foram percolados sob vácuo em cartuchos de SPE (CHROMABOND® C18 F (Fast Flow) – SPE com octadecil siloxano como fase

adsorvente, previamente condicionada com 5 mL de acetonitrila seguida de 10 mL de água ultrapura (Mili-Q). Os analitos adsorvidos foram lavados com 10 mL de uma mistura acetonitrila:água (70:30) e secos em seguida. Os HPAs foram eluídos utilizando 5 mL de hexano. O extrato obtido foi seco em sulfato de sódio anidro e concentrado a 0,5 mL em frascos Kuderna Danish sob leve fluxo de N₂ (Chatonnet e Escobessa, 2007).

Estudos de recuperação

Para avaliar a extração de HPAs em vinhos 200 mL de vinho foram adicionados com 100 µL da mistura (MP2) de HPAs deuterados a 200 µg L⁻¹ no nível inferior (0,1 µg L⁻¹) e 200 µL da mistura dos HPAs Deuterados a 20 mg L⁻¹ para o nível superior (20 µg L⁻¹), sofreram o mesmo tratamento.

Para avaliar a seletividade do método e o efeito de matriz 200 mL da amostra de vinho (amostra V1TPB) foi fortificada com 20 µg L⁻¹ com os 16 HPAs sofrendo o mesmo procedimento e com volume final corrigido a 0,5 mL. Os extratos foram analisados em modo SIM e SCAN para avaliar possíveis interferências. Para o cálculo da recuperação, foi descontado o valor dos HPAs presentes na amostra sem fortificação dos níveis obtidos a partir da amostra fortificada.

A precisão da SPE foi avaliada através do desvio padrão relativo das triplicatas em relação aos HPAs determinados em todo experimento.

3. Resultados e Discussão

Validação do Método Cromatográfico

A Tabela 3 apresenta as figuras de mérito para o método cromatográfico para determinação dos 16 HPAs. Comprova-se que o método se comportou de forma linear com coeficientes de correlação (r) entre 0,990 e 0,999 para faixa de trabalho, valores acima de 0,9 preconizado como adequado na validação de métodos pelo Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO).

Observa-se uma queda na precisão sobre a exatidão para os HPAs mais pesados (com 6 anéis aromáticos). O que pode ser explicado pela redução do fator de resposta e perda da simetria dos picos (Silva *et al.*, 2021; Sanches Filho *et al.*, 2021), fato que também reflete na menor sensibilidade do método expresso pelo coeficiente angular (a). Embora estes parâmetros estejam dentro dos valores aceitáveis para a faixa de µg L⁻¹ que admite RSD até 20% (Inmetro 2003).

Estes valores estão em acordo com outros autores como Sanches Filho *et al.*, (2021) que analisaram HPAs em amostras de marcela (*Achyrocline flaccida* DC), e Silva *et al.*, (2021) na determinação de HPAs em amostras comerciais de pimentas, ambos os estudos, utilizaram as mesmas condições cromatográficas e o mesmo equipamento e adequado a determinações cromatográficas segundo a literatura (MEDEIROS *et al.*, 2007). Os limites de detecção e quantificação apresentados na tabela foram calculados considerando 200 mL de amostras de vinho, onde variaram entre 0,01/0,05 e 0,03/0,11 µg L⁻¹ respectivamente, conforme apresentados na (Tabela 3). O regulamento de n° 836/2011 (EU, 2011) pela Comissão das Comunidades Europeias, estabelece um limite de detecção (< 0,3 µg kg⁻¹) e de quantificação (< 0,9 µg kg⁻¹) somente para análise de benzo[a]pireno. Estando os valores obtidos neste estudo abaixo do limite exigido e em uma faixa que permite a determinação de HPAs em vinho que atende esta norma.

Recuperações

As recuperações apresentadas na Tabela 4 variaram de 63% para o naftaleno D8 a 109% para o fenantreno D10, no nível inferior (0,1 µg L⁻¹) estes resultados estão em acordo com os valores obtidos por Garcia-Falcon & Simal-Gandara, (2005) com fortificações em vinhos nesta faixa.

No nível superior foi observada uma queda na recuperação do Naftaleno, que já apresentava o menor valor de recuperação no nível de fortificação inferior, sugerindo uma possível lixiviação do composto pela saturação da fase adsorvente. Perdas nas etapas de evaporação podem, também, ter reduzido a recuperação destes compostos. As recuperações para os 16 HPAs variaram entre 43,2% para o naftaleno a 110,7% para o fenantreno. A Figura 1 apresenta a comparação entre os cromatogramas em modo SCAN para as amostras VT1PB fortificadas e não fortificadas.

Tabela 3. Figuras de mérito para os 16 HPAs determinados em amostras de vinhos finos.

HPAs	Y=aX+b				µg L ⁻¹		
	a	B	r	%RSD	ER	LD	LQ
Naftaleno	715,6	-1720,7	0,996	0,5	6,0	0,02	0,07
Acenaftileno	429,8	-996,7	0,999	0,5	4,3	0,01	0,05
Acenafteno	271,3	-569,3	0,999	0,4	4,0	0,03	0,10
Fluoreno	270,1	-822,4	0,998	0,4	-8,0	0,02	0,08
Fenantreno	333,0	-1411,6	0,994	0,4	-0,8	0,03	0,09
Antraceno	389,1	-1970,0	0,993	0,4	-2,6	0,03	0,08
Fluoranteno	364,9	-1116,0	0,998	0,4	-4,3	0,01	0,04
Pireno	392,1	-1166,9	0,999	0,4	-2,7	0,02	0,05
Benzo[a]antraceno	154,0	-587,4	0,999	0,5	1,6	0,02	0,05
Criseno	245,4	-1133,9	0,995	0,5	7,7	0,02	0,08
Benzo[k]fluoranteno	137,0	-532,4	0,999	0,6	2,4	0,02	0,08
Benzo[b]fluoranteno	205,1	-871,8	0,999	0,5	4,0	0,03	0,09
Benzo[a]pireno	116,1	-263,2	0,996	0,6	4,8	0,03	0,10
Benzo[ghi]perileno	55,7	-167,4	0,994	0,8	14,2	0,03	0,11
Dibenzo[ah]antraceno	40,7	-92,3	0,990	0,7	13,0	0,03	0,11
Indeno[1,2,3-cd]pireno	96,0	-265,8	0,999	0,9	11,1	0,03	0,09

Nota: Y= aX+b (a - coeficiente angular; b - coeficiente linear); r - coeficiente correlação linear; LD - limite de detecção; LQ - limite de quantificação. Fonte: Autores, 2022.

Tabela 4. Estudo de recuperação para amostras de vinhos finos (µg L⁻¹) ± desvio padrão relativo (± RSD%).

Amostras de vinhos finos, resultados expressos em (µg l ⁻¹)							
HPAs	m/z	Valor Fortificado	Valor Encontrado	Recuperação (%)	Valor Fortificado	Valor Encontrado	Recuperação (%)
Naftaleno D 8	136	0,1	0,063±2,4	63,3	20,0	7,1±9,9	43,2
Acenafteno-D10	164	0,1	0,091±16,5	91,0	20,0	17,2±12,4	82,2
Fenantreno D10	188	0,1	0,109±7,2	109,6	20,0	24,4±10,9	110,7
Criseno D12	240	0,1	0,0817±11,9	81,7	20,0	15,4±7,2	66,8
Perileno D12	264	0,1	0,0709±3,5	70,9	20,0	12,1±5,0	50,6

Fonte: Autores, 2022.

Pode-se verificar a presença dos picos referentes aos 16 HPAs com boa separação aos demais compostos presentes na matriz, o que demonstra a seletividade do método e eficiência do *Cleanup*. Os valores de recuperação entre 50-120% estão em acordo com as normas da União Europeia (UE) regulamento 836/2011, (Commission Regulation, 2011). Através dos RSDs inferiores a 20%, considera-se o método preciso, segundo Brito *et al.*, (2003). Os valores encontram-se na faixa dos determinados em outros estudos de HPAs, como por Serrate *et al.*, (2010), que obtiveram uma recuperação desses analitos em café (extrato aquoso) de 77 a 87%, e Galinaro *et al.*, (2007), obteve recuperações de 81,5 a 113% na determinação de HPAs em cachaças.

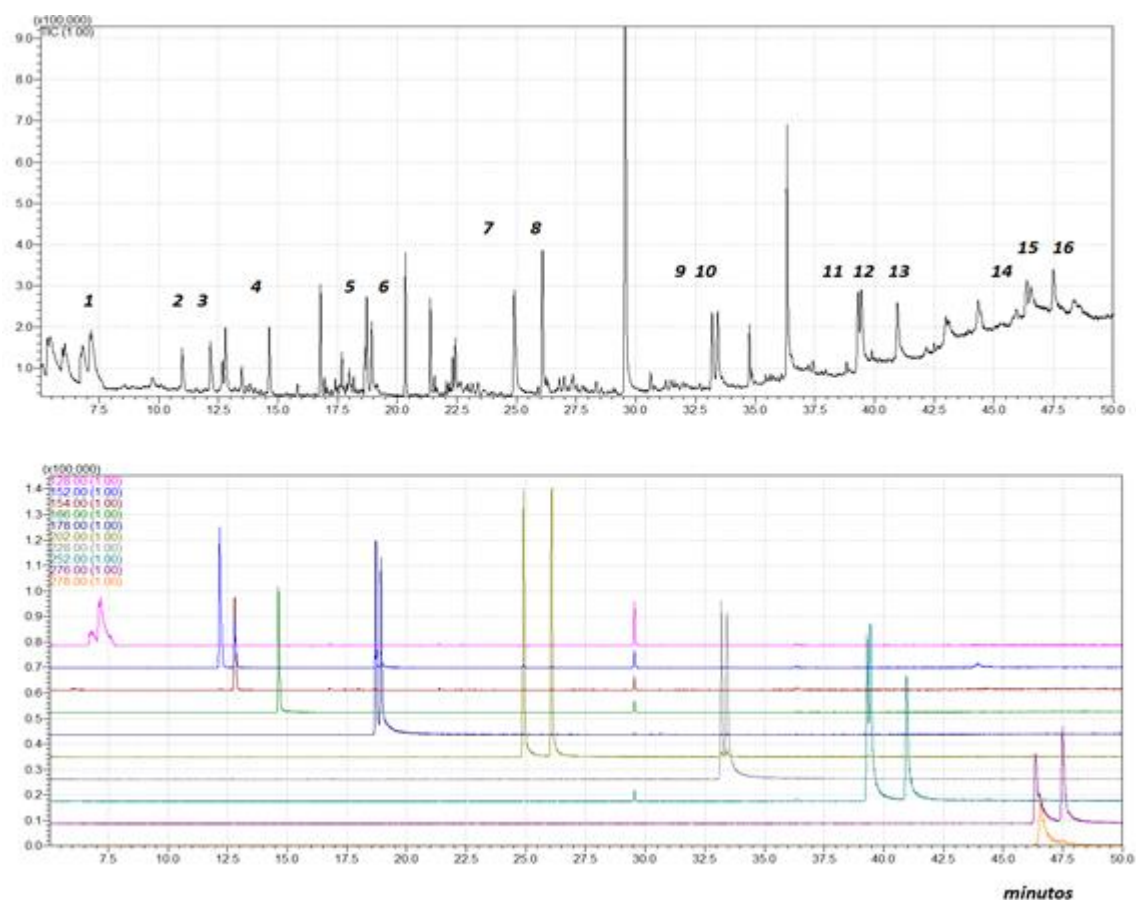


Figura 1. Cromatograma da amostra de vinho fino V1TPB fortificada analisada em modo SCAN e SIM. Fonte: Autores, 2022.

Na Tabela 5 apresenta os níveis de HPAs para as amostras de vinhos finos amostrados. Os HPAs foram encontrados em 100% das amostras analisadas, predominantemente os compostos de menor peso molecular (2 a 4 anéis aromáticos).

Tabela 5. Níveis de HPAs encontrados em amostras de vinhos finos estudados, expressos em ($\mu\text{g L}^{-1} \pm \text{RSD} \%$).

Compostos	V1TPB	V2BPB	V3TPB	V4TPB	Limites permitidos $\mu\text{g L}^{-1}$
Naf	Interf	Interf	Interf	Interf	
Acl	Nd	Nd	Nd	Nd	
Ace	0,11 \pm 14,4	0,32 \pm 10,7	0,12 \pm 12,8	0,19 \pm 13,0	
Fl	0,09 \pm 13,6	0,17 \pm 6,7	Nd	0,08 \pm 2,5	
Fen	0,58 \pm 15,8	0,52 \pm 1,6	0,13 \pm 14,3	Nd	
Na	0,67 \pm 12,8	1,17 \pm 6,8	0,28 \pm 1,1	Nd	
Flu	0,37 \pm 3,7	1,43 \pm 7,1	0,06 \pm 10,1	0,55 \pm 2,1	
Pir	0,36 \pm 9,8	2,54 \pm 7,6	0,16 \pm 12,6	0,50 \pm 1,3	
B(a)A	2,67 \pm 5,7	3,51 \pm 3,5	0,87 \pm 1,7	0,59 \pm 15,3	
ChR	0,52 \pm 4,7	2,80 \pm 1,2	0,60 \pm 5,9	0,28 \pm 15,0	
B(k)F	Nd	0,44 \pm 19,5	Nd	0,24 \pm 5,3	
B(b)F	Nd	Nd	Nd	0,26 \pm 6,2	
B(a)P	Nd	Nd	Nd	0,25 \pm 17,6	0,7***
B(g,h,i)P	Nd	Nd	Nd	0,12 \pm 19,2	
D(a,h)A	Nd	Nd	Nd	0,17 \pm 14,7	
I(1,2,3-cd)P	Nd	Nd	Nd	Nd	
Total	5,37 \pm 4,2	13,16 \pm 2,3	2,30 \pm 6,2	3,30 \pm 4,8	
ChR+BaA+BbF+BaP	3,2	6,6	1,5	1,4	35,0**
BbF+BkF+BghiP+IP	Nc	0,7	Nc	0,6	5,0*

Razões de diagnóstico de diferentes HPAs para identificação de fonte

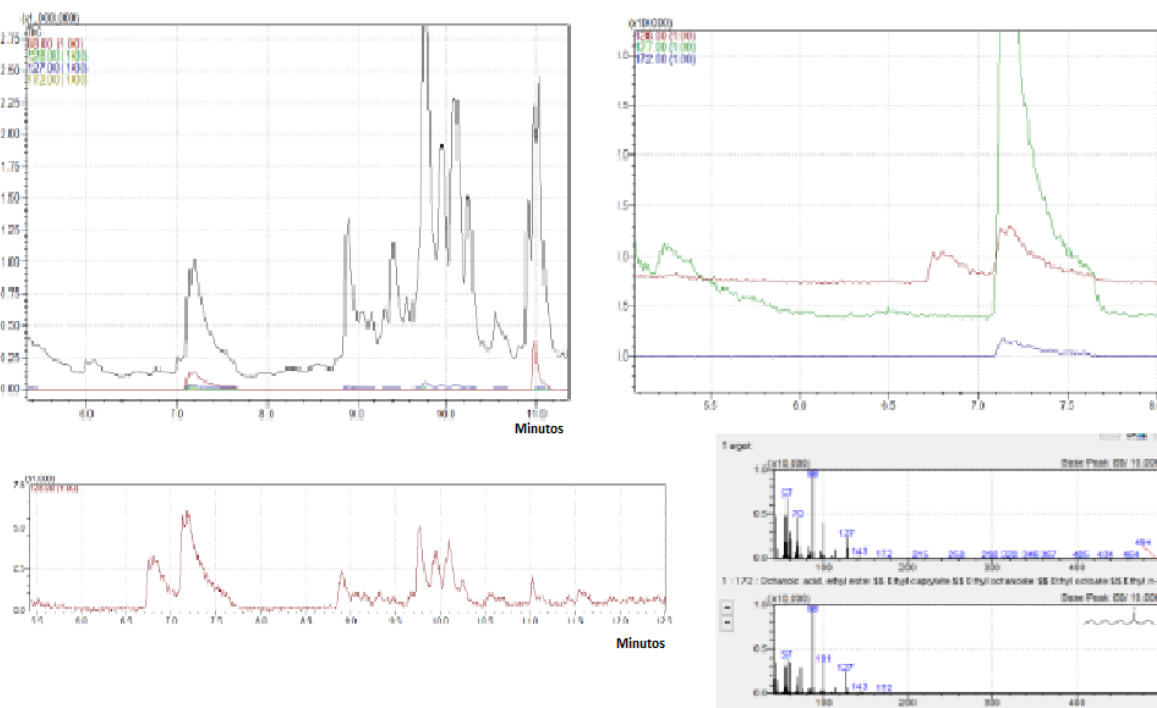
Compostos	Fontes					
					Petrogênica	Pirogênica
Flu/Flu+PIR	0,5	0,4	0,3	0,5	<0,4	>0,4
BaA/(BaA+CHR)	0,8	0,6	0,6	0,7	<0,2	>0,35

ANT/(ANT+PHE) 0,5 0,7 0,7 Nc <0,1 >0,1

Nota: *Limite estabelecido para somatório de total de HPAs com maior peso molecular pela *German Society for Fat Science*; **Regulamento de nº 835/2011 EC; ***Portaria nº2.914/2011 (ANVISA); Interf: Interferência; Nd: Não detectado; Nc: Não calculado. Amostras: V1TPB - Vinho Tinto com passagem por barrica; V2BPB - Vinho Branco com passagem por barrica; V3TPB - Vinho Tinto com passagem por barrica; V4TPB - Vinho Tinto com passagem por barrica. Fonte: Autores, 2022.

Em geral, os níveis de HPAs encontrados nos vinhos analisados foram relativamente baixos (Tabela 5). O Σ HPAs totais, variam entre $2,30 \mu\text{g L}^{-1} \pm 6,2\%$ a $13,16 \mu\text{g L}^{-1} \pm 2,3\%$. Os compostos majoritários em todas as amostras foram Benzo[a]antraceno, seguido pelo Criseno, Pireno, Fluoranteno, Antraceno e Fenantreno. A faixa de Σ HPAs entre $1,5$ a $4,5 \mu\text{g L}^{-1}$ também foi determinada em vinhos por Rascon et al., (2019) com predominância de compostos com 2 a 4 anéis, dados que concordam com este estudo.

O Naftaleno não foi determinado por sofrer interferência do éster octanoato de etila que coeluiu e possui o fragmento m/z 128. A Figura 2 ilustra o pico do composto no tempo de saída do naftaleno, bem como algum dos seus íons e espectro de massas.



F

Figura 2. Identificação do composto éster octanoato de etila coeluinto com Naftaleno (m/z 128) em amostra de vinho fino amostrado.

O Acenaftileno não foi detectado e quantificado nas amostras de vinhos finos estudados. O Fluoreno foi somente detectado nas amostras V1TPB, V2BPB e V4TPB. Somente na amostra V4TPB foram detectados HPAs de maior peso molecular (5 a 6 anéis). O nível médio do Σ HPA 4 encontrado nas amostras variaram de $1,4$ a $6,6 \mu\text{g kg}^{-1}$. Observou-se que as concentrações estão de acordo com os limites considerados seguros para Σ HPA 4 definidos no regulamento nº835/2011 estabelecido pela União Europeia.

A *German Society for Fat Science* considera como parâmetro para análise de HPAs de maior peso molecular um limite de $5 \mu\text{g L}^{-1}$. O somatório destes compostos só não é determinado nas amostras V1TPB e V3TPB, variando

nas demais de 0,6 a 0,7 $\mu\text{g L}^{-1}$, estando inferior ao estabelecido pela norma. O benzo[a]pireno só foi quantificado em uma amostra (V4TPB) em nível inferior ao estabelecido na Portaria nº2.914/2011 (ANVISA) e superior ao valor máximo estabelecido pela AFSSA.

Observando-se razões de diagnóstico para os HPAs, verifica-se a forte relação dos HPAs com origem pirolítica, o que pode estar relacionado com o tratamento de limpeza por queima aplicada as barricas conforme descrevem Chatonnet e Escobessa, (2007). Também podemos considerar a possibilidade de fontes difusas de HPAs, via transporte atmosférico em função da proximidade dos vinhedos a rodovias (emissões veiculares) (Sanchez Filho et al., 2021) ou atividades industriais (poluição atmosférica), ou tenham sido expostos à fumaça de incêndios florestais.

4. Conclusões

O método combinando SPE com C18 como adsorvente, e determinação por CG-EM em modo SIM permitiu a análise dos HPAs em amostras de vinhos finos com alta precisão, exatidão, seletividade e limites de detecção e quantificação adequados para monitoramento dos analitos dentro dos padrões exigidos por diferentes legislações e normas. Todas as amostras estudadas apresentaram HPAs com potencial impacto na saúde humana. Os vinhos apresentaram predomínio de HPAs com menor peso molecular (2 a 4 anéis) relacionados a fontes pirolíticas, porém, em níveis considerados seguros pela maioria das normas utilizadas neste estudo.

A composição da mistura dos HPAs encontrada, sugere fontes de origem pirolíticas, podendo haver um efeito cumulativo pela contaminação prévia dos vinhedos, via deposição atmosférica, como por transferência da madeira das barricas durante o envelhecimento dos vinhos.

5. Referências

- AFSSA (2006). *Agence française de sécurité sanitaire des aliments Evaluation de l'exposition aux HAP dans l'eau de boisson réflexions sur l'éventuel risque sanitaire associé*. Saisine N°2005- SA-0056, 2006; pp 23. Disponível em: <https://www.anses.fr/en/system/files/EAUX2005sa0056.pdf>. Acesso em 17 nov. 2022.
- Brasil (2005). *RDC n° 274, de 22 de setembro de 2005*, Diário Oficial da União, de 23/09/2005.
- Cacho, J. I., Campillo, N., Vinas, P. Hernandez-Cordoba, M. (1986). Evaluation of the contamination of spirits by polycyclic aromatic hydrocarbons using ultrasound-assisted emulsification microextraction coupled to gas chromatography–mass spectrometry. *Food Chemistry*, 190(2016), 324–330.
- Caruso, M., Alaburda, J. (2009). Optimization of the benzo (A) pyrene determination procedure in cachaça. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 20, 502–508.
- Chatonnet, P., Escobessa, J. (2007). Impact of Toasting Oak Barrels on the Presence of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Wine. *J. Agric. Food Chem.*, 55, 10351–10358.
- Chen, Y. C.; Chen, H. B. (2003) Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Fumes from Fried Chicken Legs. *J. Agric. Food Chem.*, 51(14), 4162–4167.
- Chinnici, F., Natali, N., Spinabelli, U., Riponi, C. (2007). Presence of polycyclic aromatic hydrocarbons in woody chips used as adjuvant in wines, vinegars and distillates. *LWT – Food Science and Technology*, 40, 1587–1592.
- Da Porto, C., Moret, S., Soldera, S. (2006). A study on the composition of distillates obtained from smoked marc. *Analytica Chimica Acta*, 563, 396–400.
- European Commission (2002). *Opinion of the Scientific Committee on Food on the risks to human health of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in food*. Disponível em: ec.europa.eu/health/scientific_committees/.../sct_out108_en.htm
- Galinario, C. A., Cardoso D. R., Franco, D. W. (2007). Profiles of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Brazilian Sugar Cane Spirits: Discrimination between Cachacüas Produced from Nonburned and Burned Sugar Cane Crops. *Agric. Food Chem.*, 55, 3141-3147. <https://doi.org/10.1021/jf063671a>
- Garcia, F. M. S., Simal, G. J., Carril-Gonzalez, B. S. T. (2000). Analysis of benzo[a]pyrene in spiked fatty foods by second derivative synchronous spectrofluorimetry after microwave-assisted treatment of samples. *Food Additives and Contaminants*, 17, 957–964.
- Garcia, F. M. S.; Perez, L. M.; Simal, G. J. (2004). Comparison of strategies for extraction of high molecular

- weight polycyclic aromatic hydrocarbons from drinking waters. *J. Agric. Food Chem.*, 52 (23), 6897–6903.
- Garcia, F. M. S., Simal, G. J. (2005). Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in alcoholic drinks and the identification of their potential sources. *Food Additives and Contaminants*, 22, 791–797.
- Garcia, L. P.; Gonçalves, B. L.; Panho, G.; Scussel, V. M. (2014). Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Alimentos: Uma Revisão. *PUBVET*, 8(19), 1788. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.02.02>
- Inmetro (2003). Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos: DOQ-CGCRE-008. Brasília.
- Lawal, A. T. (2017). *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. Aromatic Hydrocarbons: A review*. Cogent Environmental Science. <http://doi.org/10.1080/23311843.2017.1339-841>
- Phillips, D. H. (1999). Polycyclic aromatic hydrocarbons in the diet. *Mutation Research*, 443, 139–147.
- Medeiros, P. M.; Simoneit, B. R. T. (2007). Analysis of sugars in environmental samples by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1141(2), 271-278. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.12.017>
- Moret, S., Conte, L. S. (2000). Polycyclic aromatic hydrocarbons in edible fats and oils: occurrence and analytical methods. *Journal of Chromatography A*, 882, 245–253.
- Pagliuca, G., Gazzotti, T., Zironi, E., Serrazanetti, G. P., Mollica, D., Rosmini, R. (2003). Determination of high molecular mass polycyclic aromatic hydrocarbons in a typical Italian smoked cheese by HPLC-FL. *J Agric Food Chem.*, 51(17), 5111-5115. <https://doi.org/10.1021/jf034305j>
- Plaza, B. P., Garrido, F. A., Martinez, V. J. L. (2010). Polycyclic aromatic hydrocarbons in food and beverages. Analytical methods and trends. *Journal of Chromatography A*, 1217, 6303–6326.
- Rascón A. J., Azzouz A., Ballesteros E. (2019). Use of semi-automated continuous solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in alcoholic and non-alcoholic drinks from Andalucía (Spain). *J Sci Food Agric.*, 99(3), 1117-1125. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9279>.
- Rey, S. L., Martínez, C. E., García, F. M. S., González, B. C., Simal, G. J. (2009). Occurrence of polycyclic aromatic hydrocarbons and their hydroxylated metabolites in infant foods. *Food Chemistry*, 115, 814–819.
- Rey, S. L., Martínez, C. E., García, F. M. S., Simal, G. J. (2008). Effects of toasting procedures on the levels of polycyclic aromatic hydrocarbons in toasted bread. *Food Chemistry*, 108, 607–615.
- Rodil, R., Schellin, M., Popp, P. (2007). Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in water and beverages using membrane-assisted solvent extraction in combination with large volume injection-gas chromatography–mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A*, 1163, 288–297.
- Silva, M. E. A. Da; Arsand, D. R; Huber, C. S; Sanches, F. P. J. (2021). Determinação de HPAs em preparações comerciais com base em pimenta. *Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais*, 12(6), *in press*.
- Singh, L; Varshney, J. G; Agarwal, T. (2016). Polycyclic aromatic hydrocarbons formation and occurrence in processed food. *Food Chemistry*. 199, 768-781. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.12.074>.
- Sanches, F. P. J., Arduim, J., Betemps, G. R., Andrade, G. O., Silva, R. C. S. (2021). Evaluation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Achyrocline Satureiodes (Marcela) and its Infusion. *Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais*, 12(1).

Copyrights

Copyright for this article is retained by the author(s), with first publication rights granted to the journal.

This is an open-access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).