



Foto: Tomas May

COMUNICADO
TÉCNICO

233

Dezembro, 2018

Embrapa

Método de Análise de Acrilamida em Café Torrado por Cromatografia Líquida de Ultraeficiência Acoplada à Espectrometria de Massas Sequencial (CLUE-EM/EM)

Marianna Ramos dos Anjos¹
Maria de Lourdes Mendes de Souza²

Método de Análise de Acrilamida em Café Torrado por Cromatografia Líquida de Ultraeficiência Acoplada à Espectrometria de Massas Sequencial (CLUE-EM/EM)¹

¹ Licenciada em Química, M. Sc. em Ciência de Alimentos, Analista da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ.

² Farmacêutica, D. Sc. em Química de Produtos Naturais, Analista da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ.

Introdução

A acrilamida ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CONH}_2$) ou 2-propenamida é um sólido branco cristalino e inodoro, de peso molecular igual a 71,08 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$, solúvel em água, acetona e etanol, e insolúvel em solventes apolares. Estas propriedades proporcionam à acrilamida uma alta mobilidade no solo e em águas subterrâneas. Esta substância tem sido utilizada como produto químico industrial desde a década de 1950, tendo seu principal uso como intermediário na produção de poliacrilamida (Eriksson, 2005). A acrilamida também se forma durante o processamento dos alimentos (fritura, cozimento, torrefação, entre outros) através de reações entre aminoácidos (em particular, o aminoácido asparagina) e açúcares redutores. A Agência Internacional para Pesquisa

sobre o Câncer classificou a acrilamida como “provável cancerígeno” para os seres humanos (Grupo 2A) com base em estudos em animais (IARC, 2002). Pesquisas recentes relatam sua presença em alimentos processados, bem como suas ações neurotóxicas e carcinogênicas (Arisseto; Toledo, 2006).

Dessa forma, é muito importante conhecer os níveis de acrilamida nos alimentos, principalmente no café, pois o seu consumo diário é elevado no Brasil. Os principais fatores que influenciam o teor de acrilamida no café são: o grau de torra (o café de torra mais leve possui quantidades maiores quando comparado com os mais tostados), as espécies de café (normalmente o café robusta, *Coffea canéfora*, contém concentrações mais elevadas do que o arábica, *Coffea arabica*), além do processo

e quantidade de água utilizada no preparo do café (Alves, 2010).

Métodos de quantificação de acrilamida em alimentos são necessários para avaliar com precisão a exposição humana a esta substância prejudicial. Tais métodos devem produzir dados confiáveis. A determinação da concentração de acrilamida em alimentos requer uma capacidade analítica apropriada, com o uso de técnicas complexas de preparo de amostras antes da análise instrumental, que deve contar com equipamentos modernos.

O objetivo deste trabalho foi descrever um método implantado para determinação e quantificação de acrilamida em café torrado usando cromatografia líquida de ultraeficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial (CLUE-EM/EM).

Parte experimental

Preparo dos padrões

Solução padrão de acrilamida

Foram preparadas uma solução estoque com concentração igual a $1,032 \text{ mg.mL}^{-1}$ e duas soluções de trabalho com concentrações iguais a $516 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $103,2 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ em água ultrapura.

Padrão interno: padrão de $^{13}\text{C}_3$ acrilamida

Diluiu-se a solução de $^{13}\text{C}_3$ acrilamida (1 mg.mL^{-1}) em água

ultrapura, de modo a se obter uma solução de trabalho de concentração igual $1 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$.

Curva Analítica

Foi preparada uma curva analítica de acrilamida com oito pontos a partir das soluções de trabalho, com as seguintes concentrações: 0; 2,58; 5,16; 10,32; 25,8; 51,6 e $129,0 \text{ } \mu\text{g/L}$. Em cada ponto foram adicionados $50 \text{ } \mu\text{L}$ da solução $1 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ de $^{13}\text{C}_3$ acrilamida como padrão interno.

Condições Cromatográficas e Parâmetros do Espectrômetro de Massas

A fase móvel A foi composta por solução aquosa de ácido fórmico 0,1 % e a fase móvel B por acetonitrila com 0,1 % de ácido fórmico. Utilizou-se modo isocrático, com 95 % da fase A e vazão de $0,2 \text{ mL/min}$. Foi utilizada a coluna cromatográfica Waters Acquity UPLC[®] BEH C_{18} ($100 \text{ mm} \times 2,1 \text{ D.I.}, 1,7 \text{ } \mu\text{m}$) com temperatura do forno de $25 \text{ } ^\circ\text{C}$. O espectrômetro de massas Quattro Premier XE[®] foi operado com fonte de ionização por eletronebulização (ESI) em modo positivo. Os parâmetros de operação foram ajustados para as seguintes condições: voltagem do capilar: 3,5 kV; temperatura da fonte de íons: $120 \text{ } ^\circ\text{C}$; temperatura de dessolvatação: $450 \text{ } ^\circ\text{C}$; fluxo do gás do cone (N_2): 50 L.h^{-1} ; fluxo do gás de dessolvatação (N_2): 700 L.h^{-1} ; fluxo do gás de colisão (argônio): $0,16 \text{ mL.min}^{-1}$. Através da infusão da solução de trabalho

de acrilamida com concentração igual a $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ foram ajustados os parâmetros do espectrômetro de massas e foram estabelecidas a transição de quantificação, a energia de colisão e a voltagem do cone.

Preparo das amostras

A extração de acrilamida nas amostras de café foi feita com água ultrapura por agitação e limpeza através da técnica de *supported liquid extraction* (SLE) (Xu *et al.*, 2014) com a coluna Isolute SLE+®. Foram pesados 2 g de amostra comercial de café torrado em tubo de centrífuga de 50 mL e adicionados 10 mL de água ultrapura e 400 μL da solução de $^{13}\text{C}_3$ acrilamida ($1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Em seguida, agitou-se manualmente por 30 s, em vórtex por mais 30 s e em banho ultrassônico por 20 min. Centrifugou-se a 3600 rpm por 20 min a 20 °C. Foram retirados 0,6 mL do sobrenadante para um tubo de centrífuga contendo 13 μL de solução saturada de hidróxido de amônio, agitou-se o tubo e transferiu-se 500 μL para a coluna Isolute SLE+®. Após 5 min, eluiu-se com 2,5 mL da mistura de acetato de etila (1:1), com fluxo sob gravidade, recolhendo-se num tubo contendo 2 μL de etilenoglicol. Em seguida, evaporou-se à secura com nitrogênio (N_2), reconstituiu-se com 500 μL da fase móvel A, filtrou-se em membrana PTFE 0,45 μm e transferiu-se para o vial do sistema Acquity UPLC®.

Resultados

Condições Cromatográficas e Ajustes dos Parâmetros do Espectrômetro de Massas

A escolha da fase móvel foi feita de acordo com a solubilidade da acrilamida. Através da infusão da solução de trabalho de acrilamida foi estabelecido o íon precursor $[M + H]^+$ de relação massa/carga (m/z) igual a 72, a transição de quantificação de $72 \rightarrow 55$, a transição de confirmação de $72 \rightarrow 27$, a energia de colisão de 13 V e a voltagem do cone de 20 V. Para o padrão isotópico de acrilamida ($^{13}\text{C}_3$) foi estabelecida a transição de $75 \rightarrow 58$. O tempo de retenção da acrilamida foi de 1,36 min. Não foram observados interferentes da matriz com mesmo tempo de retenção e relação m/z da acrilamida. Isso demonstra que o método é seletivo. Os cromatogramas obtidos para a acrilamida e para o seu padrão isotópico encontram-se nas Figuras 1 e 2, respectivamente.

Curva analítica

A curva analítica obtida para a acrilamida encontra-se na Figura 3. Foi observada uma boa correlação entre a concentração do analito e a resposta instrumental, com valores de coeficientes de correlação (r) e de determinação (r^2) acima de 0,99 (0,997814 e 0,995632 respectivamente), para a faixa de trabalho de 0 a 129 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

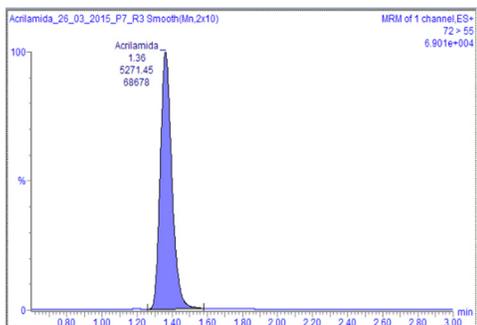


Figura 1. Cromatograma do íon extraído obtido para a acrilamida.

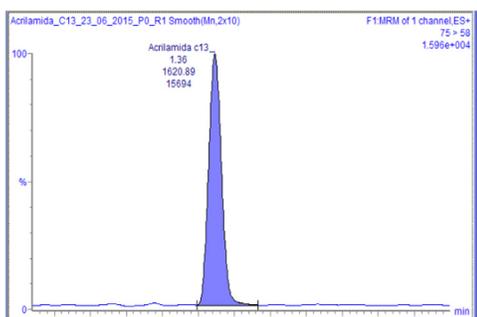


Figura 2. Cromatograma do íon extraído obtido para a acrilamida $^{13}\text{C}_3$.

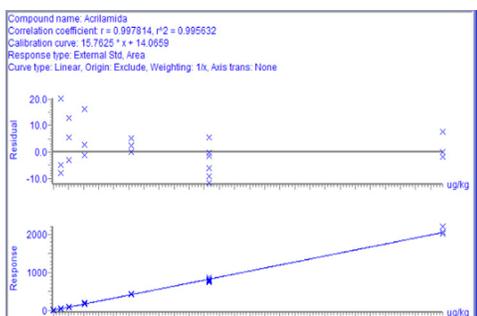


Figura 3. Curva analítica obtida para a acrilamida

Aplicação do método em amostras comerciais

O Brasil não estabelece um limite para o teor de acrilamida em café. A Portaria nº 518 do Ministério da Saúde estabelece o limite de $0,5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de acrilamida na água potável (Brasil, 2017).

A Recomendação 647 da Comissão Europeia estabelece o limite de $450 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ para a acrilamida em café torrado e $900 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ para o café solúvel (Comission of European Communities, 2013).

O valor médio de acrilamida obtido para a amostra comercial de café torrado foi de $44,78 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$. Este valor encontra-se dentro da faixa de trabalho do método (0 a $2580 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) e é dez vezes menor do que o limite estabelecido pela Comissão Europeia.

Conclusão

O método implantado se mostrou adequado para identificar e quantificar a acrilamida em café torrado, sem a presença de interferentes, e com faixa de trabalho adequada para atender aos requisitos da legislação existente.

Referências

ALVES, R. C.; SOARES, C.; CASAL, S.; FERNANDES, J.O.; BEATRIZ, M.; OLIVEIRA P.P. Acrylamide in espresso coffee: Influence of species, roast degree and brew length. **Food Chemistry**, v. 119, p. 929-934, 2010.

ARISSETO, A. P.; TOLEDO, M. C. F. Acrilamida em alimentos: uma revisão. **Brazilian Journal of Food Technology**. v. 9, n. 2, p.123-134, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. 2017. Portaria de Consolidação nº 5 de 28 de Setembro de 2017. Consolidação das normas sobre as ações e os serviços de saúde do Sistema Único de Saúde. **Diário Oficial da União**, seção 1, Brasília, DF, n. 190, suplemento de 3 out. 2017. Capítulo V. Seção II. Anexo XX. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2017/prc0005_03_10_2017.html. Acesso em: 4 nov. 2018.

COMMISSION OF EUROPEAN COMMUNITIES. Recomendação da Comissão de 08 de novembro de 2013 relativa à investigação de acrilamida nos alimentos: **Jornal Oficial da União Europeia**. Bruxelas. p. 15-17. 12 nov. 2013. Disponível em: <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2013:301:0015:0017:PT:PDF>. Acesso em: 4 nov. 2018.

ERIKSSON, S. **Acrylamide in food products: Identification, formation and analytical methodology**. 2005. 83 f. Tese (doutorado) - Departamento de Química Ambiental. Química Ambiental, Universidade de Estocolmo, Estocolmo, Suécia. 2005. Disponível em: http://www.diva-portal.org/smash/record.jsf?p_id=diva2%3A197454&dsid=-7495. Acesso em: 4 nov. 2018.

IARC. INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. WHO. World Health Organization. **IARC Monographs**

on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene, v. 82. Lyon: IARC PRESS, 2002. 601 p. Disponível em: <https://monographs.iarc.fr/wp-content/uploads/2018/06/mono82.pdf>. Acesso em: 4 nov.

ORACZ, J.; NEBESNY, E.; DOROTA, Z. New trends in quantification of acrylamide in food products – Review. **Talanta**, v. 86, p. 23-34, 2011.

XU, F.; ORUNA-CONCHA, M. J.; ELMORE, S. **Supported Liquid Extraction - New, Rapid Technique for the Analysis of Acrylamide in Roasted Coffee**. In: NURSTENPOSTGRADUATE FLAVOUR SYMPOSIUM, 2., 2014, Nottingham, UK.

Exemplares desta edição
podem ser adquiridos na:

Embrapa Agroindústria de Alimentos

Av. das Américas, 29.501 - Guaratiba
23020-470, Rio de Janeiro, RJ
Fone: (0xx21) 3622-9600
Fax: (0xx21) 3622-9713
www.embrapa.br/agroindustria-de-alimentos
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

1ª edição

Publicação digitalizada (2018)

Embrapa

MINISTÉRIO DA
**AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO**



Comitê Local de Publicações
da Embrapa Agroindústria de Alimentos

Presidente

Virgínia Martins da Matta

Membros

*André Luis do Nascimento Gomes, Celma Rivanda
Machado de Araujo, Daniela De Grandi Castro
Freitas de Sá, Elizabete Alves de Almeida Soares,
Janine Passos Lima da Silva, Leda Maria Fortes
Gottschalk, Marcos de Oliveira Moulin, Otniel
Freitas Silva e Rogério Germani*

Supervisão editorial

Daniela De Grandi Castro Freitas de Sá

Revisão de texto

Renata Valeriano Tonon

Normalização bibliográfica

Celma Rivanda Machado de Araujo

Tratamento das ilustrações

Marcos de Oliveira Moulin

Projeto gráfico da coleção

Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Editoração eletrônica

Marcos de Oliveira Moulin

Foto da capa

Tomas May

CGPE 14894