



## AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE XENOBIÓTICOS EM ÓLEOS VEGETAIS ALIMENTÍCIOS ENVASADOS EM GARRAFAS PET

*Dayne Loraine Hedler<sup>1</sup>; Adriano Valim Reis<sup>2</sup>; José Eduardo Gonçalves<sup>3</sup>*

**RESUMO:** Os disruptores endócrinos químicos (DEQs) são substâncias exógenas que causam efeitos adversos à saúde de um organismo e sua descendência, devido alterações nas funções endócrinas. Há um número significativo de substâncias catalogadas como DEQs. Dentre elas podemos citar os ftalatos ou derivados do ácido ftálico, amplamente utilizados na produção do plástico politereftalato de etileno (PET). As garrafas de PET, que são largamente utilizadas, têm sido de grande preocupação não somente pelos problemas ambientais, mas também devido aos malefícios que podem trazer à saúde humana e animal, uma vez que materiais de PET são capazes de liberar substâncias prejudiciais como os DEQs. Neste estudo foi investigada a presença de DEQs em óleos vegetais alimentícios (milho e soja) envasados em garrafa PET. Para a realização das análises utilizou-se a Cromatografia Gasosa acoplada ao Espectrômetro de Massa (CG/MS). Os cromatogramas obtidos foram avaliados e os espectros de massa gerados em cada pico dos cromatogramas foram comparados com os espectros de massa das bibliotecas NIST MS versão 2.0 e versão 11.0. Assim, por similaridade entre espectros de massas, foi possível verificar qualitativamente a presença ou ausência de ftalatos em amostras de óleos vegetais. Em amostras de óleo de milho não foram encontrados DEQs. No entanto, nas amostras de óleo de soja verificou-se a presença de compostos ésteres de ácido ftálico provavelmente lixiviados da embalagem PET para o produto envasado.

**PALAVRAS-CHAVE:** Xenobióticos; Xenoestrógenos; PET; Óleos vegetais; Cromatografia.

### 1 INTRODUÇÃO

Os xenobióticos são substâncias químicas exógenas aos organismos e estão presentes em produtos industriais como pesticidas, inseticidas, defensivos agrícolas, materiais plásticos, produtos de limpeza, etc. Os xenobióticos que interferem na ação hormonal têm sido denominados de xenoestrógenos e Disruptores ou Desreguladores Endócrinos Químicos (DEQs) (BLUMBERG *et al.*, 2011). A União Europeia (UE) definiu DEQs como substâncias exógenas que causam efeitos adversos à saúde dos organismos e sua descendência, por meio de alterações nas funções endócrinas. Para a UE, um potencial DEQ seria uma substância que causa desregulação endócrina em um organismo intacto (Commission E, 2013). Já a Organização Mundial da Saúde (OMS) caracteriza DEQ como uma substância ou mistura de substâncias exógenas aos organismos que alteram funcionalmente seu sistema endócrino produzindo efeitos adversos no organismo intacto, em sua descendência ou ainda na subpopulação (DAMSTRA *et al.*, 2002).

Inicialmente pensou-se que os DEQs exerciam ações somente nos receptores hormonais nucleares, incluindo os receptores de estrogênio, andrógenos, progesterona, hormônios da tireoide, entre outros (MCLACHLAN, 2001). No entanto, os estudos atuais afirmam que as ações dos DEQs vão além dos receptores nucleares: eles atuam em receptores de membranas, receptores de neurotransmissores (de serotonina, dopamina, norepinefrina), nas vias enzimáticas de biossíntese e metabolismo dos esteroides, além de numerosos outros mecanismos que convergem sobre os sistemas endócrino e reprodutivo (BLUMBERG *et al.*, 2011; DAMSTRA *et al.*, 2002; ITOH *et al.* 2012).

Em seres humanos os efeitos atribuídos ou relacionados ao DEQ são ginecomastia, oligospermia, impotência, hipogonadismo, diminuição da libido, redução da contagem e mobilidade de espermatozoides, irregularidades do ciclo menstrual, atraso na maturidade sexual masculina, redução da fertilidade, câncer de testículo, puberdade feminina precoce, adenocarcinoma vaginal, aumento do risco de câncer de mama, endometriose e distúrbio na lactação (DIAMANTI-KANDARAKIS *et al.*, 2009). No meio ambiente, a presença de DEQs está associada com a função anormal da tireoide em aves e peixes, feminização de peixes machos, aves e mamíferos, masculinização de peixes e aves do sexo feminino e alteração da atividade imune nos mamíferos (ZOELLER *et al.*, 2012; BOAS *et al.*, 2012; SILVA *et al.*, 2012).

<sup>1</sup> Acadêmica do Curso de Medicina Veterinária do Centro Universitário Cesumar – UNICESUMAR, Maringá – Paraná. Programa de Bolsas de Iniciação Científica da UniCesumar (PROBIC). [dayne.hedler@gmail.com](mailto:dayne.hedler@gmail.com)

<sup>2</sup> Orientador e docente do Curso de Mestrado em Tecnologias Limpas do Centro Universitário Cesumar – UNICESUMAR, Maringá – Paraná. [adriano.reis@unicesumar.edu.br](mailto:adriano.reis@unicesumar.edu.br)

<sup>3</sup> Co-orientador e docente do Curso de Mestrado em Promoção da Saúde e Tecnologias Limpas do Centro Universitário Cesumar – UNICESUMAR, Maringá – Paraná. [jose.goncalves@unicesumar.edu.br](mailto:jose.goncalves@unicesumar.edu.br)



Atualmente, há um número significativo de substâncias e classes de substâncias catalogadas como DEQs. Compostos como alquifenóis (encontrados em produtos de limpeza), ácidos perfluorooctanóicos (no teflon), bifenilas policloradas (em capacitores e motores elétricos), bisfenol A (na produção de plásticos e resinas epóxi), ftalatos (aditivos de plásticos), tributilestanho (componentes de biocidas), entre outros (AMIRIDOU e VOUTSA, 2011; MUNCKE, 2011).

O bisfenol A e os ftalatos são componentes importantes de muitos processos industriais. Estima-se que a produção mundial de ftalato chega a 6 milhões de toneladas/ano, já a produção de bisfenol A é estimada entre 2,2 e 4,7 milhões de toneladas/ano. Particularmente, o bisfenol A e os ftalatos são moléculas utilizadas nas indústrias produtoras de plásticos. O bisfenol A é utilizado na produção de policarbonato, enquanto que ftalatos ou derivados do ácido ftálico são utilizados como agentes plastificantes na produção dos plásticos dando maleabilidade ao material. O ftalato di-2-etilhexila (DEHP) é um dos mais difíceis de serem biodegradados. Estas substâncias ou os seus metabolitos têm sido detectados na urina humana, soro, fluido amniótico de mulheres grávidas, no leite materno e até mesmo no sémen (KNEZ, 2013).

O PET é um polímero termoplástico muito utilizado no envase de produtos alimentícios, como bebidas, vinagres e óleos. Pesquisas atuais têm enfatizado a lixiviação de xenoestrógenos para o produto envazado a partir de embalagens PET. Wagner e Oehlmann, 2011 apresentaram dados sobre a atividade estrogênica de água engarrafada da França, Alemanha e Itália. No total, 18 amostras foram analisadas e 61,1% destas apresentaram resposta estrogênica significativa em ensaio biológico. Ao comparar água da mesma fonte embaladas em frascos de vidro e de PET verificou-se a atividade estrogênica três vezes maior na água proveniente de garrafas de plásticas.

Considerando a toxicidade do DEQ à saúde e ao meio ambiente, este trabalho investiga presença de DEQ em produtos líquidos (óleo e água) envazados em garrafa PET.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

Foram adquiridos em mercados locais óleos de soja (marca A) e óleos de milho (marca B), ambos os produtos envazados em garrafas PET. Após a aquisição, as amostras foram armazenadas no escuro em temperatura de 20° C durante uma semana antes de seu preparo. Na Tabela 1 tem-se as especificações de marca, tipo e cor do frasco plástico, volume dos fluídos contido ou envasado em cada recipiente.

**Tabela 01 – Especificações quanto ao volume de óleo envazado, tipo e cor do frasco PET.**

	Óleos	
	Soja	Milho
Marca	A	B
Tipo de frasco	PET	PET
Cor do frasco	Transparente	Transparente
Volume (mL)	500	500

### 2.1. Preparo das amostras

Dois métodos foram utilizados no preparo das amostras: (I) Método de derivatização, que modifica grupos funcionais específicos da molécula de analito. O objetivo em derivatizar é aumentar a volatilidade dos analitos, melhorando a resposta do detector e aumentando a eficiência na separação dos picos cromatográficos. (II) Método de Extração Líquido-Líquido (ELL), nesta técnica ocorre a partição ou distribuição do analito entre duas fases imiscíveis. A eficiência da extração dependerá da afinidade dos analitos pelo solvente extrator. A lipofilicidade dos solventes de extração podem ser estimada a partir de logaritmo do coeficiente de partição água-octanol denominado de log P.

#### 2.1.1. Método de derivatização

Amostras dos óleos foram derivatizadas seguindo a metodologia IUPAC 3.301 (IUPAC, 1987). Em um tubo de ensaio, foram adicionados 0,1 g da amostra e 2 mL de hexano grau HPLC. A mistura foi agitada vigorosamente por cerca de 1 min. Então adicionou-se 0,2 mL de solução metanólica 2 mol L<sup>-1</sup> de KOH e o tubo foi novamente agitado por mais 2 min. A mistura foi deixada em repouso até que a parte superior da solução ficasse límpida. Em seguida, com auxílio de uma pipeta de Pasteur, a solução límpida contendo os ésteres metílicos foi coletada e 2 µL desta amostra foi injetada no CG-MS. Este procedimento produz reações de esterificação em grupos carboxílico e transesterificações em grupos ésteres. Nesta análise a derivatização visa aumentar a volatilização de moléculas como o ácido tereftálico (CAS: 100-21-0) e ácido ftálico (CAS: 88-99-3).



### 2.1.2. Método de extração líquido-líquido (ELL)

Para os ensaios de CG/MS, as amostras de óleo vegetal (milho ou soja) foram preparadas da seguinte forma: uma alíquota de 5 mL de óleo vegetal foi volumetricamente transferida para um tubo de ensaio onde adicionou-se volumetricamente 5 mL do fluido extrator, neste caso a acetonitrila. O tubo foi agitado vigorosamente por 1 min e deixado em repouso por 5 min para separação das fases (óleo/fluido extrator). Em seguida, com auxílio de uma pipeta de Pasteur, o fluido resultante da extração (contendo acetonitrila e analitos), denominado neste trabalho de Fex, foi transferido para um vial de 2 mL e posteriormente 2  $\mu$ L dessa amostra foi injetada no CG/MS.

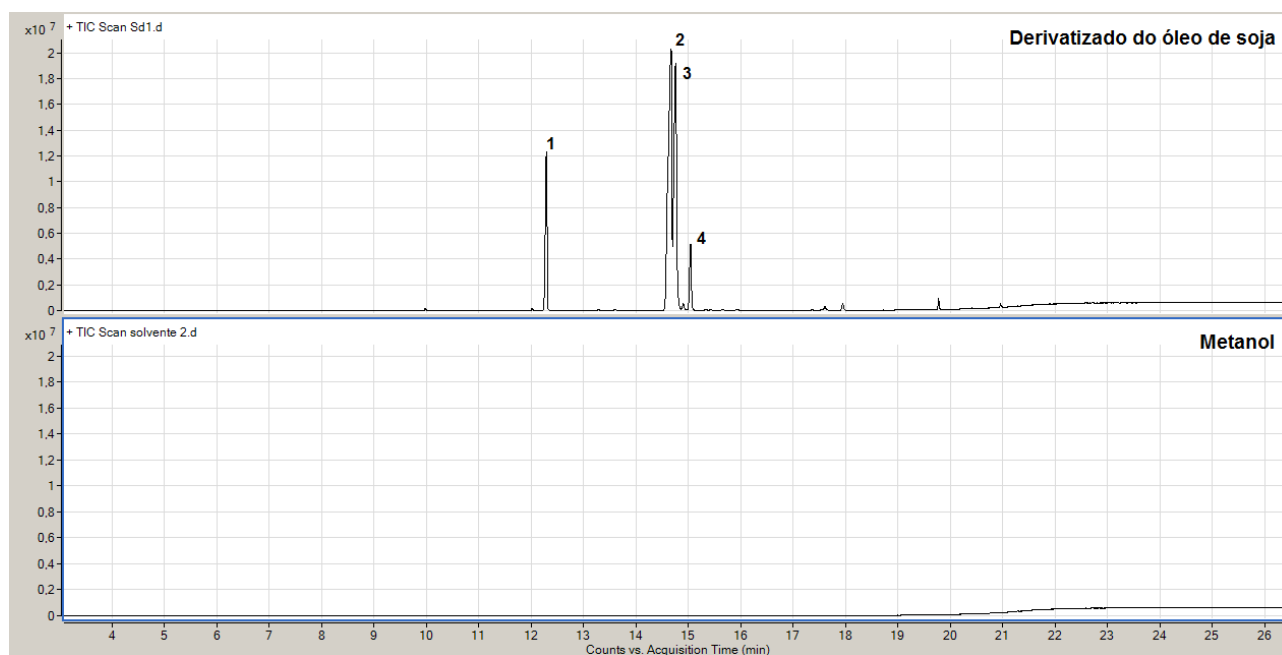
### 2.2. Análises de CG/MS

As condições operacionais do CG/MS foram embasadas na metodologia proposta por Bach *et al.*, 2013. Após devidos preparos, as amostras de óleos vegetais foram analisadas visando a identificação qualitativa de ftalatos lixiviados a partir do PET. Foi utilizado para as análises um cromatógrafo em fase gasosa Agilent 7890B, acoplado a um espectro de massa Agilent 5977A MSD. Os softwares utilizados para analisar os cromatogramas foram o MDS Chem Station® e o MassHunter® com biblioteca NIST MS ver 11.0. Um volume de 2  $\mu$ L das amostras foram injetadas no CG/MS equipado com coluna capilar de silício fundido Agilent HP-5MS IU (dimensões de 30 m x 250  $\mu$ m x 0.25  $\mu$ m). O hélio foi utilizado como gás de arraste com fluxo de 1,5 mL  $\text{min}^{-1}$ . A temperatura inicial do forno foi 60°C por 1 min, com gradiente de 20°C  $\text{min}^{-1}$  até 240 °C, então 4 °C  $\text{min}^{-1}$  até 260 °C mantido por 5 minutos e por fim 20°C  $\text{min}^{-1}$  até a temperatura final de 300°C. O tempo total das corridas foi de 24 min. Todas as análises foram realizadas no Laboratório de Análises Químicas e Biológicas do Centro Universitário de Maringá (UniCesumar). Os cromatogramas obtidos foram avaliados e os espectros de massa gerados em cada pico dos cromatogramas foram comparados com os espectros de massa da biblioteca NIST MS ver 11.0. Assim, por similaridade entre espectros de massas, foi possível verificar qualitativamente a presença ou ausência de ftalatos nas amostras.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 3.1. Análises das amostras de óleo preparadas via método de derivatização

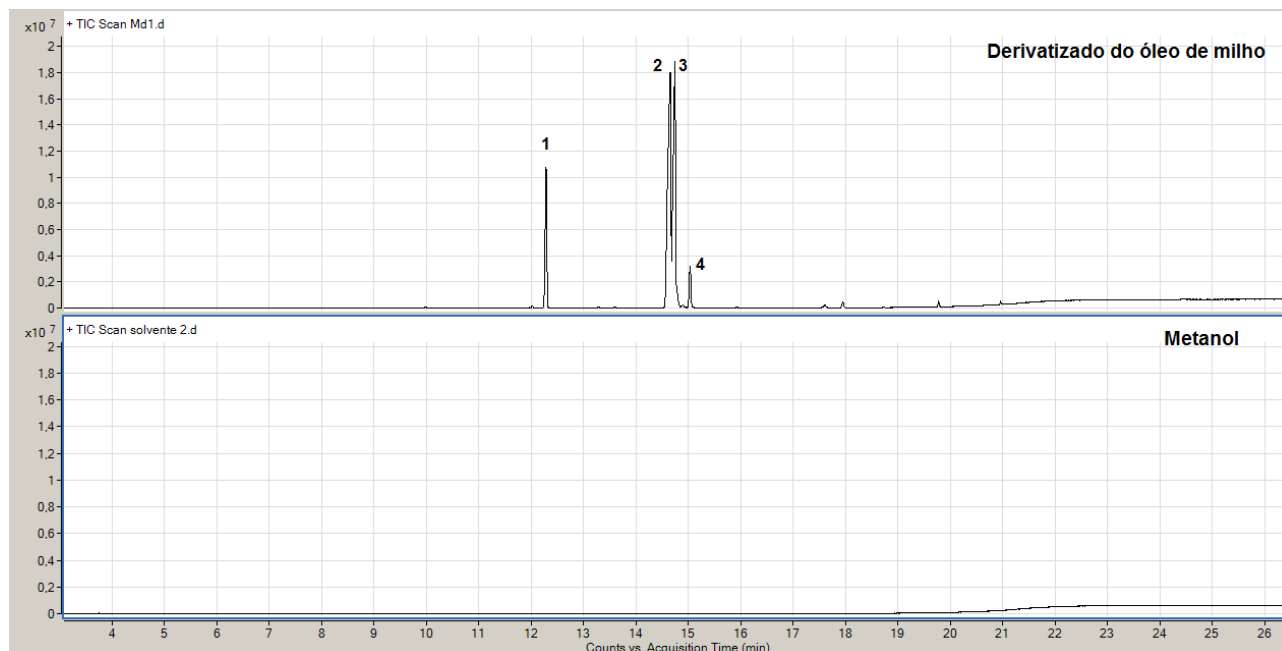
Na Figura 1 encontram-se o cromatograma gasoso do óleo de soja, submetido ao método de derivatização, bem como, o cromatograma do metanol utilizado na derivatização. O eixo x traz o tempo de retenção (min) e o eixo y a abundância relativa dos compostos, e foi observada a seguinte composição majoritária para o óleo de milho: (1) ácido palmítico, (2) ácido linoleico e (3) ácido  $\alpha$ -linolênico e (4) ácido esteárico, e os tempos de retenção em minutos 12,29; 14,67; 14,76 e 15,04 min, respectivamente.



**Figura 1** - CG do óleo de soja submetido ao método de derivatização. O eixo x refere-se ao tempo de retenção (min) e o eixo y a abundância relativa dos compostos.



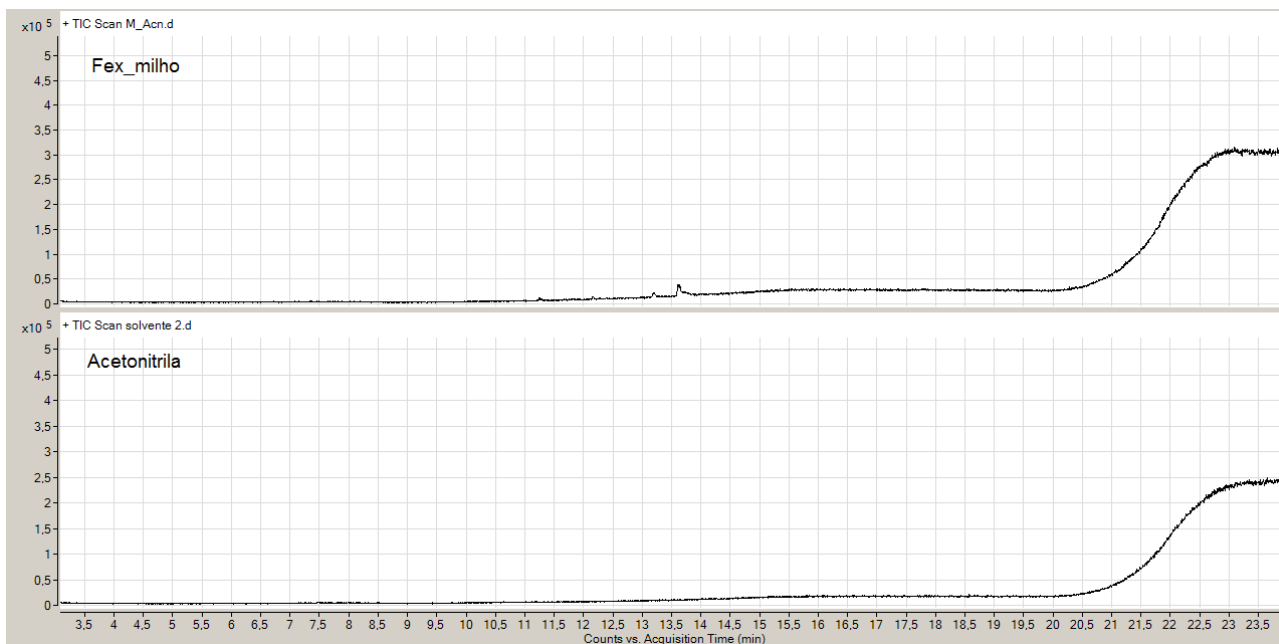
Na Figura 2 apresentam-se os cromatogramas gasosos do óleo de milho, submetido ao método de derivatização, e do metanol. Verifica-se resultados semelhantes ao do óleo de soja. Neste caso, a composição majoritária do óleo de milho consiste de: (1) ácido palmítico, (2) ácido linoleico e (3) ácido  $\alpha$ -linolênico e (4) ácido esteárico, e os tempos de retenção em minutos 12,29; 14,66; 14,74 e 15,03 min respectivamente. Em ambos os espectros não foram verificados picos relativos à compostos ftálicos.



**Figura 2** - CG do óleo de soja submetido ao método de derivatização. O eixo x refere-se ao tempo de retenção (min) e o eixo y a abundância relativa dos compostos.

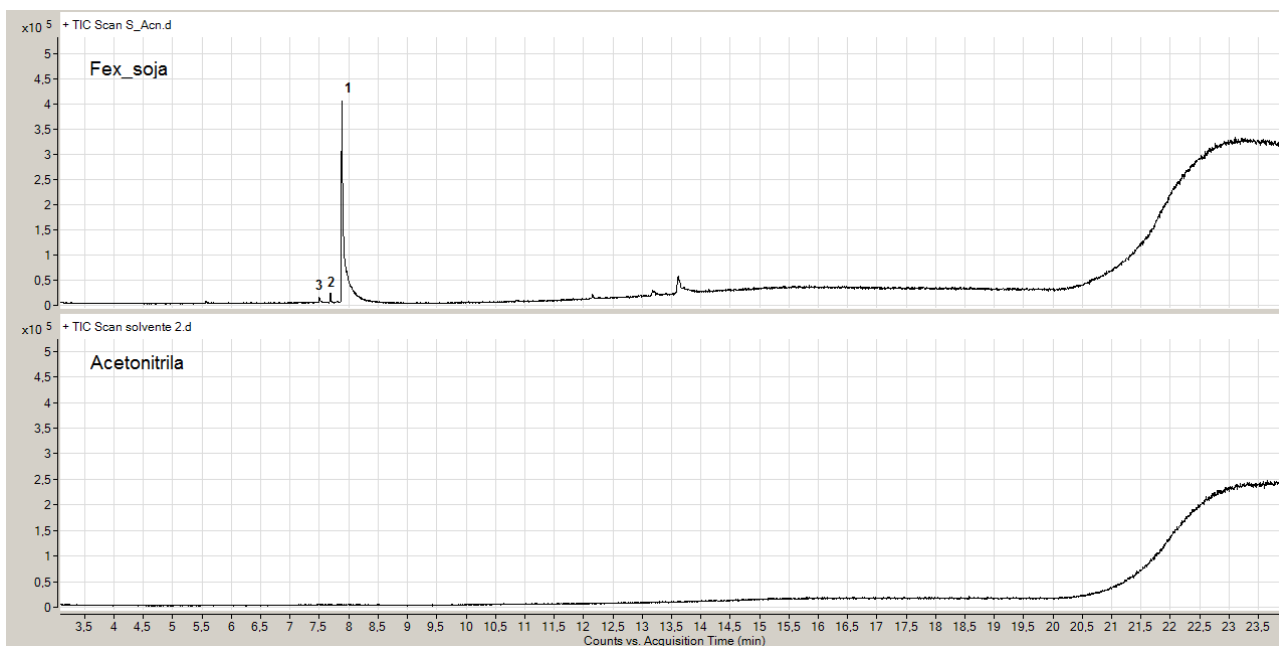
### 3.2. Análises das amostras de óleo preparadas via ELL

Na Figura 3 tem-se os cromatogramas da acetonitrila pura e da Fex de óleo de milho. Pode-se verificar pequenos picos entre 13 e 14,5 min. Analisando os espectros de massa destes picos e comparando os espectros gerados com o banco de dados da biblioteca NIST MS ver 2.0 concluiu-se que são picos referentes à siloxanos, provavelmente materiais derivados ou constituinte da coluna cromatográfica. A ausência de sinais relativos aos ftalatos no CG infere que no óleo de milho não possui contaminação oriunda do PET. A utilização de outros líquidos extratores como metanol, etanol e acetona em mais ensaios podem ser utilizados em novas análises para a complementação destes resultados.



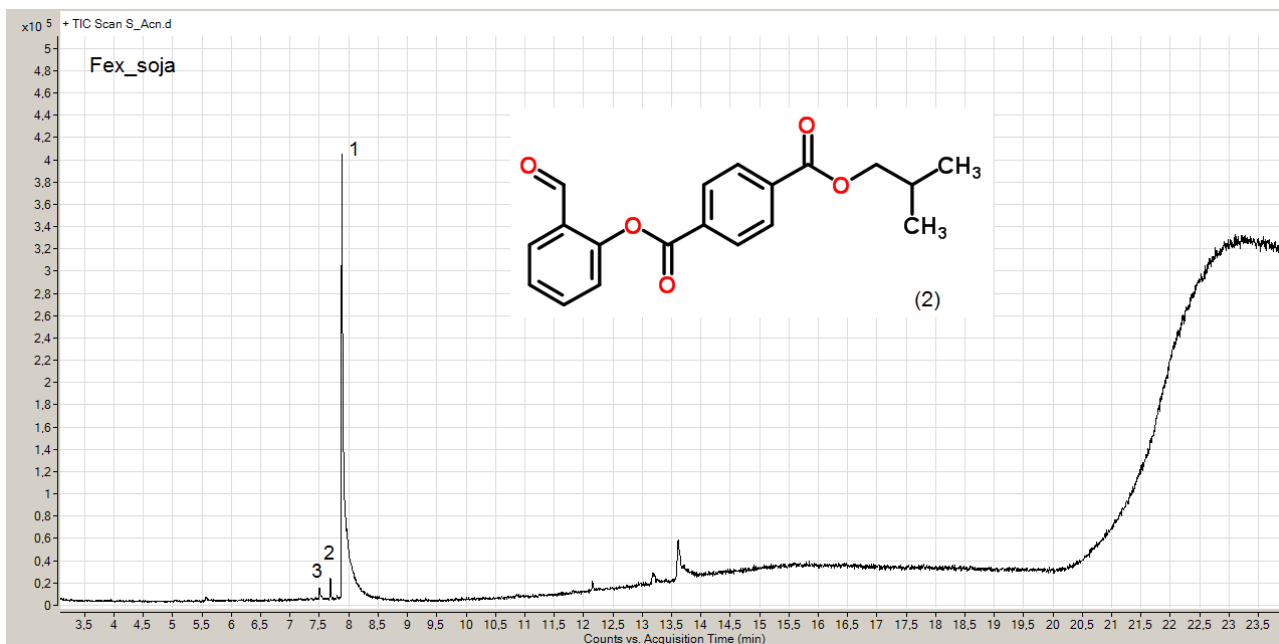
**Figura 3** - CG do óleo de milho submetido ao método ELL. O eixo x refere-se ao tempo de retenção (min) e o eixo y a abundância relativa dos compostos.

Na Figura 4 encontram-se os cromatogramas da acetonitrila pura e da Fex de óleo de soja. Os picos entre 13 e 14,5 min, como descrito anteriormente, são atribuídos às moléculas de siloxanos.



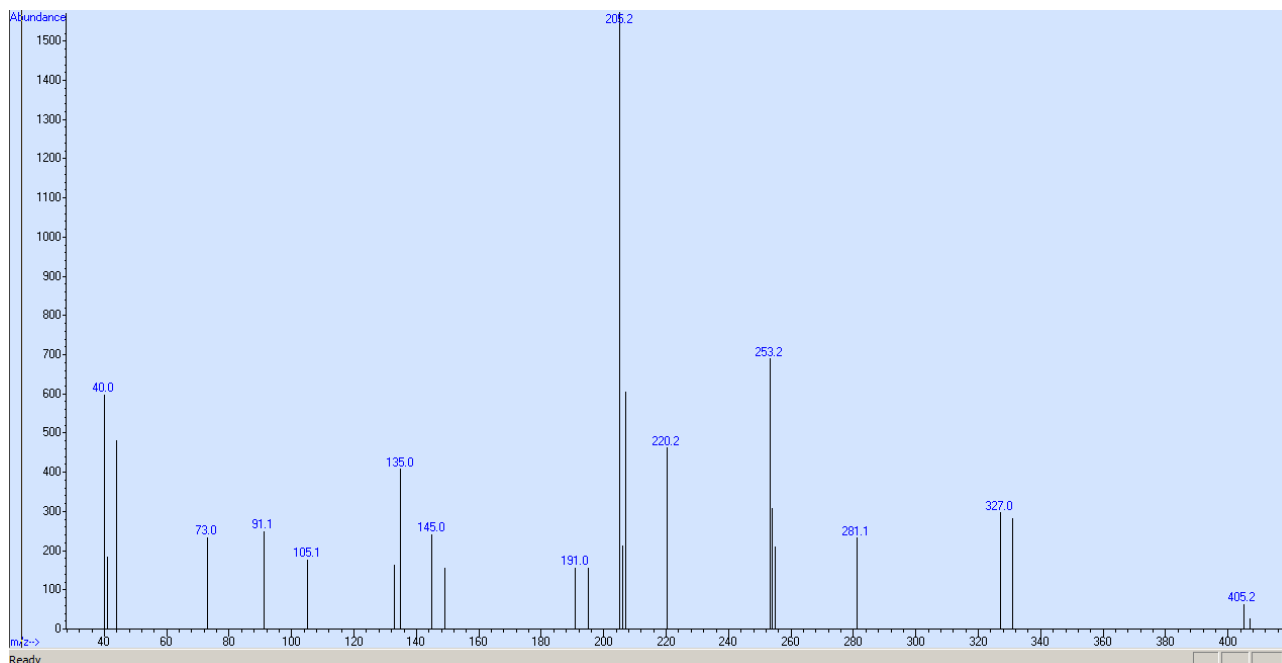
**Figura 4** - CG do óleo de soja submetido ao método ELL. O eixo x refere-se ao tempo de retenção (min) e o eixo y a abundância relativa dos compostos.

Na Figura 5 apresenta-se o CG ampliado do óleo de soja. O pico (1) do CG foi atribuído à molécula de terc-butil-hidroquinona (TBHQ) um composto fenólico sintético antioxidante utilizado em óleos vegetais para aumentar a estabilidade do produto. Com base nos resultados das análises do espectro de massa (Figura 6), o pico (2) corresponde ao isoftalato de 2- formilfenil isobutil ( $C_{19}H_{18}O_5$ ;  $326 \text{ g mol}^{-1}$ ) também denominado de tereftalato de 2- formilfenil isobutil um éster derivado do ácido ftálico. O pico (3) foi atribuído a um éster derivado do ácido malônico.



**Figura 5** - CG ampliado do óleo de soja submetido ao método ELL. A estrutura molecular representada é denominada de isoftalato de 2- formilfenil isobutil ou tereftalato de 2- formilfenil isobutil

Este indicativo qualifica a presença de ftalato no óleo de soja. Como a molécula de ftalato não é um componente natural do óleo de soja, fica evidente a lixiviação de ftalato do PET para o óleo envasado.



**Figura 6** - Espectro de massa referente ao pico (2) do CG ampliado do óleo de soja submetido ao método ELL

#### 4 CONCLUSÃO

Pelo uso do método de derivatização não foi possível verificar a presença de ftalatos em amostras de óleos vegetais. No entanto, utilizando a extração líquido-líquido (ELL), tendo como líquido extrator a acetonitrila, foi possível identificar a presença de compostos ftálicos no óleo de soja. Considerando a toxicidade dos DEQs, recomenda-se que análises quantitativas sejam realizadas com o objetivo de avaliar se as quantidades de ftalato no óleo de soja estão dentro dos limites de tolerância estabelecidos pela União Europeia (UE) e Organização Mundial da Saúde (OMS).



## REFERÊNCIAS

AMIRIDOU, D.; D. VOUTSA, Alkylphenols and phthalates in bottled waters. **J Hazard Mater**, v. 185(1): p. 281-6, 2011.

BLUMBERG, B. et al., Endocrine disrupting chemicals. **J Steroid Biochem Mol Biol**, v. 127(1-2), p. 1-3, 2011.

BOAS, M., U. FELDT-RASMUSSEN, K.M. MAIN, Thyroid effects of endocrine disrupting chemicals. **Mol Cell Endocrinol**, v. 355(2): p. 240-8, 2012.

Commission E. *European workshop on the impact of endocrine disruptors on human health and wildlife. In: Environment and climate research programme DX*. 1996 Tuesday, August 06, 2013 [cited 2013 11/06/2013]; Available from: <http://www.epa.gov/scipoly/oscpendo/>.

DAMSTRA, T.B., S *et al.*, Global assessment of the state-of-the-science of endocrine disruptors, **W.H. Organization**, Editor. 2002.

DIAMANTI-KANDARAKIS, E., et al., Endocrine-disrupting chemicals: an Endocrine Society scientific statement. **Endocr Rev**, v. 30(4), p. 293-342, 2009.

ITOH, K., *et al.*, Bisphenol A, an endocrine-disrupting chemical, and brain development. **Neuropathology**, v. 32(4), p. 447-57, 2012.

MCLACHLAN, J.A., Environmental signaling: What embryos and evolution teach us about endocrine disrupting chemicals. **Endocrine Reviews**, v. 22(3): p. 319-341, 2001.

MUNCKE, J., Endocrine disrupting chemicals and other substances of concern in food contact materials: an updated review of exposure, effect and risk assessment. **J Steroid Biochem Mol Biol**, v. 127(1-2): p. 118-27, 2011.

SILVA, C.P., M. OTERO, V. ESTEVES, Processes for the elimination of estrogenic steroid hormones from water: a review. **Environ Pollut**, v. 165, p. 38-58, 2012.

WAGNER, M.; J. OEHLMANN, Endocrine disruptors in bottled mineral water: estrogenic activity in the E-Screen. **J Steroid Biochem Mol Biol**, v. 127(1-2): p. 128-35, 2011.

ZOELLER, R.T., *et al.*, Endocrine-disrupting chemicals and public health protection: a statement of principles from The Endocrine Society. **Endocrinology**, v. 153(9): p. 4097-110, 2012.