

Acrilamida em cereais e derivados: validação do método analítico e resultados preliminares

Acrylamide in cereals and cereal products: analytical method validation and preliminary results

Sandra Copeto, Susana Jesus, Inês Delgado, Inês Coelho

ines.coelho@insa.min-saude.pt

Departamento de Alimentação e Nutrição, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal

_Resumo

A reação de Maillard, responsável pela cor, sabor e aroma dos alimentos, também produz substâncias nocivas, como a acrilamida (AA). Esta amida insaturada forma-se quando alimentos ricos em hidratos de carbono, como pão, batatas e café, são cozinhados a temperaturas elevadas e humidade baixa. A União Europeia classificou a AA como carcinogénica (Categoria 1B), mutagénica (Categoria 1B) e tóxica para a reprodução (Categoria 2). O presente estudo visa validar um método para determinar AA em cereais e derivados e investigar a sua presença em diferentes variedades desses produtos.

Utilizou-se a cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a um detetor de massa (UPLC-MS/MS) com ionização por electrospray positiva (ESI⁺) para detetar e quantificar a AA. O desempenho do método foi validado utilizando testes de avaliação externa da qualidade internacionais como testes de proficiência (FAPAS) e material de referência certificado (ERM-BD272). Avaliaram-se parâmetros como linearidade, limite de deteção (LD), limite de quantificação (LQ), precisão, exatidão e incerteza. Os LD e LQ foram de 0,40 µg/L e 1,22 µg/L, respetivamente, em conformidade com o Regulamento (UE) 2017/2158. A curva de calibração mostrou linearidade ($R^2 > 0,995$).

O método apresentou boas taxas de recuperação (92%-105%) e de precisão (desvio padrão relativo (RSD) $\leq 13\%$), participação satisfatória em ensaios de comparação interlaboratorial (ECI) (Z-score: 0,69 para *Crispbread* e -0,93 para *Biscuit*), assim como bons resultados para o ERM-BD272, demonstrando que o método é adequado para a determinação de AA em cereais e derivados. O método foi aplicado a cereais e derivados existentes no mercado, incluindo bolacha Maria, pão de trigo, flocos de milho e bolachas para bebé, todos recolhidos em Lisboa, Portugal.

Os resultados de AA das amostras avaliadas, expressos em µg/kg, encontram-se abaixo dos valores legislados pelo Regulamento (EU) 2017/2158. Embora os níveis de acrilamida encontrados cumpram os limites estabelecidos pela União Europeia, é necessária uma monitorização contínua da sua ocorrência, considerando as incertezas ainda presentes sobre os efeitos a longo prazo deste contaminante.

_Abstract

The Maillard reaction, responsible for food color, flavor, and aroma, also produces harmful substances such as acrylamide (AA). This unsaturated amide is formed when carbohydrate-rich foods such as bread, potatoes, and coffee are cooked at high temperatures and low humidity. The European Union has classified AA as carcinogenic (Category 1B), mutagenic (Category 1B), and toxic for reproduction (Category 2). The present study aims to validate a method to determine AA in cereals and cereal-based

products and investigate its presence in different food items.

Ultra-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry (UPLC-MS/MS) with positive electrospray ionization (ESI⁺) was used to detect and quantify AA. The method performance was validated using international external quality control tests such as proficiency tests (FAPAS) and a certified reference material (ERM-BD272). Parameters such as linearity, limit of detection (LD), limit of quantification (LQ), precision, accuracy and uncertainty were evaluated. The LD and LQ were 0.40 µg/L and 1.22 µg/L, respectively, in compliance with Regulation (EU) 2017/2158. The calibration curve showed linearity with an R^2 greater than 0.995.

The method showed suitable recovery rates (92%-105%) and precision (RSD $\leq 13\%$), satisfactory participation in interlaboratory comparison (ECI) assays (Z-score: 0.69 for *Crispbread* and -0.93 for *Biscuit*) and good results for the ERM-BD272, demonstrating that the method is suitable for the determination of AA in cereals and cereal-based products. The method was applied to commercially available products, including Maria biscuits, wheat bread, corn flakes, and baby biscuits collected in Lisbon, Portugal.

The AA results of the evaluated samples, expressed in µg/kg, are below the values legislated by the Commission Regulation (EU) 2017/2158. Although the acrylamide levels found comply with the limits established by the European Union, continuous monitoring of its occurrence is necessary, considering the remaining uncertainties about the long-term effects of this contaminant.

_Introdução

A acrilamida (AA) é um composto químico que se forma em alimentos ricos em hidratos de carbono quando estes são cozinhados a elevadas temperaturas e baixa humidade, levantando sérias preocupações de saúde pública ⁽¹⁾. Este composto é classificado como carcinogénico do Grupo 2A pela *International Agency for Research on Cancer* ⁽²⁾. A alimentação é a principal fonte de exposição e os produtos à base de cereais são uma das principais fontes de exposição à AA, sendo fundamental controlar a sua ocorrência nos alimentos para reduzir a exposição alimentar e o risco para a saúde humana ⁽³⁾.



Atualmente, em Portugal, existe apenas um estudo de exposição realizado, que utiliza dados de ocorrência fornecidos pela Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA) (4). Assim, é essencial avaliar a ocorrência de AA nos produtos alimentares comercializados em Portugal, utilizando métodos analíticos devidamente validados por forma a garantir a fiabilidade dos dados.

Embora os efeitos da AA na saúde humana ainda não sejam totalmente compreendidos, diversos estudos sugerem riscos potenciais. A exposição dietética à AA pode afetar negativamente o crescimento e o desenvolvimento dos recém-nascidos, tendo também sido relatado que este contaminante causa efeitos neurotóxicos, podendo levar à neuropatia (5-7). Evidências indicam uma correlação entre a exposição à AA e o aumento do risco de certos tipos de cancro, incluindo cancro do pulmão (8), linfático (9), do ovário e endométrio (10). No entanto, alguns trabalhos apresentam opiniões divergentes, sublinhando a necessidade de mais estudos para compreender plenamente os efeitos da AA na saúde humana (11,12).

A metodologia de Estudos de Dieta Total (*Total Diet Study* - TDS) é amplamente utilizada para avaliar a exposição da população a substâncias químicas nos alimentos, sejam elas benéficas ou prejudiciais à saúde. Reconhecida pela Organização Mundial da Saúde (OMS), esta metodologia, preconiza a avaliação das amostras tal como consumidas, servindo como uma ferramenta de saúde pública essencial para monitorizar a segurança de alimentos e proteger a saúde da população.

_Objetivos

Este trabalho teve como objetivos: i) desenvolver e validar um método para a determinação de acrilamida (AA) em cereais e derivados utilizando a técnica de cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a um detetor de massas (UPLC-MS/MS), ii) avaliar os níveis de AA em diferentes produtos disponíveis no mercado português utilizando o método desenvolvido.

_Materiais e métodos

O teor de AA foi determinado por UPLC-MS/MS com modo de ionização, ESI⁺. O método de extração incluiu o desengorduramento com n-hexano, a adição de AA-D3 como padrão interno, extração com água, e limpeza com coluna de extração em fase sólida. O desempenho do método e as figuras de mérito, foram avaliados recorrendo a ferramentas metrológicas como um material de referência certificado (MRC) (ERM-BD272 - Crispbread) e ensaios de comparação interlaboratorial (ECIs) (FAPAS) e pela avaliação de parâmetros como: limite de deteção (LD), limite de quantificação (LQ), linearidade, repetibilidade, precisão intermédia, exatidão e incerteza.

O processo de seleção e preparação das amostras para o estudo preliminar de monitorização dos teores de AA foi realizado de acordo com a metodologia TDS, mas com um número inferior de amostras por *pool* de grupo de alimentos. O plano de amostragem abrangeu a recolha de produtos de cereais e derivados no mercado, nomeadamente bolacha Maria (n=6), pão de trigo (n=6), flocos de milho (n=6) e biscoitos infantis (n=6), adquiridos no comércio local, em 2023, em Lisboa, Portugal. Após a recolha foram preparadas *pools* com as 6 amostras recolhidas de cada natureza, levando a um total de 4 *pools*. Estas foram analisadas em triplicado, em condições de garantia da qualidade suportadas pelos requisitos descritos na norma ISO/IEC 17025:2018 (13). A concentração de AA encontra-se expressa, pela média de três réplicas \pm desvio padrão (DP), em $\mu\text{g}/\text{kg}$.

_Resultados e discussão

Neste trabalho apresentam-se os resultados obtidos nos estudos de validação do método desenvolvido para determinação do teor de AA em cereais e derivados, e que possibilitaram a sua acreditação de acordo com a norma ISO 17025:2018, assim como os resultados decorrentes da aplicação do método a quatro categorias de produtos (bolacha Maria, bolachas infantis, pão de trigo e flocos de milho).

A **tabela 1** apresenta as figuras de mérito dos diversos parâmetros da validação do método.

artigos breves_ n. 4

A curva de calibração foi estabelecida com base no sinal/ruído (S/N) das transições quantificadora (m/z 72 > 55) e qualificadora (m/z 72 > 72 ou m/z 72 > 44 ou m/z 72 > 27) e dos rácios entre as transições qualificadora/quantificadora. Foram validadas duas gamas de trabalho, ambas apresentam linearidade das respetivas curvas de calibração e um quadrado do coeficiente de correlação (R^2) superior a 0,995. O LD e LQ do método foram calculados pela curva de calibração sendo de 0,40 $\mu\text{g/L}$ e 1,22 $\mu\text{g/L}$, respetivamente. A exatidão do método foi analisada com recurso a um MRC de pão estaladiço (ERM-BD272 - *Crispbread*), com um valor de referência de $980 \pm 90 \mu\text{g/kg}$, e a ensaios de recuperação. O laboratório obteve um valor médio ($n=17$) de $954 \pm 34 \mu\text{g/kg}$, o qual está dentro do intervalo do MRC. Foram também analisados vários alimentos de cereais e derivados ($n=7$) fortificados com uma solução padrão de AA para determinar as taxas de recuperação, que se situaram, entre 92 e 105%. Os estudos de repetibilidade e precisão intermédia do método

obtiveram resultados satisfatórios, 3,4% e $\leq 13\%$, respetivamente. O laboratório participou ainda em ECIs, obtendo z-scores dentro dos critérios de aceitação (FAPAS *Crispbread*: z-score = 0,69; FAPAS *Biscuit*: z-score = -0,93). A incerteza expandida do método, considerando um fator de expansão de 2, foi de 24%, tendo sido calculada com base em dados analíticos de controlo de qualidade interno.

Os resultados obtidos na validação do método cumprem os requisitos do Regulamento (UE) 2017/2158 da Comissão Europeia (14) e da norma ISO 17025:2018, encontrando-se o ensaio acreditado desde 2023.

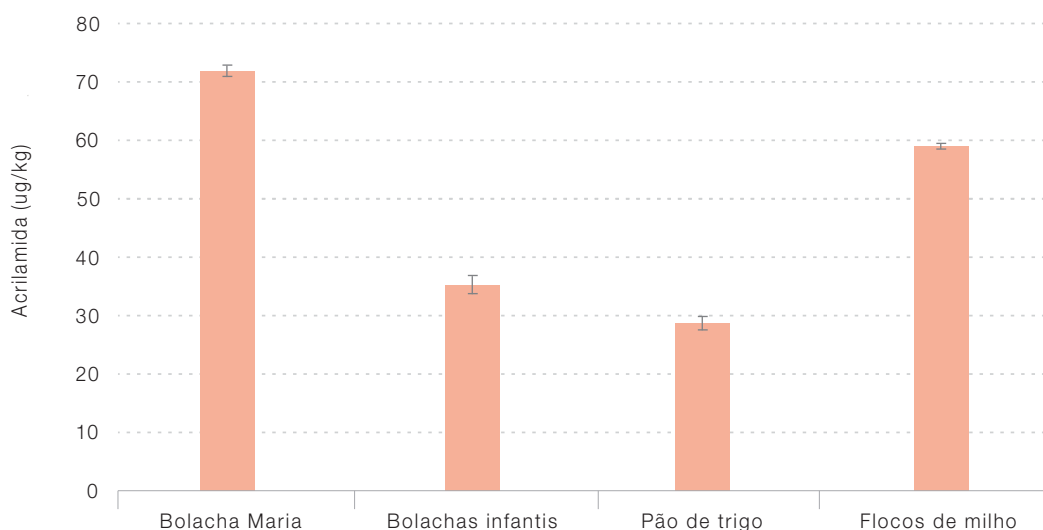
Após a otimização e validação do método, foram analisadas amostras de bolacha Maria, bolachas infantis, pão de trigo e flocos de milho, as quais foram preparadas na forma de *pools*. No gráfico 1 estão apresentados os resultados obtidos para estas amostras.

Tabela 1: Figuras de mérito da validação do método para determinação do teor de acrilamida.

	LD ($\mu\text{g/L}$)	LQ ($\mu\text{g/L}$)	Gama de trabalho ($\mu\text{g/L}$)	Recuperação (%)	Repetibilidade (%)	Precisão intermédia (%)	Incerteza expandida (%)
Acrilamida	0,40	1,22	1,25 - 12,5 10 - 100	92 - 105	3,4	≤ 13	21

LD-Limite de deteção; LQ-Limite de quantificação

Gráfico 1: Teor de acrilamida ($\mu\text{g/kg}$) nas matrizes alimentares em estudo.





artigos breves_ n. 4

A *pool* de bolacha Maria apresentou um teor médio de AA de $72 \pm 1 \mu\text{g}/\text{kg}$. No caso da bolacha Maria, os valores obtidos de AA estão abaixo dos níveis de referência da União Europeia (UE) ($350 \mu\text{g}/\text{kg}$) (14). A média da EFSA ($201 \mu\text{g}/\text{kg}$) para este tipo de produto é superior ao valor encontrado mas está dentro dos limites indicativos da UE, sugerindo que os níveis de AA são aceitáveis e seguros para o consumo (3).

No pão de trigo observou-se uma concentração média de AA de $29 \pm 1 \mu\text{g}/\text{kg}$. Os valores de AA encontrados estão abaixo dos níveis de referência estabelecidos pelo regulamento da UE, sendo também inferiores aos valores reportados pela EFSA ($42 \mu\text{g}/\text{kg}$) (3,14). Os dados do presente estudo, indicam que o pão de trigo apresenta níveis de AA seguros para o consumo humano.

Para os flocos de milho, o teor médio de AA foi de $59,0 \pm 0,4 \mu\text{g}/\text{kg}$. Os resultados mostram que os níveis de AA encontrados estão abaixo dos valores de referência da UE ($150 \mu\text{g}/\text{kg}$) (14). A média reportada pela EFSA para cereais de pequeno-almoço ($117 \mu\text{g}/\text{kg}$) mantém-se dentro dos níveis de referência da UE (3).

As bolachas infantis apresentaram uma concentração média de AA de $35 \pm 2 \mu\text{g}/\text{kg}$. Os níveis de AA encontrados estão abaixo dos limites indicativos da UE ($150 \mu\text{g}/\text{kg}$) e EFSA ($111 \mu\text{g}/\text{kg}$) para alimentos processados à base de cereais para bebés, indicando que estes produtos são seguros para o consumo infantil face à legislação atual (3,14).

Avaliando os valores de AA obtidos nas amostras de cereais e derivados analisadas, verificou-se que todos os teores estão abaixo do nível de referência estabelecido pela legislação da UE 2017/2158 (14).

Embora existam algumas diferenças entre as médias reportadas pela EFSA e os valores encontrados no presente estudo, ambos estão abaixo dos níveis de referência da UE, sendo um bom indicativo de segurança alimentar.

_Conclusão

O método analítico proposto foi validado com sucesso para determinar o teor de AA em cereais e derivados, cumprindo os requisitos estabelecidos tanto no Regulamento (UE) 2017/2158 como na norma ISO 17025:2018, estando acreditado pelo Instituto Português de Acreditação.

Avaliando os valores de AA obtidos nas amostras de cereais e derivados, verificou-se que todos os teores estão abaixo do nível de referência estabelecido pela legislação da UE, regulamento 2017/2158. Como tal, os produtos analisados ao abrigo da atual legislação, são seguros para o consumo da população portuguesa. No entanto, considerando a constante evolução da ciência, a alteração dos produtos disponíveis no mercado e a alteração nos padrões de consumo, é importante uma monitorização periódica. Torna-se fundamental expandir a monitorização dos teores de AA a outros grupos de alimentos, permitindo no futuro a realização de estudos rigorosos e fidedignos sobre a exposição a este composto químico, e possibilitando uma correlação mais precisa com dados epidemiológicos.

Referências bibliográficas:

- (1) Pandiselvam R, Süfer Ö, Özasan ZT, et al. Acrylamide in food products: Formation, technological strategies for mitigation, and future outlook. *Food Front*. 2024;5(3):1063-95. <https://doi.org/10.1002/fft2.368>
- (2) IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Acrylamide. In: WHO-International Agency for Research on Cancer. *Some Industrial Chemicals*. Lyon: IARC, 1994, pp. 389-433. (IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans; 60) https://publications.iarc.fr/_publications/-media/download/2017/91e1d37ff33b7285b94ec62e51e19cdd5107a549.pdf
- (3) EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM). Scientific opinion on acrylamide in food. *EFSA J*. 2015;13(6):4104. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2015.4104>
- (4) Costa SA, Correia D, Carvalho C, et al. Risk characterization of dietary acrylamide exposure and associated factors in the Portuguese population. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*. 2022 May;39(5):888-900. Epub 2022 Mar 14. <https://doi.org/10.1080/19440049.2022.2047540>.
- (5) Guan T, Zhang S, Jiang Y, et al. Relationship between gestational acrylamide exposure and offspring's growth: a systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Public Health Nutr*. 2020 Jul;23(10):1791-99. <https://doi.org/10.1017/S1368980019005123>. Epub 2020 Apr 30
- (6) Dearfield KL, Abernathy CO, Ottley MS, et al. Acrylamide: its metabolism, developmental and reproductive effects, genotoxicity, and carcinogenicity. *Mutat Res Genet Toxicol*. 1988;195(1):45-77. [https://doi.org/10.1016/0165-1110\(88\)90015-2](https://doi.org/10.1016/0165-1110(88)90015-2).



artigos breves_ n. 4

- (7) Hogervorst J, Virgolino A, Halldorsson TI, et al. Maternal acrylamide exposure during pregnancy and fetal growth: A systematic review and dose-response meta-analysis of epidemiological studies. *Environ Res.* 2022;213:113705. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.113705>
- (8) Hirvonen T, Kontto J, Jestoi M, et al. Dietary acrylamide intake and the risk of cancer among Finnish male smokers. *Cancer Causes Control.* 2010;21(12):2223-99. <https://doi.org/10.1007/s10552-010-9642-2>
- (9) Bongers ML, Hogervorst JG, Schouten LJ, et al. Dietary acrylamide intake and the risk of lymphatic malignancies: the Netherlands Cohort Study on diet and cancer. *PLoS One.* 2012;7(6):e38016. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038016>
- (10) Adani G, Filippini T, Wise LA, et al. Dietary intake of acrylamide and risk of breast, endometrial, and ovarian cancers: a systematic review and dose response meta-analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2020;29(6):1095-1106. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-19-1628>
- (11) Benisi-Kohansal S, Salari-Moghaddam A, Seyed Rohani, et al. Dietary acrylamide intake and risk of women's cancers: A systematic review and meta-analysis of prospective cohort studies. *Br J Nutr.* 2021;126(9):1355-63. <https://doi.org/10.1017/S0007114520005255>
- (12) Filippini T, Halldorsson TI, Capitão C, et al. Dietary Acrylamide Exposure and Risk of Site-Specific Cancer: A Systematic Review and Dose-Response Meta-Analysis of Epidemiological Studies. *Front Nutr.* 2022 Apr 25;9:875607. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.875607>
- (13) Instituto Português de Acreditação. Guia para a aplicação da NP EN ISO/IEC 17025:2018. http://www.ipac.pt/docs/publicdocs/requisitos/OGC001_GuiaAplicacao17025_v20181231.pdf
- (14) União Europeia. Regulamento (UE) 2017/2158 da Comissão, de 20 de novembro de 2017, que estabelece medidas de mitigação e níveis de referência para a redução da presença de acrilamida em géneros alimentícios. JO L 304 de 21.11.2017:24-44. <http://data.europa.eu/eli/reg/2017/2158/oj>