

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA  
INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Maria Clara de Oliveira Pinheiro

**AVALIAÇÃO DA REAL EXPOSIÇÃO A ACRILAMIDA POR CRIANÇAS PRÉ-  
ESCOLARES E ESCOLARES RESIDENTES NO MUNICÍPIO DO RIO DE  
JANEIRO**

Rio de Janeiro

2017

Maria Clara de Oliveira Pinheiro

**AVALIAÇÃO DA REAL EXPOSIÇÃO A ACRILAMIDA POR CRIANÇAS PRÉ-  
ESCOLARES E ESCOLARES RESIDENTES NO MUNICÍPIO DO RIO DE  
JANEIRO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito para obtenção do título de Doutora em Vigilância Sanitária

Orientadora: Shirley de Mello Pereira Abrantes

Rio de Janeiro

2017

Catálogo na fonte  
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde  
Biblioteca

Pinheiro, Maria Clara de Oliveira

Avaliação da real exposição a acrilamida por crianças pré-escolares e escolares residentes no município do Rio de Janeiro / Maria Clara de Oliveira Pinheiro. – Rio de Janeiro: INCQS / FIOCRUZ, 2017.

117 f. : il.

Tese (Doutorado em Vigilância Sanitária)– Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde. Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, 2017.

Orientadora: Shirley de Mello Pereira Abrantes

1. Acrilamida. 2. Nutrição da Criança. 3. Alimentos Industrializados. 4. Contaminantes Químicos em Alimentos. I. Título

Evaluation of the real exposure to acrylamide by pre-school children and school children living in the municipality of Rio de Janeiro

Maria Clara de Oliveira Pinheiro

**AVALIAÇÃO DA REAL EXPOSIÇÃO A ACRILAMIDA POR CRIANÇAS PRÉ-  
ESCOLARES E ESCOLARES RESIDENTES NO MUNICÍPIO DO RIO DE  
JANEIRO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito para obtenção do título de Doutora em Vigilância Sanitária

Aprovada em \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

Helena Pereira da Silva Zamith (Doutora)  
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde – INCQS / FIOCRUZ

---

Marco Antonio Mota da Silva (Doutor)  
Universidade Estadual da Zona Oeste – UEZO

---

Paola Cardarelli Leite (Doutora)  
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde – INCQS / FIOCRUZ

---

Shirley de Mello Pereira Abrantes (Doutora) - Orientadora  
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde – INCQS / FIOCRUZ

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente agradeço a Deus, por me abençoar, por me fazer sentir sua presença em todos os momentos da minha vida e por me guiar pelo melhor caminho, mesmo eu nem sempre encontrando tempo para agradecê-lo.

À minha orientadora Dra. Shirley de Mello Pereira Abrantes, pela oportunidade de realizar esse trabalho ao lado de quem transborda sabedoria, por me orientar desde o mestrado, pela paciência, carinho e por todas as lições que me ensinou ao longo deste período. Espero perpetuar tudo que aprendi com esta maravilhosa professora.

À professora Dra. Helena Pereira da Silva Zamith, revisora e presidente da minha banca, muito obrigada pela sua disposição em me ajudar e por todo o tempo que despendeu corrigindo este trabalho.

Ao professor Dr. Marco Antonio Mota da Silva, por participar das minhas bancas desde o mestrado, enriquecendo meus trabalhos com suas sugestões e orientações, os meus sinceros e afetuosos agradecimentos.

À professora Dra. Paola Cardarelli Leite, por aceitar fazer parte da minha banca e de maneira tão extraordinária contribuir com sugestões para o aprimoramento desta tese. Muito obrigada!

À Dra. Eliana Rodrigues Machado, por todas as sugestões desde as minhas apresentações preliminares deste projeto.

À Dra. Luciana Soares e ao Dr. Antonio Eugenio Castro Cardoso de Almeida obrigada por participarem da minha banca examinadora

Ao Dr. André Luiz Mazzei Albert, que em meio aos seus inúmeros compromissos se dispôs a me ajudar com orientações sobre o melhor uso do cromatógrafo, além de me ceder seu equipamento, para que esta pesquisa pudesse ser realizada. Muito obrigada!

Ao colega Me. Fábio Bazilio Silvestre, por todo o auxílio, conversa, idéias, paciência e boa vontade em me ajudar sempre que fosse preciso.

Ao chefe da biblioteca do INCQS, Alexandre Medeiros, pela ajuda e pelas correções, muito obrigada!

À minha eterna inspiração, Dra. Ana Maria Mendes Monteiro Wandelli, nutricionista que me incentiva a ser sempre uma profissional de excelência e me motiva a seguir a carreira acadêmica. Obrigada por tantos anos de ensinamentos.

À toda minha família, meu amado pai Antonio Carlos, meus irmãos Antonio Carlos e Carlos Antonio, minhas sobrinhas Fernanda, Larissa, Laura e Manuela, meus tios e padrinhos Nelson e Magaly, meus tios Florita e Telmo, meus primos Telma Lúcia, Elayne, Nelsinho, Raquel e Márcio, meu priminho Luiz Gabriel, minha cunhada Lígia, meu lindo afilhado Pedro, meus compadres Márcia e Kléber e minha mãe do coração Ana Maria, meu muito obrigada por todo o incentivo e torcida para que mais esta etapa fosse vencida!

Ao meu pai do coração, Elson Teixeira, minha maior inspiração nos estudos e meu amigo para todas as horas.

À minha psicóloga Vanessa Karam, por ter feito a diferença na minha vida, extraindo o melhor de mim, obrigada pela paciência e pelo carinho.

Aos meus amigos e amigas, que mesmo distantes, muitas vezes pelas atribuições desta pesquisa, torcem por mim.

À minha madrinha e tia Terezinha, por todo o incentivo e por sempre acreditar em mim. Obrigada por toda a força desde a infância.

À minha amiga e sócia Maithe Cardoso, que acredita e sonha com um mundo melhor, obrigada por sempre me incentivar e ser realmente uma amiga que me aceita e acolhe do jeito que sou.

Aos meus pacientes, que mesmo sem saberem, são um dos grandes motivos para que eu procure me aprimorar e me tornar uma profissional de excelência para atendê-los e juntos, buscarmos maneiras de melhorar a saúde de cada um deles.

E por fim, mas sempre em primeiro lugar no meu coração, agradeço a minha mãe, Lila Clara, minha melhor amiga, amor da minha vida e a grande razão de eu sempre procurar me superar e me tornar uma pessoa melhor.

“Faça o que você faz,  
Da melhor forma que pode fazer,  
Pelo máximo de tempo que puder,  
Todos os dias de sua vida.”

M. S. Cortella

## RESUMO

A acrilamida não está naturalmente presente nos alimentos, sendo um dos mecanismos de sua formação em alimentos baseado na reação de Maillard, entre aminoácidos, em especial a asparagina e açúcares redutores, quando submetidos a altas temperaturas. Alimentos ricos nestes dois precursores são derivados, principalmente, de produtos de origem vegetal como as batatas e cereais. A formação de acrilamida é observada na cocção, fritura, tostagem ou no processo de assar alimentos ricos em carboidratos com temperaturas superiores a 120°C e tende a aumentar com o tempo de cozimento e com a elevação da temperatura. Segundo a *International Agency for research on Cancer* (IARC) a acrilamida é classificada como uma substância provavelmente carcinogênica em humanos (grupo 2A) e, além disso, pode ser tóxica ao sistema nervoso e reprodutivo de homens e animais em determinadas doses. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estabeleceu um valor de ingestão diária de acrilamida tolerável de 12  $\mu\text{gkg}^{-1}$  de peso corporal (PC) / dia. Ainda são poucos os estudos sobre a exposição a acrilamida no Brasil, não existindo nenhum estudo específico desta exposição por crianças. Inúmeros estudos ao redor do mundo têm facilitado o surgimento de pesquisas mais específicas, onde é possível se dedicar a um alimento e a um grupo populacional para estabelecer a real exposição a acrilamida em um determinado contexto. O objetivo deste estudo é determinar o consumo efetivo de acrilamida pela população pré-escolar e escolar do município do Rio de Janeiro, quantificando seus níveis em alimentos consumidos por esta população. Primeiramente um questionário foi elaborado para ser respondido pelos responsáveis pelas crianças entre 3 e 14 anos. A partir dos resultados dos questionários observou-se que as batatas fritas mais consumidas pelas crianças eram as batatas vendidas em *fast food*, batatas tipo *chips* e batatas palha. O método analítico utilizado para detecção e quantificação da acrilamida nas batatas foi cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por ultra violeta. A validação do método contou com os testes de linearidade, efeito matriz repetibilidade, precisão intermediária, determinação do limite de quantificação e do limite de detecção. A exposição a acrilamida proveniente de batatas fritas tipo *chips* variou de 0,010 a 0,272  $\mu\text{g} / \text{kg PC} / \text{dia}$ . Já a exposição a acrilamida por batatas fritas tipo palha ficou entre 0,004 a 0,111  $\mu\text{g} / \text{kg PC} / \text{dia}$ . A exposição a acrilamida pelas batatas fritas vendidas em lanchonetes *fast foods* é de 0,60 a 21,06  $\mu\text{g} / \text{kg PC} / \text{dia}$ . A avaliação efetiva da exposição à acrilamida pela população infantil gera dados que contribuem para que políticas públicas sejam fortalecidas e possuam embasamento para interferir e determinar que a fabricação de alimentos industrializados sejam realizadas de maneira a diminuir o teor deste contaminante.

**Palavras chave:** Acrilamida. Crianças. Batata frita.

## ABSTRACT

Acrylamide, also known as 2-propenamide is a white crystalline solid, stable at room temperature. It forms part of its chemical structure a polar amide function, which confers the characteristic of high solubility in water and the vinyl function, which allows the polymerization. Acrylamide is not naturally present in foods, being one of the mechanisms of its formation in foods based on the Maillard reaction between amino acids, especially asparagine and reducing sugars, when subjected to high temperatures. Foods rich in these two precursors are derived mainly from products of plant origin such as potatoes and cereals. The formation of acrylamide is observed in cooking, frying, roasting or in the process of baking carbohydrate-rich foods with temperatures in excess of 120°C and tends to increase with cooking time and with raising the temperature. According to International Agency for Research on Cancer (IARC), acrylamide is classified as a likely carcinogenic substance in humans (group 2A) and, furthermore, can be toxic to the nervous and reproductive systems of men and animals at certain doses. The World Health Organization (WHO) established a tolerable daily intake of acrylamide of 12 µg kg<sup>-1</sup> of body weight (BW) / day. There are still few studies on acrylamide exposure in Brazil, and there is no specific study of this exposure by children. Numerous studies around the world have facilitated the emergence of more specific research, where it is possible to focus on a food and a population group to establish real exposure to acrylamide in a given context. The objective of this study is to determine the effective consumption of acrylamide by the preschool and school population of the city of Rio de Janeiro, quantifying their levels in foods consumed by this population. First, a questionnaire was designed to be answered by those responsible for children between the ages of 3 and 14. From the results of the questionnaires it was observed that the potatoes most consumed by the children were the potatoes sold in fast food, chips and straw potatoes. The analytical method used for detection and quantification of acrylamide in potatoes was high performance liquid chromatography with ultra violet detection. The validation of the method counted on the tests of linearity, matrix effect, repeatability, intermediate precision, determination of the limit of quantification and the limit of detection. Exposure to acrylamide from chips varied from 0.010 to 0.272 µg / kg BW / day. Already the exposure to acrylamide by straw chips was between 0.004 to 0.111 µg / kg BW / day. And the exposure to acrylamide for the chips sold in fast foods snack bars is 0.60 to 21.06 µg / kg BW / day. The effective evaluation of exposure to acrylamide by the child population tends to generate data that contribute to public policies being strengthened and have a foundation to interfere and to determine that the manufacture of processed foods is carried out in a way that decreases the content of this contaminant.

**Key words:** Acrylamide. Children. Potato chips.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura molecular da acrilamida.....	16
Figura 2 - Reação de Maillard .....	17
Figura 3 - Batata frita tipo Chips.....	43
Figura 4 - Batata frita tipo palha .....	43
Figura 5 - Batata frita de fast food.....	43
Figura 6 - Fluxograma para a análise da amostra pão francês.....	45
Figura 7 - Fluxograma para a análise da amostra batata frita tipo chips.....	46
Figura 8 - Fluxograma para a análise da amostra batata frita tipo palha. ....	47
Figura 9 - Fluxograma para a análise da amostra batata frita tipo fast food. ....	49
Figura 10 - Esquema de preparo das soluções de trabalho de acrilamida.....	51
Figura 11 – Proporção das idades dos alunos .....	57
Figura 12 - Distribuição dos alunos pelos anos escolares .....	57
Figura 13 - Consumo de pão francês .....	58
Figura 14 - Frequência diária de consumo de pão francês .....	59
Figura 15 - Frequência não diária de pão francês.....	59
Figura 16 - Consumo de batata frita.....	60
Figura 17 - Consumo semanal de batata frita .....	61
Figura 18 - Consumo não semanal de batata frita .....	61
Figura 19 - Consumo de batata frita caseira .....	62
Figura 20 - Consumo de batata frita congelada .....	62
Figura 21 - Consumo de batata frita de fast food .....	63
Figura 22 - Consumo de batata frita tipo palha .....	63
Figura 23 - Consumo de batata frita tipo chips.....	64
Figura 24 - Consumo relacionado aos tipos de batata frita .....	64
Figura 25 – Quantidade consumida de batata frita caseira .....	65
Figura 26 - Quantidade consumida de batata frita congelada.....	66
Figura 27 - Quantidade consumida de batata frita de fast food.....	66
Figura 28 - Quantidade consumida de batata frita tipo palha .....	67
Figura 29 - Quantidade consumida de batata frita tipo Chips .....	68
Figura 30 - Padrão de acrilamida (105 µg/L-1).....	69
Figura 31 - Cromatograma obtido a partir da amostra pão francês.....	69
Figura 32 - Cromatograma obtido a partir do padrão de acrilamida injetado na coluna A.....	71
Figura 33 - Cromatograma obtido a partir do padrão de acrilamida injetado na coluna B.....	71
Figura 34 - Cromatograma obtido a partir da amostra batata frita chips A.....	72
Figura 35 - Cromatograma obtido a partir da amostra batata frita chips B.....	73
Figura 36 - Cromatograma obtido a partir da amostra batata frita chips C.....	73
Figura 37 - Cromatograma obtido a partir da amostra batata frita palha D. ....	74
Figura 38 - Cromatograma obtido a partir da amostra batata frita palha E. ....	75
Figura 39 - Cromatograma obtido a partir da amostra batata frita palha F.....	75
Figura 40 - Cromatograma obtido da amostra batata frita fast food G. ....	76
Figura 41 - Cromatograma obtido da amostra batata frita fast food H. ....	77
Figura 42 - Cromatograma obtido da amostra batata frita fast food I.....	77
Figura 43 - Curva analítica final pelo método CLAE para a acrilamida .....	79

Figura 44 - Gráfico exploratório dos resíduos da regressão da curva analítica da acrilamida .....	79
Figura 45 - Gráfico de Durbin-Watson da curva analítica ( $e_i \times e_{i-1}$ ) – acrilamida .....	81
Figura 46 - Cromatograma obtido na realização do teste de efeito matriz para a batata frita tipo chips. ....	84
Figura 47 - Cromatograma obtido na realização do teste de efeito matriz para a batata frita tipo palha. ....	85
Figura 48 - Cromatograma obtido na realização do teste de efeito matriz para a batata frita tipo fast food. ....	85
Figura 49 - Cromatograma obtido na realização do teste de efeito matriz com o padrão de acrilamida em uma concentração de 75 $\mu\text{g} / \text{kg}$ . ....	86

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Exposição alimentar à acrilamida pela população adulta europeia (PÉRIZ, 2015).....	25
Tabela 2 - Exposição alimentar à acrilamida pela população infantil com até 6 anos (PÉRIZ, 2015). ....	26
Tabela 3 - Exposição alimentar à acrilamida pela população infantil e adolescente europeia (PÉRIZ, 2015). ....	27
Tabela 4 - Questionários enviados para cada escola.....	41
Tabela 5 - Amostras de batata frita .....	42
Tabela 6 - Questionários devolvidos e adequados aos critérios de aceitação da pesquisa.....	56
Tabela 7 - Normalidade dos resíduos .....	80
Tabela 8 - Resultados da análise de variância quanto a significância da regressão e não significância do desvio de linearidade ( $\alpha = 0,05$ ) para a curva analítica da acrilamida.....	81
Tabela 9 - Resumo das análises de premissas de linearidade pelo método MMQO	82
Tabela 10 - Avaliação da repetibilidade .....	83
Tabela 11 - Limites e Detecção e de Quantificação das curvas analíticas para análise da acrilamida.....	83
Tabela 12 - Peso médio por idade .....	87
Tabela 13 - Medida caseira X quantidade em gramas X teor de acrilamida em batata frita tipo chips .....	88
Tabela 14 - Medida caseira X quantidade em gramas X teor de acrilamida em batata frita tipo palha.....	88
Tabela 15 - Medida caseira X quantidade em gramas X teor de acrilamida em batata frita tipo fast food.....	88
Tabela 16 – Estimativa da exposição infantil em $\mu\text{g}$ acrilamida / kg PC em relação a ingestão de batatas tipo chips.....	89
Tabela 17 - Estimativa da exposição infantil em $\mu\text{g}$ acrilamida / kg PC em relação a ingestão de batatas tipo palha.....	90
Tabela 18 - Estimativa da exposição infantil em $\mu\text{g}$ acrilamida / kg PC em relação a ingestão de batatas tipo fast food.....	91
Tabela 19 - Estimativa da exposição infantil em $\mu\text{g}$ acrilamida / kg PC / dia em relação a ingestão de batatas tipo chips .....	92
Tabela 20 - Estimativa da exposição infantil em $\mu\text{g}$ acrilamida / kg PC / dia em relação a ingestão de batatas tipo palha.....	92
Tabela 21 - Estimativa da exposição infantil em $\mu\text{g}$ acrilamida / kg PC / dia em relação a ingestão de batatas tipo fast food.....	93

## LISTA DE SIGLAS

°C - Graus Celsius

µg - Micrograma

µL – Microlitro

µm - Micrômetro

a.C – antes de Cristo

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas

ANOVA - Análise de variância

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ppb – parte por bilhão

CLAE – Cromatografia líquida de alta eficiência

CNNPA - Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos

CV - Coeficiente de variação

EFSA – *European Food Safety Authority*

FAO - *Food and Agriculture Organization*

FDA - *Food and Drug Administration*

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz

FMA – Faixa mínima aplicável

FT - Faixa de trabalho

g – grama

h – hora

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IDA - Ingestão diária aceitável

INCQS - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia

IPEC - Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas

ISO – *International Organization for Standardization*

IUPAC – *International Union of Pure and Applied Chemistry*

JCGM – *Joint Committee for Guides in Metrology*

JECFA - *Joint Expert Committee on Food Additives* - FAO/WHO

kg – Quilograma

LM – Concentração da alíquota final de análise

LM1 – Concentração da alíquota final de análise em fração de massa

LMP – Limite máximo permitido

LOD – limite de detecção

LOQ – Limite de Quantificação

M - Molar

mg - Miligrama

min - Minutos

mL - Mililitro

MMQO - Método dos Mínimos Quadrados Ordinários

MRC - Material de referência certificado

nm – nanômetro

NBR – Normas brasileiras

OMS – Organização Mundial de Saúde

PC – Peso corporal

POP - Procedimento Operacional Padrão

RJ – Rio de Janeiro

Si – Desvio padrão de precisão intermediária

UE - União Européia

UV – ultravioleta

WHO – *World Health Organization*

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	16
1.1	ACRILAMIDA: FORMAÇÃO E APLICAÇÕES .....	16
1.2	TOXICOLOGIA E RISCOS A SAÚDE HUMANA .....	18
1.3	ESTIMATIVA DA INGESTÃO DE ACRILAMIDA .....	21
1.4	LEGISLAÇÃO BRASILEIRA E INTERNACIONAL PARA ACRILAMIDA .....	28
1.5	MÉTODOS PARA AVALIAÇÃO DO CONSUMO DE ACRILAMIDA.....	28
1.6	METODOLOGIAS ANALÍTICAS PARA A DETERMINAÇÃO DE ACRILAMIDA EM ALIMENTOS.....	29
1.7	VALIDAÇÃO DE MÉTODO.....	30
1.7.1	Linearidade .....	31
1.7.2	Homocedasticidade .....	31
1.7.3	Exatidão.....	31
1.7.4	Recuperação .....	32
1.7.5	Precisão.....	32
1.7.5.1	Repetibilidade .....	32
1.7.5.2	Precisão Intermediária.....	33
1.7.5.3	Reprodutibilidade .....	33
1.7.6	Limite de Detecção (LOD) .....	33
1.7.7	Limite de Quantificação (LOQ) .....	33
2	RELEVÂNCIA.....	35
3	OBJETIVOS .....	37
3.1	OBJETIVO GERAL.....	37
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	37
4	MATERIAL E MÉTODOS .....	38
4.1	EQUIPAMENTOS E ACESSÓRIOS.....	38
4.2	VIDRARIA.....	38
4.3	REAGENTES.....	39
4.4	CONFECÇÃO DO QUESTIONÁRIO .....	39
4.5	AVALIAÇÃO DE CONSUMO .....	40
4.6	AMOSTRAS.....	42
4.7	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	44
4.7.1	Análise das amostras.....	44
4.7.1.1	Pão francês.....	44
4.7.1.2	Batata frita tipo chips .....	45

4.7.1.3 Batata frita tipo palha .....	46
4.7.1.4 Batata frita de lanchonete fast food .....	48
4.7.2 Desenvolvimento e Validação de Método Analítico .....	49
4.7.3 Validação Intralaboratorial .....	50
4.7.3.1 Faixa de Trabalho .....	50
4.7.3.2 Linearidade .....	50
4.7.3.3 Repetibilidade .....	52
4.7.3.4 Limite de Quantificação (LOQ) e Limite de Detecção (LOD) .....	52
4.7.3.5 Efeito Matriz .....	53
4.7.3.6 Precisão Intermediária .....	53
4.7.3.7 Exatidão .....	54
4.7.4 Tratamento de dados .....	55
5 RESULTADOS .....	56
5.1 AVALIAÇÃO DE CONSUMO .....	56
5.1.1 Escolas .....	56
5.1.2 Pão francês .....	58
5.1.3 Batata frita .....	60
5.2 ANÁLISE DAS AMOSTRAS .....	68
5.2.1 Pão francês .....	68
5.2.2 Batata frita .....	70
5.2.2.1 Batata frita tipo chips .....	71
5.2.2.2 Batata frita tipo palha .....	74
5.2.2.3 Batata frita fast food .....	76
5.3 VALIDAÇÃO INTRALABORATORIAL .....	78
5.3.1 Faixa de Trabalho .....	78
5.3.2 Linearidade .....	78
5.3.2.1 Tratamento de valores aberrantes .....	79
5.3.2.2 Teste de normalidade dos resíduos .....	80
5.3.2.3 Teste de homogeneidade das variâncias dos resíduos .....	80
5.3.2.4 Teste de não autocorrelação dos resíduos .....	80
5.3.2.5 Análise de variância dos resíduos da regressão e desvio da linearidade .....	81
5.3.3 Repetibilidade .....	83
5.3.4 Limite de Detecção (LOD) e Limite de Quantificação (LOQ) .....	83

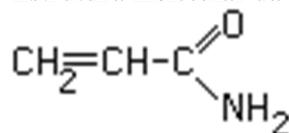
5.3.5 Efeito Matriz .....	83
5.3.6 Precisão Intermediária .....	86
5.3.7 Exatidão .....	86
5.4 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE ACRILAMIDA EM ALIMENTOS E ESTIMATIVA DA EXPOSIÇÃO .....	87
6 DISCUSSÃO .....	94
7 PERSPECTIVAS .....	98
REFERÊNCIAS .....	99
APÊNDICE A – Questionário “Avaliação da exposição efetiva a acrilamida por crianças pré-escolares e escolares residentes no município do Rio de Janeiro” ....	111
APÊNDICE B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido .....	113
APÊNDICE C – Termo de assentimento ao menor .....	115
APÊNDICE D – Termo de Consentimento da Escola .....	116

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 ACRILAMIDA: FORMAÇÃO E APLICAÇÕES

A acrilamida (Figura 1), é um sólido branco e cristalino, com peso molecular 71, estável à temperatura ambiente, solúvel em água, etanol, metanol, dimetil éter e acetona, e insolúvel no benzeno. Também conhecida como 2-propenamida, faz parte de sua estrutura química uma função amida polar, que confere a característica de alta solubilidade em água e a função vinila, que permite a polimerização (US EPA, 94).

Figura 1 - Estrutura molecular da acrilamida



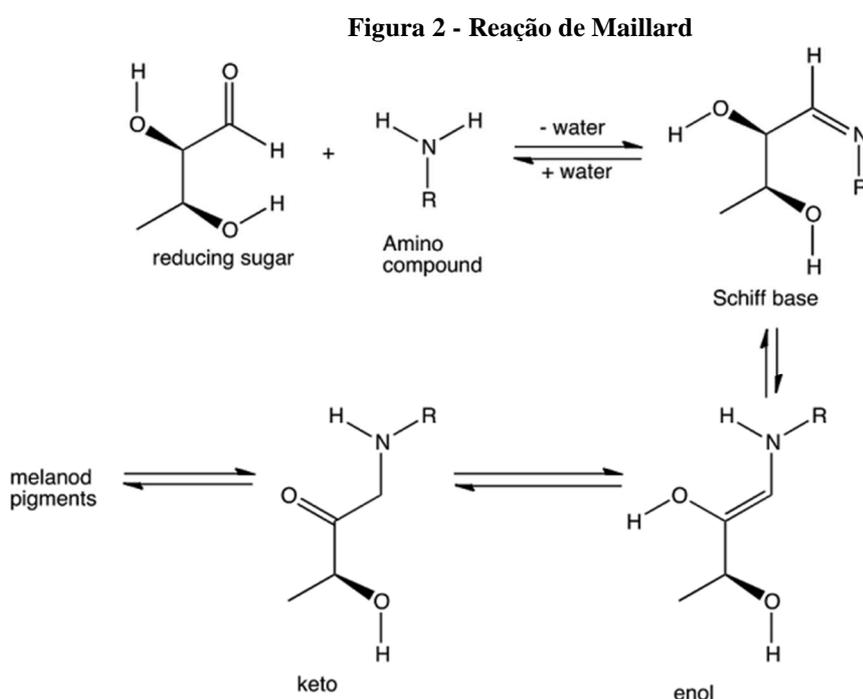
Desde que a formação da acrilamida no processo de aquecimento dos alimentos contendo amido foi observada e altos teores dessa substância foram encontrados em alimentos industrializados, há uma grande discussão envolvendo os possíveis riscos à saúde humana relacionados a essa exposição alimentar (LOFSTEDT, 2003).

A acrilamida já era utilizada pela indústria desde a década de 50 como um intermediário da produção de poliacrilamidas, também já foi usada pelas indústrias de tratamento de águas residuais e esgotos por sua ação floculante, em papel e pasta de celulose, no processamento de minerais, bem como na fabricação de cosméticos. Outras aplicações incluem a estabilização de solos ou areias, como agente fixante para selar tampas de esgotos e na química analítica como suporte sólido para a separação de proteínas por eletroforese (DEARFIELD et al, 1998; FRIEDMAN, 2003; HOGERVORST et al, 2010). A poliacrilamida não é tóxica, porém, no produto final, sempre existe uma quantidade residual de acrilamida não polimerizada, o que pode constituir um risco, principalmente quando se pensa em água potável (SOARES, 2006).

A formação de acrilamida em alimentos durante o aquecimento foi comprovada em estudos experimentais, realizados por pesquisadores da Universidade de Estocolmo, através da identificação de adutos de acrilamida com a hemoglobina em

animais alimentados com ração frita a 200 °C, sendo que a presença deste aduto não era observada no sangue de animais alimentados com ração não frita (TAREKE et al., 2000). Em abril de 2002, os mesmos pesquisadores comunicaram a descoberta de altos níveis de acrilamida em diversos alimentos submetidos a tratamento térmico em altas temperaturas (TAREKE et al., 2002). Com isso, a Agência Nacional de Alimentos da Suécia foi o primeiro órgão a realizar estudos para a determinação de acrilamida em produtos disponíveis no mercado (SNFA, 2002).

A acrilamida não está naturalmente presente nos alimentos, sendo um dos mecanismos de sua formação em alimentos baseado na reação de Maillard, entre aminoácidos, em especial a asparagina e açúcares redutores, quando submetidos a altas temperaturas (CHAROENPAINICH et al, 2012). Alimentos ricos nestes dois precursores são derivados, principalmente, de produtos de origem vegetal como as batatas e cereais (FRIEDMAN; LEVIN, 2008). Esta via parece apresentar a maior relevância na formação de acrilamida em alimentos (FRIEDMAN, 2003).



Outro mecanismo sugerido que opera no surgimento de acrilamida é o de lipídeos, onde a partir da degradação térmica de glicerol em acroleína, que sofre oxidação e reagindo com amônia forma-se acrilamida, porém esta é considerada uma fonte menos importante de formação deste composto (YASUHARA et al, 2003).

Quando as batatas são fritas em óleo de oliva, seus teores de acrilamida se apresentam maiores comparativamente as que foram fritas em óleo de milho. Porém a influência do óleo de fritura na formação de acrilamida deve estar relacionada com a taxa de transferência de calor e não com a presença de acroleína (BECALSKI et al., 2003).

A formação de acrilamida é observada na cocção, fritura, tostagem ou no processo de assar alimentos ricos em carboidratos com temperaturas superiores a 120°C (TAREKE et al, 2000; 2002) e tende a aumentar com o tempo de cozimento e com a elevação da temperatura (JACKSON, AL TAHER, 2005).

## 1.2 TOXICOLOGIA E RISCOS A SAÚDE HUMANA

Segundo a Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC), a acrilamida é classificada como uma substância provavelmente carcinogênica em humanos (grupo 2A) e, além disso, pode ser tóxica ao sistema nervoso e reprodutivo de homens e animais em determinadas doses (IARC, 1994).

O Comitê do Codex sobre Aditivos e Contaminantes em Alimentos (CCFAC), em 2004, recomendou ao Comitê de Especialistas em Aditivos Alimentares da FAO/OMS (JECFA) que realizasse uma avaliação do risco da ingestão da acrilamida através de alimentos, devido as consequências que o seu potencial tóxico poderia representar para a saúde humana. Como esta substância nunca havia sido avaliada anteriormente, o CCFAC também sugeriu que eventualmente se estabelecesse limites para a ingestão de acrilamida.

Os resultados da avaliação realizada pelo JECFA confirmaram o potencial tóxico da acrilamida, tendo o Comitê concluído que a substância deveria ser reavaliada assim que mais resultados de pesquisas em andamento sobre carcinogenicidade e neurotoxicidade estivessem disponíveis. Foi recomendado também que esforços deveriam ser direcionados para a redução do teor de acrilamida formada durante o processamento e era desejável que os países em desenvolvimento apresentassem dados sobre a ocorrência de acrilamida nos alimentos representativos das dietas nacionais (FAO/WHO, 2005).

Sendo rapidamente absorvida pelo trato gastrointestinal e largamente absorvida pelos tecidos, a acrilamida, que é oxidada a glicidamida via reação catalizada pela enzima citocromo P450 2E1, também é rapidamente eliminada na urina de animais experimentais. Ambas são substâncias reativas que formam adutos com proteínas (SEGERBACK et al, 1995). A glicidamida é mais reativa com o DNA do que a acrilamida (FAO/WHO, 2005), por conta disso, o metabólito glicidamida é considerado o fator genotóxico chave da exposição a acrilamida (PAULSSON, et al 2001). Tanto a acrilamida quanto a glicidamida possuem efeitos carcinogênicos, mutagênicos e clastogênicos em células de mamíferos (JOHNSON et al, 1986; IARC, 1994), além de apresentarem influência na redução da fertilidade e efeitos adversos na morfologia e número de espermatozoides em roedores machos (FAO/WHO, 2005).

Segundo Virk-Barker (2014) aparentemente a exposição oral a acrilamida fornece a maior absorção deste contaminante. A exposição através do uso de membranas de curativo que contém acrilamida (exposição cutânea) parece ser muito menor, pois a pele fornece uma barreira que reduz a absorção da mesma. Sendo assim, o uso de curativos que contenham acrilamida na composição do co-polímero é considerado seguro.

Estudos com animais têm demonstrado potencial carcinogênico da acrilamida após a administração oral. Estudos de longo prazo em ratos observaram o aumento significativo da ocorrência de tumores de glândulas mamárias em fêmeas, e de testículos em machos, além do aumento do número de tumores da glândula tireóide, sistema nervoso central, útero e tecidos orais (JOHNSON et al, 1986; FRIEDMAN et al, 1995).

Pesquisadores avaliaram a relação entre a ingestão de acrilamida com o sistema reprodutivo e neurotoxicidade em ratos machos. No estudo foi fornecida água contendo acrilamida nas concentrações 0, 5, 15, 30, 45 ou 60 µg/kg de PC /dia, equivalente a 0,0, 1,0, 3,0, 6,0, 9,0 e 12,0 mg de acrilamida / ml de água para os roedores durante 5 dias. Os roedores que foram expostos a maiores concentrações de acrilamida apresentaram uma redução significativa no ganho de peso, no acasalamento, na fertilidade e na força da pata caseira (mesmo não havendo alteração no nervo ciático, sugestivo de comprometimento neuromotor). Também houve uma maior incidência de abortos após a implantação nas ratas que cruzaram com ratos submetidos a ingestão da substância (TYL et al, 2000).

Em humanos os dados ainda são inconclusivos (VINHAS, 2011). Estudo realizado por pesquisadores da Holanda demonstrou aumento dos riscos de câncer de endométrio em mulheres pós-menopausa, em especial, as não fumantes (HOGERVORST, et al, 2007). O mesmo grupo de pesquisadores em 2010 apontou que existem indícios epidemiológicos de que a acrilamida possa causar câncer em humanos e que estas indicações são mais evidentes para câncer pós-menopausa, porém ressaltam a necessidade de que as associações observadas sejam mais investigadas (HOGERVORST, et al, 2010), afinal, a principal questão ainda se refere à maneira como o teor de acrilamida em alimentos pode afetar a saúde humana (ARISSETO; TOLEDO, 2006).

Estudo realizado em 2015 por Santacana e colaboradores não encontrou nenhuma associação entre a exposição dietética a acrilamida e a ocorrência de câncer de ovário em mulheres europeias. Este estudo de caso controle contou com 334 casos e 417 controles. Apesar de terem encontrado um aumento dos adutos hemoglobina-glicidamida e hemoglobina-acrilamida, esse aumento foi estatisticamente significativo. Os pesquisadores sugerem novas pesquisas com um maior número de participantes.

Já um estudo realizado com o objetivo de avaliar os danos genotóxicos induzidos pela acrilamida e pela glicidamida em cultura de linfócitos humanos verificou que a glicidamida causou maiores danos a cromatina em comparação a acrilamida, que para causar danos, precisou ser testada em concentrações bem maiores do que a da glicidamida (PINGARILHO et al, 2013).

Sabe-se que a possível mutagenicidade da acrilamida está relacionada com sua forma monomérica, porém não é possível confirmar até o momento que o efeito carcinogênico da acrilamida identificado em ratos também ocorra em humanos (SANTOS, 2015).

Com a finalidade de confirmar se o consumo alimentar de acrilamida é maior fonte de exposição a essa substância possivelmente carcinogênica em humanos, pesquisadores submeteram 3 pessoas a jejum de 48 h, mediram os níveis de metabólitos e produtos de degradação da acrilamida e encontraram níveis mais baixos do que pessoas não fumantes geralmente apresentam. Portanto, eles concluíram que a maior contribuição para a exposição a acrilamida é a dieta do indivíduo (BOETTCHER; BOLT, 2006).

Ainda são necessárias pesquisas antes de se tirar conclusões em relação ao potencial genotóxico e carcinogênico em humanos (ARISSETO; TOLEDO, 2006).

Por conta de tantos perigos que a exposição a acrilamida pode gerar, diversos países têm apresentado pesquisas com o intuito de mitigar a formação deste contaminante durante o processo de fabricação dos alimentos. A FoodDrinkEurope Federation lançou recentemente uma espécie de cartilha com orientações e ferramentas para que os fabricantes possam diminuir a formação de acrilamida nos seus produtos alimentícios (EFSA, 2015). A estratégia mais eficaz aparentemente para a mitigação de acrilamida em alimentos é a escolha de matérias primas com o menor teor dos precursores de acrilamida possíveis e o desencorajamento do uso de altas temperaturas no processo de cocção ou fritura. Já em batatas fritas a escolha de variedades de batata com menos quantidade de açúcares. Mas também existe a possibilidade do uso da enzima asparaginase, plantação em solos específicos, controle no processo de estocagem, além de submeter as batatas a um processo de branqueamento ajudem a mitigar a presença deste contaminante. É importante observar que existe uma grande dificuldade na adesão de algumas estratégias propostas, pois geram alterações relevantes no perfil sensorial dos alimentos. Mas considerando os riscos da exposição a acrilamida para a saúde humana, medidas práticas devem ser adotadas para diminuição desta exposição. (FOGLIANO et al, 2016; PEDRESCHI; MARIOTTI; GRANBY, 2014).

### 1.3 ESTIMATIVA DA INGESTÃO DE ACRILAMIDA

A partir da confirmação da presença de acrilamida em muitos alimentos processados termicamente pela Agência Nacional de Alimentos da Suécia, outros países, como Estados Unidos, Suíça, Noruega e Reino Unido iniciaram suas pesquisas e confirmaram a presença de acrilamida em diversos alimentos (FDA, 2002; NFCA, 2002; SOPH, 2002; UK FSA, 2002).

Enquanto inúmeros países já reportaram os níveis de acrilamida em produtos de mercado, nenhum dado sobre sua ocorrência em países da África ou da América Latina foi submetido ao JECFA. Apenas um estudo realizado no Brasil, entre 2004 e

2006, analisou a ocorrência de acrilamida em alimentos brasileiros (ARISSETO; TOLEDO, 2006).

Inúmeros avanços ao redor do mundo são observados nos estudos com acrilamida, facilitando o surgimento de pesquisas mais específicas, onde é possível se dedicar a um alimento e a um grupo populacional para estabelecer a real exposição a acrilamida em um determinado contexto.

Seguindo esta linha, Yan He et al (2012) avaliaram a exposição a acrilamida em relação ao consumo de macarrões instantâneos em uma província da China. Este estudo revelou que os níveis de acrilamida nestes macarrões foram significativamente diferentes nas diversas marcas analisadas. Com base nestes resultados, a conclusão que os pesquisadores chegaram é de que a exposição a acrilamida proveniente de macarrões instantâneos está diretamente relacionada as condições de processamento durante a fabricação. E que apesar de várias marcas estarem com teores de acrilamida considerados seguros pelos pesquisadores, algumas delas, apresentam níveis extremamente altos, o que se torna uma preocupação, devido ao grande aumento no consumo deste tipo de alimento pela população.

Outro estudo, realizado na Tailândia, analisou a exposição à acrilamida proveniente do consumo de “snacks” e concluiu que a ingestão deste tipo de alimento pode ser uma das principais fontes de exposição a este contaminante, porém a estimativa de exposição pelos tailandeses é menor do que a encontrada em outros países (CHAROENPANICH et al., 2012).

Um estudo recente realizado na Suíça avaliou a presença de acrilamida em batatas *rostie* comercializadas em restaurantes de Zurique. Este estudo encontrou uma média de 702  $\mu\text{g} / \text{kg}$  de acrilamida nessas batatas, 16% acima da média encontrada no último parecer da EFSA (2015) para batatas fritas (606  $\mu\text{g} / \text{kg}$ ). Este estudo também evidenciou a falta de conscientização entre os chefs e fornecedores de restaurantes de que o teor de açúcar é crucial para fazer uma *rostie* com baixos teores de acrilamida. O conjunto de dados demonstrou que usando batatas com menos de 2 g / kg de frutose e glicose (já que a quantidade de asparagina é praticamente igual em todos os tipos de batatas), a *rostie* pode ficar saborosa e com no máximo 400  $\mu\text{g} / \text{kg}$  de acrilamida. Isso representaria uma média calculada teórica de 340  $\mu\text{g} / \text{kg}$ , o que é menos da metade do que foi realmente encontrado. Em conclusão, este estudo mostrou que é possível reduzir a exposição à acrilamida

consumida através da batata *rostie* com medidas simples, como utilizar as batatas com baixas quantidades de açúcares redutores e com um processo de fritura que não deve gerar calor excessivo (PFEFFERLE et al, 2016).

Mais um estudo, dessa vez realizado no México, procurou avaliar os teores de acrilamida encontrados no milho e seus sub produtos. Isso porque o milho é um dos cereais mais cultivados do mundo, e além disso, seus produtos, feitos de flocos de milho como *chips* de *tortilla* são largamente consumidos. Sendo a presença de acrilamida formada durante a fritura de produtos de tortilha uma grande preocupação devido aos seus possíveis efeitos adversos à saúde. Sabendo-se que o milho pigmentado contém muitos metabólitos secundários, tais como substâncias fenólicas que podem ter uma influência sobre o teor de acrilamida, o objetivo do estudo foi avaliar a formação de acrilamida em tortilhas preparadas a partir de fibras brancas (comerciais) e pigmentadas (preto, vermelho, roxo e amarelo). Os níveis mais baixos de acrilamida foram encontrados em tortilhas preparadas a partir de milho vermelho e preto em comparação com o roxo, amarelo e o comercial. O estudo também revelou que um maior nível de antocianinas em grãos de milho pigmentados poderia reduzir a formação de acrilamida em tortilhas durante a fritura. Além disso, o nível de acrilamida gerado foi correlacionado positivamente com o teor de gordura e substâncias fenólicas em flocos de milho. Estes resultados sugerem que a seleção de genótipos de milho ricos em antocianinas, bem como níveis mais baixos de substâncias gordurosas e fenólicas poderiam reduzir a formação de acrilamida em *chips* de tortilha e outros alimentos à base de milho. Isto é de extrema importância, porque fornece ao fabricante de alimentos informações sobre qual genótipo pigmentado de milho é mais susceptível de obter um produto com baixo teor de acrilamida em condições semelhantes de processamento (SALAZAR et al, 2016).

Uma pesquisa recente, realizada no Chile, teve como objetivo desenvolver um pão tipo *hallulla* com adição de asparaginase para redução dos níveis de acrilamida, preservando as suas características sensoriais originais. Sabendo-se que a quantidade de acrilamida presente no pão estudado era de 108 µg / kg, foram avaliadas uma gama de concentrações de 20-300 µg da enzima asparaginase / kg de farinha. As concentrações ótimas de enzimas por kg de farinha foram 100 e 150 µg / kg, reduzindo em 80% e 99% respectivamente o teor de acrilamida no pão. Após a realização de um teste sensorial para verificar a qualidade sensorial dos pães com

adição de enzima asparaginase, os resultados demonstraram que a qualidade sensorial foi classificada como grau 1, sem diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre o pão controle e o pão feito com asparaginase, pelos atributos cor, aparência / forma, aroma, sabor e textura. Portanto, fabricar o pão com a adição da enzima asparaginase provou ser uma medida adequada para reduzir a acrilamida no produto final, obtendo-se uma redução quase completa deste contaminante e mantendo as características sensoriais originais (DÍAZ, 2015).

Outro estudo, desta vez realizado na Colômbia, avaliou a presença de acrilamida em rapadura através do uso de cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa. O teor médio encontrado foi de  $2,0 \text{ mgkg}^{-1}$ . E a conclusão obtida é de que o aumento do tempo e da temperatura de cocção (reação de Maillard) aumentam o teor de acrilamida no produto final (LASSO et al, 2014).

De modo geral, os resultados destas avaliações demonstraram que alimentos ricos em carboidratos submetidos a altas temperaturas apresentavam altos níveis de acrilamida. Alimentos que não eram fritos ou assados durante seu processamento ou preparação e alimentos ricos em proteínas apresentavam baixos e moderados níveis do contaminante, enquanto que em alimentos crus ou cozidos em água, a sua presença não foi detectada. Produtos à base de batata, como batatas fritas e batatas chips, torradas, biscoitos, cereais matinais e café apresentaram os maiores teores de acrilamida (ARISSETO; TOLEDO, 2006).

A Comissão do Codex Alimentarius (CAC, 2009) adotou um código de práticas para a redução de acrilamida em alimentos, tendo por finalidade disponibilizar aos produtores, às autoridades responsáveis pelo gerenciamento do risco e a outros órgãos competentes, orientações para prevenir e reduzir a formação de acrilamida em produtos à base de cereais e batatas. Além disso, a indústria também tem tomado medidas voluntárias para compreender o mecanismo de formação de acrilamida e sugerir possíveis estratégias de mitigação em alimentos (CIAA, 2009).

Estima-se que a ingestão diária de acrilamida esteja entre a faixa de  $0,3 - 2,0 \text{ } \mu\text{gkg}^{-1} \text{ PC/dia}$  para a população em geral (WHO, 2005).

Pérez em 2015 apresentou uma compilação com os dados encontrados até o momento sobre a exposição a acrilamida pela população adulta em diversos países europeus (Tabela 1). A maioria dos países estudados apresentam uma média de exposição que varia entre  $0,40 - 0,50 \text{ } \mu\text{gkg}^{-1} \text{ PC/dia}$ . Sendo a Polônia o país que

apresentou maior exposição  $0,67 \mu\text{gkg}^{-1}$  PC/dia e a Dinamarca apresentou a menor exposição  $0,21 \mu\text{gkg}^{-1}$  PC/dia.

**Tabela 1 - Exposição alimentar à acrilamida pela população adulta europeia (PÉRIZ, 2015).**

<b>País da estimativa</b>	<b>Nível de acrilamida em <math>\mu\text{g} / \text{kg}</math> PC / dia</b>	<b>Ano</b>	<b>Título</b>	<b>Fonte</b>
Dinamarca	0,21	2013	Current issues in dietary acrylamide: formation, mitigation and risk assessment	Pedreschi et al., 2014
Bélgica	0,37	2013	Current issues in dietary acrylamide: formation, mitigation and risk assessment	Pedreschi et al., 2014
Países Baixos	0,40	2008	Acrylamide intake through diet and human cancer risk.	Mucci et al., 2008
Finlândia (homens 25-44 anos)	0,41	2013	Current issues in dietary acrylamide: formation, mitigation and risk assessment	Pedreschi et al., 2014
França	0,43	2012	Dietary acrylamide exposure of the French population: Results of the second French Total Diet Study	Sirot et al., 2012
Suécia	0,45	2008	Acrylamide intake through diet and human cancer risk. Journal of Agricultural and Food Chemistry	Mucci et al., 2008
Holanda	0,48	2014	Dietary Acrylamide and Human Cancer: A Systematic Review of Literature	Virk-Baker et al., 2014
Noruega	0,48	2013	Current issues in dietary acrylamide: formation, mitigation and risk assessment	Pedreschi et al., 2014
França (>15 anos)	0,50	2008	Acrylamide intake through diet and human cancer risk.	Mucci et al., 2008
Suécia	0,56	2009	Acrylamide exposure measured by food frequency questionnaire and hemoglobin adduct levels and prostate cancer risk in the Cancer of the Prostate in Sweden Study	Wilson et al., 2009a
Irlanda	0,59	2013	Current issues in dietary acrylamide: formation, mitigation and risk assessment	Pedreschi et al., 2014
Reino Unido	0,61	2013	Current issues in dietary acrylamide: formation, mitigation and risk assessment	Pedreschi et al., 2014
Polónia	0,67	2012	Dietary acrylamide exposure in chosen population of South Poland	Zajac et al., 2013

No mesmo estudo realizado por Périz (2015) também foi apresentado a estimativa de exposição a acrilamida por crianças e adolescentes (Tabelas 2 e 3).

**Tabela 2 - Exposição alimentar à acrilamida pela população infantil com até 6 anos (PÉRIZ, 2015).**

<b>País da estimativa</b>	<b>Nível de acrilamida em µg / kg PC / dia</b>	<b>Ano</b>	<b>Título</b>	<b>Fonte</b>
Finlândia (crianças de 3 anos)	1,01	2013	Current issues in dietary acrylamide: formation, mitigation and risk assessment	Pedreschi et al., 2014
Holanda (1-6 anos)	1,04	2014	Dietary Acrylamide and Human Cancer: A Systematic Review of Literature	Virk-Baker et al., 2014
EEUU (2-5 anos)	1,26	2008	Acrylamide intake through diet and human cancer risk.	Mucci et al., 2008
Turquia	1,43	2012	Acrylamide exposure among Turkish toddlers from selected cereal-based baby food samples	Cengiz et al., 2013
Alemanha (4-6 anos)	1,20	2008	Acrylamide intake through diet and human cancer risk.	Mucci et al., 2008
Países Baixos (4-6 anos)	1,00	2008	Acrylamide intake through diet and human cancer risk.	Mucci et al., 2008

Quando observamos a população infantil com até 6 anos verificamos uma alta exposição à acrilamida em relação a população adulta. Possivelmente devido ao seu menor peso corporal e a elevada contribuição dos cereais infantis na alimentação dos menores de 3 anos e o elevado consumo de produtos a base de batata até os 6 anos.

E quando observamos a exposição a acrilamida por crianças e adolescentes (Tabela 3) também verificamos uma média de exposição maior do que na população adulta.

Tabela 3 - Exposição alimentar à acrilamida pela população infantil e adolescente europeia (PÉRIZ, 2015).

País da estimativa	Nível de acrilamida em $\mu\text{g} / \text{kg PC} / \text{dia}$	Ano	Título	Fonte
Alemanha (7-19 anos)	0,30	2004	Toxicity of acrylamide and evaluation of its exposure in baby foods	Erkekoğlu et al., 2010
Alemanha (1-7 anos)	0,43	2004	Toxicity of acrylamide and evaluation of its exposure in baby foods	Erkekoğlu et al., 2010
Dinamarca (4-14 anos)	0,39	2013	Current issues in dietary acrylamide: formation, mitigation and risk assessment	Pedreschi et al., 2014
Espanha (11-14 anos)	0,53	2012	Assessment of acrylamide intake of Spanish boys aged 11– 14 years consuming a traditional and balanced diet	Delgado-Andrade et al., 2012
França	0,69	2012	Dietary acrylamide exposure of the French population: Results of the second French Total Diet Study	Sirot et al., 2012
Polônia (mulheres: 16-18 anos)	1,04	2010	Estimation of dietary exposure to acrylamide of Polish teenagers from an urban environment	Wyka et al., 2014
Polônia (homens: 16-18 anos)	1,18	2010	Estimation of dietary exposure to acrylamide of Polish teenagers from an urban environment	Wyka et al., 2014
Polônia (6-12 anos)	1,51	2012	). Dietary acrylamide exposure in chosen population of South Poland	Zajac et al., 2013

No Brasil, um estudo realizado com base nos dados de consumo alimentar fornecidos pela Pesquisa de Orçamentos Familiares do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística estima que a ingestão alimentar de acrilamida esteja na média de  $0,14 \mu\text{gkg}^{-1} \text{PC}/\text{dia}$ . E os alimentos descritos como os que mais contribuíram para

esta exposição foram a batata frita, o café, a farinha de mandioca, o biscoito salgado e o pão francês (ARISSETO; TOLEDO, 2008).

O conteúdo de acrilamida nos produtos disponíveis no mercado brasileiro são compatíveis com em relatos de outros países (ARISSETO et al, 2007). A estimativa de ingestão de acrilamida por crianças, adolescentes e homens jovens foi consideravelmente maior do que para adultos em geral, em diversos estudos. Isso porque, as crianças apresentam um menor peso corporal médio quando comparados aos adultos, além de uma provável maior ingestão de alimentos ricos em acrilamida, como batata frita, por exemplo (DYBING et al, 2005).

#### 1.4 LEGISLAÇÃO BRASILEIRA E INTERNACIONAL PARA ACRILAMIDA

A Organização Mundial de Saúde (OMS) estabeleceu um valor de ingestão diária de acrilamida tolerável de  $12 \mu\text{gkg}^{-1}$  de PC / dia. E fixou um NOAEL (nível de não observação de efeitos adversos) para neuropatia em  $0,5 \text{ mgkg}^{-1}$  PC / dia e um NOAEL para mudanças na fertilidade quatro vezes maior:  $2 \text{ mgkg}^{-1}$  (JÁUREGUI, 2016).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) não estabelece ainda um limite de restrição para acrilamida em alimentos, entretanto, a Portaria nº 2914 de 12/12/2011 do MS (Ministerio da Saúde publicado em DOU de 14/12/2011) estabelece o limite de acrilamida em  $0,5 \mu\text{gkg}^{-1}$  para água de consumo humano e a diretiva da Comunidade Europeia 2002/72/CE da Comissão de 06/08/2002 estabelece o LME (limite de migração específica) = ND (não detectado) para alimentos e o Limite de detecção (confiabilidade) do método analítico de  $10 \mu\text{gkg}^{-1}$  (COMISSÃO EUROPEIA, 2002).

#### 1.5 MÉTODOS PARA AVALIAÇÃO DO CONSUMO DE ACRILAMIDA

O método de escolha para determinar o consumo de acrilamida e avaliar a associação com riscos encontrados em estudos epidemiológicos é de fundamental importância para garantir a confiabilidade dos dados gerados (VINHAS, 2011).

Os inquéritos alimentares frequentemente utilizados em estudos para avaliar a exposição a acrilamida são: diários alimentares, questionários de frequência alimentar, recordatórios de 24 horas, registros alimentares com pesagem de alimentos e autorrelato de consumo (KONINGS, 2010).

Questionários de frequência alimentar associados a bases de dados contendo o teor de acrilamida dos alimentos têm sido muito utilizados em pesquisas, porém, segundo Olesen et al (2008), esta metodologia pode limitar a confiabilidade dos dados coletados. A utilização de biomarcadores, como a acrilamida-hemoglobina e a glicidamida-hemoglobina também são utilizados associados os questionários de frequência alimentar (OLESEN et al, 2008), porém a direta relação da dieta avaliada por estes questionários e a concentração de adutos, é limitada pelo baixo número de participantes nos estudos (BJELLAAS et al, 2005; SUMNER, 1999).

Com o intuito de aumentar a precisão dos dados coletados nas pesquisas, Wilson et al (2009) validaram um questionário de frequência alimentar para estimar a ingestão dietética estabelecendo correlação com os adutos.

O método de avaliação de consumo deve ser pautado no princípio da qualidade, pois é determinante para a avaliação de desfechos, ou seja, se o inquérito não for fidedigno, a avaliação da exposição a acrilamida fica comprometida (VINHAS, 2011).

## 1.6 METODOLOGIAS ANALÍTICAS PARA A DETERMINAÇÃO DE ACRILAMIDA EM ALIMENTOS

Inúmeros métodos para a determinação de acrilamida em alimentos já foram publicados (ARISSETO; TOLEDO, 2006), demonstrando os avanços em relação ao desenvolvimento de metodologias analíticas.

Dependendo da natureza da matriz, a acrilamida pode ser extraída do alimento na presença de água e/ou de solventes orgânicos, porém a extração em meio aquoso geralmente é suficiente (ROSÉN; HELLENÅS, 2002; TATEO; BONONI, 2003). A FDA (Agência Americana de Alimentos e Medicamentos), relata que o aquecimento durante a extração da acrilamida deve ser evitado, já que este procedimento poderia

gerar uma grande quantidade de partículas finas, que poderiam saturar as colunas de extração em fase sólida utilizadas nas etapas posteriores de limpeza (FDA, 2003). Quando as amostras são ricas em gordura, a extração com solventes orgânicos é mais efetiva, sendo a mistura de água e acetona bem recomendada por diversos estudos (FAUHL et al., 2002; TAKATSUKI et al., 2003). Outra alternativa é a inclusão de uma etapa de desengorduramento antes ou em combinação com a etapa de extração (WENZL et al., 2003; ZHANG et al., 2005).

Inúmeros métodos para identificação e quantificação de acrilamida em alimentos são propostos em estudos pelo mundo, porém no Brasil, estudos propõem um método utilizando cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrômetro de massa (ARISSETO; TOLEDO, 2008).

A cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massa em série é utilizada com a finalidade de se evitar uma longa preparação da amostra e obter métodos mais rápidos destinados ao maior número de matrizes diferentes (ARISSETO; TOLEDO, 2006).

Apesar de alguns pesquisadores desencorajarem o uso de cromatografia líquida com detecção por Ultravioleta (UV), alegando que a acrilamida não possui um forte espectro no UV (CASTLE; ERIKSSON, 2005), estudo de PALEOLOGOS e KONTOMINAS realizado em 2005, para detecção de acrilamida em alimentos por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por UV, mostrou aplicabilidade e resultados similares aos encontrados na literatura. Sendo esta técnica considerada simples, rápida e barata para possíveis análises de rotina de acrilamida em alimentos (ARISSETO; TOLEDO, 2006).

O comprimento de onda ideal para análise da acrilamida por UV é 226 nm. Também apresentando resultados de qualidade em 200 nm. O que determina qual o comprimento de onda será escolhido é a complexidade da matriz a ser analisada (GOKMEN et al, 2005).

## 1.7 VALIDAÇÃO DE MÉTODO

Segundo as Orientações Sobre Validação de Métodos Analíticos, os laboratórios devem dispor de meios e critérios objetivos para demonstrar, por meio de

validação, que os métodos de ensaio que executam conduzem a resultados confiáveis e adequados à qualidade pretendida. A validação consiste na comprovação, através do fornecimento de evidência objetiva, de que os requisitos para uma aplicação ou uso específico foram atendidos (INMETRO, 2016).

#### 1.7.1 Linearidade

O estudo da linearidade tem por objetivo determinar a habilidade de um método analítico em produzir resultados diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de uma faixa de concentração especificada (CODEX, 2007).

Para avaliação da linearidade é necessário se obter uma relação entre a concentração do analito e as respostas obtidas que no caso da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), corresponde à área de pico cromatográfico, e verificar se a relação entre eles obedece a um modelo linear. A relação é obtida através da confecção de uma curva analítica construída pelo uso de concentrações equidistantes de analito e da verificação de suas respostas (INMETRO, 2016).

#### 1.7.2 Homocedasticidade

É estudo que verifica a homogeneidade da variância dos resíduos. O uso do método estatístico dos mínimos quadrados ordinários supõe que cada ponto da curva analítica tenha uma variação absoluta constante (SOUZA, 2007).

#### 1.7.3 Exatidão

A exatidão de um método analítico é a concordância dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor de referência (ISO STANDARD 3534-2, 2006). Esse parâmetro pode ser expresso como percentual de recuperação, durante a determinação de uma concentração conhecida de substância em exame num meio de composição definida.

Os processos normalmente utilizados para avaliar a exatidão de um método são: uso de materiais de referência, participação em comparações interlaboratoriais e realização de ensaios de recuperação (INMETRO, 2016).

#### 1.7.4 Recuperação

A recuperação de um analito é a relação entre o resultado experimental obtido depois da análise de uma amostra fortificada com uma quantidade conhecida do analito, e o valor teórico desta quantidade fortificada. O analito pode ser adicionado nas amostras em pelo menos três concentrações diferentes: próximo ao limite de quantificação, próxima a concentração esperada (limite estabelecido por regulamentação) e em uma concentração máxima da faixa de uso do método.

O teste de recuperação é utilizado principalmente em métodos que dependem de transferência / extração do analito a partir de uma matriz complexa, pois a possível perda de analito precisa ser observada (IUPAC, 1998).

#### 1.7.5 Precisão

É a característica que mede o grau de proximidade entre os resultados individuais de um teste quando se aplica o método analítico a múltiplas preparações de uma amostra homogênea. A precisão pode ser medida através do grau de repetibilidade, precisão intermediária e/ou reprodutibilidade do método analítico sob condições normais de operação. Usualmente ela é expressa pelo desvio padrão entre os resultados obtidos (INMETRO, 2016).

##### 1.7.5.1 Repetibilidade

É a concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo mensurando, sob as mesmas condições de medição: mesmo procedimento de

medição, mesmo analista, mesmo instrumento usado sob mesmas condições, mesmo local e repetições realizadas em um curto espaço de tempo. A repetibilidade é verificada, por no mínimo, 7 repetições genuínas (INMETRO, 2016).

#### *1.7.5.2 Precisão Intermediária*

A precisão intermediária refere-se a concordância entre os resultados de uma mesma amostra, em um mesmo laboratório, com o mesmo método, mas obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes.

Este teste é considerado o mais representativo da variabilidade dos resultados em um laboratório, portanto, é a mais aconselhável de usar (INMETRO, 2016).

#### *1.7.5.3 Reprodutibilidade*

Refere-se aos resultados de estudos colaborativos entre laboratórios, verificando o desempenho de seus métodos aos dados de validação obtidos por comparação interlaboratorial (INMETRO, 2016).

#### **1.7.6 Limite de Detecção (LOD)**

O LOD é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas.

No caso de métodos como a CLAE, a estimativa do limite de detecção pode ser feita com base na relação de 3 vezes o ruído da linha de base (INMETRO, 2016).

#### **1.7.7 Limite de Quantificação (LOQ)**

LOQ é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas.



## 2 RELEVÂNCIA

Ainda são poucos os estudos sobre a exposição a acrilamida no Brasil, não existindo nenhum estudo específico desta exposição por crianças.

No Brasil, apenas uma pesquisa relevante, realizada por Adriana Pavesi Ariseto em 2008, estimou a exposição a acrilamida pela população brasileira. Porém, como a própria pesquisadora informa em seu estudo, este foi um trabalho preliminar, onde várias hipóteses foram assumidas para que a pesquisa fosse adiante. Este estudo foi realizado com base na Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF) conduzida pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) entre 2002 e 2003. A POF quantifica o total de alimentos adquiridos por domicílio e dividido pelo número de moradores da residência, estima-se o per capita de alimentos por morador.

Porém, o consumo efetivo de cada habitante não é determinado pela POF, que não leva em conta a alimentação fora do lar, a compra de um alimento que estraga e não é consumido, a compra de um alimento destinado a apenas algum membro da família, entre outras variáveis. Segundo ARISSETO (2008), A POF não era a fonte de dados mais apropriada para estudos de ingestão alimentar, pois não reflete o consumo efetivo de alimentos, porém era a única fonte existente que pode ser utilizada para a avaliação da exposição a este contaminante.

Além disso, o estudo realizado por Ariseto em 2008, usou a hipótese de que toda a batata comprada seria frita, toda mandioca também seria frita, todo o fubá ia ser consumido como polenta frita, já que a fritura favorece a formação da acrilamida. E em sua discussão o estudo informa que devido a falta de informação sobre o modo de preparo dos alimentos no domicílio, os resultados podem ter sido superestimados, pois a fonte de dados utilizada para a pesquisa (POF) não é a mais apropriada, tendo em vista que não reflete o consumo efetivo de alimentos. Em adição, o método analítico utilizado nesta pesquisa, para avaliação do efeito matriz no procedimento de validação intralaboratorial, não utilizou a matriz do alimento e sim água como matriz branca. Este procedimento pode acarretar resultados não confiáveis.

Portanto, embora os dados desse estudo estejam associados a diversas fontes de incerteza, eles podem ser considerados uma primeira avaliação que deve ser refinada no futuro (ARISSETO, 2008).

A avaliação do risco a exposição alimentar à acrilamida necessita do desenvolvimento/aprimoramento de métodos de qualidade para a avaliação da exposição dietética e base de dados, com vista a fidedignidade nos resultados (VINHAS, 2011).

Cabe destacar que o conteúdo de acrilamida pode sofrer uma grande variação nos mesmos alimentos encontrados em diferentes regiões do mundo (PÉRIZ, 2016).

Com isto justifica-se a necessidade de novas pesquisas, que reflitam o consumo efetivo de acrilamida pela população.

Considerando que grande parte dos “alimentos-fonte” de acrilamida são consumidos largamente pela população infantil (batata frita, snacks, macarrão instantâneo, salgadinhos, etc) e que não existe nenhum estudo no Brasil voltado para monitorar a ingestão de acrilamida por esta população, este projeto pretende gerar dados que possam servir de base para estimar a efetiva exposição das crianças a este contaminante.

O controle dos níveis de acrilamida nos alimentos, é um dos grandes desafios da Saúde Pública, e é de fundamental importância devido aos riscos toxicológicos associados ao consumo dessa substância. Deste modo, o presente projeto busca contribuir com a Vigilância Sanitária através de dados e promovendo, assim, mecanismos para o monitoramento da presença e dos níveis deste contaminante em alimentos, a fim de prevenir agravos à saúde da população, especialmente a população infantil.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Determinar o consumo efetivo de acrilamida pela população pré-escolar e escolar do município do Rio de Janeiro, quantificando seus níveis nos alimentos consumidos por esta população, utilizando método analítico validado.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar pesquisa bibliográfica em relação à toxicidade e regulamentação da presença de acrilamida em alimentos;
- Realizar estudo de campo com a aplicação de um questionário de pesquisa de frequência alimentar para verificar os “alimentos-fonte” de acrilamida mais consumidos por escolares e pré-escolares no município do Rio de Janeiro;
- Validar método analítico para determinar os teores de acrilamida por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE);
- Determinar o teor de acrilamida presente nos alimentos pesquisados como mais consumidos por escolares e pré-escolares no município do Rio de Janeiro;
- Confrontar as informações da ingestão e os dados antropométricos provenientes do questionário aplicado. Contribuir com estimativas dos níveis de exposição a acrilamida por escolares e pré-escolares no município do Rio de Janeiro;
- Gerar dados para propiciar uma avaliação mais realista da exposição a acrilamida no Brasil, contribuindo para que os riscos potenciais à saúde das crianças possam ser avaliados.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 EQUIPAMENTOS E ACESSÓRIOS

- Balança analítica Sartorius modelo R200D com resolução de 0,01 mg;
- Sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), com modo de operação em gradiente, detector UV/vis WATERS – 2487 (variável e com duplo comprimento de onda), injetor automático WATERS 717 PLUS AUTOSAMPLER e computador para aquisição e processamento dos dados;
- Coluna de fase reversa (25 cm de comprimento e 4 mm de diâmetro) SYMETRY® C<sub>18</sub> – WATERS;
- Coluna de guarda C<sub>18</sub> – WATERS;
- Cartucho OASIS® HLB - recheio de equilíbrio hidrofílico-lipofílico; recheio de fase reversa;
- Cartucho Millex® 0,45 µm – MILLIPORE;
- Membrana filtrante 0,45 µm – WATERS;
- Multiprocessador Walita;
- Banho ultrassônico – BRANSON;
- Bomba de pressão a vácuo – MILLIPORE;
- Bloco de evaporação – PIERCE.
- Centrífuga – Himac CF 7D2;
- Agitador Marconi MA 162

### 4.2 VIDRARIA

- Balões volumétricos de 10, 25, 50, 100 e 1000 mL;
- Pipetas volumétricas de 1, 2, 3, 5, 10, 15, 20, 50 e 100 mL;
- Micropipetas de 100, 250 e 500 µL;
- Seringa hipodérmica;
- Tubo de vidro graduado de 15 mL;
- Reservatório para fase móvel;

- Proveta de 1000 mL;
- Becher de 50 mL;
- Naveta de vidro borossilicato;
- Frasco de vidro borossilicato com capacidade para 100 mL.

#### 4.3 REAGENTES

- Acrilamida P.A – padrão – Bio-Rad Laboratories – 99,9 % pureza;
- Metanol grau cromatográfico – VETEC;
- Acetato de amônio P.A. – MERCK;
- Acetonitrila P.A – MERCK – UN1648;
- Água desionizada tipo Milli – Q®;
- Hexacianoferrato de potássio P.A;
- Sulfato de zinco P.A – Vetec – Cód 283.
- Solução de Carrez I (15 g de hexacianoferrato de potássio em 100 mL de água)
- Solução de Carrez II (30 g de sulfato de zinco em 100 mL de água)

#### 4.4 CONFECÇÃO DO QUESTIONÁRIO

O questionário (Apêndice A) foi elaborado tendo como base os trabalhos de Wilson e colaboradores (2009), Mucci e colaboradores (2003) e Konings e colaboradores (2003), com o objetivo de identificar qual a quantidade dos “alimentos-fonte” de acrilamida mais consumidos por crianças pré-escolares e escolares (3 a 14 anos), estudantes da rede privada de ensino no município do Rio de Janeiro, RJ.

Os alimentos avaliados pelo questionário foram pão francês e batata frita. Sendo cinco tipos distintos de batata frita:

- Batata frita caseira – batata *in natura* frita em casa;
- Batata frita congelada – batata vendida pré frita, congelada e frita em casa;
- Batata frita de lanchonetes *fast food*;
- Batata frita tipo palha;
- Batata frita tipo *chips*.

No questionário também foram solicitados dados da criança como idade, data de nascimento, sexo, altura e peso.

O questionário foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEP) Fiocruz / IOC Instituto Oswaldo Cruz da Fundação Oswaldo Cruz junto com um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido destinado aos pais (Apêndice B), um Termo de assentimento ao menor (Apêndice C) e um Termo de Consentimento da Escola (Apêndice D).

#### 4.5 AVALIAÇÃO DE CONSUMO

Para determinação do tamanho da amostra, foi utilizado a ferramenta de amostragem por atributo da ISO 2859-1, com um nível de inspeção geral All no plano de amostragem simples que indicou que de um total de 59 escolas particulares na Tijuca, seria necessário realizar a pesquisa em pelo menos 8 escolas.

Desta maneira, foram sorteadas aleatoriamente 9 escolas da Tijuca, que através de contato telefônico com a coordenação e direção receberam o convite para participar da pesquisa. A participação da escola consistia em enviar para a casa das crianças, entre 3 e 14 anos, o questionário, o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e o Termo de assentimento ao menor para que fosse preenchido pelo responsável e devolvido a escola.

O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido foi enviado com informações sobre os objetivos e as finalidades da pesquisa. Junto, havia um termo de autorização para ser assinado pelo responsável legal da criança.

A aplicação do questionário foi realizada nos meses de Março e Abril de 2016, nas 9 escolas participantes, em crianças de ambos os sexos, com idade entre 3 e 14 anos.

Após a devolução, os questionários foram recolhidos para análise dos resultados obtidos.

Cada escola recebeu o número de questionários referentes à quantidade de crianças com idade entre 3 e 14 anos matriculadas na instituição (tabela 4), perfazendo um total de 2142 questionários distribuídos.

**Tabela 4 - Questionários enviados para cada escola**

<b>Escola</b>	<b>Questionários enviados</b>
Tiju A	90
Tiju B	290
Tiju C	190
Tiju D	65
Tiju E	290
Tiju F	160
Tiju G	307
Tiju H	500
Tiju I	250
<b>TOTAL</b>	<b>2142</b>

Os critérios utilizados para a inclusão na pesquisa foram: crianças estudantes de escolas particulares do bairro da Tijuca, crianças com idade entre 3 e 14 anos, questionários preenchidos corretamente e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido assinado pelo responsável legal da criança, autorizando a participação na pesquisa.

Os critérios de exclusão da pesquisa foram: crianças que não estudam em escolas particulares situadas no bairro da Tijuca, crianças que não tenham entre 3 e 14 anos, questionários preenchidos incorretamente e ausência da assinatura do responsável legal da criança autorizando a participação na pesquisa.

Com os resultados ordenados, foi possível identificar a quantidade dos “alimentos-fonte” de acrilamida que são mais consumidos pela população-alvo.

#### 4.6 AMOSTRAS

As amostras foram adquiridas, em comércio no bairro da Tijuca no Rio de Janeiro, tendo como base o resultado obtido na avaliação de consumo, concluído pelo questionário. Basicamente as amostras eram constituídas por pães franceses fabricados em padarias do bairro e três tipos de batatas fritas: batata palha, batata chips e batata frita de redes de *fast food* da região.

As amostras de pães franceses foram adquiridas em três padarias diferentes, para realização dos testes em triplicata verdadeira. Procurou-se escolher três padarias com preços distintos para os pães. Uma padaria “*gourmet*”, com pão vendido por um preço mais alto, uma padaria mais simples, onde o pão apresentou o menor preço encontrado no bairro e uma padaria onde o pão foi encontrado pelo preço médio praticado na região.

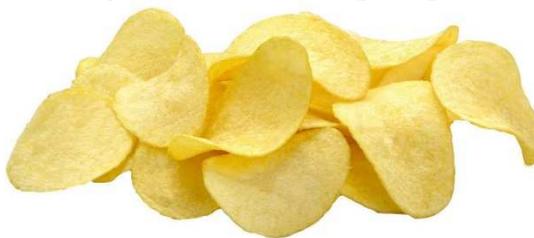
Para cada tipo de batata foram adquiridas três amostras de três marcas diferentes em mercados e/ou lanchonetes da Tijuca (tabela 5). Foram selecionadas três marcas de batata frita tipo chips (Figura 2), três marcas de batata frita tipo palha (Figura 3) e três marcas de batata frita de lanchonetes *fast food* (Figura 4).

Os três tipos diferentes de cada batata frita foram escolhidos de acordo com o seguinte critério: marca mais popular, marca mais barata e marca intermediária.

**Tabela 5 - Amostras de batata frita**

<b>Batata frita</b>	<b>Marca</b>
<i>Chips</i>	A
	B
	C
Palha	D
	E
	F
Lanchonetes <i>fast food</i>	G
	H
	I

**Figura 3 - Batata frita tipo *Chips***



**Figura 4 - Batata frita tipo palha**



**Figura 5 - Batata frita de *fast food***



## 4.7 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

### 4.7.1 Análise das amostras

#### 4.7.1.1 Pão francês

Triturou-se, em um multiprocessador, a casca de 5 pães franceses frescos. Pesou-se aproximadamente 8 g da amostra. Homogeneizou-se em 20 mL de metanol por 3 minutos. Em seguida a solução foi centrifugada por 10 minutos, a 10.000 RPM, a 10 °C. Para clarificação do sobrenadante foi transferido e tratado com as soluções de Carrez I e II e novamente centrifugado por 5 minutos, a 10.000 RPM, a 10 °C. Retirou-se 10,0 mL do sobrenadante límpido e este foi evaporado até a secura em corrente suave de nitrogênio. Em seguida adicionou-se 1 mL de fase móvel: água/acetonitrila (95:5, v/v) e agitou-se em um agitador por 2 minutos. Passou-se essa solução por um cartucho OASIS HLB (acondicionado previamente com 1 mL de metanol + 1 mL de água a uma vazão de 2 gotas por segundo), com uma vazão de 1 gota por segundo, desprezando-se as 7 gotas iniciais. Uma alíquota de 150 µL da solução final foi injetada no cromatógrafo. Esse procedimento foi realizado em triplicata verdadeira.

As soluções foram analisadas nas seguintes condições cromatográficas:

- fase móvel: água/acetonitrila (95:5, v/v);
- fluxo: 1,0 mL/min;
- comprimento de onda: 200 e 226 nm;
- "loop": 500 µL;
- volume de injeção: 150 µL.

Figura 6 - Fluxograma para a análise da amostra pão francês.



#### 4.7.1.2 Batata frita tipo chips

Foram triturados em um multiprocessador 50 g de batata frita. Pesou-se aproximadamente 4 g da amostra, homogeneizou-se em 20 mL de metanol por 3 minutos. Em seguida a solução foi centrifugada por 10 minutos, a 10.000 RPM, a 10 °C. Para clarificação do sobrenadante foi transferido e tratado com 100 µl de cada uma das soluções de Carrez I e II e novamente centrifugado por 5 minutos, a 10.000 RPM, a 10 °C. Em seguida foi retirado 5,0 mL do sobrenadante límpido e este foi evaporado até a secura em corrente suave de nitrogênio. Em seguida adicionou-se 5,0 mL de fase móvel: água/acetonitrila (95:5, v/v) e agitou-se em um misturador por 3 minutos. Essa solução foi passada por um cartucho OASIS HLB (previamente acondicionado com 1 mL de metanol + 1 mL de água a uma vazão de 2 gotas por segundo), com uma vazão de 1 gota por segundo, desprezando-se as 7 gotas iniciais.

A amostra C sofreu uma diluição de 2 vezes nesta etapa final. Esta diluição foi necessária para que o teor de acrilamida encontrado nessa amostra ficasse dentro da curva de trabalho.

Uma alíquota de 150  $\mu\text{L}$  da solução final foi injetada no cromatógrafo. Esse procedimento foi realizado em triplicata verdadeira.

Este procedimento foi realizado com as batatas das marcas A, B e C.

As soluções foram analisadas nas seguintes condições cromatográficas:

- fase móvel: água/acetonitrila (95:5, v/v);
- fluxo: 1,0 mL/min;
- comprimento de onda: 200 e 226 nm;
- "loop": 500  $\mu\text{L}$ ;
- volume de injeção: 150  $\mu\text{L}$ .

**Figura 7 - Fluxograma para a análise da amostra batata frita tipo *chips*.**



#### 4.7.1.3 Batata frita tipo palha

Foram triturados em um multiprocessador 50 g de batata frita tipo palha. Pesou-se aproximadamente 4 g da amostra, homogeneizou-se em 20 mL de metanol por 3 minutos. Em seguida a solução foi centrifugada por 10 minutos, a 10.000 RPM, a 10°C.

Para clarificação do sobrenadante foi transferido e tratado com 100  $\mu\text{l}$  de cada uma das soluções de Carrez I e II e novamente centrifugado por 5 minutos, a 10.000 RPM, a 10°C. Em seguida foi retirado 5,0 mL do sobrenadante límpido e este foi

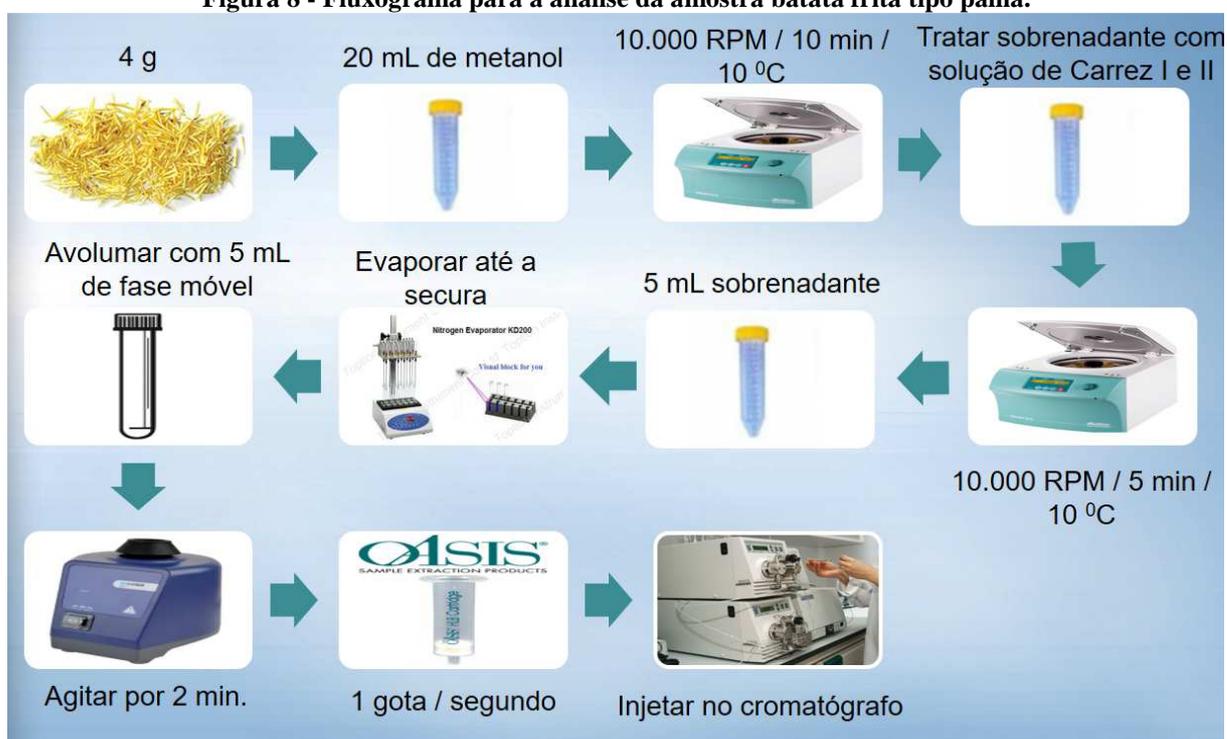
evaporado até a secura em corrente suave de nitrogênio. Em seguida adicionou-se 5,0 mL de fase móvel: água/acetonitrila (95:5, v/v) e agitou-se em um misturador por 3 minutos. Essa solução foi passada por um cartucho OASIS HLB (acondicionado com 1 mL de metanol + 1 mL de água a uma vazão de 2 gotas por segundo), com uma vazão de 1 gota por segundo, desprezando-se as 7 gotas iniciais. Uma alíquota de 150  $\mu$ L da solução final foi injetada no cromatógrafo. Esse procedimento foi realizado em triplicata verdadeira.

Este procedimento foi realizado com as batatas das marcas D, E e F.

As soluções foram analisadas nas seguintes condições cromatográficas:

- fase móvel: água/acetonitrila (95:5, v/v);
- fluxo: 1,0 mL/min;
- comprimento de onda: 200 e 226 nm;
- "loop": 500  $\mu$ L;
- volume de injeção: 150  $\mu$ L.

**Figura 8 - Fluxograma para a análise da amostra batata frita tipo palha.**



#### 4.7.1.4 Batata frita de lanchonete fast food

Foram masseradas em Graal & pistilo 50 g de batata frita. Pesou-se aproximadamente 4 g da amostra, homogeneizou-se em 20 mL de metanol por 3 minutos. Em seguida a solução foi centrifugada por 10 minutos, a 10.000 RPM, a 10°C.

Para clarificação do sobrenadante foi transferido e tratado com 100 µl de cada uma das soluções de Carrez I e II e novamente centrifugado por 5 minutos, a 10.000 RPM, a 10 °C. Em seguida foi retirado 5,0 mL do sobrenadante límpido e este foi evaporado até a secura em corrente suave de nitrogênio. Em seguida adicionou-se 5,0 mL fase móvel: água/acetonitrila (95:5, v/v) e agitou-se em um misturador por 3 minutos. Essa solução foi passada por um cartucho OASIS HLB (acondicionado com 1 mL de metanol + 1 mL de água a uma vazão de 2 gotas por segundo), com uma vazão de 1 gota por segundo, desprezando-se as 7 gotas iniciais.

As amostras G e I sofreram uma diluição nesta etapa final de 91 vezes e a amostra H uma diluição de 66 vezes aproximadamente. Esta diluição foi necessária para que o teor de acrilamida encontrado nessas amostras ficasse dentro da curva de trabalho.

Uma alíquota de 150 µL da solução final foi injetada no cromatógrafo. Esse procedimento foi realizado em triplicata verdadeira.

Este procedimento foi realizado com as batatas das marcas G, H e I.

As soluções foram analisadas nas seguintes condições cromatográficas:

- fase móvel: água/acetonitrila (95:5, v/v);
- fluxo: 1,0 mL/min;
- comprimento de onda: 200 e 226 nm;
- "loop": 500 µL;
- volume de injeção: 150 µL.

**Figura 9 - Fluxograma para a análise da amostra batata frita tipo *fast food*.**



Em todas as análises realizadas os padrões e as amostras foram solubilizados em fase móvel: água/acetonitrila (95:5, v/v) para que houvesse uma diminuição do ruído provocado pela linha de base no cromatograma.

#### 4.7.2 Desenvolvimento e Validação de Método Analítico

O método analítico para detecção e quantificação de acrilamida em “alimentos-fonte” foi validado intra laboratorialmente.

A validação do método, contou com análise da linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão, precisão e seletividade.

A técnica analítica utilizada foi CLAE com detecção por UV.

O procedimento para validação intralaboratorial foi basicamente o descrito pelo POP 65.3120.126 (INCQS, 2015).

### 4.7.3 Validação Intralaboratorial

#### 4.7.3.1 Faixa de Trabalho

A faixa de trabalho utilizada para a acrilamida foi determinada com base na concentração da alíquota final de análise (LM), considerando o procedimento de isolamento da acrilamida. Essa faixa de trabalho foi baseada no Regulamento nº 10 / 2011 da Comissão Europeia, que estabelece que a acrilamida deve se apresentar não detectável em um método com limite de detecção de até 0,01 µg/kg (10 ppb).

A faixa de trabalho também foi determinada, baseada em estudos preliminares que apresentam os teores de acrilamida por alimento.

Foi calculada a faixa de concentração mínima aplicável (FMA) pela fórmula:

$$FMA = LM \pm 0,44 \times LM$$

Onde:

FMA – faixa mínima aplicável;

LM – concentração da alíquota final de análise;

#### 4.7.3.2 Linearidade

Foram preparadas 3 soluções estoques de acrilamida, pesando-se em balança analítica calibrada 3 massas de aproximadamente 0,1 g do padrão de acrilamida. As massas foram transferidas quantitativamente para 3 balões volumétricos de 100 mL calibrados e foram avolumadas em solução água/acetoneitrila (95:5, v/v).

Foram preparadas soluções de 20 mgL<sup>-1</sup> (S<sub>1</sub>; S<sub>2</sub>; S<sub>3</sub>) a partir de cada solução estoque de acrilamida. Para isso, recolheu-se uma alíquota de 2 mL da solução estoque, que foi transferida quantitativamente para 3 balões volumétricos de 100 mL calibrados e foram avolumadas em solução água/acetoneitrila (95:5, v/v).

Uma série de 18 soluções de trabalho foi preparada medindo-se volumes apropriados, conforme apresentado na Figura 1 (com auxílio de micropipetas

calibradas e certificadas pelo laboratório de metrologia do INCQS) das soluções de 20 mgL<sup>-1</sup> e, avolumando em balão volumétrico calibrado de 100 mL com solução água/acetonitrila (95:5, v/v).

Figura 10 - Esquema de preparo das soluções de trabalho de acrilamida

Acrilamida 20 ppm (2 mL / 100 mL)											
Concentração (µg/L)	Volumes tomados S <sub>1</sub>			Volumes tomados S <sub>2</sub>			Volumes tomados S <sub>3</sub>				
	30	S <sub>1.1</sub>	←	150 µL	S <sub>2.1</sub>	←	150 µL	S <sub>3.1</sub>	←	150 µL	
45	S <sub>1.2</sub>	←	225 µL	S <sub>2.2</sub>	←	225 µL	S <sub>3.2</sub>	←	225 µL		
60	S <sub>1.3</sub>	←	300 µL	S <sub>2.3</sub>	←	300 µL	S <sub>3.3</sub>	←	300 µL		
75	S <sub>1.4</sub>	←	375 µL	S <sub>2.4</sub>	←	375 µL	S <sub>3.4</sub>	←	375 µL		
90	S <sub>1.5</sub>	←	450 µL	S <sub>2.5</sub>	←	450 µL	S <sub>3.5</sub>	←	450 µL		
105	S <sub>1.6</sub>	←	525 µL	S <sub>2.6</sub>	←	525 µL	S <sub>3.6</sub>	←	525 µL		

Após o preparo das soluções de trabalho, cada uma delas foi analisada nas seguintes condições cromatográficas:

- fase móvel: água/acetonitrila (95:5, v/v);
- fluxo: 1,0 mL/min;
- comprimento de onda: 200 e 226 nm;
- "loop": 500 µL;
- volume de injeção: 150 µL.

Nas condições indicadas acima, analisou-se 3 vezes cada ponto da curva de cada padrão e construiu-se um gráfico a partir das alturas obtidas contra a concentração das soluções padrão.

Posteriormente foi realizada a avaliação dos resíduos da regressão, através do método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO), que parte da premissa que os resíduos seguem a distribuição normal, têm variância constante e são independentes. Tais premissas relacionadas à análise de regressão foram avaliadas quanto à

normalidade pelo método de Ryan e Joiner (1976); homogeneidade de variâncias como proposto por Levene (1960) e Brown e Forsythe (1974); e independência dos resíduos de regressão como indicado por Durbin e Watson (1951). O teste F foi conduzido para verificar o ajuste ao modelo linear por meio da avaliação da significância da regressão (Draper e Smith, 1998).

#### 4.7.3.3 Repetibilidade

Conforme o método utilizado para confecção da curva analítica, foram feitas 6 repetições genuínas de um tipo de cada batata frita (uma tipo *chips*, uma palha e uma de *fast food*). Os valores extremos foram excluídos através do teste de Grubbs.

Baseando-se em critérios estabelecidos a partir da equação de Horwitz e Albert (2006), os valores de *HorRat* foram calculados.

$$CV_{\text{repe}}(\%) = \frac{s}{\bar{x}} \times 100$$

Onde,

$CV_{\text{repe}}(\%)$  = coeficiente de variação

$\bar{x}$  = média das concentrações medidas para as repetições,

$s$  = desvio padrão das concentrações medidas para as repetições.

$$PRSD_R = 22 \%$$

Onde,

$PRSD_R$  = coeficiente de variação previsto pela equação de HorRat

$$HorRat_{\text{repe}} = CV_{\text{repe}}(\%) / 2/3 PRSD_R$$

A metodologia é considerada com repetibilidade adequada com um valor de  $HorRat_{\text{repe}}$  menor ou igual a 2.

#### 4.7.3.4 Limite de Quantificação (LOQ) e Limite de Detecção (LOD)

A determinação do LOQ e do LOD foi realizada após a avaliação da curva analítica mais adequada através das equações sugeridas por MILLER (1993).

#### 4.7.3.5 Efeito Matriz

Para a determinação do efeito matriz, foram preparadas 6 soluções genuínas do padrão de acrilamida e 6 soluções genuínas de cada um dos três tipos de batata frita (*chips*, *palha* e *fast food*), ambas em uma concentração esperada de 75 µg/kg.

A partir dos resultados obtidos com os cromatogramas, realizou-se um test t para verificar se os resultados encontrados no padrão e na matriz são estatisticamente iguais e consequentemente se não existe efeito matriz.

#### 4.7.3.6 Precisão Intermediária

Para verificação da precisão intermediária a variação escolhida para ser avaliada foi a coluna utilizada no cromatógrafo.

O ensaio foi realizado com todas as condições cromatográficas iguais, apenas com a variação da coluna.

Para este teste foram utilizados 2 lotes diferentes da coluna de fase reversa (25 cm) SYMETRY® C<sub>18</sub> – WATERS.

Baseando-se em critérios estabelecidos a partir da equação de Horwitz e Albert (2006), os valores de  $HorRat_R$  foram calculados.

$$S_{i(j,k)} = \sqrt{\frac{1}{2 \cdot f} \cdot \sum_{j=1}^f (y_{j1} - y_{j2})^2}$$

$$CV_{\text{prec int}} (\%) = S_i / \bar{x} \times 100$$

$$PRSD_R = 44 \%$$

$$HorRat_R = \frac{CV_{\text{prec int}} (\%)}{PRSD_R}$$

Onde,

$S_i$  = desvio padrão de precisão intermediária

$CV_{\text{perc int}} (\%)$  = coeficiente de variação

$\bar{x}$  = média das concentrações medidas para as repetições

$t$  = total de amostras ensaiadas;  
 $y_{j1}$  = determinação da variação 1;  
 $y_{j2}$  = determinação da variação 2;  
 $n$  = total de ensaios efetuados por amostra.

Valores de  $HorRat_R$  menores ou iguais a 2 indicam precisão intermediária adequada.

#### 4.7.3.7 Exatidão

Para verificação da exatidão do método duas amostras iguais foram injetadas em colunas (A e B) de lotes diferentes 5 vezes.

Foi verificado a homogeneidade das variâncias encontrados nos ensaios na coluna A e B através do teste F (SNEDECOR & COCHRAN, 1989). A estatística F calculada foi comparada com o valor crítico F.

Confirmando a homoscedasticidade, as médias das concentrações foram comparadas através do teste t.

$$F_{\text{calculado}} = \frac{s_1^2}{s_2^2}$$

Onde,

$s_1^2$  e  $s_2^2$  são as variâncias de cada amostra, com a maior variância no numerador

$$t_{\text{calculado}} = \frac{\bar{d}}{\sqrt{s^2/n}}$$

$$\bar{d} = \frac{\sum_{i=1}^n (x_{i1} - x_{i2})}{n}$$

Sendo,

$x_{i1}$  = concentração da i-ésima replicatas da amostra ensaiada nas condições normais de metodologia,

$x_{i_2}$  = concentração da i-ésima replicatas da amostra ensaiada para variação,  
 $s^2$  = variância das diferenças.

#### 4.7.4 Tratamento de dados

Os dados foram tratados utilizando o programa Microsoft Office Excel 2016 para análise de freqüência e cruzamento dos dados.

A planilha eletrônica desenvolvida por Bazílio e colaboradores (2012), foi utilizada na verificação da adequação das curvas analíticas ao modelo linear.

Na validação intralaboratorial do método analítico CLAE para determinar acrilamida presentes em batata frita os métodos estatísticos empregados no tratamento de valores aberrantes na avaliação da linearidade como os testes para verificação da normalidade e homogeneidade de variâncias dos dados, a autocorrelação dos resíduos, bem como os testes para análise da regressão e desvio de linearidade são mencionados ao longo da apresentação dos resultados.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 AVALIAÇÃO DE CONSUMO

#### 5.1.1 Escolas

De um total de 2142 questionários enviados, 592 (27,6%) foram devolvidos, destes, 32 não obedeciam aos critérios de inclusão na pesquisa.

A adesão ao estudo foi, portanto, de 26% (560 questionários) do total de questionários enviados. Este percentual refere-se ao número de questionários devolvidos, preenchidos corretamente e com o termo de consentimento assinado pelo responsável da criança.

Na Tabela 6 é possível observar que a adesão e o comprometimento das escolas em distribuir, incentivar o preenchimento por parte dos responsáveis e recolher os questionários variou bastante, o que refletiu no percentual de questionários devolvidos, tendo a variação de 79,2 % de devolução da escola 9 a 0 % da escola 2.

**Tabela 6 - Questionários devolvidos e adequados aos critérios de aceitação da pesquisa**

Escola	Questionários enviados	Questionários devolvidos	% Questionários devolvidos	Questionários dentro do critério de aceitação	% Questionários dentro do critério de aceitação em relação ao total
1	90	34	37,8%	32	35,6%
2	290	0	0,0%	0	0,0%
3	190	42	22,1%	38	20,0%
4	65	16	24,6%	16	24,6%
5	290	81	27,9%	78	26,9%
6	160	34	21,3%	33	20,6%
7	307	115	37,5%	102	33,2%
8	500	72	14,4%	68	13,6%
9	250	198	79,2%	193	77,2%
<b>TOTAL</b>	<b>2142</b>	<b>592</b>	<b>27,6%</b>	<b>560</b>	<b>26%</b>

Das 560 crianças entrevistadas 282 (50,4%) eram do sexo feminino e 278 (49,6%) do sexo masculino. Deste total, 1,3 % com 3 anos, 2,1 % com 4 anos, 6,1 % com 5 anos, 7,9 % com 6 anos, 7,9 % com 7 anos, 5,5 % com 8 anos, 7,3 % com 9 anos, 8,4 % com 10 anos, 15,9 % com 11 anos, 17,9 % com 12 anos, 14,5 % com 13 anos e 5,4 % com 14 anos (Figura 11).

Na Figura 12 é possível observar a distribuição dos questionários respondidos nas séries/ano que correspondem a idade pré-escolar e escolar.

**Figura 11 – Proporção das idades dos alunos**



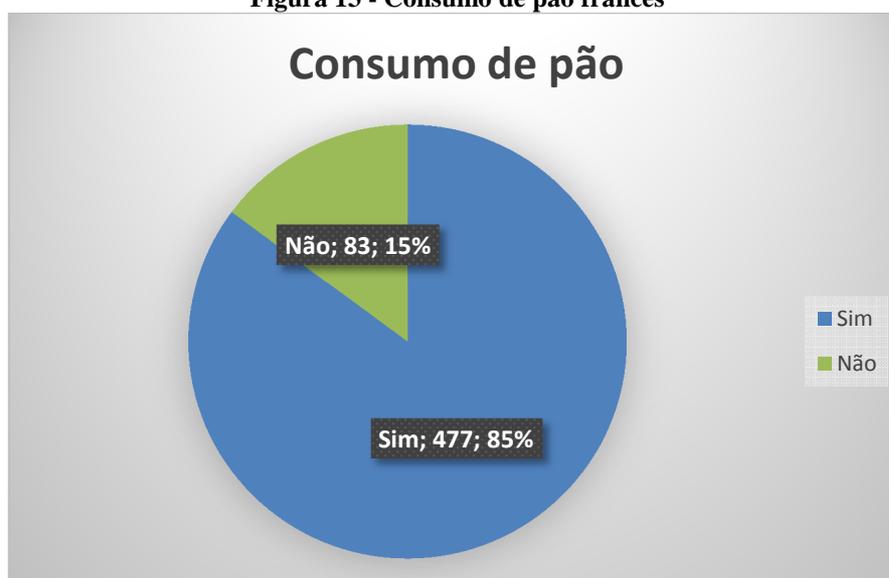
**Figura 12 - Distribuição dos alunos pelos anos escolares**



### 5.1.2 Pão francês

Das 560 crianças avaliadas nessa pesquisa, 85 % (477) consomem pão francês (Figura 3).

Figura 13 - Consumo de pão francês



Do total de 477 crianças que consomem pão francês, 282 consomem diariamente. Das crianças que consomem pão diariamente, 60 crianças consomem meio pão por dia, 146 crianças consomem 1 pão por dia, 63 crianças consomem 2 pães por dia, 9 crianças consomem 3 pães por dia e 4 crianças consomem 4 pães por dia (Figura 14). Cento e noventa e cinco (195) crianças são consumidoras de pão francês, mas não consomem diariamente. Na Figura 15 podemos observar a frequência de consumo não diário. Setenta e cinco por cento (75 %) (146) das crianças que não consomem pão francês diariamente consomem 1 ou 2 vezes por semana, sendo relatado em muitos casos pelos pais o consumo somente nos finais de semana.

Figura 14 - Frequência diária de consumo de pão francês

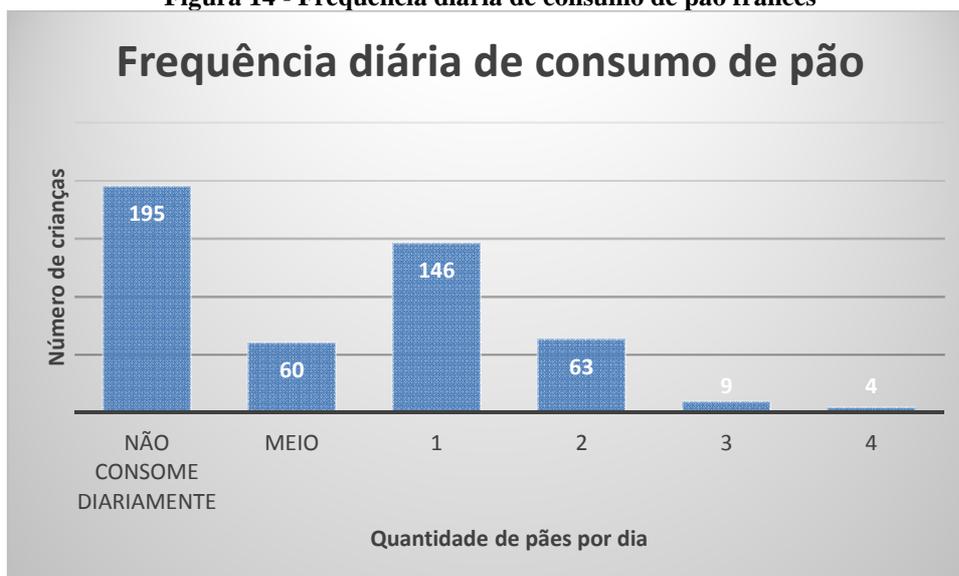
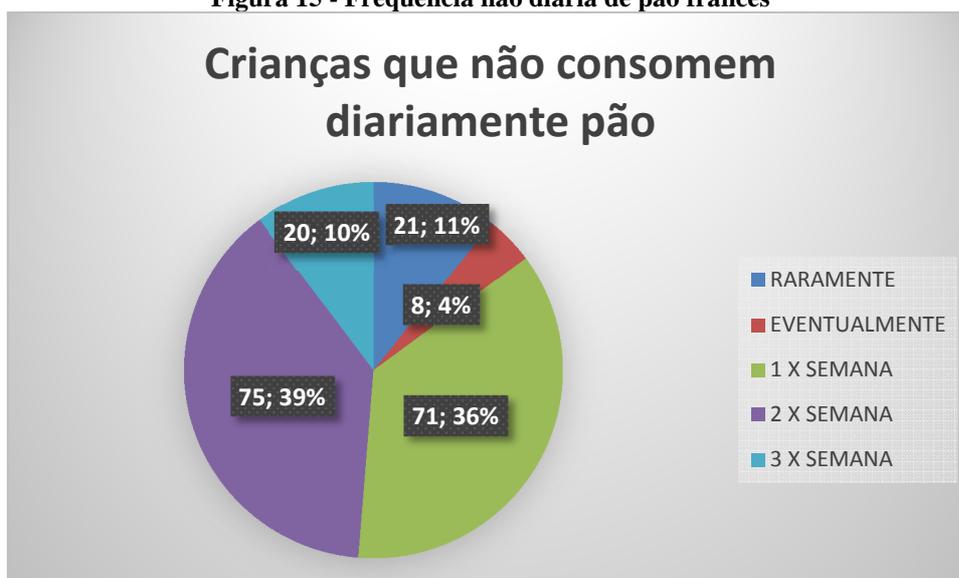


Figura 15 - Frequência não diária de pão francês



### 5.1.3 Batata frita

Das 560 crianças avaliadas nessa pesquisa, apenas 29 (5%) não consomem batata frita, enquanto 95 % (531) consomem. (Figura 16).

Figura 16 - Consumo de batata frita



Na Figura 17 podemos observar o perfil de consumo semanal de batata frita realizado pelas 531 crianças que consomem este tipo de alimento. É possível verificar que 197 (37,1%) crianças, apesar de serem consumidoras de batata frita, não consomem semanalmente. Porém 62,9% (334) das crianças consomem batata frita pelo menos 1 vez por semana.

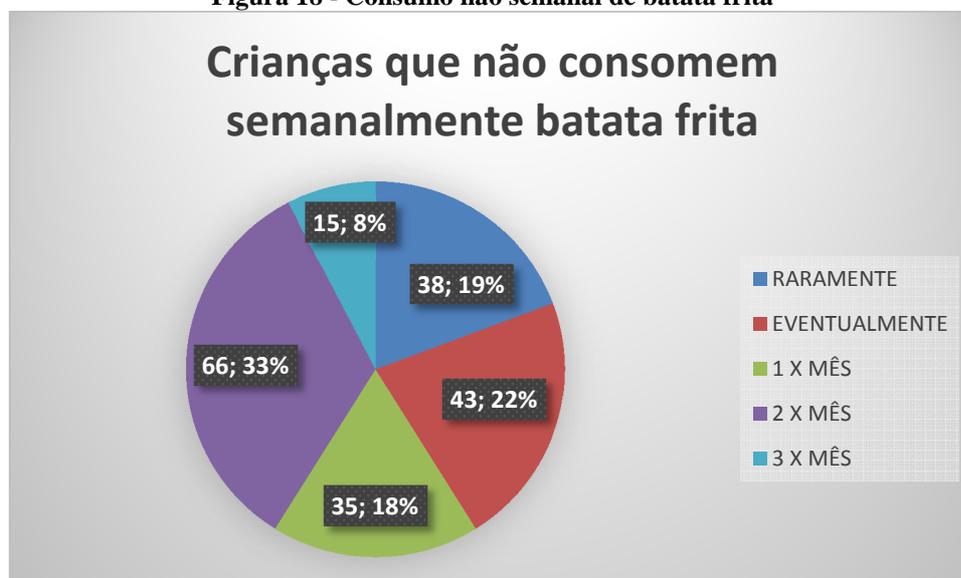
Neste gráfico também podemos observar que existem 2 crianças que consomem algum tipo de batata frita diariamente.

Figura 17 - Consumo semanal de batata frita



Das 197 crianças que são consumidoras de batata frita não semanais, 66 crianças (33%) relatam consumirem 2 X por mês. Na figura 18 é possível observar o perfil de consumo dessas crianças.

Figura 18 - Consumo não semanal de batata frita



A partir dos resultados obtidos com os 560 questionários respondidos corretamente, podemos verificar o perfil de consumo de cada tipo de batata frita. São elas: caseira, congelada, *fast food*, palha e *chips* (Figuras 19, 20, 21, 22 e 23).

Figura 19 - Consumo de batata frita caseira

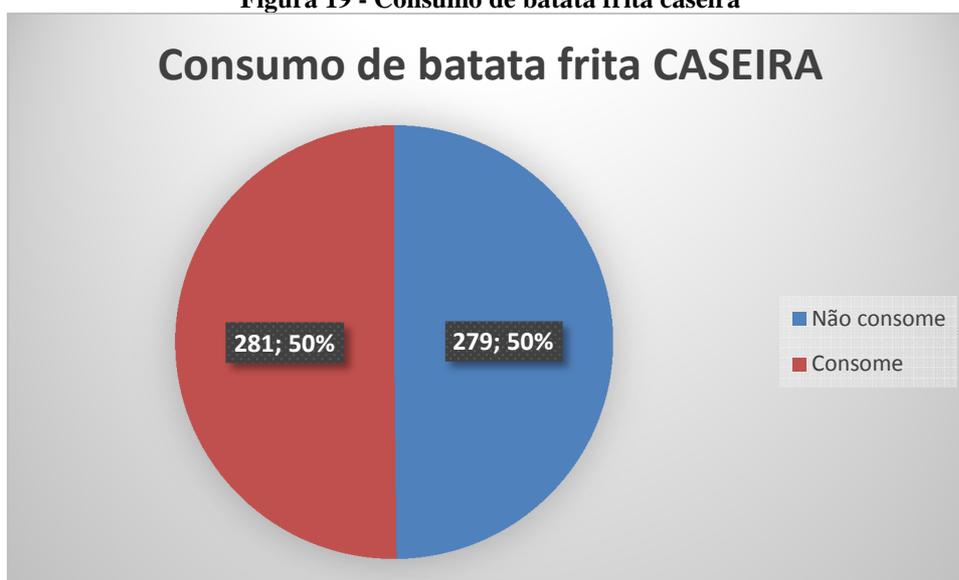


Figura 20 - Consumo de batata frita congelada

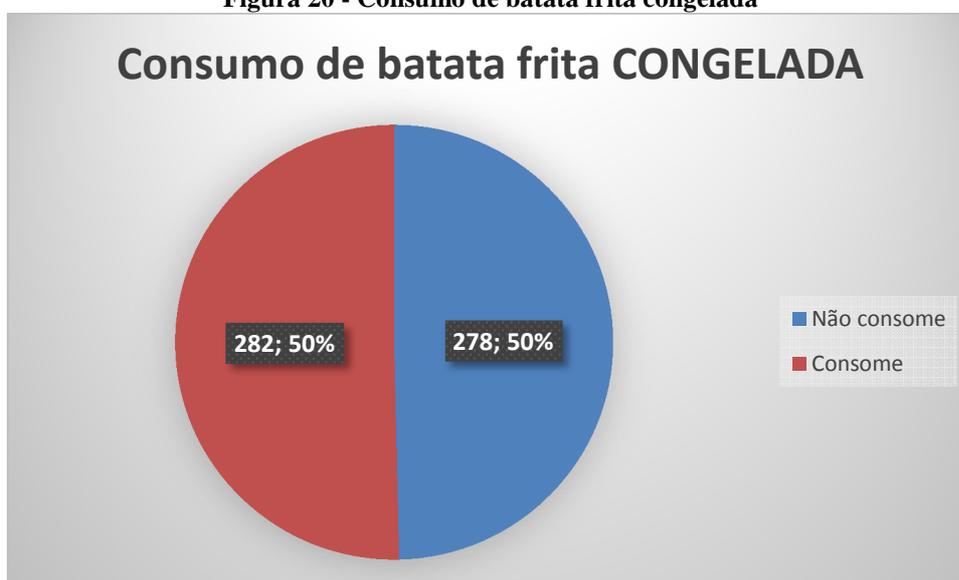
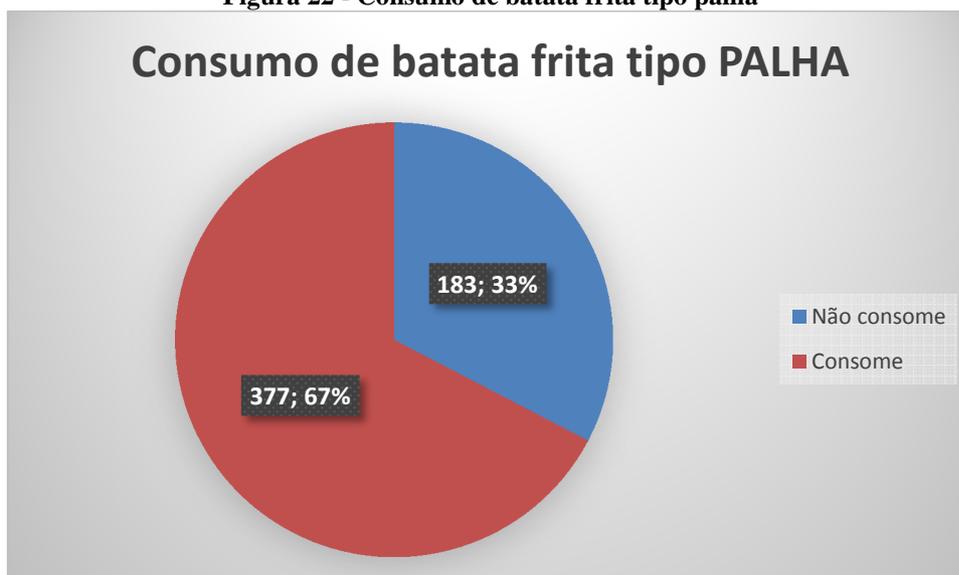
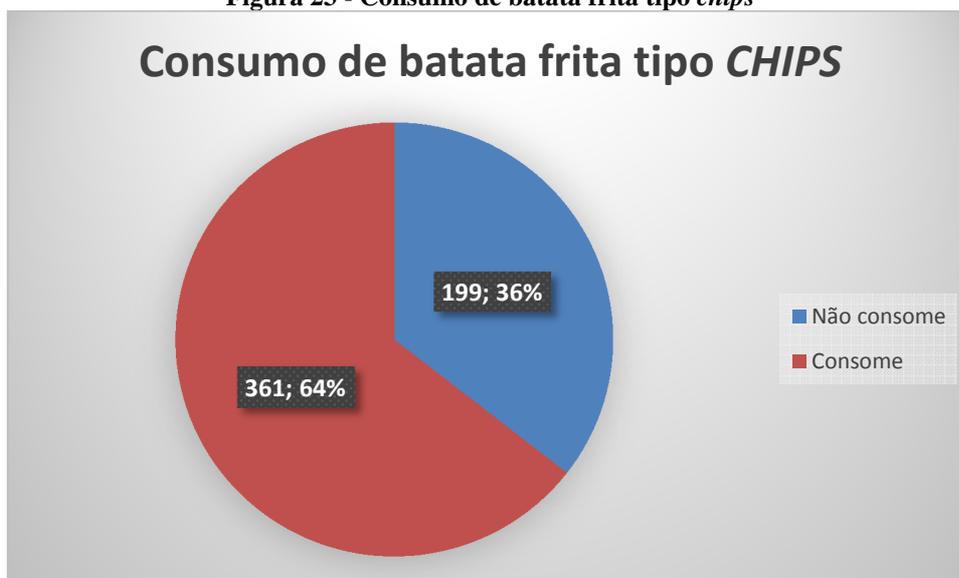


Figura 21 - Consumo de batata frita de *fast food*

Figura 22 - Consumo de batata frita tipo palha



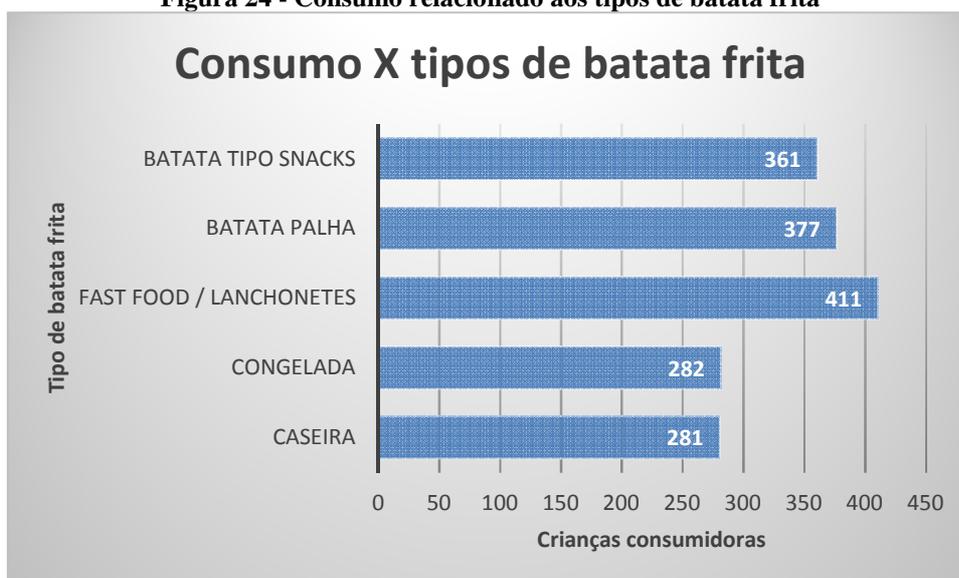
**Figura 23 - Consumo de batata frita tipo *chips***



A partir dos gráficos acima, observamos que aproximadamente 50% das crianças consomem batata frita caseira ou congelada (281 e 282 crianças, respectivamente). Já 67% (377) crianças consomem batata frita tipo palha e 64% (361) das crianças consomem batata frita tipo *chips*. A batata frita mais consumida pelas crianças é a batata frita de lanchonetes *fast foods*. Apresentando um total de 411 (73%) de crianças consumidoras.

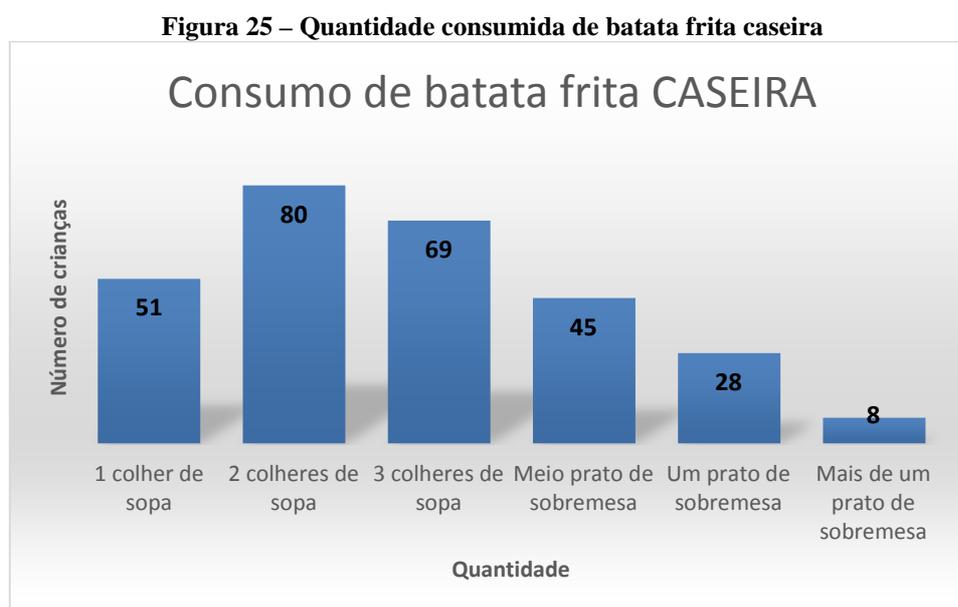
Na Figura 24 observamos um resumo com esse perfil de consumo.

**Figura 24 - Consumo relacionado aos tipos de batata frita**

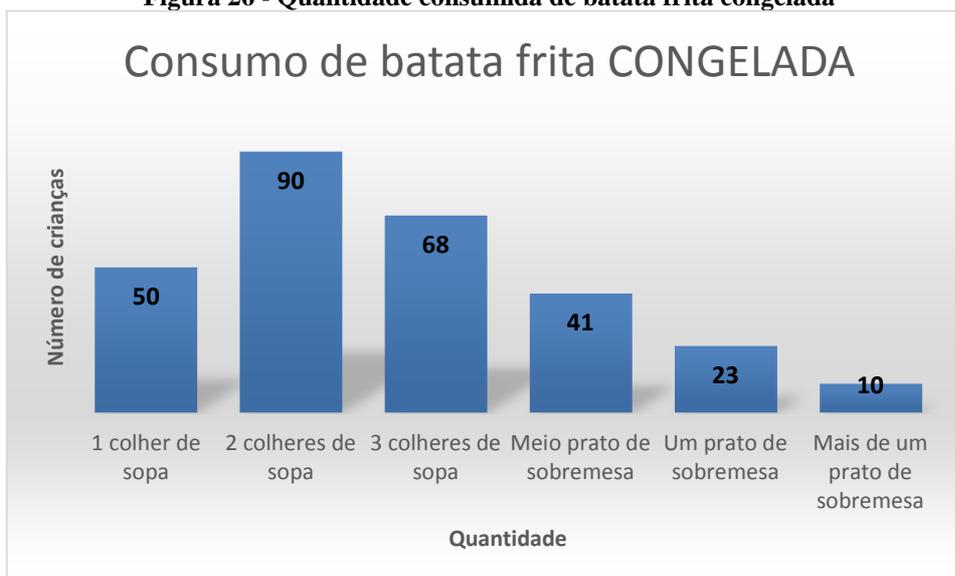


Para cada tipo de batata frita consumida, foi questionado a quantidade ingerida pela criança.

Do total de 281 crianças que consomem batata frita caseira, 51 consomem 1 colher de sopa, 80 crianças consomem 2 colheres de sopa, 69 crianças consomem 3 colheres de sopa, 45 crianças consomem meio prato de sobremesa, 28 crianças consomem 1 prato de sobremesa e 8 crianças relatam consumir mais de um prato de sobremesa quando ingerem este tipo de batata (Figura 25).



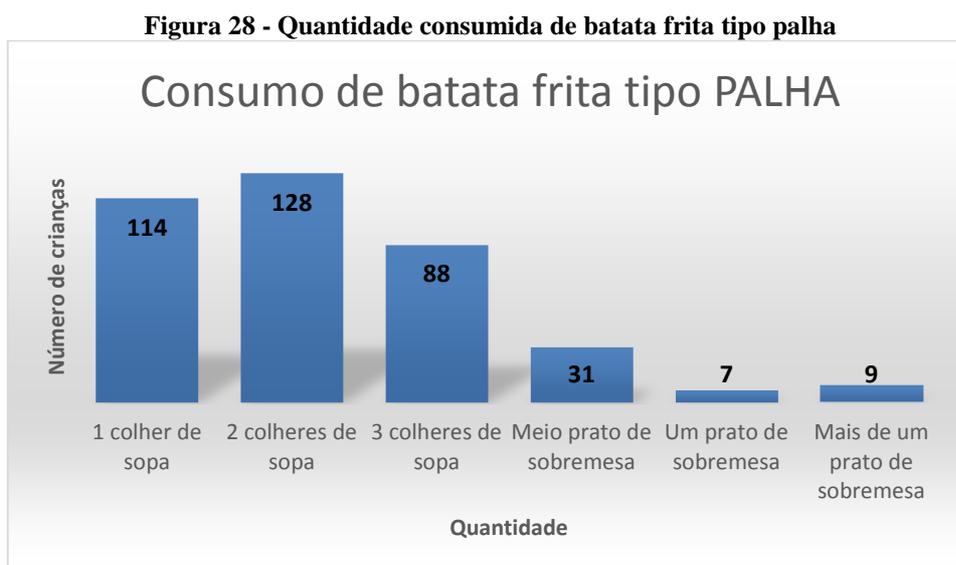
Já do total de 282 crianças que consomem batata frita congelada, 50 consomem 1 colher de sopa, 90 crianças consomem 2 colheres de sopa, 68 crianças consomem 3 colheres de sopa, 41 crianças consomem meio prato de sobremesa, 23 crianças consomem 1 prato de sobremesa e 10 crianças consomem mais de um prato de sobremesa quando ingerem este tipo de batata (Figura 26).

**Figura 26 - Quantidade consumida de batata frita congelada**

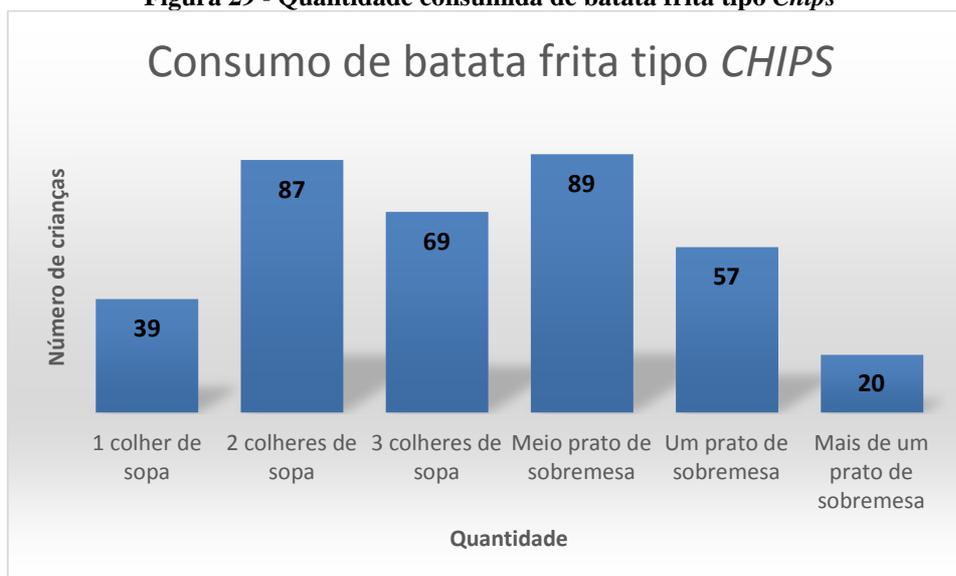
Das 411 crianças que consomem batata frita de *fast food*, 71 consomem 1 colher de sopa, 112 crianças consomem 2 colheres de sopa, 101 crianças consomem 3 colheres de sopa, 82 crianças consomem meio prato de sobremesa, 28 crianças consomem 1 prato de sobremesa e 17 crianças consomem mais de um prato de sobremesa quando ingerem este tipo de batata (Figura 27).

**Figura 27 - Quantidade consumida de batata frita de *fast food***

Já do total de 377 crianças que consomem batata frita tipo palha, 114 consomem 1 colher de sopa, 128 crianças consomem 2 colheres de sopa, 88 crianças consomem 3 colheres de sopa, 31 crianças consomem meio prato de sobremesa, 7 crianças consomem 1 prato de sobremesa e 9 crianças consomem mais de um prato de sobremesa quando ingerem este tipo de batata (Figura 28).



E por fim, do total de 361 crianças que consomem batata frita tipo *chips*, 39 consomem 1 colher de sopa, 87 crianças consomem 2 colheres de sopa, 69 crianças consomem 3 colheres de sopa, 89 crianças consomem meio prato de sobremesa, 57 crianças consomem 1 prato de sobremesa e 20 crianças relatam consumir mais de um prato de sobremesa quando ingerem este tipo de batata (Figura 29).

**Figura 29 - Quantidade consumida de batata frita tipo *Chips***

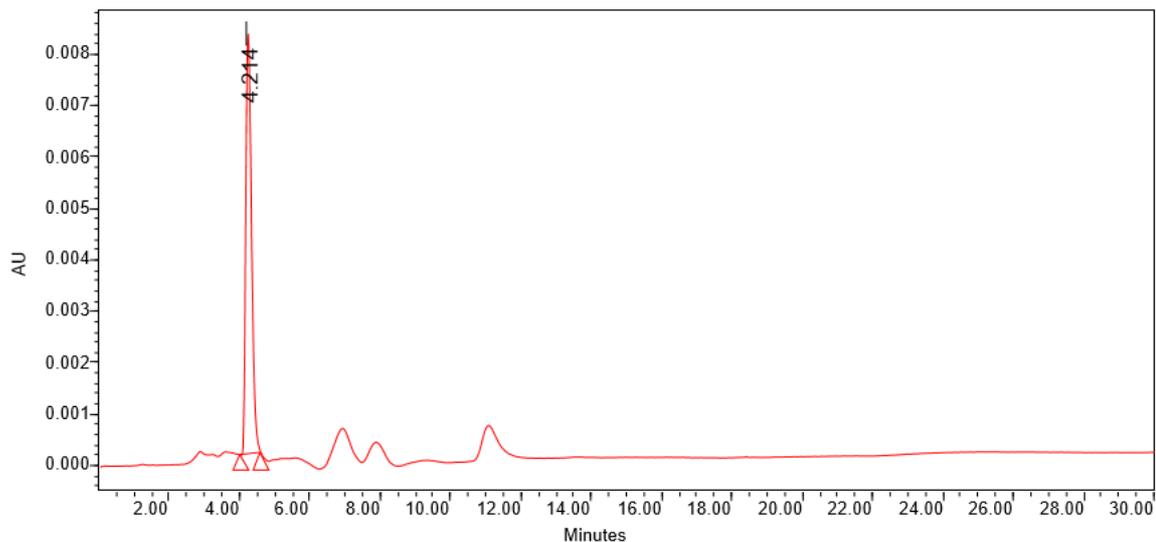
## 5.2 ANÁLISE DAS AMOSTRAS

### 5.2.1 Pão francês

As análises realizada com o pão francês não apresentaram bons resultados quanto a separação da acrilamida. O cromatograma (Figura 31) obtido não exibiu boa qualidade nos dados. Novas análises foram realizadas em outras condições cromatográficas para melhorar a separação dos picos, porém não foi possível determinar a quantidade de acrilamida presente nas amostras de pão. Na Figura 30 observamos o padrão de acrilamida (105 µg/L) injetado nas mesmas condições da amostra.

**Figura 30 - Padrão de acrilamida (105 µg/L-1).**

**Condições cromatográficas: fase móvel: água / acetonitrila (95:5, v/v); fluxo: 1,0 mL / min; comprimento de onda: 200 nm; volume de injeção: 150 µL.**

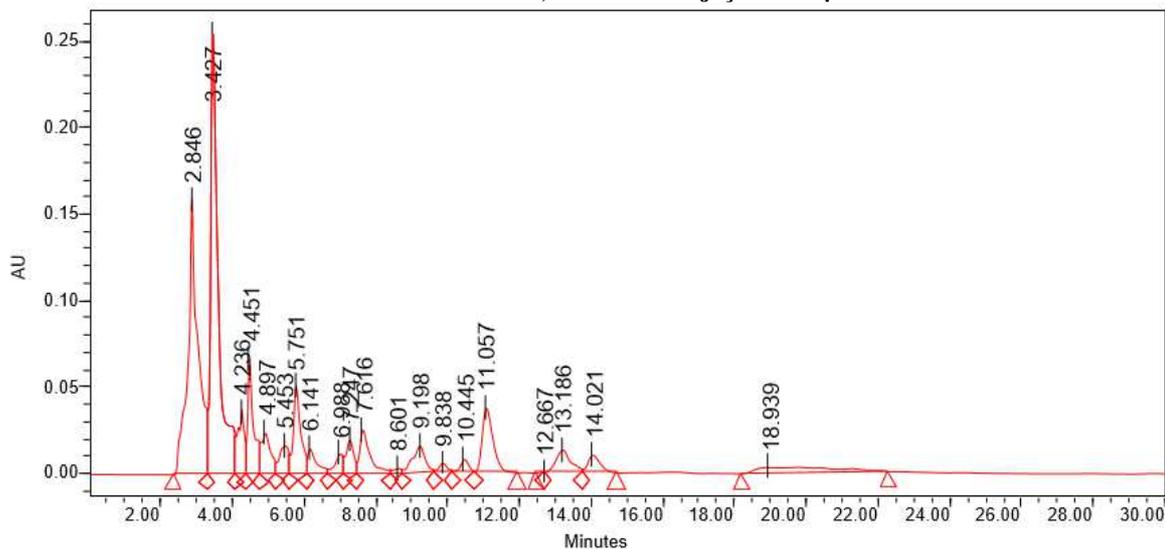


**Peak Results**

Name	RT	Area	Height	Amount	Units
1	4.214	94138	8197		

**Figura 31 - Cromatograma obtido a partir da amostra pão francês.**

**Condições cromatográficas: fase móvel: água / acetonitrila (95:5, v/v); fluxo: 1,0 mL / min; comprimento de onda: 200 nm; volume de injeção: 150 µL.**



### 5.2.2 Batata frita

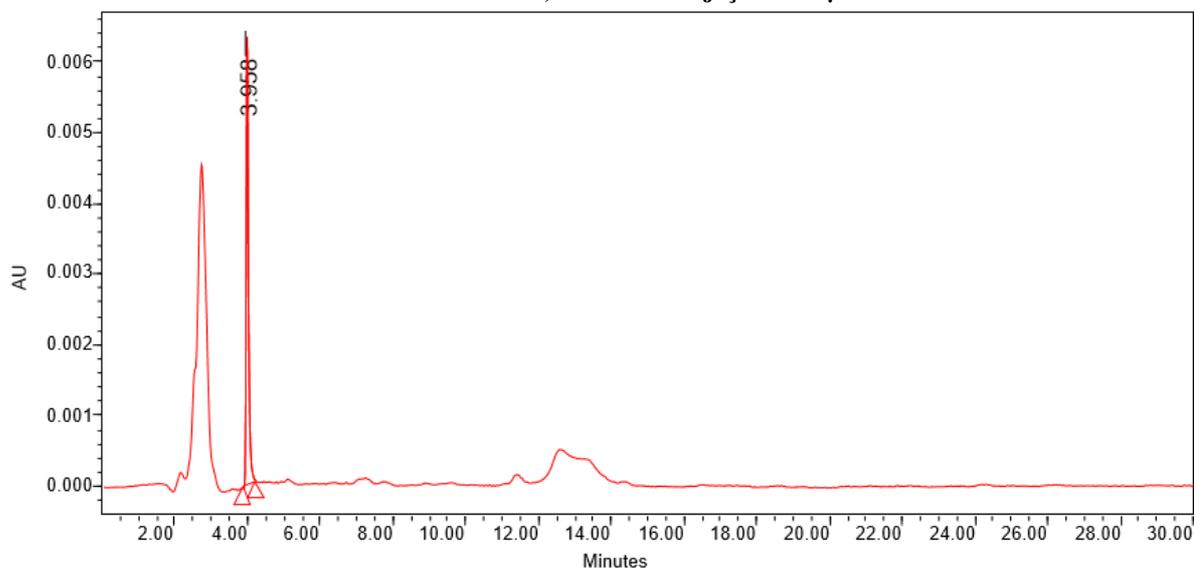
As análises realizadas com as batatas fritas apresentaram bons resultados quanto a separação da acrilamida após diversas modificações nas condições cromatográficas. O padrão de acrilamida foi injetado sempre nas mesmas condições em que as amostras eram analisadas para mostrar a garantia de confirmação de identidade da acrilamida.

O parâmetro utilizado para determinação da concentração de acrilamida presente em cada amostra foi a altura do pico, pois nas figuras abaixo é possível verificar que os picos de acrilamida são muito pequenos e que a linha de base poderia interferir na área dos picos. Por este motivo a altura foi utilizada.

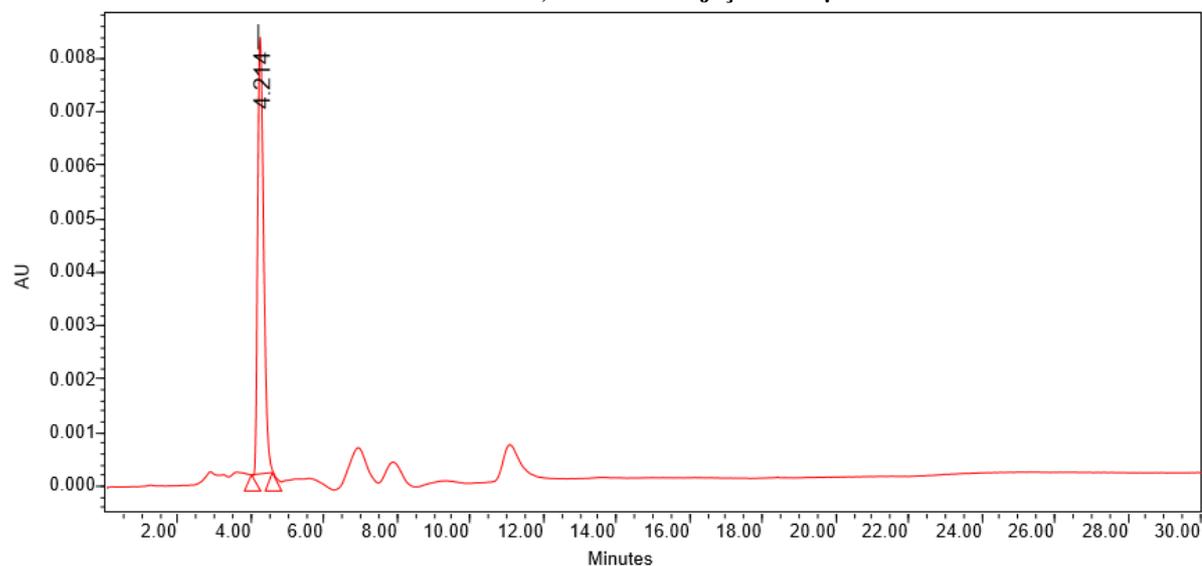
Para que fosse confirmado que o pico encontrado era realmente de acrilamida, além da comparação com o tempo de retenção obtido com a injeção do padrão na mesma corrida, as amostras também eram injetadas enriquecidas com acrilamida para que fosse possível observar o aumento do pico. Com o enriquecimento sempre houve aumento somente do pico correspondente a acrilamida.

Um padrão de acrilamida sempre foi injetado na mesma corrida que as amostras pois duas colunas iguais, porém de lotes diferentes, foram utilizadas para as análises. E com isso, o tempo de retenção foi modificado em alguns segundos. O teste de precisão intermediária realizado durante a validação comprovou que os resultados obtidos nas duas colunas tem dispersões adequadas. Nas Figuras 32 e 33 verificamos os exemplos do mesmo padrão de acrilamida injetados em colunas diferentes, apresentando tempos de retenção diferentes, e nas mesmas condições cromatográficas.

**Figura 32 - Cromatograma obtido a partir do padrão de acrilamida injetado na coluna A.**  
Condições cromatográficas: fase móvel: água / acetonitrila (95:5, v/v); fluxo: 1,0 mL / min; comprimento de onda: 200 nm; volume de injeção: 150 µL.



**Figura 33 - Cromatograma obtido a partir do padrão de acrilamida injetado na coluna B.**  
Condições cromatográficas: fase móvel: água / acetonitrila (95:5, v/v); fluxo: 1,0 mL / min; comprimento de onda: 200 nm; volume de injeção: 150 µL.



### 5.2.2.1 Batata frita tipo chips

Foram analisadas três marcas diferentes de batata frita tipo *chips*, adquiridas em mercados da região da Tijuca.

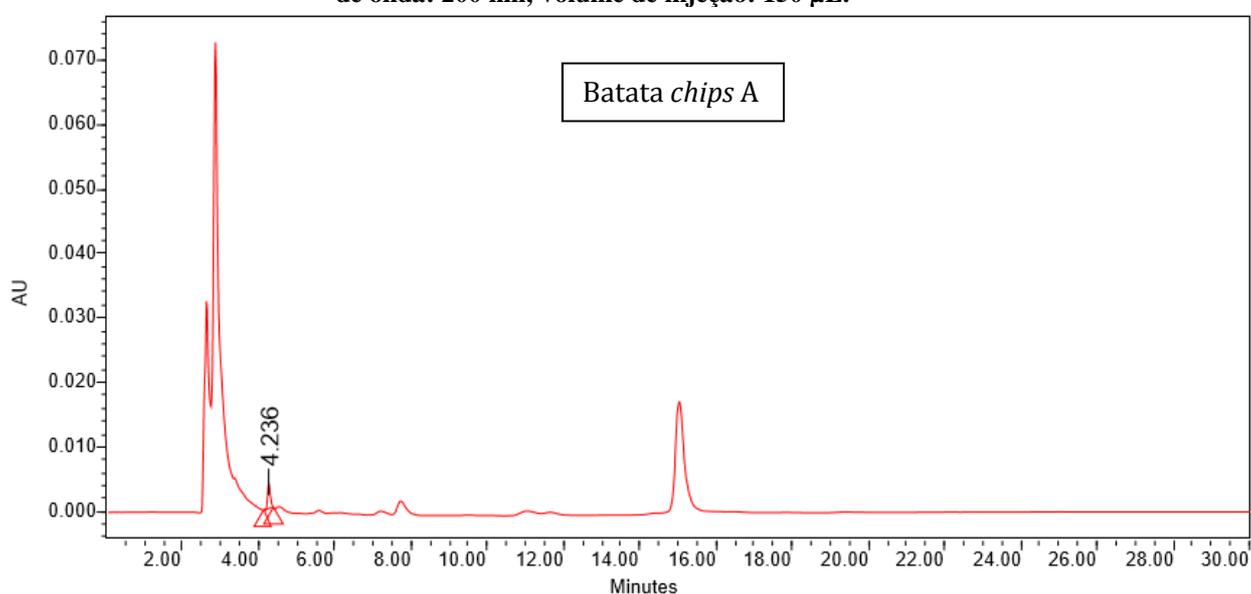
A marca A apresentou uma concentração de acrilamida de 504,04  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de amostra, já a marca B apresentou uma concentração de 281,55  $\mu\text{g}/\text{kg}$  e a amostra C apresentou uma concentração de 1.665,95  $\mu\text{g}/\text{kg}$ .

A concentração média de acrilamida na batata frita tipo chips é 817,18  $\mu\text{g}/\text{kg}$ .

Nas Figuras 34, 35 e 36 é possível observar os cromatogramas obtidos para a determinação do teor de acrilamida presente em cada uma das batatas tipo *chips*.

**Figura 34 - Cromatograma obtido a partir da amostra batata frita *chips* A.**

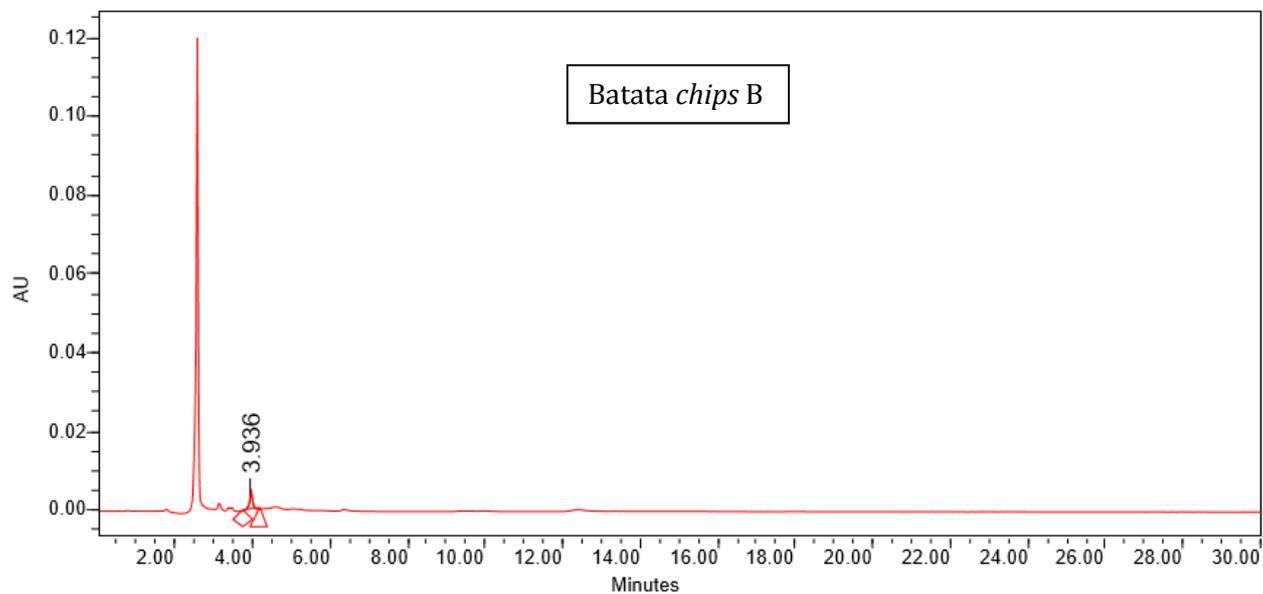
**Condições cromatográficas: fase móvel: água / acetonitrila (95:5, v/v); fluxo: 1,0 mL / min; comprimento de onda: 200 nm; volume de injeção: 150  $\mu\text{L}$ .**



**Peak Results**

	Name	RT	Area	Height	Amount	Units
1		4.236	21904	3999		

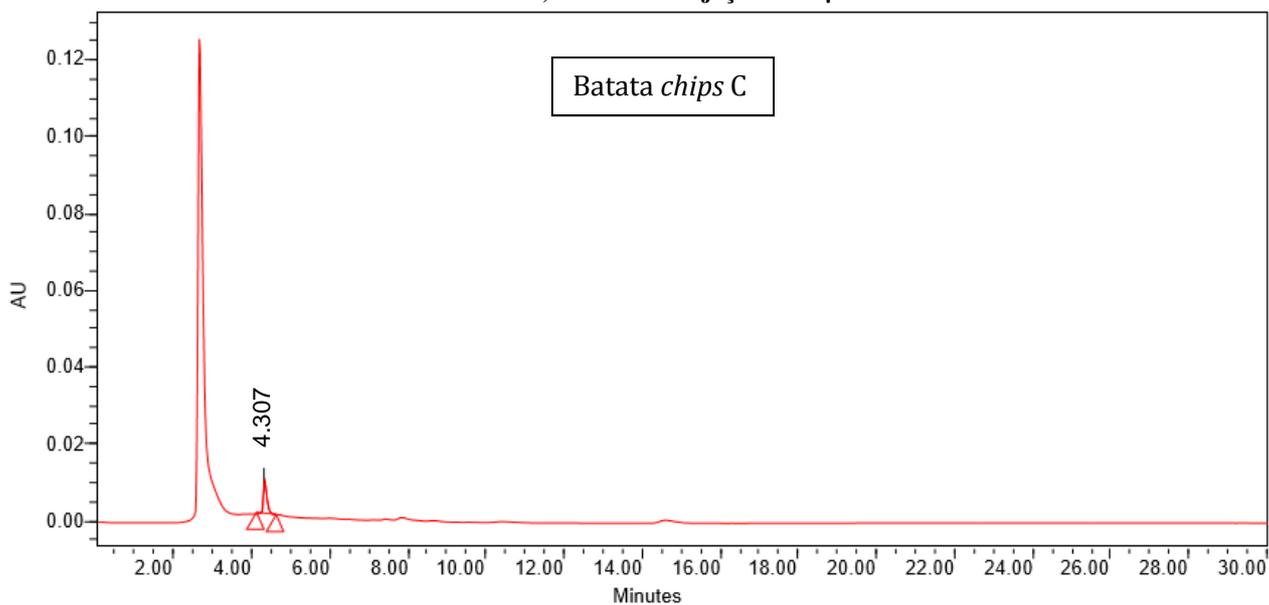
**Figura 35 - Cromatograma obtido a partir da amostra batata frita *chips* B.**  
**Condições cromatográficas: fase móvel: água / acetonitrila (95:5, v/v); fluxo: 1,0 mL / min; comprimento de onda: 200 nm; volume de injeção: 150 µL.**



**Peak Results**

	Name	RT	Area	Height	Amount	Units
1		3.936	29054	4636		

**Figura 36 - Cromatograma obtido a partir da amostra batata frita *chips* C.**  
**Condições cromatográficas: fase móvel: água / acetonitrila (95:5, v/v); fluxo: 1,0 mL / min; comprimento de onda: 200 nm; volume de injeção: 150 µL.**



**Peak Results**

	Name	RT	Area	Height	Amount	Units
1	Acrilamida	4.307	55979	8757		

### 5.2.2.2 Batata frita tipo palha

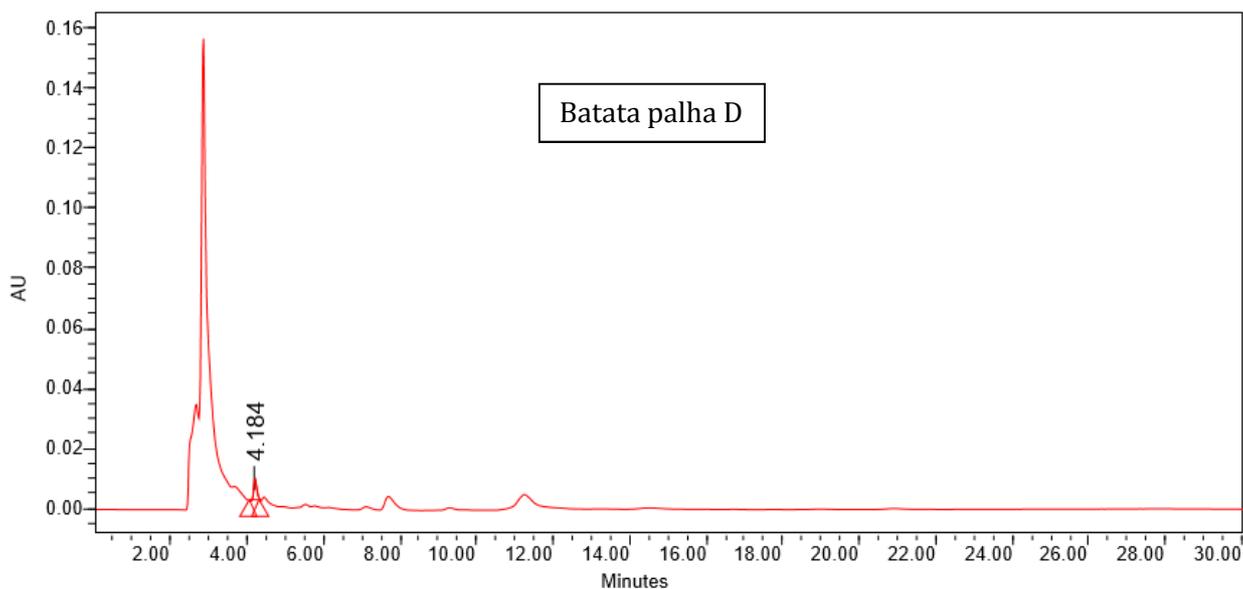
Foram analisadas três marcas diferentes de batata frita tipo palha, adquiridas em mercados da região da Tijuca.

A marca D apresentou uma concentração de acrilamida de 427,42  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de amostra, já a marca E apresentou uma concentração de 306,56  $\mu\text{g}/\text{kg}$  e a amostra F apresentou uma concentração de 134,27  $\mu\text{g}/\text{kg}$ .

A concentração média de acrilamida na batata frita tipo palha é 289,42  $\mu\text{g}/\text{kg}$ .

Nas Figuras 37, 38 e 39 é possível observar os cromatogramas obtidos para a determinação do teor de acrilamida presente em cada uma das batatas palha.

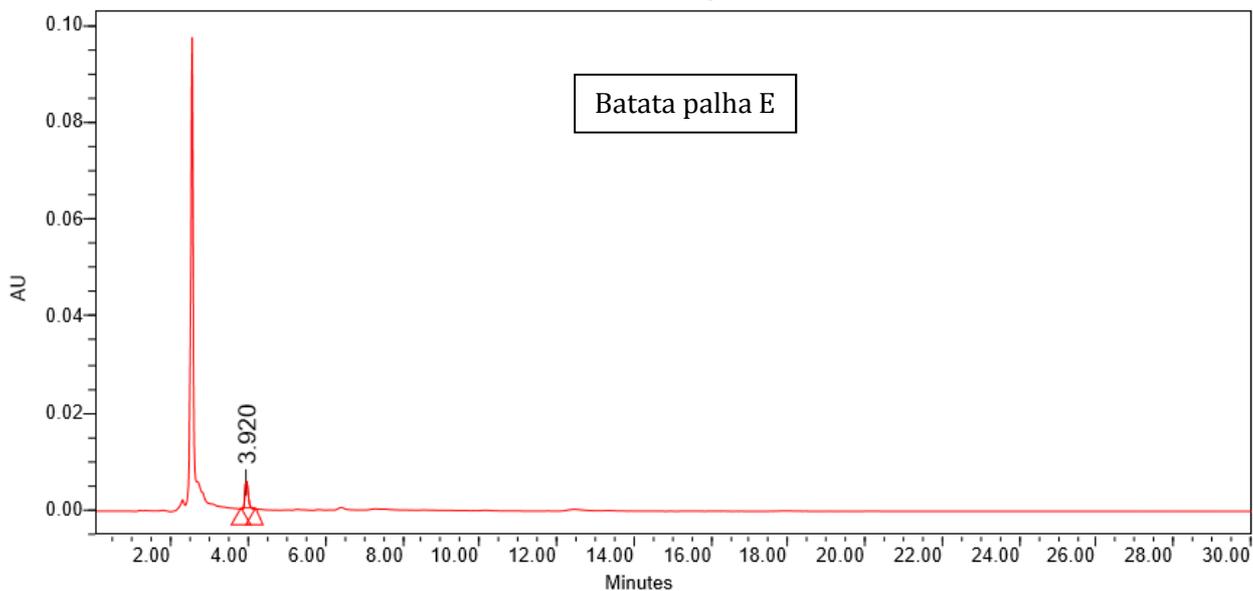
**Figura 37 - Cromatograma obtido a partir da amostra batata frita palha D.**  
Condições cromatográficas: fase móvel: água / acetonitrila (95:5, v/v); fluxo: 1,0 mL / min; comprimento de onda: 200 nm; volume de injeção: 150  $\mu\text{L}$ .



#### Peak Results

	Name	RT	Area	Height	Amount	Units
1		4.184	42459	7178		

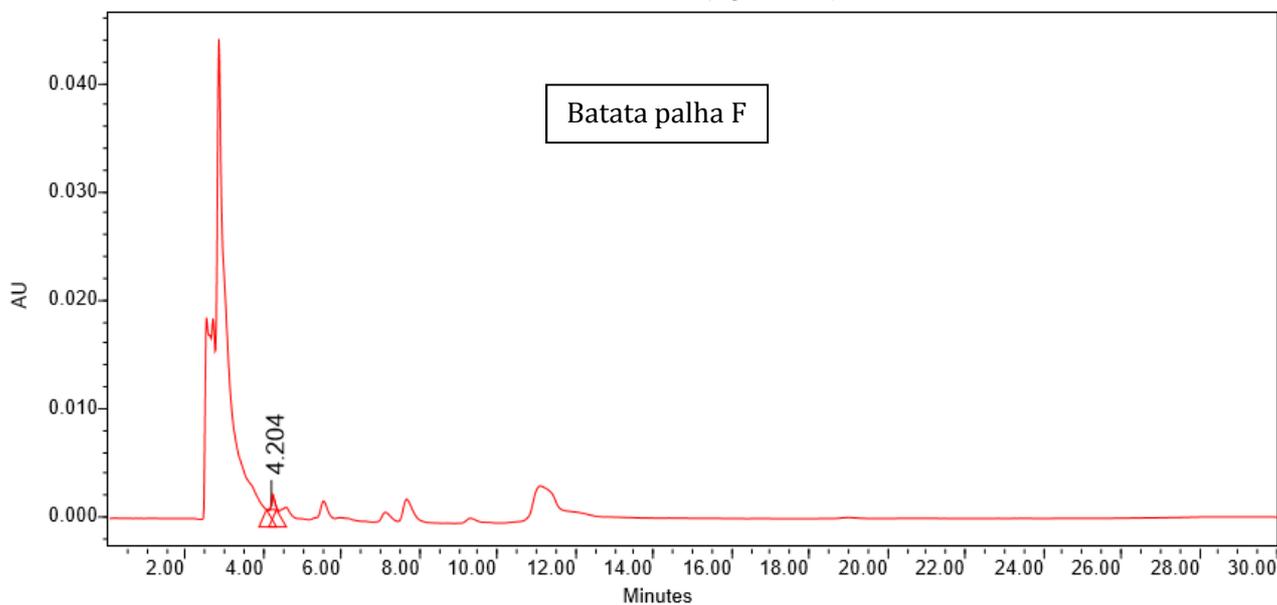
**Figura 38 - Cromatograma obtido a partir da amostra batata frita palha E.**  
 Condições cromatográficas: fase móvel: água / acetonitrila (95:5, v/v); fluxo: 1,0 mL / min; comprimento de onda: 200 nm; volume de injeção: 150 µL.



**Peak Results**

	Name	RT	Area	Height	Amount	Units
1		3.920	34925	5643		

**Figura 39 - Cromatograma obtido a partir da amostra batata frita palha F.**  
 Condições cromatográficas: fase móvel: água / acetonitrila (95:5, v/v); fluxo: 1,0 mL / min; comprimento de onda: 200 nm; volume de injeção: 150 µL.



**Peak Results**

	Name	RT	Area	Height	Amount	Units
1		4.204	9414	1470		

### 5.2.2.3 Batata frita fast food

Foram analisadas três marcas diferentes de batata frita de *fast food*, adquiridas em mercados da região da Tijuca.

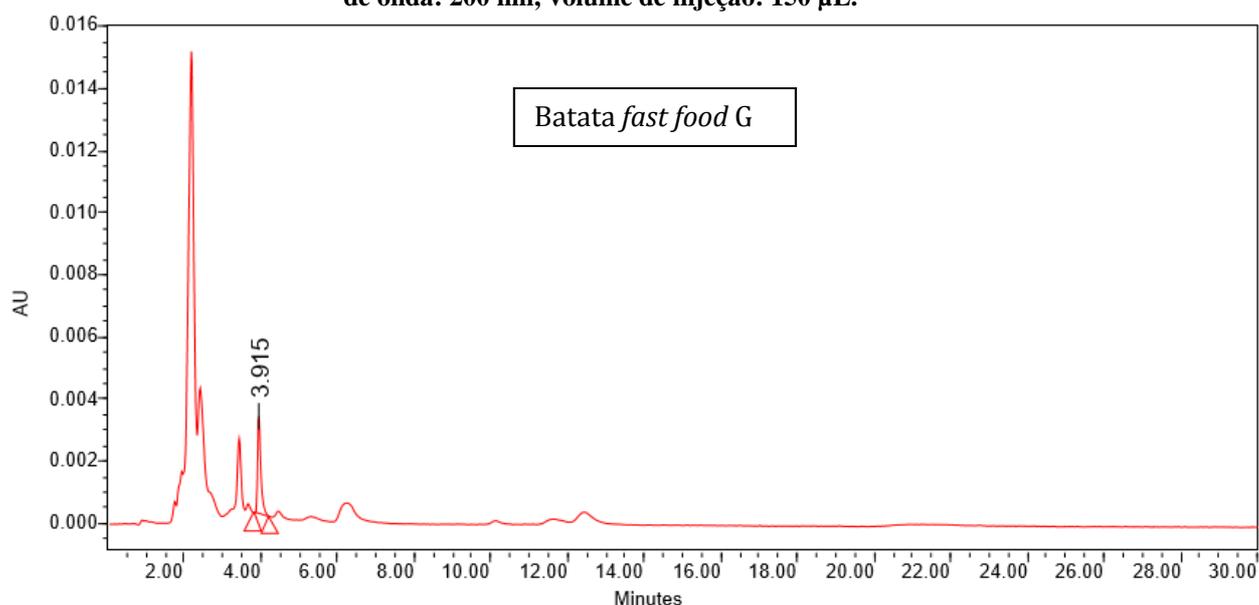
A marca G apresentou uma concentração de acrilamida de 26.862,78 µg/kg de amostra, já a marca H apresentou uma concentração de 10.408,51 µg/kg e a amostra I apresentou uma concentração de 20.383,72 µg/kg.

A concentração média de acrilamida na batata frita tipo *fast food* é 19.218,34 µg/kg.

Nas Figuras 40, 41 e 42 é possível observar os cromatogramas obtidos para a determinação do teor de acrilamida presente em cada uma das batatas de *fast food*.

**Figura 40 - Cromatograma obtido da amostra batata frita *fast food* G.**

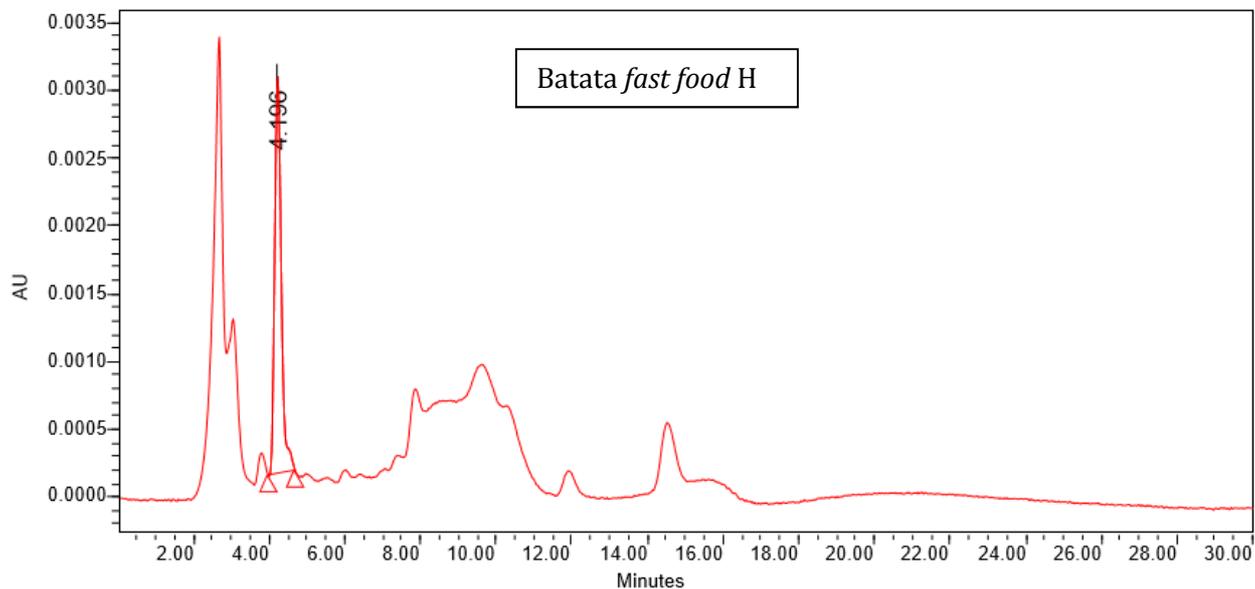
Condições cromatográficas: fase móvel: água / acetonitrila (95:5, v/v); fluxo: 1,0 mL / min; comprimento de onda: 200 nm; volume de injeção: 150 µL.



#### Peak Results

	Name	RT	Area	Height	Amount	Units
1		3.915	18975	3146		

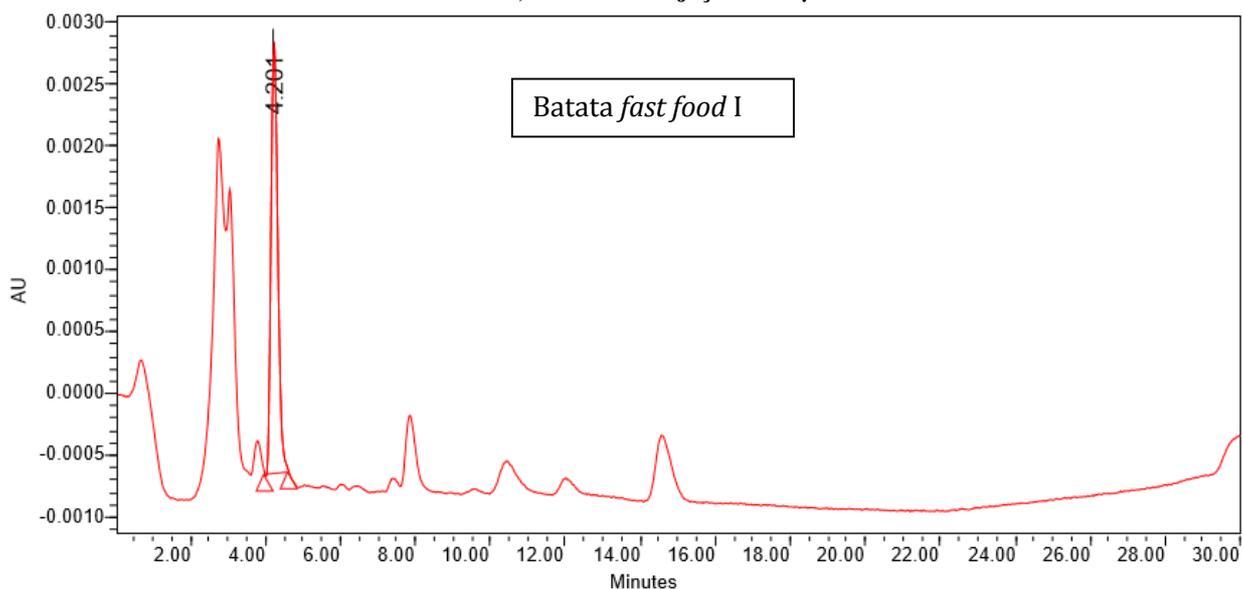
**Figura 41 - Cromatograma obtido da amostra batata frita *fast food* H.**  
**Condições cromatográficas: fase móvel: água / acetonitrila (95:5, v/v); fluxo: 1,0 mL / min; comprimento de onda: 200 nm; volume de injeção: 150 µL.**



**Peak Results**

	Name	RT	Area	Height	Amount	Units
1		4.196	35940	2938		

**Figura 42 - Cromatograma obtido da amostra batata frita *fast food* I.**  
**Condições cromatográficas: fase móvel: água / acetonitrila (95:5, v/v); fluxo: 1,0 mL / min; comprimento de onda: 200 nm; volume de injeção: 150 µL.**



**Peak Results**

	Name	RT	Area	Height	Amount	Units
1		4.201	44153	3498		

### 5.3 VALIDAÇÃO INTRALABORATORIAL

Os resultados obtidos a partir de procedimentos já mencionados e referentes à validação do método são apresentados nos itens subsequentes.

#### 5.3.1 Faixa de Trabalho

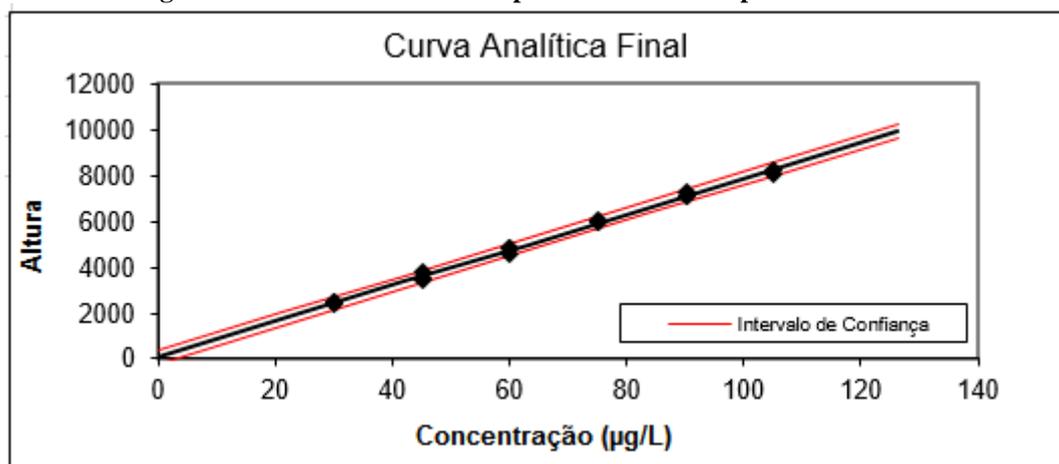
A faixa de trabalho para a acrilamida foi baseada em estudos que demonstram a quantidade que inúmeros alimentos apresentam deste contaminante. Além do Regulamento nº 10 / 2011 da Comissão Europeia, que estabelece que a acrilamida deve se apresentar não detectável em um método com limite de detecção de até  $0,01 \mu\text{gkg}^{-1}$  (10 ppb).

A faixa de trabalho ficou entre 30 a  $105 \mu\text{gL}^{-1}$ .

#### 5.3.2 Linearidade

A avaliação da linearidade e a confecção da curva analítica (Figura 43) foram realizadas através do método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO). Os valores de resíduos aberrantes foram analisados previamente, pelo método Jackknife. A cada exclusão, os testes eram novamente executados. As premissas que devem ser satisfeitas para que o MMQO possa ser realizado são: testes de normalidade, independência (não autocorrelação dos resíduos) e homogeneidade das variâncias dos resíduos, além da análise de variância da regressão e desvio da linearidade dos resíduos. Todos estes testes foram realizados para a acrilamida.

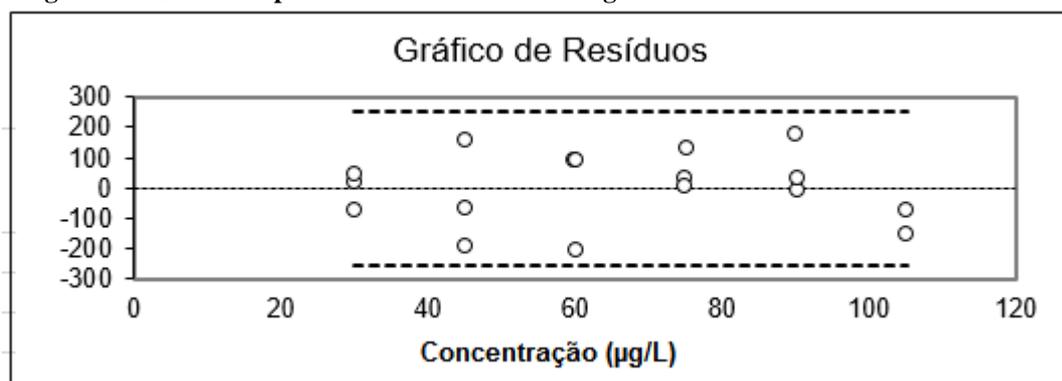
Figura 43 - Curva analítica final pelo método CLAE para a acrilamida



### 5.3.2.1 Tratamento de valores aberrantes

Após realização do teste de resíduos padronizados Jackknife, verificou-se que a acrilamida não ultrapassou o limite de 22,2 % de dados rejeitados estabelecido por Horwitz (1995), tendo apenas 1 dado rejeitado (Figura 44).

Figura 44 - Gráfico exploratório dos resíduos da regressão da curva analítica da acrilamida



### 5.3.2.2 Teste de normalidade dos resíduos

A análise dos dados utilizados para a confecção da curva da acrilamida mostrou, que os dados seguem a distribuição normal, através do coeficiente de correlação de Ryan-Joiner ( $R_{eq}$ ). O coeficiente calculado (Tabela 7) foi superior ao valor crítico estabelecido de 0,94 ( $\alpha = 0,05$ ), não havendo razões para rejeitar a hipótese nula de que os dados seguem a distribuição normal (SOUZA, 2007).

$R_{eq}$	0,98
$R_{crit} (\alpha = 0,05)$	0,94

### 5.3.2.3 Teste de homogeneidade das variâncias dos resíduos

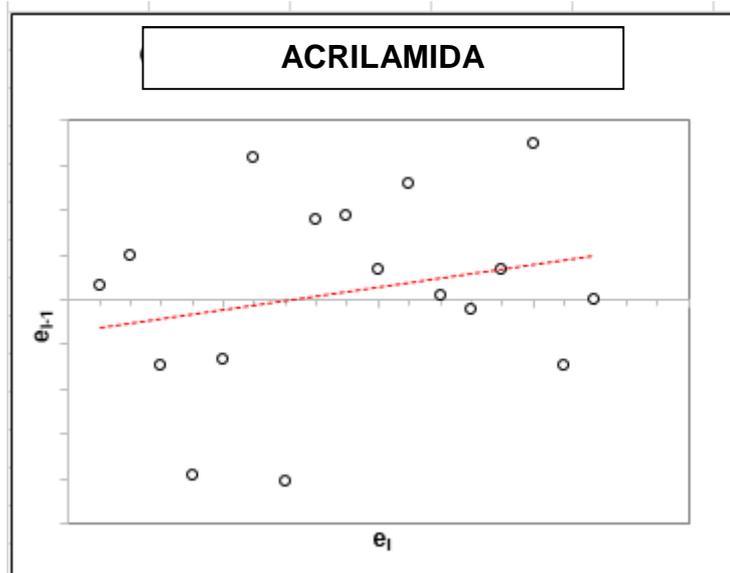
Para avaliar a homogeneidade das variâncias dos resíduos foi realizado o teste de Levene adaptado por Brown-Forsythe (SOUZA, 2007). O valor de  $t$  tabelado ( $\alpha = 0,05$ ) para a acrilamida é de 2,14 e, o valor de  $t_L$  calculado foi -0,813, ou seja, menor que o  $t$  tabelado.

Desta forma, a hipótese nula de que as variâncias dos resíduos de regressão são homogêneas foi aceita, havendo homogeneidade entre as mesmas.

### 5.3.2.4 Teste de não autocorrelação dos resíduos

A não autocorrelação ou independência dos resíduos da regressão foi avaliada pelo teste de Durbin-Watson (SOUZA, 2007). O valor estatístico do teste é o valor de  $d$ , inferiores ou superiores. O valor de  $d$  calculado para a acrilamida foi 2,04. Encontrando-se acima dos valores críticos para  $d_L$  e  $d_U$ , respectivamente, 1,11 e 1,38 ( $\alpha = 0,05$ ). Ou seja, a hipótese nula não foi rejeitada e confirmou-se a independência dos resíduos da regressão. A Figura 45 representa graficamente a independência dos resíduos da regressão.

Figura 45 - Gráfico de Durbin-Watson da curva analítica ( $e_i \times e_{i-1}$ ) – acrilamida



### 5.3.2.5 Análise de variância dos resíduos da regressão e desvio da linearidade

A regressão linear bem como o ajuste ao modelo foi confirmada através do teste ANOVA. Os dados são apresentados na Tabela 8.

Tabela 8 - Resultados da análise de variância quanto a significância da regressão e não significância do desvio de linearidade ( $\alpha = 0,05$ ) para a curva analítica da acrilamida

fonte	G.L. <sup>1</sup>	SQ <sup>2</sup>	MQ <sup>3</sup>	F	P <sup>4</sup>
regressão	1	6,26E+07	6,26E+07	4,42E+03	5,97E-20
resíduos	15	2,12E+05	1,42E+04		
Ajuste	4	5,27E+04	1,32E+04	9,08E-01	4,92E-01
erro puro	11	1,60E+05	1,45E+04		
total	16	6,28E+07			

<sup>1</sup>Graus de liberdade; <sup>2</sup>Soma dos quadrados; <sup>3</sup>Quadrado médio; <sup>4</sup>Valor de p para o estatístico F

A partir da ANOVA, a regressão da curva analítica relativa a acrilamida foi significativa ( $p < 0,001$ ) e o ajuste ao modelo linear ou o não desvio da linearidade foi não significativo ( $p > 0,05$ ) observados pelos valores do estatístico  $p$  calculado.

Ao final, a linearidade do método foi comprovada na faixa de trabalho 30 e 105  $\mu\text{gL}^{-1}$  e foi obtida a seguinte equação de regressão:  $y = 97,2 + 77,7x$ .

Onde,  $y$  é a altura do pico do acrilamida e  $x$  a concentração do analito.

Os critérios exigidos pelo método dos MMQO estão dispostos na tabela 9.

**Tabela 9 - Resumo das análises de premissas de linearidade pelo método MMQO**

Homogeneidade de variância
Há Homocedasticidade - $p > 0,05$
Regressão e Teste de Desvio de Linearidade
A regressão é significativa - $p < 0,001$
Não há desvio de Linearidade - $p > 0,05$
Autocorrelação dos Resíduos ( $\alpha = 0,05$ )
Não há autocorrelação - $d > dU$
Teste de Normalidade ( $\alpha = 0,05$ )
Segue a Normal - $R_{eq} > R_{crit}$

### 5.3.3 Repetibilidade

Baseando-se em critérios estabelecidos a partir da equação de Horwitz e Albert (2006), os valores de *HorRat* encontrados (Tabela 10) indicam que o método apresenta repetibilidade adequada.

**Tabela 10 - Avaliação da repetibilidade**  
Repetibilidade (HORWITZ e ALBERT, 2006)

Batata frita	Valor calculado HorRat <sub>repe</sub>	Critério de aceitabilidade
<i>Chips</i>	0,3339	≤ 2,0
Palha	0,2152	≤ 2,0
<i>Fast food</i>	1,8872	≤ 2,0

### 5.3.4 Limite de Detecção (LOD) e Limite de Quantificação (LOQ)

A curva analítica confeccionada para a acrilamida (Figura 36 no item 5.3.3) foi utilizada para a determinação dos limites (Tabela 11).

**Tabela 11 - Limites e Detecção e de Quantificação das curvas analíticas para análise da acrilamida**

LOD	3,96 µg/L
LOQ	11,74 µg/L

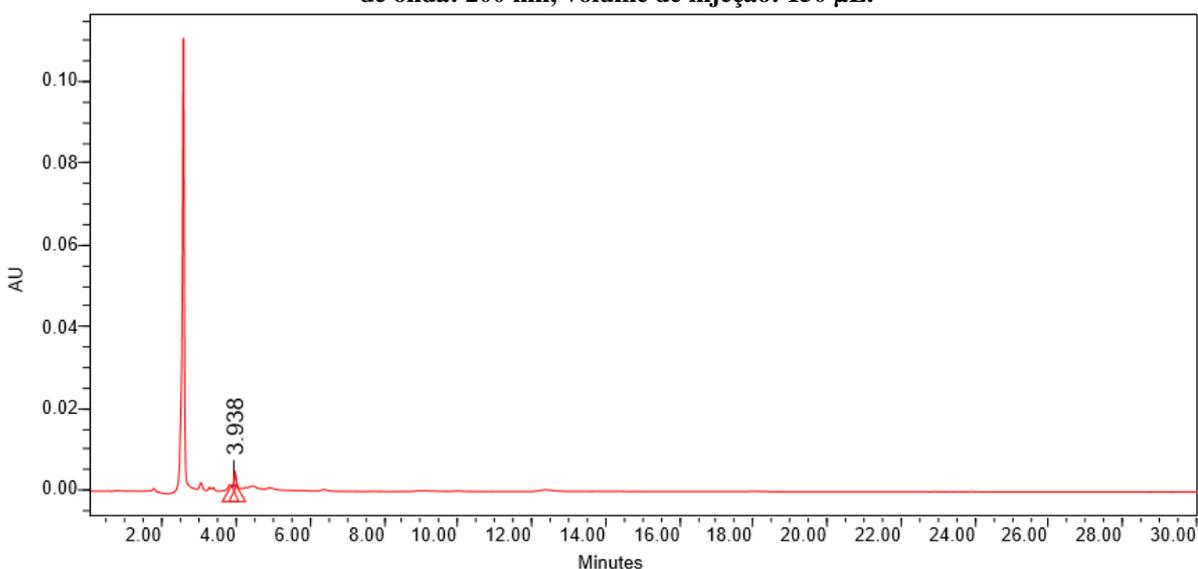
### 5.3.5 Efeito Matriz

Os resultados obtidos a partir dos cromatogramas expostos nas Figuras 46, 47 e 48 indicam que a quantidade de acrilamida medida nas amostras de batatas tipo *chips*, palha e de *fast food* (preparadas para apresentarem uma concentração de 75 µg / kg) é praticamente metade da quantidade de acrilamida medida em um padrão

com concentração de 75 µg / kg (Figura 49). Lembrando que o parâmetro utilizado para medida da concentração é a altura do pico.

A altura média encontrada no padrão de acrilamida a uma concentração de 75 µg / kg foi 6359. Já altura média encontrada nas batatas tipo *chips*, palha e de *fast food* foi respectivamente 3452, 3196 e 3210. É importante observar que as alturas encontradas nas três amostras são muito parecidas, demonstrando que o efeito matriz parece ser o mesmo sofrido em todas elas.

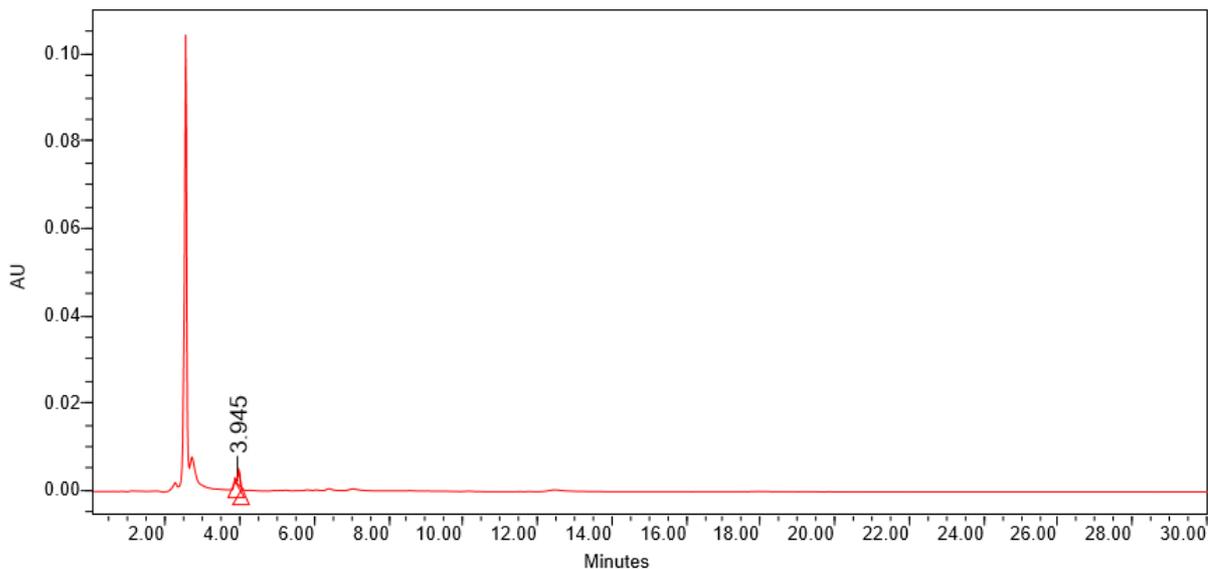
**Figura 46 - Cromatograma obtido na realização do teste de efeito matriz para a batata frita tipo chips. Condições cromatográficas: fase móvel: água / acetonitrila (95:5, v/v); fluxo: 1,0 mL / min; comprimento de onda: 200 nm; volume de injeção: 150 µL.**



**Peak Results**

	Name	RT	Area	Height	Amount	Units
1		3.938	13578	3452		

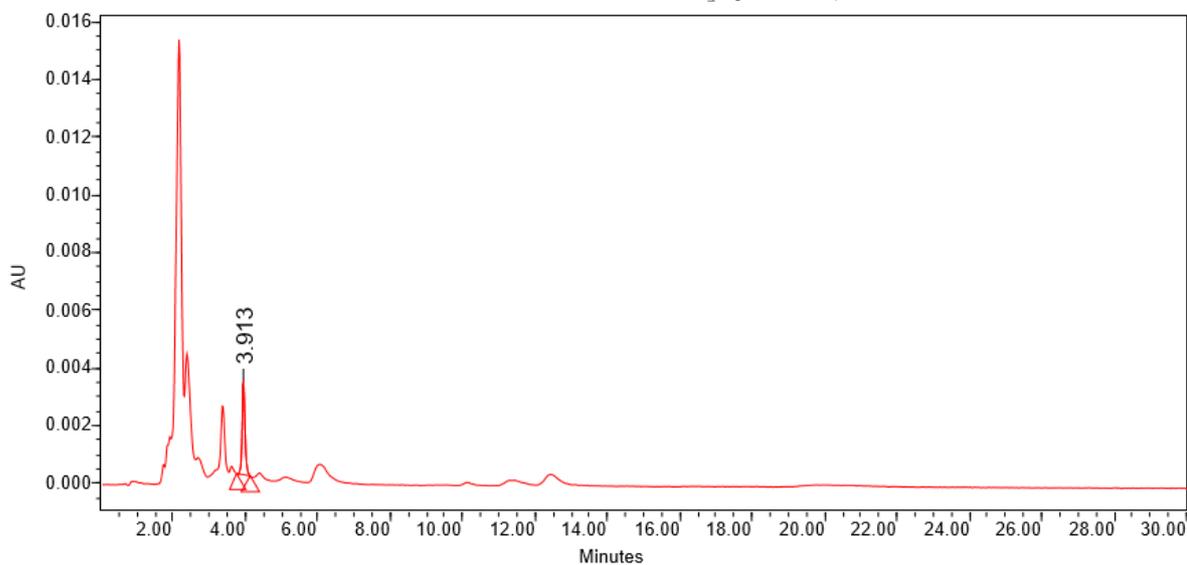
**Figura 47 - Cromatograma obtido na realização do teste de efeito matriz para a batata frita tipo palha.**  
**Condições cromatográficas: fase móvel: água / acetonitrila (95:5, v/v); fluxo: 1,0 mL / min; comprimento de onda: 200 nm; volume de injeção: 150 µL.**



**Peak Results**

	Name	RT	Area	Height	Amount	Units
1		3.945	13228	3196		

**Figura 48 - Cromatograma obtido na realização do teste de efeito matriz para a batata frita tipo *fast food*.**  
**Condições cromatográficas: fase móvel: água / acetonitrila (95:5, v/v); fluxo: 1,0 mL / min; comprimento de onda: 200 nm; volume de injeção: 150 µL.**

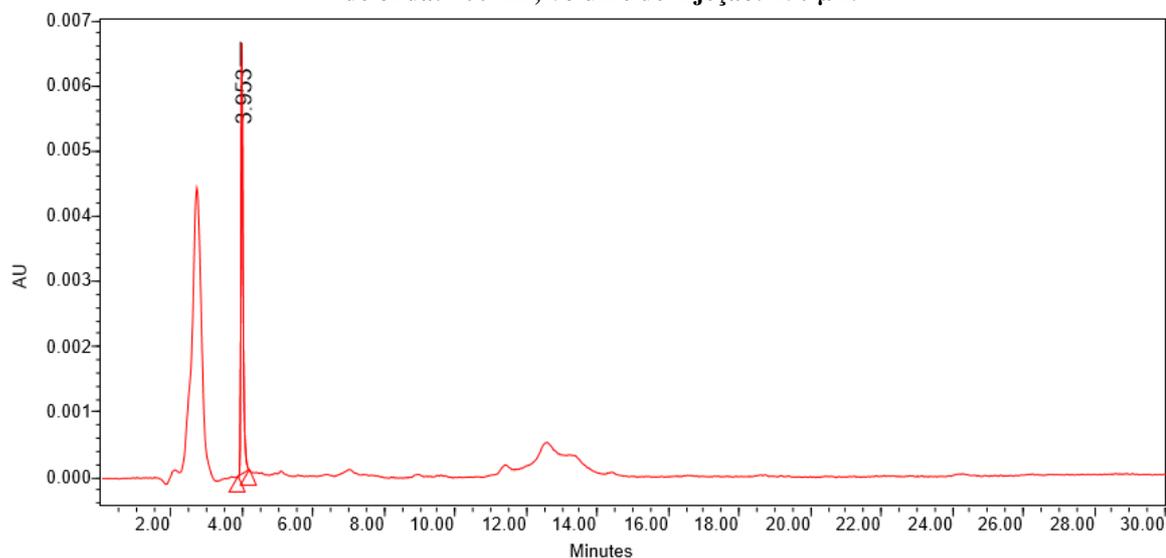


**Peak Results**

	Name	RT	Area	Height	Amount	Units
1		3.913	18345	3210		

**Figura 49 - Cromatograma obtido na realização do teste de efeito matriz com o padrão de acrilamida em uma concentração de 75 µg / kg.**

**Condições cromatográficas: fase móvel: água / acetonitrila (95:5, v/v); fluxo: 1,0 mL / min; comprimento de onda: 200 nm; volume de injeção: 150 µL.**



**Peak Results**

	Name	RT	Area	Height	Amount	Units
1		3.953	27660	6359		

### 5.3.6 Precisão Intermediária

Baseando-se em critérios estabelecidos a partir do valor de *HorRat*, encontramos 0,0144 indicando que o método apresenta precisão intermediária adequada em relação as duas colunas testadas, pois o critério de aceitabilidade é  $HorRat \leq 2,0$ .

### 5.3.7 Exatidão

Através do teste F, verificou-se que há homoscedasticidade das variâncias. Pois o F calculado foi 2,54, e é menor que o F crítico 6,39. A partir do resultado de que há homoscedasticidade entre as variâncias, realizou-se o teste *t*. Obtendo-se um *t* calculado de 1,42, inferior ao *t* crítico 2,132.

Sendo assim, a metodologia é considerada robusta.

#### 5.4 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE ACRILAMIDA EM ALIMENTOS E ESTIMATIVA DA EXPOSIÇÃO

A partir dos teores médios de acrilamida encontrados em cada tipo de batata frita foi possível determinar a exposição de acrilamida das crianças entrevistadas, tendo como base os dados obtidos nos questionários aplicados.

O peso médio das crianças em cada idade está descrito na tabela 12.

**Tabela 12 - Peso médio por idade**

<b>Idade</b>	<b>Peso Médio (kg)</b>
3	14,6
4	17,6
5	20,0
6	22,6
7	24,3
8	30,0
9	34,7
10	34,8
11	43,7
12	45,6
13	50,2
14	51,6

Nas tabelas 13, 14 e 15 é possível observar a quantidade em gramas, equivalente a cada medida caseira (porção), dos três diferentes tipos de batata analisadas (*chips*, palha e de *fast food*) argüidas nos questionários aplicados. Além disso, também verifica-se a quantidade de acrilamida em cada porção de batata frita.

A conversão das medidas caseiras para gramas foi realizada através de pesagem analítica realizada em triplicata.

Tabela 13 - Medida caseira X quantidade em gramas X teor de acrilamida em batata frita tipo *chips*

<b>Batata frita tipo <i>chips</i> medida caseira</b>	<b>Batata frita tipo <i>chips</i> Quantidade (g)</b>	<b>Acrilamida (µg)</b>
1 colher de sopa	4,5	3,7
2 colheres de sopa	9,0	7,4
3 colheres de sopa	13,5	11,0
Meio prato de sobremesa	17,0	13,9
Um prato de sobremesa	34,0	27,8
Mais de um prato de sobremesa	>34,0	>27,8

Tabela 14 - Medida caseira X quantidade em gramas X teor de acrilamida em batata frita tipo *palha*

<b>Batata frita tipo <i>palha</i> medida caseira</b>	<b>Batata frita tipo <i>palha</i> Quantidade (g)</b>	<b>Acrilamida (µg)</b>
1 colher de sopa	5,4	1,6
2 colheres de sopa	10,8	3,1
3 colheres de sopa	16,2	4,7
Meio prato de sobremesa	19,5	5,6
Um prato de sobremesa	39,0	11,3
Mais de um prato de sobremesa	>39,0	>11,3

Tabela 15 - Medida caseira X quantidade em gramas X teor de acrilamida em batata frita tipo *fast food*

<b>Batata frita tipo <i>fast food</i> medida caseira</b>	<b>Batata frita tipo <i>fast food</i> Quantidade (g)</b>	<b>Acrilamida (µg)</b>
1 colher de sopa	11,2	215,2
2 colheres de sopa	22,4	430,5
3 colheres de sopa	33,6	645,7
Meio prato de sobremesa	56,0	1.076,2
Um prato de sobremesa	112,0	2.152,5
Mais de um prato de sobremesa	>112,0	>2.152,5

A partir da quantidade em gramas de cada tipo batata frita consumida e do peso médio das crianças é possível estimar a exposição a acrilamida através deste alimento fonte a que as crianças estão sendo expostas.

Levando-se em consideração o consumo demonstrado no ítem 5.1.3 nas Figuras 29, 28 e 29, verificamos a seguinte estimativa de exposição infantil em  $\mu\text{g}$  acrilamida / kg PC em relação a ingestão de batatas tipo *chips* (Tabela 16).

**Tabela 16 – Estimativa da exposição infantil em  $\mu\text{g}$  acrilamida / kg PC em relação a ingestão de batatas tipo *chips***

<b>Idade</b>	<b><math>\mu\text{g}</math> acrilamida / kg PC</b>
3	0,25 – 1,90
4	0,21 – 1,58
5	0,19 – 1,39
6	0,16 – 1,23
7	0,15 – 1,14
8	0,12 – 0,93
9	0,11 – 0,80
10	0,11 – 0,80
11	0,08 – 0,64
12	0,08 – 0,61
13	0,07 – 0,55
14	0,07 – 0,54

Já em relação a ingestão de batatas tipo palha a exposição a acrilamida pode ser verificada na tabela 17.

**Tabela 17 - Estimativa da exposição infantil em  $\mu\text{g}$  acrilamida / kg PC em relação a ingestão de batatas tipo palha**

<b>Idade</b>	<b><math>\mu\text{g}</math> acrilamida / kg PC</b>
3	0,11 – 0,77
4	0,09 – 0,64
5	0,08 – 0,57
6	0,07 – 0,50
7	0,07 – 0,47
8	0,05 – 0,38
9	0,05 – 0,33
10	0,05 – 0,32
11	0,04 – 0,26
12	0,04 – 0,25
13	0,03 – 0,23
14	0,03 – 0,22

E por fim, a exposição a acrilamida através das batatas fritas vendidas em *fast food* está demonstrada na tabela 18.

**Tabela 18 - Estimativa da exposição infantil em  $\mu\text{g}$  acrilamida / kg PC em relação a ingestão de batatas tipo *fast food***

<b>Idade</b>	<b><math>\mu\text{g}</math> acrilamida / kg PC</b>
3	14,74 – 147,43
4	12,23 – 122,30
5	10,76 – 107,63
6	9,52 – 95,24
7	8,86 – 88,58
8	7,17 – 71,75
9	6,20 – 62,03
10	6,18 – 62,85
11	4,92 – 49,26
12	4,72 – 47,20
13	4,29 – 42,88
14	4,17 – 41,72

Ao observarmos no item 5.1.3 a Figura 17, observamos que 62,9% (334) das crianças consomem batata frita 1 vez por semana ou mais.

Se considerarmos as 38,8 % (206) das crianças que consomem uma vez por semana algum tipo de batata frita, obtemos a seguinte estimativa de exposição diária a acrilamida (tabelas 19, 20 e 21).

**Tabela 19 - Estimativa da exposição infantil em  $\mu\text{g}$  acrilamida / kg PC / dia em relação a ingestão de batatas tipo *chips***

<b>Idade</b>	<b><math>\mu\text{g}</math> acrilamida / kg PC / dia</b>
3	0,036 – 0,272
4	0,030 – 0,226
5	0,026 – 0,199
6	0,023 – 0,176
7	0,022 – 0,163
8	0,018 – 0,132
9	0,015 – 0,114
10	0,015 – 0,114
11	0,012 – 0,091
12	0,012 – 0,087
13	0,011 – 0,079
14	0,010 – 0,077

**Tabela 20 - Estimativa da exposição infantil em  $\mu\text{g}$  acrilamida / kg PC / dia em relação a ingestão de batatas tipo *palha***

<b>Idade</b>	<b><math>\mu\text{g}</math> acrilamida / kg PC / dia</b>
3	0,016 – 0,111
4	0,013 – 0,092
5	0,011 – 0,081
6	0,010 – 0,071
7	0,009 – 0,066
8	0,008 – 0,054
9	0,007 – 0,047
10	0,007 – 0,046
11	0,005 – 0,037
12	0,005 – 0,035
13	0,005 – 0,032
14	0,004 – 0,031

**Tabela 21 - Estimativa da exposição infantil em  $\mu\text{g}$  acrilamida / kg PC / dia em relação a ingestão de batatas tipo *fast food***

<b>Idade</b>	<b><math>\mu\text{g}</math> acrilamida / kg PC / dia</b>
3	2,11 – 21,06
4	1,75 – 17,47
5	1,54 – 15,38
6	1,36 – 13,61
7	1,27 – 12,65
8	1,02 – 10,25
9	0,89 – 8,86
10	0,88 – 8,84
11	0,70 – 7,04
12	0,67 – 6,74
13	0,61 – 6,13
14	0,60 – 5,96

## 6 DISCUSSÃO

A partir dos resultados obtidos nesta pesquisa foi possível verificar que as crianças estão expostas a uma quantidade bastante significativa de acrilamida proveniente apenas da ingestão de batatas fritas.

A exposição a acrilamida proveniente de batatas fritas tipo *chips* variou de 0,010 a 0,272  $\mu\text{g} / \text{kg PC} / \text{dia}$ . Já a exposição a acrilamida por batatas fritas tipo palha ficou entre 0,004 a 0,111  $\mu\text{g} / \text{kg PC} / \text{dia}$ . E por fim, a maior exposição a acrilamida pelas crianças é oriunda do consumo de batatas fritas vendidas em lanchonetes *fast foods*, representando uma variação de 0,60 a 21,06  $\mu\text{g} / \text{kg PC} / \text{dia}$ .

Observando estudos realizados ao redor do mundo, verificamos que nossas crianças consomem uma quantidade elevada de acrilamida em sua dieta.

Se levarmos em consideração que a OMS admite um consumo tolerável de 12  $\mu\text{g}$  de acrilamida / kg PC / dia, percebemos que crianças mais jovens e com um peso corporal menor, mas que consomem uma alta quantidade de batata frita em lanchonetes estão consumindo praticamente o dobro do tolerável apenas considerando o consumo dessas batatas fritas.

Foi muito comum nos questionários os pais responderem que levam as crianças a *fast foods* pelo menos 1 vez na semana, como uma rotina familiar.

Outra ponto importante observado no preenchimento dos questionários é que muitos pais relatavam que as crianças não consumiam batata frita na primeira página de perguntas, porém, ao virarem a página e serem questionados sobre cada tipo de batata frita, muitos deles admitiam que os filhos consumiam com regularidade batatas fritas tipo *chips* e palha. Isso foi observado, muito provavelmente, porque os pais não associam batatas fritas vendidas em saquinho como sendo batatas que foram fritas em óleo e embaladas para a venda. Possivelmente, os pais acreditam que por estarem em “embalagens comerciais” essas frituras sejam somente biscoitos.

Verificou-se também que as batatas de *fast food*, *chips* e palha são mais consumidas que as batatas fritas caseiras (batata *in natura*, cortada e frita em casa) e que as batatas compradas congeladas pré fritas (somente para serem fritas em casa). O maior consumo dessas batatas pode ser explicado pela facilidade de comprar batatas em saquinho (*chips* e palha) e de levar as crianças até lanchonetes (*fast food*),

que oferecem um grande apelo em suas propagandas e também se tornam programas de família.

Ao observarmos os estudos realizados em outros países, percebemos que cada estudo, estima a exposição a acrilamida de sua população em um alimento específico. Alimento este, geralmente escolhido, por ser representativo no consumo habitual da população estudada.

Este estudo procurou avaliar a exposição a acrilamida por crianças residentes no bairro da Tijuca, no município do Rio de Janeiro em relação ao consumo de pão francês e batata frita.

Os resultados encontrados para a determinação do teor de acrilamida em pão francês não foram satisfatórios. Mesmo com inúmeras modificações na metodologia aplicada, e várias etapas de otimização do método, não foi possível garantir a separação completa dos picos obtidos nos cromatogramas, e assim, não foi possível quantificarmos a acrilamida presente no pão. Para obtermos uma melhor separação, precisaríamos usar mais água na proporção da fase móvel, porém, nossa fase móvel já estava com o máximo de água suportado pela coluna cromatográfica (95 % de água e 5 % de acetonitrila). Aparentemente o pico encontrado em 4.236 minutos parece ser acrilamida, porém, para essa confirmação se faz necessário um outro método de identificação. A alternativa que utilizamos foi enriquecer a amostra com acrilamida, e este pico, aumentava, porém, como não houve uma separação adequada preferimos não afirmar que se tratava da acrilamida, pois poderiam haver dois picos ou mais sobrepostos.

Já em relação as análises realizadas nos três tipos de batatas fritas, observamos uma boa separação dos picos e uma boa extração da acrilamida para as análises. Tanto as condições de extração (peso da amostra e volume de metanol utilizado para extração) quanto as condições cromatográficas (cromatógrafo, coluna, fluxo, fase móvel, volume de injeção e comprimento de onda UV) foram alteradas diversas vezes, com a intenção de otimizar os resultados obtidos.

Vale ressaltar que o teor de acrilamida presente em batatas fritas de *fast food* foram bem maiores do que os teores encontrados em batatas *chips* e palha. É importante também destacar, que se levarmos em conta o resultado do teste de efeito matriz, a quantidade de acrilamida presente nessas amostras pode ser o dobro do encontrado.

Tanto para confecção da curva que avaliou a linearidade do método quanto para a análise das amostras, a concentração estudada de acrilamida é expressa em  $\mu\text{g} / \text{kg}$ , ou seja, em ppb. Como esta concentração é muito pequena e os picos obtidos nos cromatogramas ficam muito próximos a linha de base, para determinação da concentração de acrilamida, utilizou-se como parâmetro a altura do pico, e não sua área. Assim minimizam-se os possíveis erros da interferência da linha de base na área dos picos.

A quantidade de acrilamida presente nas diferentes marcas de cada tipo de batata frita, sugerem que diferentes processos de fabricação, podem gerar alimentos com um menor teor deste contaminante. Nas batatas tipo chips por exemplo, a marca mais barata apresentou um teor de acrilamida de  $1.665,95 \mu\text{g} / \text{kg}$ , enquanto a marca mais cara apresentou um teor de  $281,55 \mu\text{g} / \text{kg}$  e a marca mais popular (conhecida) apresentou um teor de  $504,04 \mu\text{g} / \text{kg}$ . Esses resultados podem demonstrar que fábricas com um processo de fabricação com mais controle, podem produzir batatas com menos acrilamida. Portanto, é de grande importância que providências sejam tomadas, com a finalidade de divulgar e incentivar as indústrias a fabricarem produtos com a menor quantidade possível de acrilamida.

Procedimentos simples podem resultar na mitigação de acrilamida, como por exemplo a escolha de variedades de batata com menos quantidades de açúcares. Além de existir a possibilidade do uso da enzima asparaginase, plantação em solos específicos, controle no processo de estocagem, um processo de fritura que não gere calor excessivo e submeter as batatas a um processo de branqueamento. Certamente alguns desses procedimentos podem gerar alterações relevantes no perfil sensorial dos alimentos, o que desencorajaria as indústrias a utilizá-los. Porém, se houvesse uma recomendação do teor máximo de acrilamida que cada tipo de alimento poderia conter, possivelmente os fabricantes se esforçariam para adequar sua produção à legislação e ao mesmo tempo agradar ao consumidor com um produto sadio.

Sendo o primeiro estudo direcionado à população infantil produzido no Brasil, esta pesquisa procurou colaborar para que seja possível traçar um perfil de consumo de acrilamida pela população brasileira, em especial o consumo pelas crianças.

É necessário que novas pesquisas, com grupos etários específicos e alimentos largamente consumidos pela população brasileira sejam realizadas, para que se possa traçar um panorama nacional da exposição alimentar à acrilamida pela

população brasileira. Correlacionando os dados de exposição obtidos em novos trabalhos com as pesquisas toxicológicas que demonstram o potencial nocivo dessa substância espera-se que as autoridades se atentem para a necessidade de uma legislação, cartilha ou ao menos um manual com orientações para que a presença de acrilamida em produtos nacionais seja minimizada.

## 7 PERSPECTIVAS

Espera-se que as informações geradas nesta tese possam contribuir para avaliações de risco realizadas ao redor do mundo, além de permitir uma melhor compreensão da distribuição de acrilamida em alimentos de diferentes países.

A avaliação efetiva da exposição à acrilamida pela população infantil tende a gerar dados que contribuam para que políticas públicas sejam fortalecidas e possuam embasamento para interferir e determinar que a fabricação de alimentos industrializados sejam realizadas de maneira a diminuir o teor deste contaminante. Contribuindo assim, com a Vigilância Sanitária, para que a informação seja disseminada e que a cooperação das indústrias e do consumidor de maneira geral possa ser efetiva.

## REFERÊNCIAS

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

ARISSETO, A. P. et al. Determination of acrylamide levels in selected foods in Brazil. **Food Addit Contam.** v. 24, n. 3, p. 236-41, Mar. 2007.

ARISSETO, A. P.; TOLEDO, M. C. F. Estimativa preliminar da ingestão de acrilamida no Brasil. **Rev. Bras. Toxicol.** v. 21, n.1, p. 9-14, 2008.

BAZÍLIO, F. S. et al. Uso de planilha eletrônica na verificação da adequação de curva analítica ao modelo linear. **Revista Analytica**. Brasil. n. 59, p. 60-67, 2012.

BECALSKI, A. et al. Acrylamide in foods: occurrence, sources, and modelling. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 51, n. 3, p. 602-608, 2003.

BJELLAAS T, et al. Determination and quantification of urinary metabolites after dietary exposure to acrylamide. **Xenobiotica**. v. 35, n. 10-11, p. 1003-18. Oct-Nov. 2005.

BOETTCHER, M.I.; BOLT, H.M.; ANGERER, J. Acrylamide exposure via the diet: influence of fasting on urinary mercapturic acid metabolite excretion in humans. **J. Arch Toxicol.** v. 80, p. 817, 2006.

BOMFIM, M.V.J., **Avaliação Sanitária de Filmes de Poliamida (Nylon 6) em Embalagens Acondicionantes de Alimentos Gordurosos**. 2008. 80p. Dissertação de Mestrado – INCQS, Rio de Janeiro, 2008.

BRASIL. Resolução nº 105, de 19 de maio de 1999. Aprova os regulamentos técnicos e disposições gerais para embalagens e equipamentos plásticos em contato com alimentos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília, DF, 20 de maio de 1999.

BRASIL. Portaria MS 2914, de 12 de dezembro de 2011. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília, DF, 14 de dezembro de 2011.

BROWN, M.B.; FORSYTHE, A.B. Robust tests for the equality of variances. **Journal of The American Statistical Association**. v. 69, p. 364-67, 1974.

CAC (**Codex Alimentarius Commission**). Code of Practice for the reduction of acrylamide in foods. CAC/RCP 67-2009.

CASTLE, L., ERIKSSON, S. Analytical methods used to measure acrylamide concentrations in foods. **Journal of the AOAC International**, Gaithersburg, v.88, n.1, p.274-284, 2005.

CCFAC (Codex Committee on Food Additives and Contaminants). Proposal for a new work on a Code of Practice for the reduction of acrylamide in food. In: **Report of the 38th Session of the Codex Committee on Food Additives and Contaminants**, The Hague, The Netherlands, 2006. p.233.

CENGIZ, M.F.; GÜNDÜZ C.P. An eco-friendly, quick and cost effective method for the quantification of acrylamide in cereal based baby foods. Wiley Online Library. **Journal of the science of food and agriculture**. v. 94, p. 2534–2540, 2014.

CENGIZ, M.F.; GÜNDÜZ C.P. Acrylamide exposure among Turkish toddlers from selected cereal-based baby food samples. Elsevier. **Food and Chemical Toxicology**. v. 60, p. 514-519, 2013.

CIAA (**Confédération des Industries Agro-Alimentaires de l'Union Européenne**). Acrylamide Toolbox 2011. Disponível em: [http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/contaminants/ciaa\\_acrylamide\\_toolbox\\_09.pdf](http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/contaminants/ciaa_acrylamide_toolbox_09.pdf).

CHAROENPANICH J. et al. Determination of acrylamide in Thai-conventional snacks from Nong Mon market, Chonburi using GC-MS technique. **Food Additives and Contaminants**. v. 5, n. 1, p. 20-28. Março, 2012.

Comunidade Europeia. Regulamento (EU) N<sup>o</sup> 10/2011 da Comissão de 14 de Janeiro de 2011 relativo aos materiais e objetos de matéria plástica destinados a entrar em contato com os alimentos. **Jornal Oficial da União Europeia**.

DEARFIELD, KL. et al. Acrylamide: its metabolism, developmental and reproductive effects, genotoxicity, and carcinogenicity. **Mutat Res**. v. 195, n. 1, p. 45–77, Jan. 1988.

DELGADO-ANDRADE, C. et al. Assessment of acrylamide intake of Spanish boys aged 11– 14 years consuming a traditional and balanced diet. **LWT. Food Science and Technology**. v. 46, p. 16-22, 2012.

DÍAZ, C. I. P. **Reducción del contenido de acrilamida en pan tipo hallulla mediante la incorporación de asparaginasa**. Faculdade de Ciências Químicas e Farmacêuticas. Universidade do Chile. 82 p. Santiago, 2015.

DRAPER, N. R.; SMITH, H. **Applied regression analysis**. 3. Ed. Washington: Wiley, 1998.

DURBIN, J.; WATSON, G.S. Testing for serial correlation in least squares regression ii. **Biometrika**, v. 38, p 159-178, 1951.

DYBING, E. et al. Human exposure and internal dose assessments of acrylamide in food. **Food Chem Toxicol**. v. 43, n. 3, p. 365-410, Nov. 2005.

EFSA CONTAM Panel (**EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain**). 2015. Scientific opinion on acrylamide in food. **EFSA J**. 13:321. 4104.

ERKEKOĞLU, P.; BAYDAR T. Toxicity of acrylamide and evaluation of its exposure in baby foods. Cambridge Univ Press. **Nutrition research reviews**. v. 23, p. 323-333, 2010.

FAUHL, C. et al. Acrylamide interlaboratory study, 2002. Disponível em: <[http://www.bfr.bund.de/cm/245/proficiency\\_testing\\_studie.pdf](http://www.bfr.bund.de/cm/245/proficiency_testing_studie.pdf)>. Acesso em: 24 jan.2012.

FDA (**Food and Drug Administration**). Exploratory data on acrylamide in food, 2002. Disponível em: <<http://www.cfsan.fda.gov/~dms/acrydata.html>>. Acesso em: 25 jan.2012.

FDA (**Food and Drug Administration**). Draft: detection and quantitation of acrylamide in foods, 2003. Disponível em: <<http://vm.cfsan.fda.gov/~dms/acrylami.html>>. Acesso em: 16 jan.2012.

FDA (**Food and Drug Administration**). Exploratory data on acrylamide in food: most recently data, 2005. Disponível em: <<http://www.cfsan.fda.gov/~dms/acrydata.html>>. Acesso em: 16 jan.2012.

FOGLIANO, V. et al. Acrylamide mitigation strategies: critical appraisal of the FoodDrinkEurope toolbox. **Food & Function**. v. 7. p. 2516-2525, 2016.

FRIEDMAN, M.; LEVIN, CE. Review of methods for the reduction of dietary content and toxicity of acrylamide. **J Agric Food Chem**. v. 56, n. 15, p. 6113-40, Ago. 2008.

FRIEDMAN, M. Chemistry, biochemistry, and safety of acrylamide. A review. **J Agric Food Chem**. v. 51, n. 16, p. 4504-26, Jul. 2003.

FRIEDMAN, M.A.; DULAK, L.H.; STEDHAM, M.A. A lifetime oncogenicity study in rats with acrylamide. **Fundam Appl Toxicol**. v. 27, n. 1, p. 95-105, Ago. 1995.

GOVAERT, Y. et al. Optimisation of a liquid chromatography–tandem mass spectrometric method for the determination of acrylamide in foods. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v.556, n.2, p.275-280, 2006.

GOKMEN, V.; SENYUVA H. Z., Interference-free determination of acrylamide in potato and cereal-based food by a laboratory validated liquid chromatography-mass spectrometry method. **Food Chemistry**. v. 97, p. 539-545, 2006

GOKMEN, V., et al. Determination of acrylamide in potato chips and crisps by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**. v.1088, p.193-199, 2005.

HOGERVORST, J. G. et al. The carcinogenicity of dietary acrylamide intake: a comparative discussion of epidemiological and experimental animal research. **Crit Rev Toxicol**. v. 40, n. 6, p. 485-512, Jul. 2010.

HOGERVORST, J. G. et al. A prospective study of dietary acrylamide intake and the risk of endometrial, ovarian, and breast cancer. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**. v. 16, n. 11, p. 2304-13, Nov. 2007.

IARC (International Agency for Research on Cancer). In: Monographs on the evaluation of carcinogenic risks of chemicals to humans, vol. 60, p. 389, Lyon, 1994.

IBGE, 2005 (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). Pesquisa de orçamentos familiares 2002-2003: Consumo alimentar domiciliar per capita. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>.

INCQS - INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE. POP **65.3120.126**: Validação de Metodologia com Determinação através de curva analítica linear. Ver. 4. Rio de Janeiro, 2015. 24p. (Manual de qualidade. Seção 4.3).

INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial). DOQ-CGCRE-008 rev. 05. Orientação sobre validação de métodos analíticos. Rio de Janeiro, 2016.

JACKSON, L. S., AL-TAHER, F. Effects of consumer food preparation on acrylamide formation. *Adv Exp Med Biol.* v. 561, p. 447-65, 2005.

JÁUREGUI, A. M. M. La acrilamida en el procesamiento de los alimentos. **Rev Soc Quim Perú.** 81 (1). 2016.

JOHNSON, K. A. et al. Chronic toxicity and oncogenicity study on acrylamide incorporated in the drinking water of Fischer 344 rats. **Toxicol Appl Pharmacol.** v. 85, n. 2, p. 154-68, Set. 1986.

KONINGS E. J. et al. Acrylamide exposure from foods of the 553 Dutch population and an assessment of the consequent risks. **Food Chem Toxicol.** v. 554 n. 41. p. 1569-79, 2003.

KONINGS E. J. et al. Validation of database on acrylamide for use in epidemiological studies. *Eur J Clin Nutr.* v.64 (05). p. 534-40. 2010.

LASSO, J. J. V. et al. Determinación de acrilamida en el procesamiento de la panela por cromatografía líquida. **Revista Ciencia en Desarrollo.** v. 5, n. 2, p. 99-105, 2014.

LEVENE, H. Robust tests for equality of variances. In: OLKIN, I; et al. (Ed.). **Contributions to probability and statistics.** Stanford University Press, 278-92, 1960.

LOFSTEDT, R. E. Science communication and the Swedish acrylamide "alarm". **J Health Commun.** v. 8, n. 5, p. 407-32, Set-Out. 2003.

MUCCI, L. A. et al. Dietary acrylamide and cancer of the large bowel, kidney, and bladder: absence of an association in a population-based study in Sweden. **Br J Cancer.** v. 88, n. 1, p. 84-9, Jan. 2003.

MUCCI, L. A.; WILSON K. A. Acrylamide intake through diet and human cancer risk. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 56, n. 15, p. 6013–6019, 2008.

MILLER, J. C.; MILLER, J. N. Error in instrumental analysis; regression and correlation. In: \_\_\_\_\_. **Statistic for analytical chemistry**. 3rd ed. Chichester: Ellis Horwood. Chapter v.5, p. 101-141, 1993.

NFCA (Norwegian Food Control Authority). Assessment of cancer risk due to acrylamide intake from coffee consumption. In: Report from the Scientific Committee of the Norwegian Food Control Authority, 2002. Disponível em: [http://snt.mattilsynet.no/nytt/tema/Akrylamid/RA\\_coffee.pdf](http://snt.mattilsynet.no/nytt/tema/Akrylamid/RA_coffee.pdf).

OLESEN, P. T. et al. Acrylamide exposure and incidence of breast cancer among postmenopausal women in the Danish Diet, Cancer and Health Study. **Int J Cancer**. v. 122, n. 9, p. 2094-100, Mai. 2008.

PALEOLOGOS, E. K.; KONTOMINAS, M. G. Determination of acrylamide and methacrylamide by normal phase high performance liquid chromatography and UV detection. **Journal of Chromatography A, Amsterdam**, v.1077, n.2, p.128-135, 2005.

PAULSSON, B. et al. The multiplicative model for cancer risk assessment: applicability to acrylamide. **Carcinogenesis**. v. 22, n. 5, p. 817-9, Mai. 2001.

PEDRESCHI, F. MARIOTTI M. S.; GRANBY K. Current issues in dietary acrylamide: formation, mitigation and risk assessment. Wiley Online Library. **Journal of the science of food and agriculture**. v. 94, p. 9-20, 2014.

PÉRIZ, M. E. Evaluación del riesgo de exposición alimentaria a acrilamida en España. Tese de doutorado. **Vniversitat de València**. 304 p., 2015.

PFEFFERLE, A., et al. Acrylamide in a fried potato dish (rösti) from restaurants in Zurich, Switzerland. **Food Additives & Contaminants**, v. 9, n. 1, p. 21-26, 2016.

PINGARILHO, M. et al. Induction of sister chromatid exchange by acrylamide and glycidamide in human lymphocytes: Role of polymorphisms in detoxification and DNA-repair genes in the genotoxicity of glycidamide. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis - Elsevier**. v 752, p1-7. 2013.

ROSÉN, J.; HELLENÄS, K. E. Analysis of acrylamide in cooked foods by liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Analyst, Cambridge**, v.127, n.7, p.880-882, 2002.

RYAN, T.A.; JOINER, B.L. Normal probability plots and tests for normality. The State College: **Pennsylvania State University**, 1976.

RYDBERG, P. et al. Investigations of factors that influence the acrylamide content of heated foodstuffs. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.51, n.24, p.7012-7018, 2003.

SALAZAR, R., et al. Acrylamide Content in Tortilla Chips Prepared From Pigmented Maize Kernels. **Revista Mexicana de Ingeniería Química**. v. 15, n. 1, p. 69-78, 2016.

SANTACANA, M. O. et al. Acrylamide and Glycidamide Hemoglobin Adducts and Epithelial Ovarian Cancer: A Nested Case–Control Study in Nonsmoking Postmenopausal Women from the EPIC Cohort. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**. v 10, 2015.

SANTOS, J. T. T. Avaliação do potencial mutagênico de uma membrana regeneradora de tecido através do teste de micronúcleo. **Universidade Estadual da Paraíba**. Campo Grande – PB – 2015.

SENYUVA, H. Z.; GÖKMEN, V. Study of acrylamide in coffee using an improved liquid chromatography mass spectrometry method: investigations of color changes and

acrylamide formation in coffee during roasting. **Food Additives and Contaminants**, Oxon, v. 22, n. 3, p. 214-220, 2005 a.

SEGERBÄCK, D. et al. Formation of N-7-(2-carbamoyl-2-hydroxyethyl)guanine in DNA of the mouse and the rat following intraperitoneal administration of [<sup>14</sup>C]acrylamide. **Carcinogenesis**. v. 16, n. 5, p. 1161-5, Mai. 1995.

SIROT, V. et al. Dietary acrylamide exposure of the French population: Results of the second French Total Diet Study. **Food and Chemical Toxicology**. v. 50, p. 889–894, 2012.

SNFA (**Swedish National Food Administration**). Acrylamide in food, 2002. Disponível em: <[http://www.slv.se/templates/SLV\\_DocumentList.aspx?id=4089](http://www.slv.se/templates/SLV_DocumentList.aspx?id=4089)>. Acesso em: 25 Jan 2012.

SOPH (**Swiss Office of Public Health**). Assessment of acrylamide intake by duplicate diet study, 2002. Disponível em: <http://www.bag.admin.ch/verbrau/aktuell/d/DDS%20acrylamide%20preliminary%20communication.pdf>.

SOUZA S. V. C. **Procedimento para validação intralaboratorial de métodos de ensaio: delineamento e aplicabilidade em análises de alimentos**. 2007. 296 f. tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.

SUMNER S. C. et al. Role of cytochrome P450 2E1 in the metabolism of acrylamide and acrylonitrile in mice. **Chem Res Toxicol**. v. 12, n. 11, p.1110-6. Nov. 1999.

TAREKE, E. et al. Acrylamide: a cooking carcinogen? **Chem Res Toxicol**. v. 13, n. 6, p. 517-22, Jun. 2000.

TAREKE, E. et al. Analysis of acrylamide, a carcinogen formed in heated foodstuffs. **J Agric Food Chem**. v. 50, n. 17, p. 4998-5006, Ago. 2002.

TAKATSUKI, S. et al. Determination of acrylamide in processed foods by LC-MS using column switching. *Journal of the Food Hygienic Society of Japan, Hokkaido*, v.44, n.2, p.89-95, 2003.

TATEO, E.; BONONI, M. A GC-MS method for the routine determination of acrylamide in food. *Italian Journal of Food Science*, Pinerolo, v.15, n.1, p.149-151, 2003.

TAUBERT, D., HARLFINGER, S., HENKES, L., BERKELS, R., SCHÖMIG, E. Influence of processing parameters on acrylamide formation during frying of potatoes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Washington, v.52, n.9, p.2735-2739, 2004.

TYL, R. W. et al. Relationship between acrylamide reproductive and neurotoxicity in male rats. *Reproductive Toxicology*. v. 14, p.147-157, 2000.

UK FSA (**United Kingdom Food Standards Agency**). Food Standards Agency study of acrylamide in foods: background information and research findings, 2002. Disponível em: <http://www.food.gov.uk/multimedia/pdfs/acrylamideback.pdf>.

US EPA (**United States Environmental Protection Agency**). Acrylamide, document EPA 749-F-94-005. In: *Chemicals in the environment*, 1994. Disponível em: [http://www.epa.gov/chemfact/f\\_acryla.txt](http://www.epa.gov/chemfact/f_acryla.txt)>. Acesso em: 17 abr.2012.

VINHAS, A. M. Exposição Alimentar à Acrilamida: Uma revisão sistemática. **Universidade Federal do Rio Grande do Sul**. Faculdade de Medicina. Curso de Nutrição. Porto Alegre, 2011.

VIRK-BAKER, MK., NAGY, TR., BARNES, S., GROOPMAN, J. Dietary Acrylamide and Human Cancer: A Systematic Review of literatures. *Nutrition and Cancer*. v. 66, n. 5, p. 774-790, 2014.

WENZL, T.; DE LA CALLE, M. B.; ANKLAM, E. Analytical methods for the determination of acrylamide in food products: a review. **Food Additives and Contaminants**, Oxon, v.20, n.10, p.885-902, 2003.

WILSON, K. M. et al. Acrylamide exposure measured by food frequency questionnaire and hemoglobin adduct levels and prostate cancer risk in the Cancer of the Prostate in Sweden Study. **International Journal of Cancer**. v. 124, p. 2384–2390, 2009a.

WILSON, K. M. et al. Dietary acrylamide intake and risk of premenopausal breast cancer. **American Journal of Epidemiology**. v. 169, p. 954-961, 2009b.

WILSON, K. M. et al. Validation of a food frequency questionnaire measurement of dietary acrylamide intake using hemoglobin adducts of acrylamide and glycidamide. **Cancer Causes Control**. v. 20, n. 3, p. 269-78, Apr. 2009.

World Health Organization. (2005) Summary Report of the Sixty-Fourth Meeting of the Joint **FAO/WHO** Expert Committee on Food Additive (JECFA). Rome, Italy. The ILSI Press International Life Sciences Institute, Washington DC. pp. 1–47.

WYKA, J. et al. Estimation of dietary exposure to acrylamide of Polish teenagers from an urban environment. Elsevier. **Food and Chemical Toxicology**. v. 75, p. 151–155, 2014.

YAN HE. et al. LC-MS/MS determination of acrylamide in instant noodles from supermarkets in the Hebei province of China. **Food Additives and Contaminants**, v. 5, n. 2, p. 100-104. Jun. 2012.

YASUHARA, A. et al. Gas chromatographic investigation of acrylamide formation in browning model systems. **J Agric Food Chem**. v. 51, n. 14, p. 3999-4003, Jul. 2003.

ZAJAC, J. et al. Dietary acrylamide exposure in chosen population of South Poland. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**. v. 20, 2013.

ZHANG, Y.; ZHANG, G.; ZHANG, Y. Occurrence and analytical methods of acrylamide in heated-treated foods: review and recent developments. **Journal of Chromatography A, Amsterdam**, v.1075, n.1-2, p.1-21, 2005.

## APÊNDICE A – Questionário “Avaliação da exposição efetiva a acrilamida por crianças pré-escolares e escolares residentes no município do Rio de Janeiro”



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde



**INCQS**

“Avaliação da exposição efetiva a acrilamida por crianças pré-escolares e escolares residentes no município do Rio de Janeiro”

Nome da criança: \_\_\_\_\_

Escola: \_\_\_\_\_

Série: \_\_\_\_\_

Data de Nascimento: \_\_\_\_\_

Sexo: ( ) Masculino ( ) Feminino

Peso da criança: \_\_\_\_\_

Altura da criança: \_\_\_\_\_

1 - A criança consome pão francês (também conhecido como pão de sal)?

SIM  NÃO (neste caso passe para a pergunta 4)

2 - Quantos pães franceses a criança consome por dia?

Zero  Meio pão  1 pão  2 pães  3 pães  4 pães ou mais

3 - Caso a criança não consuma pão francês diariamente, qual é a frequência que ela consome este alimento? E qual a quantidade que ela consome por vez?

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

4 - A criança consome batata frita? (Obs. O interesse desta pergunta é saber se a criança consome batatas fritas em óleo ou em qualquer outro tipo de gordura)

SIM (neste caso siga para a pergunta 5)  NÃO (neste caso o questionário acaba aqui)

5 - Quantas vezes na semana a criança consome algum tipo de batata frita?

1  2  3  4  5  6  7

Outra frequência Especificar: \_\_\_\_\_

6 – Quais os tipos de batatas fritas que a criança consome? (marque quantas alternativas forem necessárias)

Batata frita caseira (batata in natura, cortada e frita em casa) – responda pergunta 7

Batata frita congelada (batata comprada já cortada e congelada no supermercado e frita em casa) – responda pergunta 8

Batata frita de lanchonetes e restaurantes Fast Food – responda pergunta 9

Batata palha – responda pergunta 10

Batata tipo Rufles, Pringles, Layes, etc. – responda pergunta 11

7 - Qual a quantidade de **batata frita caseira** (batata in natura, cortada e frita em casa) que a criança consome por vez, ou seja, em uma refeição?

1 colher de sopa

2 colheres de sopa

3 colheres de sopa

Meio prato de sobremesa

1 prato de sobremesa

Mais de 1 prato de sobremesa

8 - Qual a quantidade de **batata frita congelada** (batata comprada já cortada e congelada no supermercado e frita em casa) que a criança consome por vez, ou seja, em uma refeição?

1 colher de sopa

2 colheres de sopa

3 colheres de sopa

Meio prato de sobremesa

1 prato de sobremesa

Mais de 1 prato de sobremesa

9 - Qual a quantidade de **batata frita de lanchonetes e restaurantes Fast Food** que a criança consome por vez, ou seja, em uma refeição?

1 colher de sopa

2 colheres de sopa

3 colheres de sopa

Meio prato de sobremesa

1 prato de sobremesa

Mais de 1 prato de sobremesa

10 - Qual a quantidade de **batata palha** que a criança consome por vez, ou seja, em uma refeição?

1 colher de sopa

2 colheres de sopa

3 colheres de sopa

Meio prato de sobremesa

1 prato de sobremesa

Mais de 1 prato de sobremesa

11 - Qual a quantidade de **batata tipo Rufles, Pringles, Layes, etc.** que a criança consome por vez, ou seja, em uma refeição?

1 colher de sopa

2 colheres de sopa

3 colheres de sopa

Meio prato de sobremesa

1 prato de sobremesa

Mais de 1 prato de sobremesa

## APÊNDICE B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

**Instituto Nacional de Controle de Qualidade em**

**Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**



Caro (a) Senhor (a),

Eu, Shirley de Mello Pereira Abrantes, pesquisadora da FIOCRUZ, departamento de química, do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), Avenida. Brasil nº 4365, Manguinhos, shirley.abrantes@incqs.fiocruz.br, cujo telefone de contato é (21) 38655124, vou desenvolver uma pesquisa cujo título é “Avaliação da real exposição a acrilamida por crianças pré-escolares e escolares residentes no município do Rio de Janeiro”.

Gostaríamos de convidá-lo a participar desta pesquisa, cujo objetivo é determinar o consumo efetivo de acrilamida pela população pré-escolar e escolar do município do Rio de Janeiro, quantificando seus níveis em alimentos consumidos por esta população. A acrilamida é uma substância normalmente presente em pães, biscoitos, batatas fritas, dentre outros alimentos. A partir da determinação dos seus teores nos alimentos será possível relacionar esses dados com publicações existentes sobre os riscos e os danos à saúde de crianças.

O controle dos níveis de acrilamida nos alimentos, é um grande desafio da Saúde Pública, e é de fundamental importância devido aos riscos toxicológicos associados ao consumo dessa substância. Deste modo, o presente projeto busca contribuir com a divulgação de dados e sugestões para que a presença da acrilamida seja minimizada ou eliminada nos alimentos durante a fabricação e o processamento. Além, da necessidade da melhoria dos hábitos alimentares e uma maior preocupação com os alimentos que são oferecidos as crianças, a fim de prevenir agravos à saúde da população, especialmente a população infantil.

Necessito que o Sr. (a) forneça informações a respeito de seu (sua) filho (a), cujas perguntas estão em anexo.

A participação do (a) seu (a) filho (a) nesta pesquisa é voluntária e não determinará qualquer risco ou desconforto, pois não mantere qualquer contato com ele (a), ficando a coleta dos dados restritos à entrevista.

A participação do (a) seu (a) filho (a) não trará qualquer benefício direto mas proporcionará um melhor conhecimento a respeito dos efeitos da ingestão de acrilamida sobre as crianças, que poderão beneficiar outras crianças ou, então, somente no final do estudo poderemos concluir a presença de algum benefício.

Informo que Sr (a) tem a garantia de acesso, em qualquer etapa do estudo, sobre qualquer esclarecimento de eventuais dúvidas. Se tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos - CEP Fiocruz / IOC Instituto Oswaldo Cruz / Fundação Oswaldo Cruz, situado na Avenida Brasil, 4.036 - sala 705 (Expansão) Manguinhos - Rio de Janeiro - RJ - CEP: 21.040-360 Tel.: (21) 3882-9011 e-mail: [cepfiocruz@ioc.fiocruz.br](mailto:cepfiocruz@ioc.fiocruz.br) - coordenação: Dr. José Henrique da Silva Pilotto e Dra. Maria Regina Reis Amendoeira

Também é garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo, punição ou atitude preconceituosa.

Garanto que as informações obtidas serão analisadas em conjunto com outras crianças, não sendo divulgada a identificação de nenhum dos participantes.

O Sr (a) tem o direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas e caso seja solicitado, darei todas as informações que solicitar.

Não existirá despesas ou compensações pessoais para o participante em qualquer fase do estudo. Também não há compensação financeira relacionada à participação do (a) seu (a) filho (a).

Eu me comprometo a utilizar os dados coletados somente para pesquisa e os resultados serão veiculados através de artigos científicos em revistas especializadas e/ou em encontros científicos e congressos, sem nunca tornar possível a identificação do (a) seu (a) filho (a).

Este termo de consentimento livre e esclarecido será feito em duas vias de igual teor, sendo uma disponibilizada ao senhor (a) e a outra ficará conosco.

### Consentimento Pós-informação

Acredito ter sido suficiente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo “Avaliação da real exposição a acrilamida por crianças pré-escolares e escolares residentes no município do Rio de Janeiro”.

Eu entendi a proposta da pesquisadora Shirley de Mello Pereira Abrantes e estou certo sobre a minha decisão em permitir a participação de meu (minha) filho (a) nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes.

Ficou claro também que a participação do (a) meu (minha) filho (a) é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso aos resultados e de esclarecer minhas dúvidas a qualquer tempo. Concordo voluntariamente em permitir a participação do (a) meu (minha) filho (a) deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidade ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido.

Nome da criança: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Data \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Assinatura do pai (mãe) ou responsável

Nome:

Endereço:

RG:

Fone:

\_\_\_\_\_

Data \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Assinatura da pesquisadora

\_\_\_\_\_

Data \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Assinatura da aluna de doutorado

## APÊNDICE C – Termo de assentimento ao menor



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde



**INCQS**

### Termo de assentimento ao menor

Você está sendo convidado para participar da pesquisa “Avaliação da real exposição a acrilamida por crianças pré-escolares e escolares residentes no município do Rio de Janeiro”.

A acrilamida pode estar presente em pães, batata frita, bolos e salgadinhos. Queremos saber quanto as crianças e jovens estão consumindo desses alimentos, para verificarmos se essa quantidade prejudica a saúde, pois a acrilamida é uma substância que pode ser tóxica para os seres humanos.

As crianças e jovens que irão participar dessa pesquisa têm de 3 (três) a 14 (quatorze) anos de idade.

Você não precisa participar da pesquisa se não quiser, é um direito seu, não terá nenhum problema se desistir.

A pesquisa será distribuída na sua escola. Para isso, será usado um questionário que deve ser preenchido com suas informações por seus responsáveis.

Caso aconteça algo errado, você pode nos procurar pelo telefone 38655124 da pesquisadora Shirley de Mello Pereira Abrantes.

Ninguém saberá que você está participando da pesquisa, não falaremos a outras pessoas, nem daremos a estranhos as informações que você nos der. Os resultados da pesquisa vão ser publicados, mas sem identificar as crianças que participaram da pesquisa. Quando terminarmos a pesquisa os resultados serão divulgados em revistas científicas.

Se você tiver alguma dúvida, você pode me perguntar ou a pesquisadora Maria Clara de Oliveira Pinheiro. Eu escrevi o telefone na parte de cima desse texto.

Em caso de esclarecimentos quanto a ética deste estudo, você pode entrar em contato com Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos - CEP FIOCRUZ/IOC Instituto Oswaldo Cruz / Fundação Oswaldo Cruz Avenida Brasil, 4.036 - sala 705 (Expansão) Manguinhos - Rio de Janeiro-RJ - CEP: 21.040-360 Tel.: (21) 3882-9011 e-mail: [cepfiocruz@ioc.fiocruz.br](mailto:cepfiocruz@ioc.fiocruz.br) - coordenação: Dr. José Henrique da Silva Pilotto e Dra. Maria Regina Reis Amendoeira

Este termo de assentimento será feito em duas vias iguais, sendo uma sua e a outra ficará conosco.

Eu \_\_\_\_\_ aceito participar da pesquisa “Avaliação da real exposição a acrilamida por crianças pré-escolares e escolares residentes no município do Rio de Janeiro” que tem o objetivo de determinar o consumo efetivo de acrilamida pela população infantil do município do Rio de Janeiro e quantificar seus níveis em alimentos consumidos pelas crianças e jovens. Entendi que posso dizer “sim” e participar, mas que, a qualquer momento, posso dizer “não” e desistir. Os pesquisadores tiraram minhas dúvidas e conversaram com os meus responsáveis.

Rio de Janeiro, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

\_\_\_\_\_  
Assinatura do menor

\_\_\_\_\_  
Assinatura da pesquisadora

## APÊNDICE D – Termo de Consentimento da Escola



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
Fundação Oswaldo Cruz



Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

**INCQS**

### Termo de Consentimento da Escola

Prezado (a),

Eu, Shirley de Mello Pereira Abrantes, pesquisadora titular em Saúde Pública da FIOCRUZ, venho solicitar autorização para que Maria Clara de Oliveira Pinheiro, aluna do Doutorado, desenvolva a pesquisa "Avaliação da real exposição a acrilamida por crianças pré-escolares e escolares residentes no município do Rio de Janeiro" sob minha orientação nesta escola.

O objetivo deste estudo é avaliar a presença e o consumo de acrilamida presente em pães e batatas fritas consumidos pelas crianças, determinando seus teores nesses produtos, tentar relacionar com dados de outras publicações e verificar se e em que quantidade o consumo de algum ou alguns deles trariam dano à saúde das crianças.

Para conhecermos a quantidade de pães e batatas fritas consumidos pelas crianças, pretendemos aplicar um questionário (modelo em anexo). As crianças levariam o questionário para a casa, entregando-o ao seu responsável, o qual, após respondê-lo, encaminharia ao professor, possibilitando-nos, assim, a coleta de dados e conseqüentemente sua análise. Junto com o questionário iria um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, elucidando aos responsáveis sobre a pesquisa e, confirmando ou não sua participação.

A participação da criança consiste apenas no preenchimento do questionário por seus responsáveis.

Em qualquer etapa do estudo a escola e os responsáveis têm a garantia de acesso ao trabalho feito para esclarecer dúvidas eventuais.

Caso haja alguma consideração sobre a ética da pesquisa poderá ser feito contato com o Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos - CEP Fiocruz / IOC Instituto Oswaldo Cruz / Fundação Oswaldo Cruz, situado na Avenida Brasil, 4.036 - sala 705 (Expansão) Manguinhos - Rio de Janeiro - RJ - CEP: 21.040-360 Tel.: (21) 3882-9011 e-mail: cepfiocruz@ioc.fiocruz.br - coordenação: Dr. José Henrique da Silva Pilotto e Dra. Maria Regina Reis Amendoeira.

Os responsáveis têm a liberdade de retirar a autorização a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo, punição ou atitude preconceituosa.

Garantimos que todas as informações obtidas serão analisadas em conjunto com outras crianças e nenhum participante será identificado.

Estamos à disposição para informações complementares.

Atenciosamente,

SHIRLEY DE MELLO PEREIRA ABRANTES  
Pesquisadora Titular em Saúde Pública

Departamento de Química do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde –  
INCQS – FIOCRUZ

Avenida Brasil no. 4365, em Manguinhos no Rio de Janeiro  
Telefone: (021) 38655124 / e-mail: [shirley.abrantes@incqs.fiocruz.br](mailto:shirley.abrantes@incqs.fiocruz.br)

### Consentimento Pós-informação

Acredito ter sido suficiente informado a respeito das informações sobre o estudo “Avaliação da real exposição a acrilamida por crianças pré-escolares e escolares residentes no município do Rio de Janeiro”.

Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes.

Ficou claro também que a participação do (s) alunos (s) é isenta de despesas e que a escola tem garantia do acesso aos resultados e de esclarecer minhas dúvidas a qualquer tempo. Concordo voluntariamente em permitir a participação desta escola neste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidade ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido.

\_\_\_\_\_

Assinatura do responsável da escola

Nome:

RG:

Data \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Assinatura da pesquisadora

Data \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Assinatura da aluna de mestrado

Data \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_