

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ALIMENTOS E NUTRIÇÃO

Juliana Silva Félix

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO
ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DE
CAPROLACTAMA EM SIMULANTES DE ALIMENTOS:
ESTUDO DE MIGRAÇÃO E EFEITO DA IRRADIAÇÃO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Alimentos e Nutrição da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Alimentos e Nutrição

Orientadora: Profa. Dra. Magali Monteiro da Silva

Co-Orientadora: Profa. Dra. Marisa Padula

ARARAQUARA – SP

2008

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ALIMENTOS E NUTRIÇÃO

Juliana Silva Félix

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO
ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DE
CAPROLACTAMA EM SIMULANTES DE ALIMENTOS:
ESTUDO DE MIGRAÇÃO E EFEITO DA IRRADIAÇÃO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Alimentos e Nutrição da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Alimentos e Nutrição

Orientadora: Profa. Dra. Magali Monteiro da Silva

Co-Orientadora: Profa. Dra. Marisa Padula

ARARAQUARA – SP

2008

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

Félix, Juliana Silva

F316d Desenvolvimento e validação de método analítico para determinação de caprolactama em simulantes de alimentos: estudo de migração e efeito da irradiação. / Juliana Silva Félix. – Araraquara, 2008.
120 f.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Alimentos e Nutrição

Orientador: Magali Monteiro da Silva

Co-orientador: Marisa Padula

1.Caprolactama. 2.Poliamida. 3.Validação de método analítico. I. Silva, Magali Monteiro da. , orient.. II. Padula, Marisa, co-orient. III. Título.

CDD 664

CAPES: 50700006

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Análise de Alimentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP) sob orientação da Profa. Dra. Magali Monteiro da Silva desta Universidade e sob co-orientação da Profa. Dra. Marisa Padula do Centro de Tecnologia de Embalagens (CETEA) - Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL).

Estágio de pesquisa, com bolsa CAPES-PDEE do “programa de doutorado no país com estágio no exterior”, foi desenvolvido no Laboratório de Química Analítica da Universidade de Zaragoza (UNIZAR), Espanha, sob orientação da Profa. Dra. Cristina Nerín.

O trabalho recebeu suporte financeiro da CAPES, com as bolsas de Doutorado e do PDEE, do PADC-FCF/UNESP e do Governo de Aragón através do Grupo GUIA.

*Com todo o meu amor
A meus pais,
Darcí e Neuza Félix*

*A meus irmãos,
Darcí Jr. e Andréa*

*Ao meu lindo sobrinho
Francisco Emanuel*

*“Perdoem a cara amarrada
Perdoem a falta de abraço
Perdoem a falta de espaço
Os dias eram assim”*

(Ivan Lins & Vítor Martins)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Profa. Dra. Magali Monteiro da Silva, pela orientação, apoio e discussões que brindaram durante o desenvolvimento desta Tese, que começou Dissertação de Mestrado, transformou-se em Tese de Doutorado, viajou à Espanha, retornou ao Brasil e rendeu prêmios e publicações. Agradeço pela confiança no meu trabalho e os bons e “maus” momentos de convivência e amizade. Sem você, nada disso teria se concretizado.

À Profa. Dra. Marisa Padula, co-orientadora e incentivadora de primeira hora, pelas discussões que nos renderam muitos frutos.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista e ao Departamento de Alimentos e Nutrição da FCF-UNESP.

À UNIPAC pelo fornecimento de todas as embalagens.

Ao Prof. Dr. José Eduardo Manzoli pelas irradiações das amostras, apoio e discussões, uma pessoa sempre disponível.

Ao IPEN-CTR pelas irradiações de todas as embalagens.

A la Profa. Dra. Cristina Nerín de La Puerta que confió en mi trabajo, aunque no me conocía, abrió las puertas de su laboratorio de Química Analítica en la Universidad de Zaragoza, para el desarrollo de una parte de mi Tesis. Agradezco también a los técnicos y estudiantes del laboratorio por el apoyo durante mi pasantía en España.

À Comissão Coordenadora deste Curso de Pós-Graduação, pela acolhida no Programa e pelo apoio durante estes quase cinco anos.

A todos os professores deste Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, às técnicas dos laboratórios, em especial à Elizene que acompanhou toda a parte prática de meu trabalho, ao Gilberto, que sempre estava disposto a emprestar tudo

que eu necessitava da secretaria, a todos os alunos e amigos do Departamento e a todos os funcionários que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento desta Tese.

À Profa. Dra. Janete Harumi Yariwake, ao Prof. Dr. José Eduardo Manzoli, à Profa. Dra. Maria Teresa de Alvarenga Freire, à Profa. Dra. Mary Rosa de Marchi, à Profa. Dra. Natália Soares Janzantti, ao Prof. Dr. Rodrigo Rodrigues Petrus e à Profa. Dra. Shirley de Mello Pereira Abrantes que estiveram dispostos em participar da Banca Examinadora desta Tese e oferecer brilhante contribuição com as devidas sugestões e correções.

Aos meus pais, irmãos, amigos e demais familiares que sempre acreditaram e acreditam no meu trabalho.

À CAPES, ao PADC-FCF/UNESP e ao Governo de Aragón através do Grupo GUIA pelas bolsas e financiamentos.

SUMÁRIO

Lista de Figuras.....	i
Lista de Tabelas.....	v
Resumo.....	viii
Abstract.....	x
INTRODUÇÃO.....	01
Referências Bibliográficas.....	05
OBJETIVOS.....	10
Capítulo 1. EMBALAGEM PLÁSTICA CONTENDO POLIAMIDA 6 PARA PRODUTOS CÁRNEOS E QUEIJOS: MIGRAÇÃO DE CAPROLACTAMA E EFEITO DA IRRADIAÇÃO	
Resumo.....	13
Introdução.....	14
Uso da poliamida como embalagens de alimentos.....	14
Carnes e aves.....	15
Queijos.....	16
Aspectos de legislação.....	17
Aspectos toxicológicos.....	19
Migração de caprolactama de embalagens de poliamida para alimentos e/ou simulantes de alimentos.....	21
Irradiação de alimentos e de embalagens de alimentos e seus efeitos sobre a migração de caprolactama.....	23
Considerações finais.....	25
Agradecimentos.....	26
Abstract.....	26
Referências bibliográficas.....	27

Capítulo 2. DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DE ϵ -CAPROLACTAMA EM SIMULANTE DE ALIMENTOS GORDUROSOS

Resumo.....	38
Introdução.....	38
Material e Métodos.....	39
Amostras e reagentes.....	39
Equipamento.....	39
Condições cromatográficas.....	39
Preparo das soluções.....	39
Validação do método analítico.....	39
Calibração e linearidade.....	39
Limite de detecção e limite de quantificação do método.....	39
Precisão e exatidão do método.....	39
Análise estatística.....	40
Resultados e discussão.....	40
Condições cromatográficas.....	40
Validação do método analítico.....	41
Curva de calibração e linearidade.....	41
Limite de detecção do método.....	42
Precisão e exatidão do método.....	43
Limite de quantificação do método.....	43
Conclusão.....	43
Abstract.....	43
Referências Bibliográficas.....	44
Errata.....	45

Capítulo 3. MIGRAÇÃO DE ϵ -CAPROLACTAMA DE EMBALAGENS CONTENDO POLIAMIDA 6 PARA SIMULANTE ÁCIDO ACÉTICO 3% E VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO

Resumo.....	47
Abstract.....	47
Introdução.....	47

Material e métodos.....	48
Resultados e discussão.....	48
Condições cromatográficas.....	48
Validação do método analítico.....	48
Seletividade.....	49
Curva de calibração e linearidade.....	49
Limite de detecção do método.....	49
Precisão e exatidão do método.....	50
Limite de quantificação do método.....	50
Migração.....	50
Conclusões.....	51
Agradecimentos.....	51
Referências bibliográficas.....	51
Errata.....	53

Capítulo 4. MIGRATION OF CAPROLACTAM FROM MULTILAYER POLYAMIDE 6 FILMS INTO FOOD SIMULANTS. DEVELOPMENT AND VALIDATION OF A GAS CHROMATOGRAPHIC METHOD

Abstract.....	55
Introduction.....	55
Experimental.....	57
Samples, chemicals and reagents.....	57
Instrumentation and Chromatographic conditions.....	57
Standard solutions.....	58
Validation.....	58
Migration.....	58
Results and discussion.....	59
Validation of the chromatographic method.....	59
Migration.....	60
Conclusions.....	62
Acknowledgements.....	63
References.....	63

Capítulo 5. EFFECT OF GAMMA IRRADIATION ON CAPROLACTAM MIGRATION FROM MULTILAYER POLYAMIDE 6 FILMS INTO FOOD SIMULANTS

Abstract.....	72
Introduction.....	72
Experimental.....	74
Chemicals and reagents.....	74
Samples.....	75
GC-FID Analysis.....	75
Irradiation.....	75
Migration.....	75
Results and discussion.....	76
Migration.....	76
Conclusions.....	79
Acknowledgements.....	79
References.....	79

Capítulo 6. IDENTIFICATION AND MIGRATION OF DEGRADATION COMPOUNDS FROM IRRADIATION OF MULTILAYER POLYAMIDE 6 FILMS FOR MEAT FOODSTUFFS AND CHEESE

Abstract.....	87
Introduction.....	87
Experimental.....	88
Chemicals and samples.....	88
Irradiation.....	88
Identification.....	88
SPME optimization.....	88
Validation.....	90
Migration.....	90
Results and discussion.....	91
Identification.....	91
Optimization.....	93
Validation.....	93
Migration.....	96

Conclusions.....	96
Acknowledgements.....	97
References.....	97
CONCLUSÕES.....	98
ANEXOS.....	102
Anexo 1.....	105
Anexo 2.....	107
Anexo 3.....	114
Anexo 4.....	116

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1. EMBALAGEM PLÁSTICA CONTENDO POLIAMIDA 6 PARA PRODUTOS CÁRNEOS E QUEIJOS: MIGRAÇÃO DE CAPROLACTAMA E EFEITO DA IRRADIAÇÃO**Figura 1** Estrutura da caprolactama..... 34**Capítulo 2. DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DE ϵ -CAPROLACTAMA EM SIMULANTE DE ALIMENTOS GORDUROSOS****Figura 1** Cromatogramas típicos obtidos por CG/DIC para: (a) branco (metanol), (b) solução de 2-azociclononano (9,4 μ g/g) em azeite de oliva (branco do simulante) e (c) solução padrão de ϵ -caprolactama e 2-azociclononano em azeite de oliva (10,63 e 9,4 μ g/g, respectivamente). Condições: Coluna capilar: DB-1701; Temperatura da coluna: 130°C por 1min, programada à 10°C/min até 170°C por 1min e à 10°C/min até 200°C por 2 min; Gás de arraste: Hidrogênio; Volume de injeção: 1 μ L; Modo de injeção: Split; Temperatura do injetor: 240°C; Temperatura do detector: 250°C..... 40**Figura 2** Curva de calibração de ϵ -caprolactama/2-azociclononano em azeite de oliva (concentração de ϵ -caprolactama/2-azociclononano: 0,20 a 1062,34 μ g/g e 9,4 μ g/g). ^aEquação da reta; ^bDesvio padrão; ^cCoefficiente de correlação; ^d Intervalo de confiança de 95%..... 41**Figura 3** Curva da razão área relativa/concentração relativa da ϵ -caprolactama e 2-azociclononano vs. log da concentração relativa da ϵ -caprolactama e 2-azociclononano, com intervalo de confiança de 95%..... 42

Capítulo 3. MIGRAÇÃO DE ϵ -CAPROLACTAMA DE EMBALAGENS CONTENDO POLIAMIDA 6 PARA SIMULANTE ÁCIDO ACÉTICO 3% E VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO

- Figura 1** Cromatograma típico da curva de calibração da ϵ -caprolactama e 2-azociclononana em solução de ácido acético 3%, obtido por CG/DIC (concentração da ϵ -caprolactama e do padrão interno: 8,00 e 14,00 μ g/mL, respectivamente). Condições cromatográficas de acordo com a Tabela 1..... 49
- Figura 2** Curva de calibração de ϵ -caprolactama/2-azociclononana em solução de ácido acético 3% (concentração: 1,6 a 640 μ g/mL). ^aEquação da reta; ^bDesvio padrão; ^cCoeficiente de correlação; ^d Intervalo de confiança de 95%..... 49
- Figura 3** Curva da razão área relativa/concentração relativa da ϵ -caprolactama e 2-azociclononana *versus* log da concentração relativa da ϵ -caprolactama e 2-azociclononana, com intervalo de confiança de 95%..... 49
- Figura 4** Cromatogramas típicos da quantificação da ϵ -caprolactama migrada de filmes contendo PA-6 para simulante solução de ácido acético 3%, obtidos por CG/DIC: a) marca 1 - produtos cárneos e b) marca 1 - queijos. Condições cromatográficas de acordo com a Tabela 1..... 51

Capítulo 4. MIGRATION OF CAPROLACTAM FROM MULTILAYER POLYAMIDE 6 FILMS INTO FOOD SIMULANTS. DEVELOPMENT AND VALIDATION OF A GAS CHROMATOGRAPHIC METHOD

- Figura 1** Area/concentration ratio of caprolactam/2-azacyclononane *versus* concentration of caprolactam/2-azacyclononane used in the calibration curve, expressed in logarithmic scale. Values inside dash lines are between confidence interval of 95%. (a) Water and (b) 15% ethanol food simulants..... 65

Figura 2 Typical chromatograms of caprolactam migrated from multilayer PA-6 films into water, 15% ethanol and olive oil, using GC-FID; (a) brand 6 for meat foodstuffs and (b) brand 2 for cheese. Conditions: Column temperature was held for 1 min at 130°C, programmed at 10°C/min to 170°C and held for 1 min, and then programmed at 10°C/min to 200°C and held for 2 min. Carrier gas: Hydrogen (1 mL/min). Injections (1 µL) were performed at 240°C in split mode (1:20). The detector temperature was 250°C..... 66

Capítulo 5. EFFECT OF GAMMA IRRADIATION ON CAPROLACTAM MIGRATION FROM MULTILAYER POLYAMIDE 6 FILMS INTO FOOD SIMULANTS

Figura 1 Typical chromatograms for caprolactam migration from irradiated and non-irradiated multilayer PA-6 films (brand 2), used for meat foodstuffs, into olive oil, using GC-FID. (a) Non-irradiated; (b) irradiated at 3 kGy and (c) irradiated at 7 kGy. Conditions: Column temperature was held for 1 min at 130°C, programmed at 10°C/min to 170°C and held for 1 min, and then programmed at 10°C/min to 200°C and held for 2 min. Carrier gas: Hydrogen (1mL/min). Injections (1µL) were performed at 240°C in split mode (1:20). The detector temperature was 250°C..... 83

Capítulo 6. IDENTIFICATION AND MIGRATION OF DEGRADATION COMPOUNDS FROM IRRADIATION OF MULTILAYER POLYAMIDE 6 FILMS FOR MEAT FOODSTUFFS AND CHEESE

Figura 1 Chromatograms obtained by headspace solid-phase microextraction (SPME) – gas chromatography – mass spectrometry, using polydimethylsiloxane fiber, from multilayer polyamide 6 films (sample M1) after irradiation with 0, 3 and 7 kGy. Numbered peaks are identified in Table 2..... 89

Figura 2 Chromatogram obtained for the 17 compounds shown in Table 2, using polydimethylsiloxane fiber and gas chromatography–flame ionization detection..... 92

Figura 3 Response surface methodology (RSM) total area graphics obtained from SPME optimization of 17 compounds shown in Fig. 2..... 92

Figura 4 RSM graphics obtained from SPME optimization for a diphenyl ether, b octanal, c 2-cyclopentylcyclopentanone, d caprolactam, e copaene and f caprylic ether at 225 rpm..... 93

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1. EMBALAGEM PLÁSTICA CONTENDO POLIAMIDA 6 PARA PRODUTOS CÁRNEOS E QUEIJOS: MIGRAÇÃO DE CAPROLACTAMA E EFEITO DA IRRADIAÇÃO

Tabela 1 Tipos de poliamida usadas como embalagens de alimentos..... 35

Tabela 2 Limite de migração específica estabelecidos para compostos utilizados na fabricação de PA destinadas ao contato com alimentos..... 36

Capítulo 2. DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DE ϵ -CAPROLACTAMA EM SIMULANTE DE ALIMENTOS GORDUROSOS

Tabela 1 Áreas dos picos referentes às soluções padrão de ϵ -caprolactama (CP) em diferentes concentrações e 2-azociclononano (PI) (9,4 $\mu\text{g/g}$) em azeite de oliva, obtidas por CG/DIC..... 41

Tabela 2 Quantidade de ϵ -caprolactama (ng) e áreas do pico de ϵ -caprolactama (CP) e 2-azociclononano (PI)* obtidas no ensaio de determinação experimental do limite de detecção. 42

Tabela 3 Avaliação da exatidão e da precisão intra e inter-ensaios do método para determinação de ϵ -caprolactama em azeite de oliva utilizando CG/DIC..... 43

Capítulo 3. MIGRAÇÃO DE ϵ -CAPROLACTAMA DE EMBALAGENS CONTENDO POLIAMIDA 6 PARA SIMULANTE ÁCIDO ACÉTICO 3% E VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO

Tabela 1 Parâmetros analíticos otimizados para determinação de ϵ -caprolactama em simulante solução de ácido acético 3% usando CG/DIC..... 48

Tabela 2 Avaliação da precisão intra e inter-ensaios e da exatidão do método para determinação da ϵ -caprolactama em simulante solução de ácido acético 3% utilizando CG/DIC..... 50

Tabela 3 Nível de ϵ -caprolactama (mg.Kg^{-1}) migrada de filmes contendo PA-6, usados como embalagens de produtos cárneos (marcas 1-8) e de queijos (marcas 1-5) para o simulante solução de ácido acético 3% durante 10 dias a 40°C..... 51

Capítulo 4. MIGRATION OF CAPROLACTAM FROM MULTILAYER POLYAMIDE 6 FILMS INTO FOOD SIMULANTS. DEVELOPMENT AND VALIDATION OF A GAS CHROMATOGRAPHIC METHOD

Tabela 1	Validation parameters for caprolactam analysis in water, 15% ethanol, 3% acetic acid and olive oil food simulants, using GC-FID.....	67
Tabela 2	Precision and accuracy of the method for determination of caprolactam in water and 15% ethanol food simulants.....	68
Tabela 3	Migration levels of caprolactam from multilayer PA-6 films, used for meat foodstuffs, into water, 15% ethanol, olive oil and 3% acetic acid food simulants (10 days at 40°C).....	69
Tabela 4	Migration levels of caprolactam from multilayer PA-6 films, used for cheese, into water, 15% ethanol, olive oil and 3% acetic acid food simulants (10 days at 40°C).....	70

Capítulo 5. EFFECT OF GAMMA IRRADIATION ON CAPROLACTAM MIGRATION FROM MULTILAYER POLYAMIDE 6 FILMS INTO FOOD SIMULANTS

Tabela 1	Migration levels (mg kg ⁻¹) of caprolactam from irradiated and non-irradiated multilayer PA-6 films, used for meat foodstuffs, into water, 3% acetic acid, 15% ethanol and olive oil food simulants (10 days at 40°C).....	84
Tabela 2	Migration levels (mg kg ⁻¹) of caprolactam from irradiated and non-irradiated multilayer PA-6 films, used for cheese, into water, 3% acetic acid, 15% ethanol and olive oil food simulants (10 days at 40°C).....	85

Capítulo 6. IDENTIFICATION AND MIGRATION OF DEGRADATION COMPOUNDS FROM IRRADIATION OF MULTILAYER POLYAMIDE 6 FILMS FOR MEAT FOODSTUFFS AND CHEESE

Tabela 1	Compounds identified in irradiated and non-irradiated multilayer polyamide 6 (PA-6) film samples, using headspace solid-phase microextraction (SPME) and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS).....	90
-----------------	--	----

Tabela 2	Peak areas of water standard solution compounds extracted by different SPME fibers and analyzed by gas chromatography-flame ionization detection, and chemical structure of the substances.....	91
Tabela 3	Validation parameters to determine the compounds studied in water food simulant by SPME-GC-MS.....	94
Tabela 4	Validation parameters to determine the compounds studied in 95% ethanol by GC-MS.....	95
Tabela 5	Levels of migration of compounds from irradiated and non-irradiated multilayer PA-6 films into water and 95% ethanol food simulants.....	96

RESUMO

A poliamida 6 (PA-6) é mundialmente usada como embalagem de alimentos, especialmente no acondicionamento de produtos cárneos e queijos, e seu emprego para contato com alimentos é permitido no Brasil, na Europa e nos Estados Unidos. A PA-6 também está autorizada para o uso em contato com alimentos pré-embalados que serão submetidos à irradiação. A caprolactama, monômero utilizado na fabricação da PA-6, permanece na resina após a polimerização e pode migrar para o alimento em contato. A irradiação de polímeros pode afetar a migração, mas também é capaz de originar compostos de degradação que podem migrar para o alimento em contato. Este trabalho teve como objetivos obter informações a respeito da migração da caprolactama de embalagens contendo PA-6 para o alimento em contato e do efeito da irradiação sobre a migração visando dar suporte às pesquisas experimentais; desenvolver e validar método analítico para determinar caprolactama em simulantes de alimentos; estudar a migração da caprolactama de filmes multicamada contendo PA-6, utilizados no acondicionamento de produtos cárneos e queijos, para os simulantes água destilada, solução de ácido acético 3%, solução de etanol 15% e azeite de oliva; avaliar o efeito da irradiação gama sobre a migração da caprolactama dos filmes multicamada contendo PA-6 para os diferentes simulantes de alimentos; desenvolver e validar método analítico para determinar compostos voláteis formados pela irradiação dos filmes multicamada contendo PA-6, assim como sua migração para os simulantes água destilada e solução de etanol 95%. O método analítico desenvolvido e validado, empregando a cromatografia gasosa com detector de ionização de chama (GC-FID), foi considerado sensível e eficiente, apresentando alta precisão e exatidão para determinar caprolactama nos simulantes água destilada, solução de ácido acético 3%, solução de etanol 15% e azeite de oliva, com a vantagem de tempo máximo de análise de 11 minutos. A faixa linear obtida para todos os simulantes estudados foi ampla, com coeficientes de correlação maiores que 0,9997. O limite de detecção da caprolactama em azeite de oliva foi de 0,10 µg/g e variou de 0,16 a 0,32 µg/mL para os demais simulantes, tendo sido obtida alta precisão para todas as injeções efetuadas ($CV \leq 5,5\%$) e recuperação de 89 a 112%. A migração da caprolactama dos filmes usados para produtos cárneos variou de 5,34 a 11,89 mg/kg e dos filmes usados para queijos variou de 1,03 a 7,59 mg/kg, para todos os simulantes estudados. Houve redução na migração de caprolactama com o aumento da dose de irradiação para filmes usados no acondicionamento de produtos cárneos, enquanto a migração de caprolactama

dos filmes usados como embalagem de queijos praticamente não foi afetada pela irradiação. Os níveis de caprolactama migrados dos filmes usados para produtos cárneos variaram de 5,72 a 11,89 mg/kg para filmes não-irradiados, de 4,80 a 10,60 mg/kg para filmes irradiados com 3 kGy e de 3,62 a 6,02 mg/kg para filmes irradiados com 7 kGy, para todos os simulantes estudados. A migração da caprolactama dos filmes usados para queijos variou de 1,03 a 7,59 mg/kg para filmes não-irradiados e de 4,02 a 7,90 mg/kg para filmes irradiados com 12 kGy. Os compostos de degradação formados pela irradiação dos filmes multicamada contendo PA-6 usando a microextração em fase sólida (SPME) e a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) foram identificados caprolactama, 2-ciclopentilciclopentanona, tributil fosfato e alguns aldeídos, entre outros. As condições de extração foram 20 minutos, 80°C e 225 rpm, usando a fibra de polidimetilsiloxano. O método analítico desenvolvido e validado para determinar compostos de degradação no simulante água destilada usando SPME-GC-MS foi considerado sensível e apresentou boa precisão e exatidão. Foi obtida uma ampla faixa linear para todos os compostos voláteis, com coeficientes de correlação maiores que 0,9872. Os limites de detecção para todas as substâncias identificadas estiveram na faixa de $1,76 \cdot 10^{-7}$ a 1,52 µg/g. O método foi considerado eficiente para quantificar compostos voláteis que migraram dos filmes irradiados e não-irradiados para a água destilada. A caprolactama (7,52-12,96 µg/g), decaldeído (4 ng) e 2-ciclopentilciclopentanona (10 a 20 ng) migraram somente de filmes não-irradiados para água destilada. O método analítico desenvolvido e validado usando GC-MS para determinar compostos de degradação no simulante solução de etanol 95% também foi considerado sensível, apresentando boa precisão e exatidão. Os limites de detecção obtidos para todos os compostos voláteis estiveram na faixa de 0,01 a 0,13 µg/g. Apenas a caprolactama migrou dos filmes não-irradiados (7,68-10,01 µg/g) e irradiados (6,11-8,99 µg/g) para o simulante. Nos filmes usados como embalagem de produtos cárneos a migração da caprolactama foi reduzida com a dose de 3 kGy e se manteve praticamente a mesma até a dose de 7 kGy, enquanto para os filmes não-irradiados e irradiados (12 kGy) usados como embalagem de queijos, os níveis foram similares. A migração da caprolactama dos filmes multicamada contendo PA-6 para todos os simulantes avaliados atendeu às exigências da legislação Brasileira para migração desse monômero.

ABSTRACT

Polyamide 6 (PA-6) is widely used as food packaging, especially for foodstuffs and cheese. PA-6 is allowed for contact with food in Brazil, Europe and the United States. PA-6 is also approved for contact with prepackaged foods during irradiation. Caprolactam, the monomer used in the manufacture of PA-6, remains in the resin after polymerization and can migrate into food in contact. The irradiation of polymers can affect the migration, but can also be able to originate degradation compounds that can migrate into food in contact. The aim of this work was to obtain information about the migration of caprolactam from packaging containing PA-6 into food in contact and about the effect of irradiation on migration to provide support to research experimental; to develop and validate an analytical method to determine caprolactam in food simulants; to study the migration of caprolactam from multilayer PA-6 films, used for meat foodstuffs and cheese, into distilled water, 3% acetic acid, 15% ethanol and olive oil food simulants; to evaluate the effect of gamma irradiation on caprolactam migration from multilayer PA-6 films into the different food simulants; to develop and validate analytical method to determine volatile compounds formed after irradiation of multilayer PA-6 films and to study their migration from the films into distilled water and 95% ethanol food simulants. The analytical method developed and validated, using gas chromatography with flame ionization detector (GC-FID) was considered sensitive and efficient and showed high precision and accuracy to determine caprolactam in distilled water, 3% acetic acid, 15% ethanol and olive oil food simulants, with the advantage of a maximum time of analysis of 11 minutes. A wide linear range was obtained for all simulants, with correlation coefficients higher than 0.9997. The limit of detection for caprolactam in olive oil was 0,10 µg/g and ranged from 0.16 to 0.32 µg/mL for the other simulants, and it was obtained high precision (RSD ≤ 5.5%) and recovery from 89 to 112%. Caprolactam migration from films used for meat foodstuffs ranged from 5.34 to 11.89 mg/kg and from films used for cheese ranged from 1.03 to 7.59 mg/kg, into all studied simulants. There was a reduction of caprolactam levels with the increase of irradiation dose for films used as meat foodstuffs packaging, while for films used as cheese packaging, caprolactam levels were practically not affected by irradiation. Caprolactam that migrated from films used for meat foodstuffs ranged from 5.72 to 11.89 mg/kg for non-irradiated films, 4.80 to 10.60 mg/kg for films irradiated at 3 kGy and 3.62 to 6.02 mg/kg for films irradiated at 7 kGy, into all studied simulants. The migration of caprolactam from films used for cheese ranged from 1.03 to 7.59 mg/kg for non-irradiated

films and from 4.02 to 7.90 mg/kg for films irradiated at 12 kGy. The degradation compounds formed by irradiation of multilayer PA-6 films using solid-phase microextraction (SPME) and gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) were caprolactam, 2-cyclopentylcyclopentanone, tributyl phosphate and some aldehydes, among other. The conditions of extraction were 20 min, 80 °C and 225 rpm, using polydimethylsiloxane fiber. The analytical method developed and validated to determine degradation compounds in distilled water simulant using SPME-GC-MS was considered sensitive and showed good precision and accuracy. A wide linear range for all volatile compounds was obtained, with correlation coefficients higher than 0.9872. The limits of detection for all identified substances ranged from $1.76 \cdot 10^{-7}$ to 1.52 µg/g. The method was considered efficient to quantify volatile compounds that migrated from irradiated and non-irradiated films into distilled water. Caprolactam (7.52-12.96 µg/g), decaldehyde (4 ng) and 2-cyclopentylcyclopentanone (10-20 ng) migrated only from non-irradiated films into distilled water. The analytical method developed and validated using GC-MS to determine degradation compounds in 95% ethanol simulant was also considered sensitive and showed good precision and accuracy. The limits of detection obtained for all volatile compounds were in the range of 0.01 to 0.13 µg/g. Only caprolactam migrated from non-irradiated films (7.68-10.01 µg/g) and irradiated (6.11-8.99 µg/g) into simulant. In films used for meat foodstuffs, caprolactam migration was reduced with dose of 3 kGy and remained almost the same up to 7 kGy, while for films irradiated and non-irradiated (12 kGy) used as cheese packaging, the levels were similar. Caprolactam migration from multilayer PA-6 films into all the studied simulants was in accordance to the requirements of Brazilian legislation for migration of this monomer.

INTRODUÇÃO

A embalagem tem uma grande importância no mundo atual. Praticamente todos os produtos vendidos são embalados, seja na sua forma final, seja nas fases intermediárias de fabricação e transporte. A demanda progressiva de alimentos embalados vem despertando a necessidade de manter a qualidade e aumentar a vida de prateleira dos produtos por períodos de tempo cada vez maiores e sob condições adversas, tornando necessária a produção de embalagens mais adequadas, convenientes e competitivas (MONTEIRO, 1997; ABRE, 2008).

A indústria de alimentos tem um papel determinante junto à indústria de embalagem, sendo responsável por cerca de 65,6% do consumo total da embalagem plástica (DATAMARK, 2006). Dentre os diversos materiais disponíveis, a poliamida é muito usada como embalagem de alimentos. Filmes de poliamida, em estrutura mono ou multicamada, produzidos por extrusão ou coextrusão são usados no acondicionamento de alimentos, com destaque para a poliamida 6 (PA-6), especialmente empregada no acondicionamento de carnes e aves frescas e processadas, e queijos (HERNANDEZ et al., 2000; SARANTÓPOULOS et al., 2001; 2002). O emprego da PA-6 como embalagem plástica para contato com alimentos é permitido no Brasil, na Europa e nos Estados Unidos. A PA-6 também está autorizada para o uso em contato com alimentos pré-embalados que serão submetidos à irradiação (ANVISA, 1999; 2001; EC, 1999a; 1999b; 2002; FDA, 2005; 2006).

A caprolactama é o monômero utilizado na fabricação de alguns tipos de poliamidas, particularmente da PA-6 (ANVISA, 1999). Após o processo de polimerização parte do monômero permanece na resina. Podem também estar presentes oligômeros de baixa massa molecular, além de aditivos e produtos de decomposição, entre outros (BARKBY e LAWSON, 1993; BEGLEY et al., 1995; NERÍN, 1995; SOTO-VALDEZ et al., 1997; POGORZELSKA e MIELNICZUK, 2001; BRADLEY et al., 2004; STOFFERS et al., 2005). Todos estes compostos têm potencial para migrar para o alimento em contato (MONTEIRO et al., 1996; 1999; CATALÁ e GAVARA, 2002; MONTEIRO, 2005; NASSER et al., 2005).

Existe uma preocupação com danos à saúde associados à utilização de substâncias quimicamente ativas e, conseqüentemente, aos monômeros residuais, oligômeros, aditivos de embalagem plástica, etc., cuja exposição esteja relacionada com a ingestão desses compostos quando ocorre a migração da embalagem para o alimento em contato. A

migração destas substâncias pode representar um risco à saúde humana, particularmente durante a exposição crônica, através do consumo de alimentos (DE FUSCO et al., 1990; MONTEIRO et al., 1999; MONTEIRO, 2005; NASSER et al., 2005). No caso da caprolactama, cujo limite de migração específica é de 15 mg/kg de alimento (ANVISA, 1999; EC, 2002), pouco se conhece sobre seu potencial de migração de embalagens de poliamida usadas no Brasil para produtos cárneos e queijos (FÉLIX et al., 2007; 2008).

A irradiação de alimentos é um processo alternativo ao tratamento térmico e químico, capaz de eliminar microrganismos e aumentar a vida de prateleira dos alimentos. Seu emprego é autorizado em mais de quarenta países, para diversos tipos de alimentos. A irradiação tem a vantagem adicional de poder ser utilizada em alimentos pré-embalados, além de permitir o emprego de diferentes materiais de embalagem, particularmente da embalagem plástica (CHMIELEWSKI, 2006). A aplicação de diferentes doses de radiação depende da finalidade do uso. Doses entre 0,1-1 kGy podem estender o tempo de amadurecimento de frutas e vegetais, e doses de 2-8 kGy são usadas para “pasteurizar a frio” carnes e produtos cárneos em geral, eliminando microrganismos patogênicos, enquanto queijos devem ser tratados com doses maiores que 10 kGy. Doses mais elevadas, entre 25-75 kGy, são usadas para esterilização de alimentos pré-cozidos (TRS-409, 2002). Contudo, paralelamente aos benefícios proporcionados aos alimentos, a radiação ionizante pode provocar alterações nos polímeros, incluindo modificações nas propriedades mecânicas, de barreira, na resistência térmica e no comportamento de migração, além de produzir compostos de degradação de baixa massa molecular (BUREAU e MULTON, 1996; IAEA, 2002; CHMIELEWSKI, 2006).

O efeito da irradiação sobre a migração de componentes de embalagens de alimentos é de interesse de pesquisadores e da indústria de embalagens e de alimentos devido à possível redução dos níveis migrados (STOFFERS et al., 2004; ITO et al., 2005; JEON et al., 2007; FÉLIX et al., 2008). Sua avaliação poderá contribuir com informações sobre embalagens mais adequadas à produção de alimentos seguros e compatíveis com a crescente demanda por conveniência, frescor, facilidade e vida de prateleira estendida.

A determinação de substâncias que migram das embalagens plásticas para os alimentos e de substâncias residuais presentes nas embalagens requer o emprego de técnicas sensíveis, uma vez que tais substâncias geralmente estão presentes na ordem de traços e ultratraços (NERÍN, 2002; MONTEIRO, 2005). A cromatografia gasosa com detector de ionização de chama (GC-FID) vem sendo muito usada para separar e quantificar compostos voláteis presentes em embalagens plásticas (POGORZELSKA e

MIELNICZUK, 2001; BUCHALLA et al., 2002; STOFFERS et al., 2003). A cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC/MS) também tem sido utilizada para identificar e quantificar compostos voláteis obtidos por separação cromatográfica (MONTEIRO et al., 1996; 1998; 1999; NERÍN, 2002; PARK et al., 2006), uma vez que alia maior sensibilidade, indispensável para compostos presentes em baixa concentração, à identificação inequívoca. A maioria das técnicas cromatográficas exige uma etapa prévia de preparo de amostras. Técnicas convencionais de extração de compostos voláteis fazem uso de solventes e/ou consomem muito tempo. A microextração em fase sólida (SPME) tem sido considerada efetiva para extrair compostos voláteis de uma variedade de matrizes, incluindo polímeros e, aliada às técnicas cromatográficas, tem sido empregada na identificação de compostos voláteis presentes em poliamida (GRÖNING & HAKKARAINEN, 2001; 2004a; b) com a vantagem da rapidez, simplicidade e redução do uso de solventes.

Nesse sentido e, dado o desconhecimento sobre o potencial de migração da caprolactama e dos compostos de degradação originados a partir da irradiação de filmes multicamada contendo PA-6, torna-se imprescindível a realização de estudos que visem à identificação, à quantificação e à avaliação do potencial de migração desses compostos.

Este trabalho teve como objetivo desenvolver e validar método analítico para avaliar a migração da caprolactama de filmes multicamada contendo PA-6 para simulantes de alimentos, e foi dividido em seis Capítulos. No Capítulo 1 foi apresentada uma revisão sobre a embalagem plástica contendo PA-6, usada para acondicionar produtos cárneos e queijos, os aspectos de migração da caprolactama e os efeitos da irradiação sobre a migração. O Capítulo 2 apresenta o desenvolvimento e a validação de método analítico para determinação de caprolactama em simulante de alimentos gordurosos. O Capítulo 3 aborda a migração de caprolactama de filmes multicamada contendo PA-6 para simulante solução de ácido acético 3% e a validação do método analítico. O Capítulo 4 apresenta o desenvolvimento e a validação de método analítico para determinação de caprolactama em água e solução de etanol 15% e a migração de caprolactama de filmes multicamada contendo PA-6 para os simulantes de alimentos água, solução de etanol 15% e azeite de oliva. O Capítulo 5 mostra o efeito da irradiação gama na migração de caprolactama de filmes multicamada contendo PA-6 para os simulantes água, solução de ácido acético 3%, solução de etanol 15% e azeite de oliva. Finalmente, o Capítulo 6 apresenta o estudo da identificação e da migração de compostos de degradação originados da irradiação de filmes multicamada contendo PA-6 usados para produtos cárneos e queijos.

Cabe mencionar que as doses de irradiação empregadas neste trabalho para os filmes usados para produtos cárneos, 3 e 7 kGy, e para queijos, 12 kGy, foram selecionadas visando atender ao protocolo TRS-490 (2002), que recomenda o uso de tais doses com o objetivo de estender a vida de prateleira e pasteurizar “a frio” carnes, produtos cárneos e queijos.

Referências Bibliográficas

- ABRE (Associação Brasileira de Embalagem). Apresentação do setor: a embalagem. Disponível em: <http://www.abre.org.br/centro_dados.php>. Acesso em: 09 jan. 2008.
- ANVISA, 1999. Resolução No. 105 (19 Maio 1999). Regulamentos técnicos sobre disposições gerais para embalagens e equipamentos plásticos em contato com alimentos e seus anexos. Disponível em: <<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=19772&word=>>> Acesso em: 15 jan. 2008.
- ANVISA, 2001. Resolução No. 21 (26 Janeiro 2001). Regulamento Técnico para Irradiação de Alimentos. Disponível em: <<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=161&word=>>> Acesso em: 15 jan. 2008.
- BARKBY, C. T.; LAWSON, G. Analysis of migrants from nylon 6 packaging films into boiling water. *Food Additives and Contaminants*, v. 10, p. 541-553, 1993.
- BEGLEY, T. H.; GAY, M. L.; HOLLIFIELD, H. C. Determination of migrants in and migration from nylon food packaging. *Food Additives and Contaminants*, v. 12, p. 671-676, 1995.
- BRADLEY, E.L.; SPECK, D.R.; READ, W.A.; CASTLE, L. Method os test and survey of caprolactam migration into foods packaged in nylon-6. *Food Additives and Contaminants*, v. 21, p. 1179-1185, 2004.
- BUCHALLA, R.; BEGLEY, T.H.; MOREHOUSE, K.M. Analysis of low-molecular weight radiolysis products in extracts of gamma-irradiated polymers by gas chromatography and high-performance liquid chromatography. *Radiation Physics and Chemistry*, v. 63, p. 837-840, 2002.
- BUREAU, G.; MULTON, J. L. Ionizing treatment and packaging - preservation of foodstuffs packaged in flexible packaging. In: Bureau G, Multon JL (eds) *Food Packaging Technology*, v.2, New York: VCH, 1996, p.65-84.

- CATALÁ, R.; GAVARA, R. Fundamentos y mecanismos de la migración. In: CATALÁ, R.; GAVARA, R. (Ed.). *Migración de componentes y residuos de envases en contacto con alimentos*. España: Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, 2002. p.1-17.
- CHMIELEWSKI, A.G. *Packaging for food irradiation*. Raporty IChTj. Seria B nr 1'/2006. Edited by Institute of Nuclear Chemistry and Technology, Warszawa, 26 p., 2006.
- DATAMARK. Dados de embalagem: mercado de embalagens por material – 1999 - 2006. Disponível em: <http://www.datamark.com.br/NewDatamark/ASP/FS/fs_pk_p.asp>. Acesso em 09 jan. 2008.
- DE FUSCO, R; MONARCA, S; BISCARDI, D; PASQUINI, R; FATIGONI, C. Leaching of mutagens into mineral water from polyethyleneterephthalate bottles. *Science Total Environment*, v. 90, p. 241-248, 1990.
- EC, 1999(a), Commission Directive 1999/2/CE on the approximation of the laws of the Member States concerning foods and food ingredients treated with ionising radiation. *Official Journal of the European Communities*. Disponível em: <http://ec.europa.eu/food/fs/sfp/fi02_en.pdf#search=%22Directive%201999%2F2%2FEC%22>. Acesso em: 25 jun. 2007.
- EC, 1999(b), Commission Directive 1999/3/EC on the establishment of a Community list of foods and food ingredients treated with ionising radiation. *Official Journal of the European Communities*. Disponível em: <http://ec.europa.eu/food/fs/sfp/fi03_en.pdf>. Acesso em: 25 jun. 2007.
- EC, 2002, Commission Directive 2002/72/EC relating to plastics materials and articles intended to come into contact with foodstuffs. *Official Journal of the European Communities*, L220, 18-58.
- FDA, 2005. US Code of Federal Regulations. Packaging materials for use during the irradiation of prepackaged food. 21CFR 179.45. Disponível em: <<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?fr=179.45&SearchTerm=irradiation>>. Acesso em: 25 jun. 2007
- FDA, 2006. Food Ingredients and Packaging Food Contact Substance Notification Program. Disponível em: <<http://www.cfsan.fda.gov/~dms/opa-notf.html>>. Acesso em 15 abr. 2006.

- FÉLIX, J. S.; PADULA, M.; MANZOLI, J. E.; MONTEIRO, M. Migração de ϵ -caprolactama de embalagens contendo poliamida 6 para simulante ácido acético 3% e validação do método analítico. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 27, p. 27-32, 2007.
- FÉLIX, J. S.; MONTEIRO, M.; MANZOLI, J. E.; PADULA, M.; PEZO, D.; ROMERO, J.; NERÍN, C. Identification and migration of degradation compounds from irradiation of multilayer polyamide 6 films for meat foodstuffs and cheese. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. DOI 10.1007/s00216-008-1893-3, 2008. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/e666100588515j55/fulltext.pdf>>.
- GRÖNING, M.; HAKKARAINEN, M. Headspace solid-phase microextraction – a tool for new insights into the long-term thermo-oxidation mechanism of polyamide 6.6. *Journal of Chromatography A*, v. 932, n. 1-2, p. 1-11, 2001.
- GRÖNING, M.; HAKKARAINEN, M. Multiple headspace solid-phase microextraction of 2-cyclopentyl-cyclopentanone in polyamide 6.6: possibilities and limitations in the headspace analysis of solid hydrogen-bonding matrices. *Journal of Chromatography A*, v. 1052, p. 61-68, 2004a.
- GRÖNING, M.; HAKKARAINEN, M. Correlation between emitted and total amount of 2-cyclopentyl-cyclopentanone in polyamide 6.6 allows rapid assessment by HS and HS-SPME under non-equilibrium conditions. *Journal of Chromatography A*, v. 1052, p. 151-159, 2004b.
- HERNANDEZ, R. J.; SELKE, S. E. M.; CULTER, J. D. *Plastics packaging: properties, processing, applications and regulations*. Cincinnati: Hanser Gardner Publications, 2000. p.113-115.
- IAEA, 2002, TRS-409, *Dosimetry for food irradiation*. International Atomic Energy Agency, Vienna, Technical report series, ISSN 0074-1914; no.409.
- ITO, R.; SESHIMO, F.; HAISHIMA, Y.; HASEGAWA, C.; et al. Reducing the migration of di-2-ethylhexyl phthalate from polyvinyl chloride medical devices. *International Journal Pharmaceutical*, v. 3003, p. 104-112, 2005.
- JEON, D. H.; PARK, G. Y.; KWAK, I. S.; LEE, K. H.; PARK, H. J. Antioxidants and their migration into food simulants on irradiated LLDPE film. *LWT - Food Science and Technology*, v. 40, p. 151-156, 2007.
- MONTEIRO, M.; NERIN, C.; REYES, F. G. R. Determination of UV stabilizers in PET bottles by high performance-size exclusion chromatography. *Food Additives and Contaminants*, v.13, p.575-586, 1996.

- MONTEIRO, M. *Absorvedores de radiação ultravioleta em embalagens plásticas e em óleos vegetais: metodologia analítica e estudo de migração*. 1997. 123 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, Campinas, 1997.
- MONTEIRO, M.; NERÍN, C.; RUBIO, C.; REYES, F.G.R. A GC/MS method for determining UV stabilizers in polyethyleneterephthalate bottles. *Journal of High Resolution Chromatography*, v. 21, p. 317-320, 1998.
- MONTEIRO, M.; NERÍN, C.; REYES, F. G. R. Migration of Tinuvin P, as a UV stabilizer, from PET bottles into fatty-food simulants. *Packaging Technology and Science*, v. 12, p. 241-248, 1999.
- MONTEIRO, M. *Contribuição ao estudo de aditivos, monômeros e oligômeros de embalagem plástica e à avaliação de frutas, polpas, sucos e bebidas à base de fruta*. 2005. 91f. Texto sistematizado sobre a contribuição científica (Livre Docência) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2005.
- NASSER, A. L. M.; LOPES, L. M. X.; MONTEIRO, M. Oligômeros em embalagens de PET para água mineral e suco de fruta. Uma revisão. *Alimentos e Nutrição*, v. 16, n. 2, p. 183-194, 2005.
- NERÍN, C. Alimentos preparados para cocinar en la bolsa. In: NERÍN, C.; CACHO, J.; REYES, F. G. R.; FARIA, J. A.; ANJOS, C. A. R.; PADULA, M. *Materiais plásticos em contato com alimentos*. Campinas: CETEA/ITAL, 1995. Cap. 5, p. 1-21. (apostila).
- NERÍN, C. Nuevas técnicas analíticas para la evaluación de la migración específica. In: CATALÁ, R.; GAVARA, R. (Ed.). *Migración de componentes y residuos de envases en contacto con alimentos*. España: Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, 2002. p.163-183.
- PARK, G.Y.; CHO, S.Y.; JEON, D.H.; KWAK, I.S.; LEE, K.H.; PARK, H.J. Formation of monomer residues in PS, PC, PA-6 and PVC upon γ -irradiation. *Radiation Physics and Chemistry*, v. 75, p. 1055-1059, 2006.
- POGORZELSKA, Z.; MIELNICZUK, Z. Determination of ϵ -caprolactam migration from polyamide plastics: A new approach. *Packaging and Technology Science*, v. 14, p. 31-35, 2001.

- SARANTÓPOULOS, C. I. G. L.; OLIVEIRA, L. M.; CANAVESI, E. *Requisitos de conservação de alimentos em embalagens flexíveis*. Campinas: CETEA/ITAL, 2001. p.151-171; 175-182.
- SARANTÓPOULOS, C. I. G. L.; OLIVEIRA, M.L.; COLTRO, L.; VERCELINO, A. R. M.; CORRÊA, G. E. E. *Embalagens plásticas flexíveis: principais polímeros e avaliação de propriedades*. Campinas: CETEA/ITAL, 2002. p.24-27.
- SOTO-VALDEZ, H., GRAMSHAW, J. W.; VANDERBURG, H. J. Determination of potencial migrants present in Nylon 'microwave and roasting bags' and migration into olive oil. *Food Additives and Contaminants*, v. 14, p. 309-318, 1997.
- STOFFERS, N. H.; BRANDL, F.; LINSSEN, J. P. H.; FRANZ, R. Development and validation of analytical methods for monomeric and oligomeric migrants from nylon 12 packaging materials. *Food Additives and Contaminants*, v.20, n.4, p.410-416, 2003.
- STOFFERS, N. H.; LINSSEN, J., P., H.; FRANZ, R.; WELLE, F. Migration and sensory evaluation of irradiated polymers. *Radiation Physics and Chemistry*, v. 71, p. 203-206, 2004.
- STOFFERS, N. H., DEKKER M., LINSSEN, J. P. H., STÖMER A., FRANZ, R.; VAN BOEKEL, M. A. J. S. Modelling of simultaneous two-sided migration into water and olive oil from nylon food packaging. *European Food Research Technology*, v. 220, p. 156-162, 2005.

OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo desenvolver e validar método analítico para avaliar a migração da caprolactama de filmes multicamada contendo poliamida 6 (PA-6) para simulantes de alimentos.

Os objetivos específicos foram:

Obter informações a respeito da migração da caprolactama de embalagens contendo PA-6 para o alimento em contato e do efeito da irradiação sobre a migração visando dar suporte às pesquisas experimentais;

Desenvolver e validar método analítico para determinar caprolactama nos simulantes de alimentos água destilada, solução de ácido acético 3%, solução de etanol 15% e azeite de oliva utilizando cromatografia gasosa com detector de ionização de chama;

Estudar a migração da caprolactama de filmes multicamada contendo PA-6, utilizados no acondicionamento de produtos cárneos e queijos, para os simulantes de alimentos utilizando cromatografia gasosa com detector de ionização de chama;

Avaliar o efeito da irradiação sobre a migração da caprolactama de filmes multicamada contendo PA-6, utilizados no acondicionamento de produtos cárneos e queijos, para os simulantes de alimentos;

Desenvolver e validar método analítico, utilizando microextração em fase sólida e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas para determinar compostos voláteis formados pela irradiação dos filmes multicamada contendo PA-6, utilizados no acondicionamento de produtos cárneos e queijos, assim como sua migração para os simulantes água destilada e etanol 95%.

CAPÍTULO 1

**EMBALAGEM PLÁSTICA CONTENDO POLIAMIDA 6 PARA PRODUTOS
CÁRNEOS E QUEIJOS: MIGRAÇÃO DE CAPROLACTAMA E EFEITO DA
IRRADIAÇÃO**

Trabalho submetido à revista Alimentos e Nutrição, 2008

EMBALAGEM PLÁSTICA CONTENDO POLIAMIDA 6 PARA PRODUTOS CÁRNEOS E QUEIJOS: MIGRAÇÃO DE CAPROLACTAMA E EFEITO DA IRRADIAÇÃO

Juliana Silva Félix*

José Eduardo Manzoli**

Marisa Padula***

Magali Monteiro*

RESUMO: As poliamidas são muito usadas como embalagem de alimentos, principalmente devido à resistência mecânica, térmica, química e a gorduras, às boas propriedades de barreira e por serem termofomáveis. Filmes mono ou multicamada contendo poliamida 6 são usados especialmente no acondicionamento de produtos cárneos e queijos. A caprolactama, monômero da poliamida 6, assim como oligômeros de baixa massa molecular, aditivos, compostos de degradação, etc., também podem estar presentes nas embalagens e têm potencial para migrar para o alimento em contato. O emprego da poliamida 6 como embalagem plástica para contato com alimentos é permitido no Brasil, na Europa e nos Estados Unidos, estando também autorizado o uso para contato com alimentos pré-embalados que serão submetidos à irradiação. Apesar da baixa toxicidade, a presença de caprolactama em alimentos é considerada indesejável. A migração da caprolactama de embalagens de poliamida para alimentos e simulante de alimentos tem sido relatada em alguns estudos. Os níveis de caprolactama migrados variam dependendo da composição da embalagem, do tempo e temperatura de contato, do tipo de simulante ou alimento, etc. A migração de caprolactama de embalagens de poliamida irradiadas está ainda relacionada à dose de irradiação, mas de uma maneira geral, mostra tendência de redução com o aumento da dose.

PALAVRAS-CHAVE: Embalagem plástica, poliamida 6; caprolactama; migração, irradiação.

* Departamento de Alimentos e Nutrição – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP – 14801-902 – Araraquara – SP – Brasil.

** Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (CTR) – CNEN – 05508-000 – São Paulo – SP – Brasil e Universidade São Judas Tadeu – 03166-000 – São Paulo – SP – Brasil.

*** Centro de Tecnologia de Embalagem – ITAL – 13070-178 – Campinas – SP – Brasil.

Introdução

Vários são os materiais empregados como embalagem de alimentos, entre os quais se destacam o plástico, o vidro, o papel e o papelão e as embalagens metálicas, que apresentaram em 2006, participação de 31,5%, 6,6%, 38,4% e 21,5%, respectivamente, no mercado de embalagens¹.

As embalagens plásticas utilizam diferentes materiais poliméricos. Dentre os polímeros mais utilizados, pode-se citar o polietileno (PE), o polipropileno (PP), o poli(tereftalato de etileno) (PET), o policloreto de vinila (PVC), o poliestireno (PS) e a poliamida (PA), entre outros. A PA é muito usada como embalagem de alimentos por oferecer elevada resistência mecânica, térmica, química e a gorduras, além de ser considerada material com boa barreira a gases e aromas, e ainda ser termoformável^{18, 61}.

Esse trabalho apresenta uma revisão sobre o uso da PA-6 como embalagem de alimentos, especialmente para produtos cárneos e queijos, enfocando os principais aspectos de legislação e toxicológicos, a migração de caprolactama e o efeito da irradiação sobre a migração desse monômero para os alimentos.

Uso da Poliamida como embalagem de alimentos

As PA são polímeros termoplásticos que contêm um grupo amida como parte da cadeia, sendo *nylon* seu nome genérico e náilon seu nome comercial no Brasil^{40, 57}.

A família das PA é bastante extensa destacando-se, para o uso no acondicionamento de alimentos, as PA-6, PA-66, PA-11, PA-12 e mais recentemente os copolímeros de PA, entre outras^{2, 57, 61} (Tabela 1). A PA-6 é produzida pela polimerização do monômero caprolactama (Figura 1). A PA-66 é produzida pela reação de hexametilenodiamina e ácido adípico e a PA-11 é produzida pela condensação de ácido 11-amino undecanóico^{2, 61}. A PA-12 é produzida pela policondensação da dodecanolactama⁶⁵. O monômero caprolactama é ainda usado no processo de fabricação de outras PA, como no caso da PA-6/12, PA-6/6T/6I e PA-6/66². Durante o processo de polimerização da caprolactama para a produção da PA, parte do monômero empregado permanece na resina, já que a polimerização não é completa^{9, 11}.

As propriedades das PA estão associadas à sua estrutura polimérica, que resulta da matéria-prima utilizada para sua produção. Como embalagens de alimentos, as PA são mundialmente utilizadas, sobretudo devido à alta resistência à tenacidade, ao impacto, à

flexão, à perfuração e à abrasão, à boa resistência térmica, química e a gorduras, por serem termoformáveis, além de possuírem boas propriedades de barreira a gases e aromas^{12, 57, 61}. As PA são muito permeáveis ao vapor d'água e a umidade absorvida exerce efeito plastificante no polímero, promovendo alterações nas propriedades mecânicas e nas propriedades de barreira, com considerável aumento de permeabilidade ao oxigênio⁶¹.

A maior aplicação das PA é na forma de filmes, como componente único ou em estruturas de multicamada⁴⁰. Os filmes podem ser produzidos por extrusão ou coextrusão e por ambos os processos podem ser mono ou biorientados. Os filmes não orientados são usados para termoformação. As PA são usadas em filmes multicamada coextrusados, ou laminadas a poliolefinas, a copolímeros de etileno e acetato de vinila (EVA) ou a ionômeros⁶¹.

Filmes de PA têm sido muito empregados como embalagens a vácuo e com atmosfera modificada para carnes e aves frescas e processadas, além de queijos, e como embalagens tipo *cook in* para carnes e aves processadas⁶⁰.

Carnes e aves

Carnes e aves frescas e processadas necessitam que a embalagem ofereça resistência mecânica, boa barreira a gases, a aromas, a gorduras e ao vapor d'água, visando minimizar a oxidação de gorduras, a descoloração, a desidratação superficial e os danos provocados por abrasão e perfuração, além da perda de aromas, no caso de carnes e aves processadas, preservando as características sensoriais desenvolvidas no processamento⁶⁰. Todos esses aspectos devem ser contemplados para que se possa estender a vida de prateleira de carnes e aves frescas e processadas, e dispor de produtos de boa qualidade.

A embalagem a vácuo altera a atmosfera gasosa ao redor da superfície do produto retardando o crescimento de bactérias deteriorantes e a oxidação de gorduras devido à redução do nível de oxigênio presente⁵⁹. PA mono e multicamada têm sido empregadas em embalagens a vácuo de carnes e aves frescas e processadas por apresentar boa propriedade de barreira a gases, principalmente ao oxigênio, boa barreira a gorduras e a aromas, além de conferir alta resistência mecânica, neste caso, à perfuração, o que é um requisito importante no acondicionamento de cortes de carnes e de aves com ossos embaladas a vácuo. Paralelamente, as boas características de termoformação dos filmes de PA proporcionam a adesão da embalagem ao produto minimizando a exudação de líquidos⁶⁰.

A embalagem com atmosfera modificada utiliza mistura gasosa de CO₂ e N₂, reduz ou exclui o O₂, dependendo do produto, retardando o desenvolvimento microbiano, a descoloração e a rancificação. A PA também tem sido muito usada para carnes e aves frescas e processadas embaladas com atmosfera modificada, oferecendo boas propriedades de barreira e resistência mecânica. Em embalagens de transporte tipo *masterpack* (produto pré-embalado, colocado dentro de embalagem de transporte) com atmosfera modificada e em bandejas seladas para porções de varejo, a PA pode ser empregada por conferir baixa permeabilidade a gases, alta resistência à perfuração e característica de termoformação⁶⁰.

O cozimento do produto dentro da embalagem plástica, conhecido como *cook in*, é muito usado na fabricação de presunto cozido e apresuntados, além de *roast beef* e produtos à base de aves, entre outros. O cozimento do produto já acondicionado em uma embalagem a vácuo reduz a exudação de líquidos, melhora o sabor, o aroma, a textura, a aparência e retém nutrientes, além de impedir a perda de peso, com a conveniência adicional da possibilidade de reaquecimento do produto na própria embalagem. As estruturas utilizadas no sistema *cook in* combinam PA e ionômero tanto no corpo quanto na tampa. No caso de envoltórios (*casings*), normalmente são usadas estruturas coextrudadas de PA. Estruturas multicamada com filme à base de PA-6, PA-66, PA-12 e PA MXD-6 são usadas como embalagens para produtos cárneos tais como mortadela, presunto, salsicha, entre outros, que são submetidos a algum tipo de tratamento térmico após acondicionamento na embalagem para promover seu cozimento³². Embalagens contendo PA-6 e PA-66 tipo *microwave and roasting bags* (MRB), *oven roasting bag* e *boil-in-the-bag* usadas nos processos *roast-in-the-bag* onde o alimento pode ser aquecido, cozido ou assado na própria embalagem em fornos de microondas ou fornos convencionais, também vêm sendo usadas^{9, 10, 36, 64}. A PA é um dos poucos polímeros que pode acondicionar alimentos diretamente para o cozimento, pois é termorresistente, tem capacidade de reter exudados e permite que a carne fique dourada.

Queijos

O emprego de uma embalagem adequada no acondicionamento de queijos aliado às boas práticas de processamento pode proteger o alimento contra contaminação microbiana, rancificação, desidratação superficial, alteração de sabor/aroma e danos mecânicos provocados durante o transporte e/ou armazenamento. Sacos de filmes coextrudados, tipo PA/PE (polietileno) termosselados e termoformados têm sido empregados para o

acondicionamento de queijos frescos como minas frescal e ricota, queijo processado como o requeijão e para queijo duro como o parmesão. A PA é empregada por apresentar boa barreira a gases, prevenindo o crescimento de fungos e retardando a oxidação de gorduras, o que é reforçado por sua resistência à gordura. Além disso, para o requeijão, a embalagem deve manter-se estável e sem deformações durante o acondicionamento a quente, o que torna a PA uma boa opção de uso por ser termorresistente. Outro exemplo é o queijo parmesão em pedaços, que tem sido embalado a vácuo em embalagens de PA, com o objetivo de evitar o desenvolvimento de fungos na superfície e de oferecer resistência mecânica⁶⁰.

Queijos macios como *roquefort* e gorgonzola são acondicionados em embalagens plásticas rígidas termoformadas e termosseladas em estruturas contendo PA/PEBD (polietileno de baixa densidade). Neste caso, a PA é utilizada por ser termoformável e por oferecer boa barreira a gases, especialmente ao oxigênio, uma vez que o fungo *Penicillium roqueforti* encontrado nestes tipos de queijos, cresce em baixas concentrações de O₂ e a presença de CO₂ parece estimular seu crescimento⁶⁰.

Queijos semi-duros como prato e filados como mussarela têm sido acondicionados em embalagens multicamada de PA. No Brasil, estes queijos também estão sendo embalados a vácuo em embalagens flexíveis termoformadas, cuja estrutura do filme de fundo e do filme para tampa combina PA com outros materiais. A PA também tem sido aplicada em embalagens com atmosfera modificada, em sacos ou bandejas flexíveis direcionadas ao uso doméstico e institucional para estes tipos de queijos. Em todos casos, a PA é utilizada devido à sua propriedade de barreira a gases e gorduras, além de sua característica de termoformação. A redução de O₂ no interior da embalagem é capaz de aumentar a vida de prateleira destes queijos, protegendo contra o desenvolvimento de microrganismos na superfície⁶⁰.

Aspectos de legislação

O controle e a regulamentação de materiais plásticos empregados na elaboração de embalagens e equipamentos destinados ao contato com alimentos e bebidas no Brasil são realizados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). A Resolução nº 105, de 19 de maio de 1999, em vigor, estabelece os regulamentos técnicos sobre as disposições gerais para embalagens e equipamentos plásticos em contato com alimentos².

As restrições ao uso de substâncias químicas nas embalagens plásticas são feitas em três níveis: listas positivas, limite de composição e limites de migração global (LMG) e específica (LME). As listas positivas contêm as substâncias (resinas, polímeros e aditivos) permitidas para uso, dentre as quais estão as PA. O limite de composição expressa a quantidade máxima destas substâncias que pode estar presente na embalagem plástica e os LMG e LME representam a quantidade máxima que pode migrar para o alimento em contato².

O LMG estabelecido pela legislação Brasileira é de 50 mg/kg de simulante para embalagens e equipamentos com capacidade igual ou superior a 250 mL, ou para embalagens e equipamentos em que não seja possível estimar a área da superfície em contato, ou ainda para embalagens e equipamentos com elementos de vedação ou objetos de área pequena. Já para embalagens e equipamentos com capacidade inferior a 250 mL e material plástico genérico, o LMG é de 8 mg/dm² de área de superfície da embalagem. No caso da PA é importante considerar que foram estabelecidos LME apenas para alguns compostos utilizados na fabricação de PA destinadas ao contato com alimentos (Tabela 2), e que o LME estabelecido para caprolactama em resinas e embalagens de PA é 15 mg/kg de alimento ou de simulante de alimentos^{2,23}.

A legislação da União Européia controla e regulamenta a embalagem plástica em contato com alimentos pelas Diretivas da União Européia. O controle e regulamentação das substâncias também compreendem três níveis de restrição: listas positivas, limite de composição e LMG e LME. A Diretiva 90/128/CEE, chamada Diretiva dos Plásticos, estabelece o conceito de migração global e fixa os monômeros e substâncias de partida que podem ser usados na fabricação de plásticos em contato com alimentos. O limite de migração global adotado pela União Européia é de 60 mg/kg de alimento ou simulante, ou 10 mg/dm² de área de contato. A Diretiva 1999/91/CEE de 23 de novembro de 1999 contém as listas positivas e os LME. Estas Diretivas sofreram atualizações que posteriormente foram revogadas, sendo a Diretiva 2002/72/CE a que está atualmente em vigor^{23,37}.

Nos Estados Unidos as substâncias químicas usadas em polímeros em contato com alimentos são regulamentadas pela *Food and Drug Administration* (FDA). As restrições da FDA estão baseadas nos limites máximos de substâncias químicas para uso na formulação de determinado material polimérico. A permissão para o emprego destas substâncias químicas é determinada através de testes toxicológicos e pela exposição esperada através da ingestão diária baseada em estudos de migração. Com base nesses testes, apenas os

materiais que apresentem risco aceitável ao consumidor são permitidos pela FDA. Além disso, também é utilizado o limiar de regulamentação (*threshold of regulation*) aplicado a substâncias químicas para as quais os níveis de migração resultem numa exposição que não exceda 0,5 µg de substância/kg da dieta diária (menor que 1,5 µg/pessoa/dia), eliminando a necessidade de regulamentação para a substância química. Para se determinar se uma substância preenche os requisitos necessários para isenção da necessidade de regulamentação, são necessárias as seguintes informações: composição química da substância, condições detalhadas de uso proposto para a substância, tipo de alimento com o qual a substância entrará em contato, duração do contato e se o material de embalagem ou equipamento sofrerá ou não uso repetido²⁵.

A ANVISA também é o órgão responsável pela regulamentação da irradiação de alimentos. De acordo com a Resolução RDC nº 21, de 26 de janeiro de 2001, radiação gama, beta ou raio-X podem ser empregados, em doses controladas, em qualquer alimento já embalado com finalidade sanitária, fitossanitária e/ou tecnológica. A dose máxima deve ser inferior àquela que comprometa as propriedades funcionais e/ou sensoriais do alimento. A embalagem deve ser apropriada para o procedimento de irradiação e estar de acordo com a legislação vigente^{2, 3}.

Também nos Estados Unidos, a FDA autoriza a irradiação de alimentos embalados e lista os materiais permitidos para uso, dentre os quais está a PA²⁴. Na União Européia, o emprego de materiais de embalagem adequados e a lista de alimentos e ingredientes que podem ser tratados por radiação ionizante também estão regulamentados^{21, 22}.

Aspectos toxicológicos

Existe uma preocupação com possíveis danos à saúde associados à utilização de substâncias quimicamente ativas e, conseqüentemente, a componentes de embalagens plásticas. No caso dos monômeros residuais, oligômeros, aditivos de embalagens plásticas, etc., a exposição está relacionada com a ingestão desses compostos quando ocorre a migração das embalagens para os alimentos em contato^{49, 50, 52, 53}. A migração destas substâncias pode representar um risco à saúde humana, particularmente durante a exposição crônica, através do consumo de alimentos¹⁹.

A literatura a respeito da avaliação toxicológica de componentes de embalagens plásticas para alimentos e bebidas é escassa. Segundo Ferguson e Wheeler²⁸ a exposição ao pó ou vapor da caprolactama em concentrações variando de 10 a 100 ppm pode

provocar irritação transitória da pele, olhos, nariz e esôfago em humanos²⁸. Os limites aceitáveis para exposição à caprolactama são de 1 mg/m³ para o pó e 20 mg/m³ para o vapor⁴. Outros estudos descreveram que a inalação de 120 a 150 mg/m³ de caprolactama por 24 dias pode alterar a função dos rins, das gônadas e dos sistemas nervoso e respiratório³¹, além de poder reduzir a fertilidade em ratos⁴⁶. Quando a caprolactama foi administrada intraperitonealmente em ratos, nas concentrações de 350 a 600 g/kg de peso corpóreo, foi capaz de causar tremores, convulsões, redução da temperatura e sangramento dos olhos, tendo também sido observada sua excreção pela urina, na forma de lactama e de aminoácido³³.

A baixa toxicidade da caprolactama em humanos foi em parte atribuída à sua rápida excreção, de acordo com experimentos descritos por Gross³⁸ utilizando ratos, que também relatou a hepatotoxicidade causada pela 4-hidroxycaprolactama, um dos metabólitos da caprolactama. Sintomas como fraqueza, irritabilidade, dores de cabeça e insônia, e diagnósticos de neuroses, neurastenia e rápida alteração de humor foram relacionados à exposição excessiva à caprolactama em trabalhadores de indústrias Russas³⁸.

A caprolactama não demonstrou ser carcinogênica e teratogênica para ratos-F344 e carcinogênica para camundongos-B6C3F1, sob as condições do bioensaio de carcinogênese, quando administrada na dieta alimentar contendo 3.750, 7.500 e 15.000 ppm de caprolactama para ratos-F344 e camundongos-B6C3F1, respectivamente, por 103 semanas. Nenhuma evidência de lesões neoplásicas ou não-neoplásicas associadas com a administração oral de caprolactama foi demonstrada nas análises histopatológicas destes animais⁵⁴.

Segundo Pogorzelska e Mielniczuk⁵⁶, a caprolactama apresenta propriedades tóxicas, não tendo mostrado, entretanto, de acordo com Fisher e Crescentini³⁰, ação mutagênica às bactérias (Teste de Ames e outros) e às células ovarianas de hamsters, embora Kulkarni e Kanekar⁴⁷ tenham relatado sua ação genotóxica, enquanto Sheldon⁶³ demonstrou que a caprolactama provocou danos cromossômicos e aneuploidia nos linfócitos humanos num ensaio citogenético *in vitro*. De acordo com relatos da *International Agency for Research on Cancer (IARC)*⁴² a caprolactama não foi mutagênica para roedores *in vivo*. Por outro lado, os resultados da transformação morfológica em células mamárias foram inconclusivos. Ainda, a caprolactama foi considerada mutagênica nas células somáticas e em menor grau nas células germinativas em *Drosophila melanogaster*⁴².

Serota et al.⁶² avaliaram o efeito tóxico da caprolactama em ratos-F344 fêmeas e machos que foram alimentados com dieta contendo caprolactama nas concentrações de 1000, 5000 e 10.000 mg/kg durante três gerações. Também foi avaliado um grupo controle, sem caprolactama. A média do peso corpóreo e consumo de alimento foram reduzidos em ambas as gerações nas concentrações de 5000 e 10.000 mg/kg. O peso corpóreo da prole foi também reduzido nestas concentrações. Um pequeno aumento na severidade da nefropatia espontânea foi observado em exame histopatológico de machos nos grupos de altas doses da primeira geração. Nenhum efeito adverso foi notado com concentrações de 1000 mg/kg. A dose de 50 mg/kg/dia foi escolhida como NOAEL (dose que não produz efeitos adversos) e serviu de base para estabelecer a RfD (dose de referência para exposição oral crônica) em 0,5 mg/kg p.c./dia para humanos.

De acordo com a IARC, embora a caprolactama esteja inserida no Grupo 4 e classificada como provavelmente não carcinogênica para humanos⁴², sua presença em alimentos é ainda considerada indesejável.

Migração de caprolactama de embalagens de poliamida para alimentos e/ou simulantes de alimentos

As embalagens plásticas podem conter pequenas quantidades de monômeros residuais e oligômeros de baixa massa molecular formados durante o processo de produção da resina, além de aditivos, resíduos relacionados ao processo de conversão dos plásticos, compostos de degradação, etc. Todos esses compostos possuem potencial de migração para o alimento em contato e, dependendo das condições de uso, como tempo e temperatura de contato, tipo de alimento ou simulante, entre outras, poderá resultar em alterações sensoriais e toxicológicas^{16, 51}.

A literatura disponível sobre a migração de caprolactama de embalagens de PA produzidas no país para alimentos e simulantes é ainda restrita. Particularmente, para produtos cárneos e queijos acondicionados em filmes multicamada contendo PA-6, os trabalhos disponíveis foram desenvolvidos pelo nosso grupo de pesquisa²⁶.

Barkby e Lawson⁹ quantificaram caprolactama e oligômeros de dois filmes de PA-6, usados em embalagens tipo *boil-in-the-bag*, na água em ebulição depois de 1h de contato. Os níveis de caprolactama migrada foram 260 µg/cm² para o filme de 15 µm de espessura e 1800 µg/cm² para o filme de 80 µm.

Begley et al.¹⁰ avaliaram monômeros e oligômeros de embalagens de PA tipo *roasting bag* (PA-6 e PA-66), usadas para o aquecimento de alimentos em forno convencional e sua migração para simulante gorduroso (Miglyol 812) por 30 minutos de contato a 176°C. A caprolactama que migrou da embalagem de PA para Miglyol 812 foi em média 0,98 µg/g de simulante.

Soto-Valdez et al.⁶⁴ determinaram compostos de embalagens MRB e sua migração para azeite de oliva a 175°C por 1 h. A migração da caprolactama da embalagem para o simulante foi de 60 µg/dm².

Gramshaw e Soto-Valdez³⁶ estudaram a migração de caprolactama de embalagens MRB para carne, pele e exudado de frango assado a 200°C por 2 h em forno convencional. A migração de caprolactama variou entre 2,5-4,0 e 2,5-6,7 µg/g de exudado e pele de frango, respectivamente. Já a migração da caprolactama para a carne e para o frango inteiro desossado foi de 1,3 e 1,4 µg/g de alimento, respectivamente.

Pogorzelska e Mielniczuk⁵⁶ relataram a migração da caprolactama de filmes de PA mono e multicamada, laminados de PA/PE, PA granulada, envoltórios de PA para embutidos, dentre outros, para simulantes de alimentos como água destilada, solução de ácido acético 3%, solução de etanol 15% e 95% e azeite de oliva. A migração da caprolactama, considerando os vários tipos de PA utilizadas, variou de 0,2-56,6 mg/kg para água destilada, de 6,0-48,6 mg/kg para solução de ácido acético 3%, de 6,3-46,5 mg/kg para solução de etanol 15%, de 6,4-42,7 mg/kg para solução de etanol 95% e de 1,5-3,8 mg/kg para azeite de oliva.

Caprolactama foi quantificada em alimentos embalados em *casings* para salsicha processadas termicamente dentro da embalagem, em filmes de PA usados para embalar alimentos refrigerados como o *bacon*, e em *pouches* (bolsas) laminados com PA/PE, para aquecimento do alimento pelo próprio consumidor. O nível de migração esteve na faixa de 0,8 a 13 mg/kg¹¹.

Stoffers et al.⁶⁷ avaliaram a migração de caprolactama de filmes mono e multicamada de PA-6/PA-12 e PA-6 obtendo 0,002 a 0,02 mg/dm² e 0,3 a 2,5 mg/dm², para água e azeite de oliva após contato de 2 h/100°C, respectivamente.

Felix et al.²⁶ quantificaram a migração de caprolactama de filmes multicamada contendo PA-6, usados para acondicionamento de produtos cárneos e queijos, para simulante solução de ácido acético 3%, que variou entre 6,9 e 10,5 mg/kg de simulante.

Irradiação de alimentos e de embalagens de alimentos e seus efeitos sobre a migração de caprolactama

A radiação ionizante proveniente de raios gama, raios-X e ultravioleta, e de aceleradores de elétrons vem sendo amplamente utilizada na conservação de alimentos em países industrializados¹⁷. A irradiação é capaz de inativar e destruir microrganismos presentes nos alimentos, interromper sua germinação e eliminar parasitas^{15,66,68}. A aplicação de diferentes doses de radiação depende da finalidade do uso. Doses entre 0,1-1 kGy podem estender o tempo de amadurecimento de frutas e vegetais, e doses de 2-8 kGy são usadas para “pasteurizar a frio” carnes e produtos cárneos em geral, eliminando microrganismos patogênicos. Doses mais elevadas, entre 25-75 kGy, são usadas para esterilização de alimentos pré-cozidos⁴¹.

Os materiais de embalagem podem ser irradiados antes ou após o acondicionamento do alimento. A irradiação de alimentos pré-embalados visa evitar a recontaminação microbiana. Carnes processadas, molhos para salada, gelatina e suco de frutas, vinhos, manteiga e outros produtos lácteos têm sido submetidos à irradiação e os materiais de embalagem usados são considerados críticos para o controle das indústrias de alimentos. Filmes plásticos laminados à folha de alumínio são irradiados para uso como embalagem *bag-in-the-box* de molho de tomate, suco de frutas e vinhos. Outros materiais usados como envoltório, para recobrimento e para embalagem asséptica de alimentos também são usualmente irradiados. O processo de irradiação também pode ser empregado para aumentar a reticulação da cadeia polimérica de forma a aumentar a resistência à mecânica e ao aquecimento, e para produzir embalagens com características especiais como os filmes retráteis. De maneira geral, o material de embalagem deve ser compatível com a irradiação e com o alimento, e não deve sofrer modificações em suas propriedades nem produzir substâncias tóxicas que possam ser transferidas aos alimentos quando irradiados nas doses requeridas¹⁷.

Alguns tipos de material de embalagem são aprovados pela FDA para irradiação de alimentos, dependendo da dose e do tipo de radiação ionizante, e desde que atendam as exigências do limiar de regulamentação e da *premarket notification**. Papel *kraft*, papel com cobertura de parafina, celofane, PA-11 e estruturas multicamada contendo PET, copolímeros de etileno e cloreto de vinila (PVDC) e filmes de poliolefinas podem ser

* Certificado pré-mercado: Autorização que as empresas precisam para lançar um produto no mercado americano, neste caso, o material de embalagem em contato com alimento, que será irradiado.

empregados quando doses de até 10 kGy de radiação gama forem usadas. Filmes multicamada contendo PE, PA-6, PET e copolímeros de cloreto de vinila e álcool vinílico (PVC/VA) podem ser submetidos à radiação gama e raios-X em doses até 60 kGy, enquanto copolímeros de EVA são autorizados para “pasteurização a frio”, em doses de até 30 kGy¹⁷.

Foi demonstrado que a irradiação pode promover a redução da migração de aditivos de embalagens dependendo do polímero e da dose empregada^{5, 6, 29, 38, 39, 43, 44, 45, 48, 66}. Contudo, parece não existir redução significativa na migração global, uma vez que, com a irradiação da embalagem ocorre formação de compostos de degradação que também podem migrar para o alimento em contato^{44, 66, 68}. Adicionalmente, tem sido verificada a formação de compostos voláteis em diferentes polímeros devido ao uso da irradiação^{7, 8, 58, 66, 68}.

Alguns trabalhos relataram modificações em embalagens de PA após irradiação, assim como alterações na concentração da caprolactama no polímero. Yagoubi et al.⁶⁹ observaram que doses de 25, 50 e 100 kGy formaram ácido aminocapróico, embora a concentração de caprolactama não tenha sido alterada. Buchalla et al.^{13, 14} verificaram que a pentanamida foi o principal produto da radiólise de filmes de PA-6 irradiados com doses de 25 e 50 kGy, embora formamida, acetamida, propanamida, butanamida e hexanamida também tenham sido formadas. Demertzis et al.²⁰ observaram que filmes de PA irradiados com 44 kGy não apresentaram diferença significativa em relação à formação de compostos de degradação em função da irradiação. Goulas et al.³⁴ observaram diferenças significativas ($p < 0,05$) na migração global de filmes de PEBD/PA/Ionômero para isooctano e solução de ácido acético 3%, que foram submetidos à radiação gama (5, 10 e 30 kGy), sendo que níveis maiores que 10 mg/dm² migraram para o simulante solução de ácido acético 3%. Doses de radiação gama de 5 e 10 kGy empregadas em garrafas contendo PEAD e PA, não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) na migração global (<10 mg/dm²) para água destilada, solução de ácido acético 3% e isooctano³⁵. Stoffers et al.⁶⁶ verificaram que o nível dos monômeros e oligômeros de baixa massa molecular de filmes de PA-6 e PA-12 não foram afetados pela radiação gama (0-54 kGy), e que além dos hidrocarbonetos alifáticos C₉ e C₁₀, outras substâncias voláteis formadas durante a irradiação foram detectadas. Segundo Park et al.⁵⁵, a irradiação de filme de PA-6 com dose de 5 kGy aumentou o nível de caprolactama de 70,76 mg/kg de embalagem (não-irradiada) para 164,10 mg/kg de embalagem (irradiada). Com doses entre 5 e 200 kGy a concentração de caprolactama permaneceu entre 122 e 164 mg/kg de embalagem.

Entretanto, embora o efeito da irradiação sobre a migração de componentes de embalagens de alimentos venha sendo pesquisado, poucos estudos a respeito da migração de caprolactama de embalagens de PA irradiadas têm sido encontrados. O efeito da irradiação na migração de caprolactama de filmes multicamada contendo PA-6 para simulantes de alimentos foi descrito por Félix et al.²⁷. Foi verificado que a caprolactama migrou dos filmes não irradiados para o simulante água destilada. Para os filmes usados como embalagem de produtos cárneos a migração foi de 10,22 a 12,96 µg/g de simulante, enquanto para os filmes usados como embalagem de queijos, de 7,52 µg/g de simulante. A caprolactama migrou dos filmes irradiados (3, 7 e 12 kGy) e não-irradiados (0 kGy) para o simulante solução de etanol 95%. Para os filmes usados como embalagem de produtos cárneos, o nível de caprolactama esteve na faixa de 9,43 a 10,01 µg/g de simulante para os filmes não-irradiados, e de 6,11 a 8,99 µg/g de simulante, para os filmes irradiados. Os filmes usados como embalagem de queijos, não irradiados e irradiados com 12 kGy, apresentaram níveis de caprolactama de 7,68 e 6,97 µg/g de simulante, respectivamente. A migração da caprolactama dos filmes usados como embalagem de produtos cárneos foi reduzida com o aumento da dose de irradiação de 0 kGy para 3 kGy, e se manteve praticamente a mesma até a dose de 7 kGy, enquanto que para os filmes usados como embalagem de queijos, os níveis de migração da caprolactama diminuíram com a irradiação.

Considerações finais

Embalagens de PA são muito usadas para acondicionar alimentos, especialmente produtos cárneos e queijos. Vários compostos presentes na embalagem podem migrar para o alimento em contato, como a caprolactama, monômero da PA-6, cujo limite de migração específica é de 15 mg/kg de alimento ou simulante. Embora o emprego da PA-6 seja autorizado para contato com alimentos e também para contato com alimentos pré-embalados que serão submetidos à irradiação, a presença da caprolactama não é desejável e o limite de migração específica deve ser respeitado. A migração da caprolactama de embalagens de PA para alimentos e simulante de alimentos varia dependendo da composição da embalagem, das condições de contato e do tipo de alimento ou simulante, assim como a migração de caprolactama das embalagens irradiadas, que dependem adicionalmente da dose de irradiação, embora mostre tendência de redução com o aumento da dose.

Agradecimentos

À CAPES e ao PADC/FCF/UNESP pelo suporte financeiro.

FÉLIX, J. S., MANZOLI, J. E.; PADULA, M.; MONTEIRO, M. Plastic packaging with polyamide 6 used for meat foodstuffs and cheese: caprolactam migration and effect of irradiation. **Alim. Nutr.**, Araraquara.

ABSTRACT: Polyamides are widely used as food packaging, mainly due to the mechanical, thermal, chemical and fat resistance, good barrier and thermoforming properties. Mono or multilayer polyamide 6 films are used especially for meat foodstuffs and cheese. Caprolactam, the monomer of polyamide 6, as well as low molecular mass oligomers, additives, degradation compounds, etc., may also be present in the packaging and have potential to migrate into food in contact. The use of polyamide 6 as plastic packaging for food contact is permitted in Brazil, Europe and USA. The polyamide 6 is also allowed for contact with pre-packaged food that will be submitted to irradiation. Despite its low toxicity, the presence of caprolactam in foods is considered undesirable. The caprolactam migration from polyamide packaging into food and food simulants has been reported in some studies. The levels of caprolactam migration vary depending on the packaging composition, time and temperature of contact, kind of simulant or food, etc. Caprolactam migration from irradiated polyamide packaging is still related to the dose of irradiation, although in a general way, it shows tendency of reduction with the increase of irradiation dose.

KEYWORDS: Plastic packaging, polyamide 6, caprolactam, migration, irradiation.

Referências Bibliográficas

1. ABRE (Associação Brasileira de Embalagem). Dados de mercado: receita líquida de vendas, 2006. Disponível em: <http://www.abre.org.br/centro_dados.php>. Acesso em: 09 jan. 2008.
2. ANVISA, 1999. Resolução No 105 (19 Maio 1999). Regulamentos técnicos sobre disposições gerais para embalagens e equipamentos plásticos em contato com alimentos e seus anexos. Disponível em: <<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=19772&word=>>>. Acesso em: 14 dez. 2007.
3. ANVISA, 2001. Resolução No 21 (26 Janeiro 2001). Regulamento Técnico para Irradiação de Alimentos. Disponível em: <<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=161&word=>>>. Acesso em: 14 dez. 2007.
4. ACGIH TLVs: Threshold limit values for chemical substances in workroom air adopted by ACGIH for 1975. The American Conference of Governmental Industrial Hygienists, Cincinnati, p.12, 1975. In: NTP (National Toxicology Program). Carcinogenic bioassay of caprolactam (CAS No. 105-60-2) in F344 rats and B6C3F1 mice (feed study). NTP Tech. Report Series No. 214, 1982. Disponível: <http://ntp.niehs.nih.gov/ntp/htdocs/LT_rpts/tr214.pdf>. Acesso em: 24 nov. 2005.
5. ALLEN, D. W. ICI-UNILEVER Fifth Symposium London, 1987. In: BUREAU, G.; MULTON, J. L. **Food Packaging Technology**, v.2, New York: VCH, 1996, p.65-84.
6. ALLEN, D. W.; LEATHARD, D. A.; SMITH, C.; McGUINNESS, J. D. Chem. Ind., p.198-199, 1987. In: BUREAU, G.; MULTON, J. L. **Food Packaging Technology**, v.2, New York: VCH, 1996, p.65-84.
7. AZUMA, K.; TANAKA, Y.; TSUNODA, H.; HIRATA, T.; ISHITANI, T. Agric. Biol. Chem., v.48, n.8, p.2003-2008, 1984a. In: BUREAU, G.; MULTON, J. L. **Food Packaging Technology**, v.2, New York: VCH, 1996, p.65-84.
8. AZUMA, K.; TSUNODA, H.; HIRATA, T.; ISHITANI, T.; TANAKA, Y. Agric. Biol. Chem., v.48, n.8, p.2009-2015, 1984b. In: BUREAU, G.; MULTON, J. L. **Food Packaging Technology**, v.2, New York: VCH, 1996, p.65-84.
9. BARKBY, C. T.; LAWSON, G. Analysis of migrants from nylon 6 packaging films into boiling water. **Food Addit. Contam.**, v.10, n.5, p.541-553, 1993.
10. BEGLEY, T. H.; GAY, M. L.; HOLLIFIELD, H. C. Determination of migrants in and migration from nylon food packaging. **Food Addit. Contam.**, v.12, n.5, p.671-676, 1995.

11. BRADLEY, E. L.; SPECK, D. R.; READ, W. A.; CASTLE, L. Method of test and survey of caprolactam migration into food packaged in nylon-6. **Food Add. Contam.**, v.21, n.12, p.1179-1185, 2004.
12. BROWN, W. E. **Plastics in food packaging: properties, design and fabrication**. New York: Marcel Dekker, 1992. p.129-130.
13. BUCHALLA, R.; BOESS, C.; BÖGL, W. Characterization of volatile radiolysis products in radiation-sterilized plastics by thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry: screening of six medical polymers. **Radiat. Phys. Chem.**, v. 56, p. 353-367, 1999.
14. BUCHALLA, R.; BEGLEY, T.H.; MOREHOUSE, K.M. Analysis of low-molecular weight radiolysis products in extracts of gamma-irradiated polymers by gas chromatography and high-performance liquid chromatography. **Radiat. Phys. Chem.**, v. 63, p. 837-840, 2002.
15. BUREAU, G. Ionizing treatment and packaging - preservation of foodstuffs packaged in flexible packaging. In: BUREAU, G.; MULTON, J. L. (ed.). **Food Packaging Technology**, v.2, New York: VCH, 1996, p.65-84.
16. CATALÁ, R.; GAVARA, R. Fundamentos y mecanismos de la migración. In: CATALÁ, R.; GAVARA, R. (Ed.). **Migración de componentes y residuos de envases en contacto con alimentos**. España: Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, 2002. p.1-17.
17. CHMIELEWSKI, A.G. **Packaging for food irradiation**. Raporty IChTj. Seria B nr 1'/2006. Edited by Institute of Nuclear Chemistry and Technology, Warszawa, 26 p., 2006.
18. DATAMARK. Dados de embalagem: materiais por peso – 1999 – 2006. Disponível em: <http://www.datamark.com.br/NewDatamark/ASP/FS/fs_pk_p.asp>. Acesso em 15 jan. 2008.
19. DE FUSCO, R; MONARCA, S; BISCARDI, D; PASQUINI, R; FATIGONI, C. Leaching of mutagens into mineral water from polyethyleneterephthalate bottles. **Sci. Total Environ.**, v.90, p.241-248, 1990.
20. DEMERTZIS, P.G.; FRANZ, R.; WELLE, F. The effects of γ -irradiation on compositional changes in plastics packaging films. **Pack. Technol. Sci.**, v.12, p. 119-130, 1999.

21. EC, 1999. Commission Directive 1999/2/CE on the approximation of the laws of the Member States concerning foods and food ingredients treated with ionising radiation. **Off. J. Eur. Com.** Disponível em: <http://ec.europa.eu/food/fs/sfp/fi02_en.pdf#search=%22Directive%201999%2F2%2FEC%22>. Acesso em: 09 jan. 2008.
22. EC, 1999. Commission Directive 1999/3/EC on the establishment of a Community list of foods and food ingredients treated with ionising radiation. **Off. J. Eur. Com.** Disponível em: <http://ec.europa.eu/food/fs/sfp/fi03_en.pdf>. Acesso em: 09 jan. 2008.
23. EC, 2002, Commission Directive 2002/72/EC relating to plastics materials and articles intended to come into contact with foodstuffs. **Off. J. Eur. Com.**, L220, 18-58.
24. FDA, 2005, Code of Federal Regulations. Packaging materials for use during the irradiation of prepackaged food. 21CFR 179.45. Disponível em: <<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?fr=179.45&SearchTerm=irradiation>>. Acesso em: 10 dez. 2007.
25. FDA, 2006, Food Ingredients and Packaging Food Contact Substance Notification Program. Disponível em: <<http://www.cfsan.fda.gov/~dms/opa-notf.html>>. Acesso em 15 abr. 2006.
26. FÉLIX, J. S.; PADULA, M.; MANZOLI, J. E.; MONTEIRO, M. Desenvolvimento e validação de método analítico para determinação de ϵ -caprolactama em simulante de alimentos gordurosos. **Alim. Nutr.**, 17(3): 329-335, 2006.
27. FÉLIX, J. S.; MONTEIRO, M.; MANZOLI, J. E.; PADULA, M.; PEZO, D.; ROMERO, J.; NERÍN, C. Identification and migration of degradation compounds from irradiation of multilayer polyamide 6 films for meat foodstuffs and cheese. **Anal. Bioanal. Chem.**, (DOI 10.1007/s00216-008-1893-3), 2008. Disponível em:<<http://www.springerlink.com/content/e666100588515j55/fulltext.pdf>>. Acesso em: 15 fev. 2008.
28. FERGUSON, W. S.; WHEELER, D. D. Caprolactam vapor exposure. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.*34, p.384-389, 1973. In: NTP (National Toxicology Program). Carcinogenic bioassay of caprolactam (CAS No. 105-60-2) in F344 rats and B6C3F1 mice (feed study). NTP Tech. Report Series No. 214, 1982. Disponível: <http://ntp.niehs.nih.gov/ntp/htdocs/LT_rpts/tr214.pdf>. Acesso em: 24 nov. 2005.
29. FIGGE, K.; FREYTAG, W. *Detsche Lebensmittel Rundschau*, v.73, n.7, p.205-210, 1977. In: BUREAU, G.; MULTON, J. L. **Food Packaging Technology**, v.2, New York: VCH, 1996, p.65-84.

-
30. FISHER, W. B.; CRESCENTINI, L. Polyamides: caprolactam. In: OTHMER, K. **Encyclopedia of chemical technology**. 3rd ed. New York: John Wiley & Sons, 1994. 1 CD ROM.
 31. GABPIELYAN, N. I.; KUCHUKHIBSA, G. E.; CHIRKOVA, E. M. Characterization of the general and gonadotropic action of caprolactama. *Gig. Trud. Prof. Zabol.*, v.10, p.40-42, 1975. In: NTP (National Toxicology Program). Carcinogenic bioassay of caprolactam (CAS No. 105-60-2) in F344 rats and B6C3F1 mice (feed study). NTP Tech. Report Series No. 214, 1982. Disponível: <http://ntp.niehs.nih.gov/ntp/htdocs/LT_rpts/tr214.pdf>. Acesso em: 24 nov. 2005.
 32. GARCIA, E. E. C. **Estudo do potencial de migração de componentes de embalagens plásticas para produtos gordurosos a altas temperaturas**. 1996. 86 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1996.
 33. GOLDBLATT, M. W.; et al. *Br. J. Ind. Med.* v.11, p.1-10, 1954. In: NTP (National Toxicology Program). Carcinogenic bioassay of caprolactam (CAS No. 105-60-2) in F344 rats and B6C3F1 mice (feed study). NTP Tech. Report Series No. 214, 1982. Disponível: <http://ntp.niehs.nih.gov/ntp/htdocs/LT_rpts/tr214.pdf>. Acesso em: 24 nov. 2005.
 34. GOULAS, A. E.; RIGANAKOS, K. A.; KONTOMINAS, M. G. Effect of ionizing radiation on physicochemical and mechanical properties of commercial multilayer coextruded flexible plastics packaging materials. **Radiat. Phys. Chem.**, v. 68, p. 865-872, 2003.
 35. GOULAS, A. E.; RIGANAKOS, K. A.; KONTOMINAS, M. G. Effect of ionizing radiation on physicochemical and mechanical properties of commercial monolayer and multilayer semirigid plastics packaging materials. **Radiat. Phys. Chem.**, v. 69, p. 411-417, 2004.
 36. GRAMSHAW, J. W.; SOTO-VALDEZ, H. Migration from polyamide 'microwave and roasting bags' into roast chicken. **Food Addit. Contam.**, v.15, n.3, p.329-335, 1998.
 37. GROB, K.; PFENNINGER, S.; POHL, W.; LASO, M.; IMHOF, D.; RIEGER, K. European legal limits for migration from food packaging materials: 1. Food should prevail over simulants; 2. More realistic conversion from concentrations to limits per surface area. PVC cling films in contact with cheese as an example. **Food Control**, v. 18, p. 201-210, 2007.

-
38. GROSS, P. Biologic activity of epsilon-caprolactam. **Crit. Rev. Toxicol.** v.13, n.3, p.205-216, 1984.
 39. HAESSEN, G.; DEPAUS, R.; VAN TILBEURGH, H.; LE GOLF, B.; LOX, F. *Ind. Irr. Tech.*, v.1, n.3, p.259-280, 1983. In: BUREAU, G.; MULTON, J. L. **Food Packaging Technology**, v.2, New York: VCH, 1996, p.65-84.
 40. HERNANDEZ, R. J.; SELKE, S. E. M.; CULTER, J. D. **Plastics packaging: properties, processing, applications and regulations.** Cincinnati: Hanser Gardner Publications, 2000. p.113-115.
 41. IAEA, 2002, TRS-409, **Dosimetry for food irradiation.** International Atomic Energy Agency, Vienna, Technical report series, ISSN 0074-1914; no.409.
 42. IARC (International Agency for Research on Cancer). Summaries & evaluations: caprolactam (group 4), 1999. Disponível em: <<http://www.inchem.org/documents/iarc/vol71/010-caprolactam.html>>. Acesso em: 24 nov. 2005.
 43. ITO, R.; SESHIMO, F.; HAISHIMA, Y.; HASEGAWA, C.; et al. Reducing the migration of di-2-ethylhexyl phthalate from polyvinyl chloride medical devices. **Int. J. Pharm.**, v.3003, p.104-112, 2005.
 44. JEON, D. H.; PARK, G. Y.; KWAK, I. S.; LEE, K. H.; PARK, H. J., 2007, Antioxidants and their migration into food simulants on irradiated LLDPE film. **LWT - Food Sci. Technol.**, v. 40, p. 151-156.
 45. KATAN, L. L. *FCD Packaging*, v.10, n.3, p.9, 1987. In: BUREAU, G.; MULTON, J. L. **Food Packaging Technology**, v.2, New York: VCH, 1996, p.65-84.
 46. KHADZHIEVA, E. D. Effect of caprolactam on the reproductive functions of albino rats. *Hyg. Sanit. (USSR)*, v.34, n.7, p.28-32, 1969. In: NTP (National Toxicology Program). Carcinogenic bioassay of caprolactam (CAS No. 105-60-2) in F344 rats and B6C3F1 mice (feed study). NTP Tech. Report Series No. 214, 1982. Disponível: <http://ntp.niehs.nih.gov/ntp/htdocs/LT_rpts/tr214.pdf>. Acesso em: 24 nov. 2005.
 47. KULKARNI, R.; KANEKAR, P. Simultaneous determination of epsilon-caprolactam and epsilon-aminocaproic acid by high-performance liquid chromatography. **Process Control Qual.**, v.9, n.1-3, p.31-37, 1997.
 48. LOX, F. 5th IAPRI Conf. Bristol, UK, 1986 In: BUREAU, G.; MULTON, J. L. **Food Packaging Technology**, v.2, New York: VCH, 1996, p.65-84.
 49. MONTEIRO, M.; NERIN, C.; REYES, F. G. R. Determination of UV stabilizers in PET bottles by high performance-size exclusion chromatography. **Food Addit. Contam.**, v.13, p.575-586, 1996.
-

-
50. MONTEIRO, M. **Absorvedores de radiação ultravioleta em embalagens plásticas e em óleos vegetais:** metodologia analítica e estudo de migração. 1997. 123 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, Campinas, 1997.
51. MONTEIRO, M.; NERÍN, C.; REYES, F. G. R. Migration of Tinuvin P, as a UV stabilizer, from PET bottles into fatty-food simulants. **Pack. Technol. Sci.**, v.12, p.241-248, 1999.
52. MONTEIRO, M. **Contribuição ao estudo de aditivos, monômeros e oligômeros de embalagem plástica e à avaliação de frutas, polpas, sucos e bebidas à base de fruta.** 2005. 91f. Texto sistematizado sobre a contribuição científica (Livre Docência) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2005.
53. NASSER, A. L. M.; LOPES, L. M. X.; MONTEIRO, M. Oligômeros em embalagens de PET para água mineral e suco de fruta. Uma revisão. **Alim. Nutr.**, v. 16, n. 2, p. 183-194, 2005.
54. NTP (National Toxicology Program). Carcinogenic bioassay of caprolactam (CAS No. 105-60-2) in F344 rats and B6C3F1 mice (feed study). NTP Tech. Report Series No. 214, 1982. Disponível: <http://ntp.niehs.nih.gov/ntp/htdocs/LT_rpts/tr214.pdf>. Acesso em: 24 nov. 2005.
55. PARK, G.Y.; CHO, S.Y.; JEON, D.H.; KWAK, I.S.; LEE, K.H.; PARK, H.J. Formation of monomer residues in PS, PC, PA-6 and PVC upon γ -irradiation. **Radiat. Phys. Chem.**, v. 75, p. 1055-1059, 2006.
56. POGORZELSKA, Z.; MIELNICZUK, Z. Determination of ϵ -caprolactam migration from polyamide plastics: A new approach. **Packag. Technol. Sci.**, v.14, p.31-35, 2001.
57. RETO, M. A. S. Náilon beira os setenta anos no auge do sucesso. **Plástico Mod.**, n.352, p.24-35, 2004.
58. ROJAS DE GANTE, C.; PASCAT, B.; BUREAU, G. 6th IAPRI Conf. Bruxelles, 1988. In: BUREAU, G.; MULTON, J. L. **Food Packaging Technology**, v.2, New York: VCH, 1996, p.65-84.
59. SARANTÓPOULOS, C. I. G. L.; OLIVEIRA, L. M. Sistemas de embalagens plásticas para preservação de carne boviana e derivados. In: **Ciência e Tecnologia da Carne Bovina**. Campinas,: CTC/ITAL, p.58-70, 1994.

-
60. SARANTÓPOULOS, C. I. G. L.; OLIVEIRA, L. M.; CANAVESI, E. **Requisitos de conservação de alimentos em embalagens flexíveis.** Campinas: CETEA/ITAL, 2001. p.151-171; 175-182.
 61. SARANTÓPOULOS, C. I. G. L.; OLIVEIRA, M.L.; COLTRO, L.; VERCELINO, A. R. M.; CORRÊA, G. E. E. **Embalagens plásticas flexíveis: principais polímeros e avaliação de propriedades.** Campinas: CETEA/ITAL, 2002. p.24-27.
 62. SEROTA, C.G.; HOBERTMAN, A. M.; GAD, S. C. 1984. A three-generation reproduction study with caprolactam in rats. In: Proc. Symp. Ind. Approach Chem. Risk Assess.: Caprolactam Relat. Compd. Case Study. Ind. Health Found., Pittsburgh, PA. p.191-204.
 63. SHELDON, T. Chromosomal damage induced by caprolactam in human lymphocytes. **Mutat Res.** v.224, n.3, p.325-327, 1989.
 64. SOTO-VALDEZ, H.; GRAMSHAW, J. W.; VANDERBURG, H. J. Determination of potencial migrants present in Nylon 'microwave and roasting bags' and migration into olive oil. **Food Addit. Contam.,** v.14, n.3, p.309-318, 1997.
 65. STOFFERS, N. H.; BRANDL, F.; LINSSEN, J. P. H.; FRANZ, R. Development and validation of analytical methods for monomeric and oligomeric migrants from nylon 12 packaging materials. **Food Addit. Contam.,** v.20, n.4, p.410-416, 2003.
 66. STOFFERS, N. H.; LINSSEN, J., P., H.; FRANZ, R.; WELLE, F. Migration and sensory evaluation of irradiated polymers. **Radiat. Phys. Chem.,** v.71, p.203-206, 2004.
 67. STOFFERS, N. H.; DEKKER M.; LINSSEN, J. P. H.; STÖMER A.; FRANZ, R.; VAN BOEKEL, M. A. J. S. Modelling of simultaneous two-sided migration into water and olive oil from nylon food packaging. **Eur. Food Res. Technol.,** 220: 156-162, 2005.
 68. WELLE, F.; MAUER, A.; FRANZ, R. Migration and sensory changes of packaging materials caused by ionising radiation. **Radiat. Phys. Chem.,** v.63, p.841-844, 2002.
 69. YAGOUBI, N.; BAILLET, A.; PELLERIN, F.; FERRIER, D. Physico-chemical behaviour of β irradiated plastic materials currently used as packaging and medical products. **Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. B,** v. 105, p. 340-344, 1995.

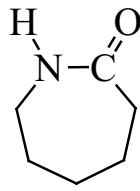


FIGURA 1 - Estrutura da caprolactama.

Tabela 1 - Tipos de poliamida usadas como embalagens de alimentos.

Tipos de poliamida	Compostos
PA-6	Caprolactama
PA-6/12	Caprolactama e lauro lactama
PA-6/66	Hexametilendiamina, ácido adípico e caprolactama
PA-6/6T	Hexametilendiamina, ácido adípico e ácido tereftálico
PA-6I/6T	Hexametilendiamina, ácido tereftálico e ácido isoftálico
PA-6/6T/6I	Caprolactama, ácido adípico, Ω -1,6-diamino-2,2,4-trimetil-hexano, 1,6-diamino-2,2,4-trimetil-hexano e 1-amino-3-aminometil-3,5,5-trimetil-ciclohexano
PA-11	Ácido Ω -amino undecanóico
PA-12	Lauro lactama
PA-12T	Lauro lactama, ácido isoftálico e bis(4-amino-3metil ciclohexil) metano
PA MXD-6	Ácido adípico e 1,3-benzenodimetano amina
PA MXD-6 modificada para o impacto	Ácido adípico e 1,3-benzenodimetano amina e T3- α -(3-amino propil) Ω -(3-aminopropoxi) polioxi etileno
PA-66	Hexametilendiamina e ácido adípico
PA-610	Hexametilendiamina e ácido sebácico
PA-611	Hexametilendiamina e ácido Ω -amino undecanóico
PA-612	Hexametilendiamina e ácido dodecanodióico

Fonte: ANVISA, 1999.

Tabela 2 - Limite de migração específica estabelecidos para compostos utilizados na fabricação de PA destinadas ao contato com alimentos.

Compostos	LME (mg/kg)	Tipos de PA
Ácido tereftálico	7,5	PA-12T, PA-6I/6T, PA-6/6T
Ácido Ω -amino undecanóico	5	PA-11, PA-611
1,3-Benzenodimetanamina	0,05	PA MXD-6, PA MXD-6 modificada para o impacto
Caprolactama	15	PA-6, PA-6/6T/6I, PA-6/12, PA-6/66
Hexametilendiamina	2,4	PA-66, PA-6/66, PA-6/6T, PA-612, PA-611, PA-610, PA-6I/6T

Fonte: ANVISA, 1999.

CAPÍTULO 2

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DE ϵ -CAPROLACTAMA EM SIMULANTE DE ALIMENTOS GORDUROSOS

Trabalho publicado na revista Alimentos e Nutrição,
v.17, n.3, p.329-335, jul./set. 2006



DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DE ϵ -CAPROLACTAMA EM SIMULANTE DE ALIMENTOS GORDUROSOS*

Juliana Silva FÉLIX*

Marisa PADULA***

José Eduardo MANZOLI****

Magali MONTEIRO**

■ **RESUMO:** A ϵ -caprolactama é o monômero utilizado na fabricação da poliamida 6, empregada como embalagem de alimentos, especialmente produtos cárneos e queijos. Após a polimerização, parte do monômero pode permanecer na resina e posteriormente poderá migrar para o alimento com o qual entrará em contato. Este trabalho teve como objetivo desenvolver e validar método analítico para determinar 55-caprolactama no azeite de oliva, visando subsidiar futuros estudos de migração de ϵ -caprolactama de embalagens contendo poliamida 6 usadas no acondicionamento de produtos cárneos e de queijos, que apresentam alto teor de gordura. A técnica utilizada foi a cromatografia gasosa, empregando ϵ -caprolactama como padrão analítico e 2-azociclononano como padrão interno. O intervalo de linearidade obtido foi 0,20 a 1062,34 $\mu\text{g/g}$, com coeficiente de correlação 0,99993. Os limites de detecção e de quantificação do método foram 0,10 ng e 0,20 ng, respectivamente. A precisão do método revelou valores de coeficientes de variação menores que 3,8%, enquanto a exatidão do método apresentou valores de recuperação entre 88,6 e 112,0%, além de coeficientes de variação menores que 3,8%. O método desenvolvido e validado poderá ser empregado para dosar os níveis de ϵ -caprolactama migrados para o simulante azeite de oliva em contato com poliamida 6.

■ **PALAVRAS-CHAVE:** Poliamida; ϵ -caprolactama; validação de método analítico; cromatografia gasosa.

INTRODUÇÃO

A poliamida 6 (PA6) é produzida pela polimerização do monômero ϵ -caprolactama.¹⁸ Durante o processo de polimerização, parte do monômero empregado pode permanecer na resina, já que a polimerização não é completa. Podem também estar presentes oligômeros e outros

compostos de baixa massa molecular, aditivos, compostos de degradação, entre outros, que podem migrar para o alimento em contato.^{1, 2, 12, 18}

A PA6 é muito usada como embalagem de alimentos. Sua maior aplicação ocorre na forma de filmes e envoltórios, como componente único ou em estruturas de multicamadas.^{7, 17} Filmes de PA6 têm sido muito empregados como embalagens a vácuo e com atmosfera modificada para carnes e aves frescas e processadas, para queijos, e como embalagens tipo *cook in* para carnes e aves processadas. De maneira geral, a PA oferece boa barreira aos gases, aromas, gorduras e ao vapor d'água e boa resistência mecânica, além de ser termoformável e termorresistente.^{15, 16}

A migração da ϵ -caprolactama de filmes de PA mono- e multicamada, laminados de PA/PE, PA granulada, envoltórios de PA para embutidos, dentre outros, variou de 0,2-56,6 mg/kg para água destilada, de 6,0-48,6 mg/kg para solução de ácido acético 3%, de 6,3-46,5 mg/kg para solução de etanol 15%, de 6,4-42,7 mg/kg para solução de etanol 95% e de 1,5-3,8 mg/kg para azeite de oliva, considerando os vários tipos de PA utilizadas.¹³ Já o nível de ϵ -caprolactama que migrou de filmes de PA6, usados em embalagens *boil-in-the-bag*, para água em ebulição após 1h de contato variou de 2,60-18,0 $\mu\text{g/dm}^2$, enquanto 0,98 g/g de ϵ -caprolactama migraram de embalagens *roasting bag* de PA6 e PA66 após contato de 30min/176°C com simulante gorduroso e 60 $\mu\text{g/dm}^2$ (0,36mg/kg) migraram para azeite de oliva após contato de 1h/175°C.^{1, 2, 18}

Uma variedade de métodos cromatográficos tem sido utilizada na determinação de ϵ -caprolactama e seus oligômeros no próprio polímero, em simulantes de alimentos e em alimentos: cromatografia gasosa com detector de ionização de chama (CG/DIC),^{6, 9, 13} cromatografia líquida de alta eficiência usando detector de ultravioleta (CLAE/UV),^{1, 2, 3, 5, 10, 18} cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM)^{9, 19} e cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (CLAE/EM).^{1, 18}

* Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - 14801-902 - Araraquara - SP - Brasil. Trabalho elaborado com auxílio financeiro do PADC-FCF/UNESP (Processo nº 2005/1-I) e da CAPES.

** Departamento de Alimentos e Nutrição - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - 14801-902 - Araraquara - SP - Brasil.

*** Centro de Tecnologia de Embalagem - ITAL - 13070-178 - Campinas - SP - Brasil.

**** Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (CTR) - CNEN - 05508-000 - São Paulo - SP - Brasil e Universidade São Judas Tadeu - 03166-000 - São Paulo - SP - Brasil.

A CG/DIC é amplamente utilizada em ensaios de migração por detectar a ϵ -caprolactama em níveis de traços, enquanto a CLAE/UV tem sido muito empregada quando o objetivo é a análise da ϵ -caprolactama e seus oligômeros. Já a CG/EM e CLAE/EM vêm sendo usadas para identificar e quantificar os compostos presentes nas diferentes matrizes dependendo de sua massa molecular, polaridade e volatilidade.

O objetivo deste trabalho foi desenvolver e validar método analítico para determinar ϵ -caprolactama no simulante de alimentos gordurosos azeite de oliva.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras e reagentes

A ϵ -caprolactama (pureza >99%, Sigma-Aldrich) foi utilizada como padrão analítico e a 2-azociclononano (pureza >98%, Sigma-Aldrich) como padrão interno. Azeite de oliva extra virgem foi empregado durante a validação da metodologia como simulante de alimentos gordurosos.

Metanol e n-heptano foram adquiridos da Mallinckrodt Chemicals (Phillipsburg, USA) e etanol da J. T. Baker, todos de grau cromatográfico. Azeite de oliva extra virgem (La Española), adquirido em supermercado, e água destilada, também foram utilizados.

Equipamento

Foi utilizado o cromatógrafo gasoso (CG) Shimadzu 17-A (Shimadzu, Kyoto, Japão), com detector de ionização de chama (DIC) e colunas capilares DB-1701 (J&W Scientific) de 30m de comprimento por 0,25mm de diâmetro interno e 0,25 μ m de espessura do filme interno e DB-5 (J&W Scientific) de 60m de comprimento por 0,25mm de diâmetro interno e 0,25 μ m de espessura do filme interno.

Métodos

Condições cromatográficas

As condições de operação do equipamento foram estabelecidas utilizando a coluna DB-1701. Os parâmetros analíticos como temperatura do injetor, coluna e detector, fluxo do gás de arraste, volume de injeção e fase estacionária foram estabelecidos com base no método descrito pela União Européia,⁹ otimizados de acordo com as condições do laboratório.

Preparo das soluções

As soluções estoque de ϵ -caprolactama e de 2-azociclononano foram preparadas em metanol na concentração de 10.000 e 350 μ g/mL, respectivamente. Posteriormente, por diluições sucessivas, foram obtidas as soluções de trabalho, as quais foram diluídas em azeite de oliva, conforme necessário. As soluções padrão de

ϵ -caprolactama e 2-azociclononano em metanol, de diferentes concentrações, foram adicionadas ao azeite de oliva, sendo realizada a seguir uma extração líquido-líquido usando n-heptano e solução de etanol/água (1:2). Após agitação por 2 min e descanso de 30 min, a fase aquosa foi recolhida e filtrada em PTFE 0,22 μ m, sendo posteriormente injetada no CG. Tais soluções foram armazenadas a 10°C no escuro, sendo pesadas diariamente e utilizadas por no máximo três meses.

Validação de método analítico

A validação do método analítico incluiu a avaliação dos seguintes parâmetros: calibração, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção e limite de quantificação.

Calibração e linearidade

Seis concentrações das soluções padrão foram usadas na construção da curva de calibração, que foram injetadas no CG em decuplicata, empregando o método do padrão interno.

A linearidade do método foi determinada a partir dos dados referentes à curva de calibração. O cálculo da regressão linear pelo método dos mínimos quadrados forneceu a equação da reta ($y = a + bx$), onde x é a concentração do analito na matriz e y a área do pico.

Limite de detecção e limite de quantificação do método

O limite de detecção do método (LD) foi determinado como sendo a quantidade de ϵ -caprolactama correspondente a três vezes à área do ruído de fundo no tempo de retenção do pico do analito, injetando-se no sistema cromatográfico soluções padrão de ϵ -caprolactama e 2-azociclononano em azeite de oliva, em hexaduplicata.

O limite de quantificação do método (LQ) foi determinado como sendo a menor quantidade de ϵ -caprolactama determinada na matriz, ao serem injetadas soluções de ϵ -caprolactama e 2-azociclononano em azeite de oliva, em decuplicata, tendo o coeficiente de variação sido mantido em níveis menores que 5%.

As soluções padrão em azeite de oliva foram preparadas como descrito anteriormente e injetadas no sistema cromatográfico.

Precisão e exatidão do método

A precisão do método foi avaliada mediante ensaio de repetibilidade e de precisão intermediária. A repetibilidade foi avaliada realizando medidas intra-dias. Para tanto, três concentrações da solução padrão (2,13, 79,76 e 797,28 μ g/g de ϵ -caprolactama e 9,4 μ g/g de 2-azociclononano em azeite de oliva), preparadas como descrito anteriormente, foram injetadas no CG em triplicata num mesmo dia. A precisão intermediária foi avaliada realizando medidas inter-dias e as mesmas concentrações empregadas no ensaio de

repetibilidade foram usadas. As soluções padrão foram injetadas no CG em dias consecutivos, totalizando 10 injeções.

A exatidão do método foi avaliada mediante o estudo de recuperação. Para tanto, soluções padrão contendo 2,13; 79,76 e 797,28 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ϵ -caprolactama e 9,4 $\mu\text{g}/\text{g}$ de 2-azociclononana em azeite de oliva, foram injetadas 10 vezes no CG. A exatidão foi expressa como a razão percentual entre a concentração de ϵ -caprolactama obtida e a concentração adicionada.^{4,8,11,14}

Análise estatística

O tratamento estatístico dos dados da validação do método analítico envolveu a determinação da média, do desvio padrão e do coeficiente de variação utilizando o software MICROSOFT EXCEL, 2000.

O tratamento estatístico dos dados para a obtenção da curva de calibração envolveu a determinação da equação da reta de regressão linear e do coeficiente de correlação utilizando o software ORIGIN 7.0, 2000.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Condições cromatográficas

Foram realizados estudos preliminares para

estabelecer as condições de operação do equipamento (diferentes fases estacionárias, diferentes programações de temperatura, etc.) utilizando soluções padrão de ϵ -caprolactama e 2-azociclononana, com base no método de determinação de ϵ -caprolactama em simulantes de alimentos⁹.

A ϵ -caprolactama e a 2-azociclononana estiveram livres de compostos interferentes ou que se sobrepujam aos seus sinais quando as duas colunas, DB-5 e DB-1701, foram utilizadas. No entanto, a melhor resolução foi obtida usando a coluna DB-1701 que foi, então, empregada na otimização e validação do método analítico. As condições utilizadas foram: temperatura inicial da coluna de 130°C durante 1 minuto, programada a 10°C/min até 170°C e mantida por 1 minuto, novamente aquecida a 10°C/min até 200°C permanecendo por 2 minutos. O gás de arraste utilizado foi hidrogênio com vazão de 1 mL/min. As injeções (1 μL) foram feitas a 240°C no modo split e razão 1:20. A temperatura de detecção foi de 250°C.

Os cromatogramas obtidos para o branco do solvente e do simulante, e para uma solução padrão de ϵ -caprolactama e 2-azociclononana em azeite de oliva estão apresentados na Figura 1. Verifica-se, de acordo com os cromatogramas, que a ϵ -caprolactama e a 2-azociclononana apresentaram tempos de retenção de 6,4 e 8,8 minutos, respectivamente e estavam livres de compostos interferentes ou que sobrepujam aos seus sinais (Figura 1).

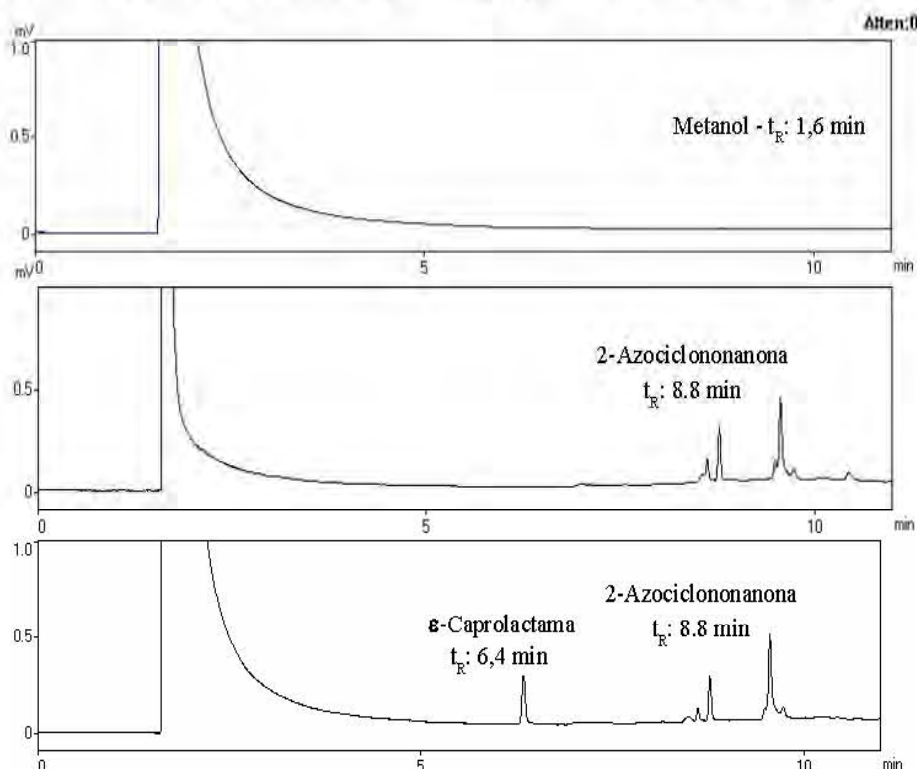


FIGURA 1 - Cromatogramas típicos obtidos por CG/DIC para: (a) branco (metanol), (b) solução de 2-azociclononana (9,4 $\mu\text{g}/\text{g}$) em azeite de oliva (branco do simulante) e (c) solução padrão de ϵ -caprolactama e 2-azociclononana em azeite de oliva (10,63 e 9,4 $\mu\text{g}/\text{g}$, respectivamente).

Condições: Coluna capilar: DB-1701; Temperatura da coluna: 130°C por 1min, programada a 10°C/min até 170°C por 1min e a 10°C/min até 200°C por 2 min; Gás de arraste: Hidrogênio; Volume de injeção: 1 μL ; Modo de injeção: Split; Temperatura do injetor: 240°C; Temperatura do detector: 250°C.

Validação do método analítico

A validação foi efetuada de acordo com os protocolos relatados na literatura.^{4, 8, 11, 14}

Curva de calibração e linearidade

A curva de calibração obtida apresentou linearidade no intervalo de concentração de 0,20 a 1062,34 µg/g de ε-caprolactama (Figura 2). A equação de regressão foi $y = -0,07077 + 1,0706x$, onde y é a razão da área do pico da ε-caprolactama

pela área do pico do padrão interno e x, a razão da concentração da ε-caprolactama pela concentração do padrão interno. O coeficiente de correlação (r) foi 0,99993. Foram realizadas 10 injeções de cada concentração empregada (0,20; 0,80; 1,06; 106,30; 531,03 e 1062,34 µg/g de ε-caprolactama e 9,4 µg/g de 2-azociclononano), e determinadas as médias, os desvios padrão e os coeficientes de variação, que foram menores que 5,1%, para todas concentrações avaliadas. Na Tabela 1 estão apresentadas as áreas dos picos da ε-caprolactama e da 2-azociclononano correspondentes a cada concentração das soluções padrão usadas.

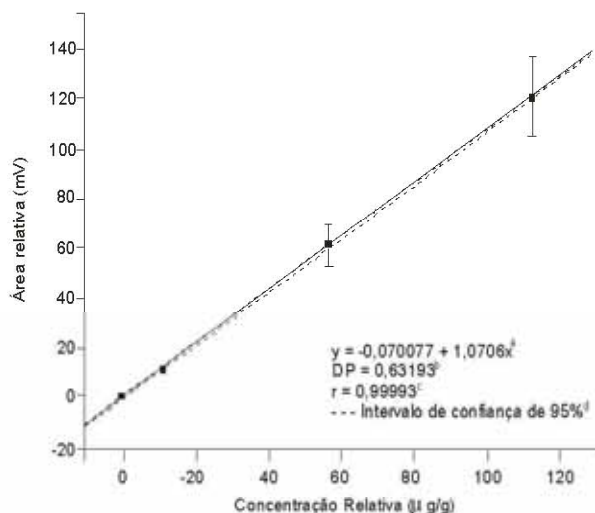


FIGURA 2 - Curva de calibração da ε-caprolactama/2-azociclononano em azeite de oliva (concentração de ε-caprolactama/2-azociclononano: 0,20 a 1062,34 µg/g e 9,4 µg/g).

^aEquação da reta

^bDesvio padrão

^cCoefficiente de correlação

^dIntervalo de confiança de 95%

Tabela 1 - Áreas dos picos referentes às soluções padrão de ε-caprolactama (CP) em diferentes concentrações e 2-azociclononano (PI) (9,4 µg/g) em azeite de oliva, obtidas por CG/DIC.

	Concentração (µg/g)											
	CP	AZO	CP	AZO	CP	AZO	CP	AZO	CP	AZO	CP	AZO
	0,20		0,80		1,06		106,3		531,03		1062,34	
Área do pico (mV)	26	644	50	588	71	653	6900	615	37470	619	69559	623
	24	632	52	629	67	575	7323	625	36650	610	67326	561
	23	622	46	610	64	592	7198	618	37151	602	72847	593
	25	684	47	642	68	617	6730	604	36510	583	69263	568
	25	610	47	637	73	636	6669	603	36460	587	72630	589
	25	681	47	575	74	551	6663	589	34578	545	71739	582
	23	680	49	607	72	573	6505	613	34797	579	66846	561
	26	641	48	599	69	601	7490	661	34758	575	74562	625
	26	612	48	576	65	587	7062	631	38256	638	67383	550
	24	595	52	576	67	593	6767	590	35029	558	73052	605
	26	644	50	588	71	653	6900	615	37470	619	69559	623
Média (µg/g)	24,7	640,1	48,6	603,9	69,0	597,8	6930,7	609,4	36165,9	589,6	70520,7	585,7
DP	1,2	32,2	2,1	25,6	3,4	30,5	324,0	21,2	1297,4	28,2	2791,8	26,2
CV(%)	4,7	5,0	4,4	4,2	4,9	5,1	4,7	3,5	3,6	4,8	4,0	4,5

CP: caprolactama; PI: padrão interno; DP: desvio padrão; CV: coeficiente de variação

A linearidade também foi estudada utilizando a curva da relação área relativa/concentração relativa *versus* log da concentração relativa das soluções padrão empregadas¹⁴. Verificou-se que todas as concentrações das soluções padrão utilizadas na curva de calibração estavam perfeitamente dentro do intervalo de confiança de 95% (Figura 3). Além disso, considerou-se o intervalo obtido suficientemente amplo, uma vez que para o sistema estudado não há necessidade de quantificar amostras com concentrações de ϵ -caprolactama muito elevadas.

Límite de detecção do método

O LD do método foi determinado experimentalmente utilizando sucessivas diluições a partir da solução padrão de concentração 0,05 $\mu\text{g/g}$ de ϵ -caprolactama e 9,4 $\mu\text{g/g}$ de 2-azociclononana, que foram injetadas ($n=6$) no CG. O valor obtido para LD ($S/R=3$)^{8,11,14} foi 0,10 ng (Tabela 2). Os coeficientes de variação referentes às áreas dos picos da ϵ -caprolactama e 2-azociclononana obtidos quando a solução foi injetada seis vezes no CG foram 4,8 e 3,4%, respectivamente, indicando boa precisão.

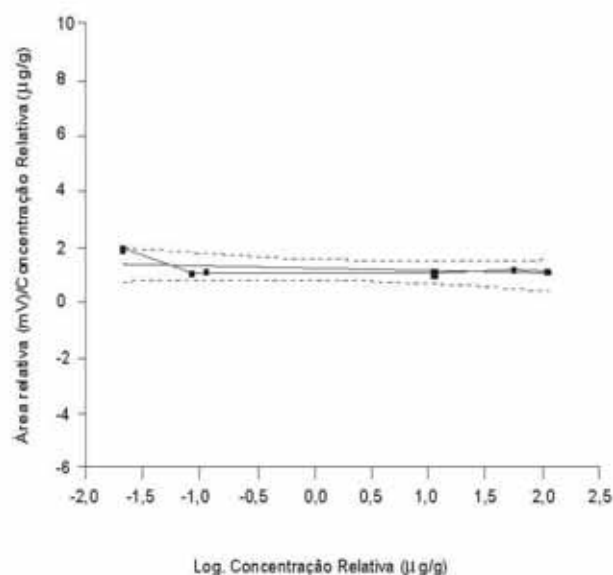


FIGURA 3 - Curva da razão área relativa/concentração relativa da ϵ -caprolactama e 2-azociclononana vs. log da concentração relativa da ϵ -caprolactama e 2-azociclononana, com intervalo de confiança de 95%.

Tabela 2 - Quantidade de ϵ -caprolactama (ng) e áreas do pico de ϵ -caprolactama (CP) e 2-azociclononana (PI)* obtidas no ensaio de determinação experimental do limite de detecção.

Quantidade de caprolactama (ng)	Área do pico da CP (mV)	Área do pico do PI (mV)
0,10 (n=6)	10	602
	11	575
	11	571
	11	593
	11	547
	10	592
Média	10,7	580,0
DP	0,5	20,0
CV	4,8	3,4

DP, desvio padrão

CV, coeficiente de variação (%)

*Concentração: 9,4 $\mu\text{g/g}$ de azeite de oliva

Precisão e exatidão do método

A precisão é um critério utilizado para avaliar o desempenho de um método analítico e expressa concordância entre os dados experimentais obtidos, ou seja, quanto mais próximos entre si maior será a precisão^{4, 8}. A precisão do método foi avaliada durante o ensaio de recuperação utilizando a repetibilidade e a precisão intermediária. Os valores do coeficiente de variação obtidos na avaliação da precisão intra-ensaio e inter-ensaio foram menores que 2,4 e 3,8%, respectivamente, indicando boa repetibilidade e precisão intermediária (Tabela 3).

A exatidão do método foi estudada durante o ensaio de recuperação usando diferentes níveis de fortificação e foi expressa como a porcentagem entre a quantidade de ϵ -caprolactama adicionada à matriz e a quantidade obtida^{4, 8, 11, 14}. Verifica-se pela Tabela 3 que foram obtidos valores de recuperação entre 88,6 e 112,0% e coeficientes de variação inferiores a 3,8%, indicando boa exatidão do método. A porcentagem de recuperação foi elevada para todas as concentrações de ϵ -caprolactama adicionadas.

Limite de quantificação do método

O LQ do método expresso como a menor quantidade de ϵ -caprolactama quantificada na matriz azeite de oliva no tempo de retenção do pico do analito, determinado com nível de precisão aceitável, correspondeu a 2 vezes o LD^{8, 11, 14}. O valor obtido para LQ foi 0,20ng. Os coeficientes de variação referentes às áreas dos picos da ϵ -caprolactama e 2-azociclononano obtidos quando a solução foi injetada

dez vezes no CG foram 4,7 e 5,0%, respectivamente, indicando que a precisão obtida foi muito boa.

CONCLUSÃO

O método desenvolvido e validado pode ser considerado efetivo para determinação da ϵ -caprolactama em azeite de oliva, por apresentar boa precisão e exatidão, com um tempo de análise máximo de 11 minutos, e poderá ser empregado em estudos de migração para dosar níveis de ϵ -caprolactama migrados de embalagens contendo PA6 para azeite de oliva.

FÉLIX, J.S.; PADULA, M.; MANZOLI, J.E.; MONTEIRO, M. Development and validation of an analytical method to determine ϵ -caprolactam in fatty-food simulant. *Alim. Nutr.*, Araraquara, v. 17, n.3, p. 329-335, jul./set. 2006.

■ **ABSTRACT:** ϵ -Caprolactam is the monomer used to produce polyamide 6, used as food packaging, especially for meat products and cheeses. After polymerization a part of the monomer can remain in the resin and can migrate into the food in contact. The aim of this work was to develop and to validate an analytical method to determine ϵ -caprolactam in olive oil, to support future studies of ϵ -caprolactam migration from polyamide 6 used to package meat products and cheeses, which have high fat levels. Gas chromatography was used and ϵ -caprolactam and 2-azociclononano were

Tabela 3 - Avaliação da exatidão e da precisão intra e inter-ensaios do método para determinação de ϵ -caprolactama em azeite de oliva utilizando CG/DIC.

Injeções	Repetibilidade (intra-ensaio)			Precisão Intermediária (inter-ensaio)		
	n=3	n=3	n=3	n=10	n=10	n=10
Concentração Real ($\mu\text{g/g}$)	2,13	79,76	797,28	2,13	79,76	797,28
	2,38	71,57	770,20	2,20	64,42	805,03
	2,38	71,55	788,71	2,41	72,57	805,44
	2,36	68,67	771,88	2,45	72,73	803,13
				2,42	69,72	788,27
Concentração Obtida ($\mu\text{g/g}$)				2,41	71,57	770,20
				2,42	71,55	788,71
				2,43	68,67	771,88
				2,38	73,46	752,00
				2,38	69,51	792,81
				2,36	72,68	799,09
Média ($\mu\text{g/g}$)	2,37	70,60	776,93	2,39	70,69	787,66
DP	0,0	1,7	10,2	0,1	2,7	17,8
CV (%)	0,4	2,4	1,3	3,0	3,8	2,3
Exatidão (%)				112,0	88,6	98,8

DP, desvio padrão

CV, coeficiente de variação (%)

used as analytical and internal standard, respectively. The calibration curve for ϵ -caprolactam was linear over the concentration range of 0.20 to 1062.34 $\mu\text{g/g}$, with correlation coefficient of 0.99993. The limits of detection and quantification of the method were 0.10 ng and 0.20 ng, respectively. Relative standard deviations obtained for method precision were less than 3.8%, while method accuracy showed recovery between 88.6 and 112.0%. The developed and validated method could successfully be used to determine ϵ -caprolactam migrated from polyamide 6 into olive oil.

■ **KEYWORDS:** Polyamide; ϵ -caprolactam; validation of analytical method; gas chromatography.

Referências bibliográficas

1. BARKBY, C. T.; LAWSON, G. Analysis of migrants from nylon 6 packaging films into boiling water. **Food Addit. Contam.**, v.10, n.5, p.541-553, 1993.
2. BEGLEY, T. H.; GAY, M. L.; HOLLIFIELD, H. C. Determination of migrants in and migration from nylon food packaging. **Food Addit. Contam.**, v.12, n.5, p.671-676, 1995.
3. BONIFACI, L. et al. Analysis of ϵ -caprolactam and its oligomers by high-performance liquid chromatography. **J. Chromatogr.**, v.585, p.333-336, 1991.
4. CASS, Q. B.; DEGANI, A. L. G. **Desenvolvimento de métodos por HPLC: fundamentos, estratégias e validação**. São Carlos: EdUFSCar, 2001. 77p (Série Apontamentos).
5. GRAMSHAW, J. W.; SOTO-VALDEZ, H. Migration from polyamide 'microwave and roasting bags' into roast chicken. **Food Addit. Contam.**, v.15, n.3, p.329-335, 1998.
6. GROMAN, A.; GUBERSKA, J. Gas chromatographic determination of ϵ -caprolactam migrating from plastic materials. *Polimery*, v.44, n.9, p.618-622, 1999. In: **Chem. Abstr.**, 1997-2001. Abstract 132:22239. CD ROM.
7. HERNANDEZ, R. J.; SELKE, S. E. M.; CULTER, J. D. **Plastics packaging: properties, processing, applications and regulations**. Cincinnati: Hanser Gardner Publ., 2000. p.113-115.
8. INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY. Harmonised guidelines for the in-house validation of methods of analysis (Technical Report). Disponível em: <http://www.iupac.org/divisions/V/501/draftoct19.pdf>. Acesso em: 30 ago. 2006.
9. JOINT RESEARCH CENTRE. European Commission. Determination of caprolactam in food simulants. Disponível em: <http://cpf.jrc.it/smt/monomers/downloads/pm14200.pdf>. Acesso em: 30 ago. 2006.
10. KULKARNI, R.; KANEKAR, P. Simultaneous determination of epsilon-caprolactam and epsilon-aminocaproic acid by high-performance liquid chromatography. *Process Control Qual.*, v.9, n.1/3, p.31-37, 1997.
11. LANÇAS, F. M. **Validação de métodos cromatográficos de análise**. São Carlos: Rima, 2004. p.62.
12. NERÍN, C. Alimentos preparados para cocinar en la bolsa. In: NERÍN, C. et al. **Materiais plásticos em contato com alimentos**. Campinas: CETEA/ITAL, 1995. cap.5, p.1-21. (apostila).
13. POGORZELSKA, Z.; MIELNICZUK, Z. Determination of ϵ -caprolactam migration from polyamide plastics: A new approach. **Packag. Technol. Sci.**, v.14, p.31-35, 2001.
14. RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Quim. Nova**, v.27, n.5, p.771-780, 2004.
15. SARANTÓPOULOS, C. I. G. L.; OLIVEIRA, L. M.; CANAVESI, E. Carnes, aves, pescados e derivados. In: **Requisitos de conservação de alimentos em embalagens flexíveis**. Campinas: CETEA/ITAL, 2001. p.151-171.
16. SARANTÓPOULOS, C. I. G. L.; OLIVEIRA, L. M.; CANAVESI, E. Queijos. In: **Requisitos de conservação de alimentos em embalagens flexíveis**. Campinas: CETEA/ITAL, 2001. p. 175-182.
17. SARANTÓPOULOS, C. I. G. L. et al. Principais materiais plásticos para embalagens flexíveis. In: **Embalagens plásticas flexíveis: principais polímeros e avaliação de propriedades**. Campinas: CETEA/ITAL, 2002. p.1-43.
18. SOTO-VALDEZ, H.; GRAMSHAW, J. W.; VANDERBURG, H. J. Determination of potential migrants present in Nylon 'microwave and roasting bags' and migration into olive oil. **Food Addit. Contam.**, v.14, n.3, p.309-318, 1997.
19. ZHAO, Y. et al. The determination of impurities in caprolactam by capillary gas chromatography-mass spectrometry. **Microchem. J.**, v. 69, n.3, p.213-217, 2001.

ERRATA

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DE ϵ -CAPROLACTAMA EM SIMULANTE DE ALIMENTOS GORDUROSOS

Juliana Silva FÉLIX*, Marisa PADULA***, José Eduardo MANZOLI****, Magali MONTEIRO**

O artigo publicado contém os seguintes erros:

Página 38, Resumo, linha 17: substituir “10 ng e 20 ng” por “10 $\mu\text{g/g}$ e 20 $\mu\text{g/g}$ ”.

Página 42, Resultados e discussão, coluna direita, linha 3: substituir “0,05 $\mu\text{g/g}$ ” por “1,06 $\mu\text{g/g}$ ”.

Página 42, Resultados e discussão, coluna direita, linha 5: substituir “0,10 ng” por “0,10 $\mu\text{g/g}$ ”.

Página 42, Resultados e discussão, Tabela 2: substituir “ng” por “ $\mu\text{g/g}$ ”.

Página 43, Resultados e discussão, coluna esquerda, linha 26: substituir “0,20 ng” por “0,20 $\mu\text{g/g}$ ”.

Página 44, Abstract, coluna esquerda, linha 5: substituir “0,10 e 0,20 ng” por “0,10 e 0,20 $\mu\text{g/g}$ ”.

CAPÍTULO 3

MIGRAÇÃO DE ϵ -CAPROLACTAMA DE EMBALAGENS CONTENDO POLIAMIDA 6 PARA SIMULANTE ÁCIDO ACÉTICO 3% E VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO

Trabalho publicado na Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos,
v. 27(supl.), p. 27-32, ago. 2007

Migração de ϵ -caprolactama de embalagens contendo poliamida 6 para simulante ácido acético 3% e validação do método analítico

ϵ -Caprolactam migration from polyamide 6 packaging into 3% acetic acid food simulant and validation of the analytical method

Juliana Silva FÉLIX¹, Marisa PADULA², José Eduardo MANZOLI³, Magali MONTEIRO^{1*}

Resumo

Este trabalho teve como objetivo desenvolver e validar método analítico para determinar ϵ -caprolactama no simulante de alimentos solução de ácido acético 3% e estudar sua migração de embalagens contendo poliamida 6 para o simulante em contato. Foi empregada a cromatografia gasosa usando ϵ -caprolactama como padrão analítico e 2-azociclononano como padrão interno. A linearidade esteve entre 1,60 e 640,00 μg de ϵ -caprolactama. mL^{-1} de simulante, com coeficiente de correlação 0,9999. Os limites de detecção e de quantificação do método foram 0,24 e 1,60 ng, respectivamente. A precisão do método revelou valores de coeficiente de variação menores que 4,3% e a avaliação da exatidão mostrou recuperação de 100 a 106%. O método demonstrou ser eficaz para quantificar ϵ -caprolactama no simulante, apresentando ampla linearidade, boa precisão e exatidão. No ensaio de migração, embalagens contendo poliamida 6 foram colocadas em tubos de vidro com 10 mL do simulante, que foram hermeticamente fechados e acondicionados a 40 ± 1 °C durante 10 dias. O ensaio de migração foi realizado por imersão total. A quantidade de ϵ -caprolactama migrada variou de 7,8 a 10,5 e de 6,9 a 7,6 mg kg^{-1} de simulante para as embalagens destinadas aos produtos cárneos e queijos, respectivamente. Todas as embalagens atenderam às exigências da Legislação Brasileira para migração de ϵ -caprolactama.

Palavras-chave: migração; ϵ -caprolactama; poliamida 6; simulante de alimento; validação de método analítico; cromatografia gasosa de alta resolução.

Abstract

The aim of this work was to develop and validate an analytical method to determine ϵ -caprolactam in 3% acetic acid solution and to study its migration from polyamide 6 into food simulant. Gas chromatography was used with ϵ -caprolactam as an analytical standard and 2-azacyclononane as an internal standard. The linearity was obtained by the concentration range of 1.60 to 640.00 $\mu\text{g mL}^{-1}$, with a correlation coefficient of 0.9999. Detection and quantification limits of the method were 0.24 ng and 1.60 ng, respectively. Relative standard deviations obtained for method precision were less than 4.3%, while method accuracy showed recovery between 100 and 106%. The method was able to quantify ϵ -caprolactam in the simulant, showing a wide linearity, good precision and accuracy. For the migration assay, polyamide 6 films were placed in glass vials containing 10 mL of simulant, which were hermetically capped and exposed at 40 °C for 10 days (total immersion). The amount of ϵ -caprolactam that migrated from packaging into the simulant varied from 7.8 to 10.5 and 6.9 to 7.6 mg Kg^{-1} , for films used as meat products and cheese packaging, respectively.

Keywords: migration; ϵ -caprolactam; polyamide 6; food simulant; validation of analytical method; gas chromatography.

1 Introdução

A ϵ -caprolactama é o monômero utilizado na fabricação da poliamida 6 (PA-6)^{14,22,28}. Durante o processo de polimerização, parte do monômero empregado pode permanecer na resina, já que a polimerização não é completa. Podem também estar presentes oligômeros de baixa massa molecular, aditivos, compostos de degradação, entre outros, que podem migrar para o alimento em contato^{2,3,17,19,21,28}.

A PA-6 é muito usada como embalagem de alimentos. Sua maior aplicação é na forma de filmes e envoltórios, como componente único ou em estruturas de multicamadas^{10,26}. Filmes de PA-6 têm sido muito empregados como embalagens a vácuo e com atmosfera modificada para carnes e aves frescas

e processadas, para queijos, e como embalagens tipo *cook in* para carnes e aves processadas. De maneira geral, a PA oferece boa barreira a gases, a aromas, a gorduras e ao vapor d'água e boa resistência mecânica, além de ser termofórmável e termorresistente^{24,25}.

A literatura disponível sobre migração da ϵ -caprolactama de embalagens de PA para alimentos e simulantes é ainda restrita. Particularmente, no caso de embalagens contendo PA-6 produzidas e amplamente empregadas no Brasil, não foram encontrados trabalhos descritos na literatura.

Os compostos presentes em embalagens plásticas podem representar um risco à saúde humana, principalmente durante a exposição crônica, através do consumo de alimentos^{6,18,20}. A ϵ -caprolactama foi descrita como hepatotóxica^{9,29}, neurotóxica²⁹ e genotóxica¹⁵, além de ter sido considerada mutagênica para células somáticas e germinativas de *Drosophila melanogaster*¹¹ e capaz de provocar danos cromossômicos e aneuploidia em linfócitos humanos²⁷. A ϵ -caprolactama está inserida no grupo 4, de acordo com a classificação da *International Agency for Research on Cancer* (IARC), sendo considerada como provavelmente não carcinogênica para humanos¹¹.

¹ Departamento de Alimentos e Nutrição, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista – UNESP, CEP 14801-902, Araraquara - SP, Brasil, E-mail: monteiro@focfar.unesp.br

² Centro de Tecnologia de Embalagem, Instituto de Tecnologia de Alimentos – ITAL, CP 139, CEP 13070-178, Campinas - SP, Brasil

³ Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN, Centro de Tecnologia das Radiações – CTR, Comissão Nacional de Energia Nuclear – CNEN, CP 11049, CEP 05508-000, São Paulo - SP, Brasil e Universidade São Judas Tadeus, CEP 03166-000, São Paulo - SP, Brasil

*A quem a correspondência deve ser enviada

Uma variedade de métodos cromatográficos tem sido utilizada na determinação de ϵ -caprolactama e seus oligômeros no próprio polímero, em simulantes de alimentos e em alimentos: cromatografia gasosa com detector de ionização de chama (CG/DIC)^{6,13,22}, cromatografia líquida de alta eficiência usando detector de ultravioleta (CLAE/UV)^{2-4,7,15,28}, cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM)^{13,30} e cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (CLAE/EM)^{2,28}. A CG/DIC é amplamente utilizada em ensaios de migração por detectar a ϵ -caprolactama em níveis de traços, enquanto a CLAE/UV tem sido muito empregada quando o objetivo é a análise da ϵ -caprolactama e seus oligômeros. Já a CG/EM e a CLAE/EM vêm sendo usadas para identificar e quantificar os compostos presentes nas diferentes matrizes dependendo de sua massa molecular, polaridade e volatilidade.

Este trabalho teve como objetivo desenvolver e validar método analítico para determinar ϵ -caprolactama no simulante solução de ácido acético 3% e estudar sua migração de filmes contendo PA-6 para o simulante em contato.

2 Material e métodos

Foram utilizados filmes contendo PA-6, correspondentes a 13 marcas comerciais de embalagens empregadas no Brasil para o acondicionamento de produtos cárneos, denominadas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8, e de queijos, denominadas 1, 2, 3, 4 e 5, fornecidas pelas empresas produtoras.

A ϵ -caprolactama (pureza > 99%, Sigma-Aldrich) foi utilizada como padrão analítico e a 2-azociclononano (pureza > 98%, Sigma-Aldrich) como padrão interno. Foi utilizado o cromatógrafo gasoso (CG) Shimadzu 17-A (Shimadzu, Kyoto, Japão), com detector de ionização de chama (DIC) e colunas capilares DB-1701 e DB-5 (J&W Scientific) de 30 m de comprimento x 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 μ m de espessura do filme interno e 60 m de comprimento x 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 μ m de espessura do filme interno, respectivamente.

Metanol (MeOH) e n-heptano foram adquiridos da Mallinckrodt Chemicals (Phillipsburg, USA), etanol (EtOH), da J. T. Baker, todos de grau cromatográfico e ácido acético 100% PA foi adquirido da Merck (Darmstadt, Germany). Água destilada também foi utilizada.

As soluções estoque de ϵ -caprolactama e de 2-azociclononano foram preparadas em MeOH na concentração de 10.000 e 350 μ g.mL⁻¹, respectivamente. Posteriormente, por diluições sucessivas das soluções estoque, foram obtidas as soluções padrão de ϵ -caprolactama e 2-azociclononano de diferentes concentrações, que foram diluídas em simulante solução de ácido acético 3% e então injetadas no CG/DIC.

Para o ensaio de migração, os filmes foram cortados em seções de 6 cm² de área. Cada seção foi colocada em tubo de vidro de 20 mL contendo 10 mL de simulante solução de ácido acético 3%. Os tubos foram hermeticamente fechados e acondicionados em estufa a 40 \pm 1 °C durante 10 dias¹. O ensaio de migração foi realizado sob imersão total, em triplicata. Um tubo branco, usado como referência, contendo apenas o simulante foi exposto e analisado sob as mesmas condições.

Após o período de contato, cada seção da embalagem foi retirada do tubo e descartada, sendo, a seguir, adicionado o padrão interno. As soluções de simulante assim obtidas foram injetadas no CG/DIC em duplicata, empregando o método previamente desenvolvido e validado, que foi então utilizado para quantificar a ϵ -caprolactama no simulante solução de ácido acético 3%.

O tratamento estatístico dos dados da validação do método analítico envolveu a determinação da média, do desvio padrão e do coeficiente de variação, enquanto o tratamento estatístico dos dados da curva de calibração envolveu a determinação da equação da reta de regressão linear e do coeficiente de correlação. Os resultados do ensaio de migração foram submetidos à Anova e teste de Tukey (Origin 7.0, 2000).

3 Resultados e discussão

3.1 Condições cromatográficas

Foram realizados estudos preliminares para estabelecer as condições de operação do equipamento (diferentes fases estacionárias, diferentes programações de temperatura, etc.) utilizando soluções padrão de ϵ -caprolactama e 2-azociclononano, com base no método de determinação de ϵ -caprolactama em simulantes de alimentos¹³. A melhor resolução foi obtida quando a temperatura da coluna foi mantida a 130 °C por 1 minuto, programada a 10 °C/min até 170 °C e mantida por 1 minuto, novamente aquecida a 10 °C/min até 200 °C, permanecendo por 2 minutos. O gás de arraste utilizado foi hidrogênio com vazão de 1 mL/min. As injeções (1 μ L) foram feitas a 240 °C no modo *split* e razão 1:20. A temperatura de detecção foi de 250 °C (Tabela 1).

Tabela 1. Parâmetros analíticos otimizados para determinação de ϵ -caprolactama em simulante solução de ácido acético 3% usando CG/DIC.

Parâmetros analíticos	Valores otimizados
Temperatura do injetor	240 °C
Coluna DB-1701	30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m
Temperatura da coluna	
Temperatura do detector	250 °C
Gás de arraste	Hidrogênio
Vazão do gás de arraste	1 mL/min
Volume de injeção	1 μ L
Tempo de análise	11 minutos

3.2 Validação do método analítico

A validação foi estudada de acordo com os protocolos relatados na literatura^{5,12,16,23}. A seletividade, calibração, linearidade, limite de detecção e limite de quantificação, precisão e exatidão foram avaliados.

Seletividade

A seletividade do analito no sistema cromatográfico foi avaliada utilizando as colunas capilares DB-1701 e DB-5, com diferentes fases estacionárias. A ϵ -caprolactama e a 2-azociclononona estavam livres de compostos interferentes ou que se sobreponham aos seus sinais.

Curva de calibração e linearidade

Foram realizadas 10 injeções de cada concentração empregada (1,60; 16,01; 64,00; 160,11; e 640,00 μg de ϵ -caprolactama. mL^{-1} de simulante e 14,00 μg de 2-azociclononona. mL^{-1} de simulante), e determinadas as médias, os desvios padrão e os coeficientes de variação, que foram menores que 5,0 e 5,3%, para a ϵ -caprolactama e 2-azociclononona, respectivamente, para todas concentrações avaliadas. O cromatograma típico da curva de calibração está apresentado na Figura 1. Os tempos de retenção obtidos para a ϵ -caprolactama e a 2-azociclononona foram 6,4 e 8,8 minutos, respectivamente.

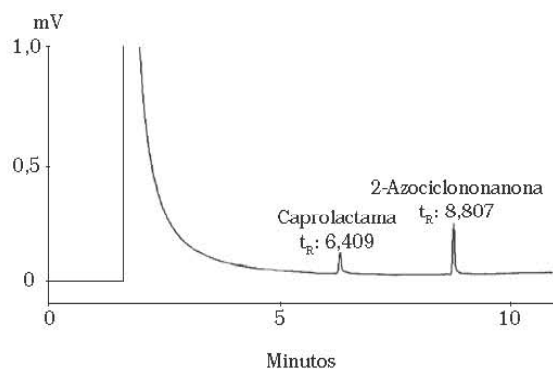


Figura 1. Cromatograma típico da curva de calibração da ϵ -caprolactama e 2-azociclononona em solução de ácido acético 3%, obtido por CG/DIC (concentração da ϵ -caprolactama e do padrão interno: 8,00 e 14,00 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectivamente). Condições cromatográficas de acordo com a Tabela 1.

A linearidade do método foi determinada a partir dos dados referentes à curva de calibração. O cálculo da regressão linear, usando o método dos mínimos quadrados, forneceu a equação da reta ($y = a + bx$), sendo x a concentração do analito na matriz e y , a área do pico.

A curva de calibração obtida apresentou linearidade e no intervalo de concentração de 1,60 a 640,00 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Figura 2).

A equação de regressão foi $y = -0,0744 + 0,93463x$, sendo y a razão da área do pico da ϵ -caprolactama pela área do pico do padrão interno e x , a razão da concentração da ϵ -caprolactama pela concentração do padrão interno. O coeficiente de correlação (r) foi 0,9999.

A linearidade também foi estudada utilizando a curva da razão área relativa/concentração relativa versus log da concentração relativa das soluções padrão empregadas²³. Verificou-se que todas as concentrações das soluções padrão utilizadas na curva de calibração estavam perfeitamente dentro do intervalo

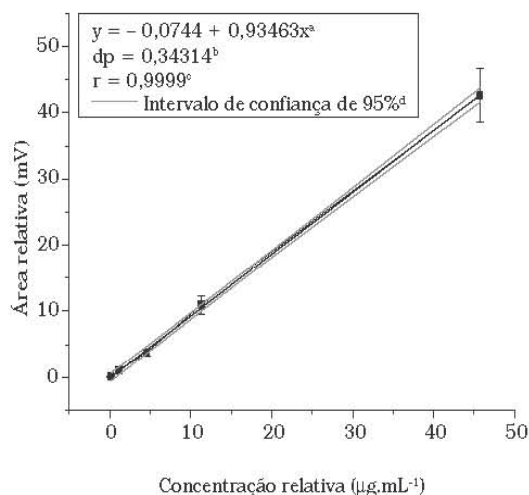


Figura 2. Curva de calibração de ϵ -caprolactama/2-azociclononona em solução de ácido acético 3% (concentração: 1,6 a 640 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). ^aEquação da reta; ^bDesvio padrão; ^cCoefficiente de correlação; ^dIntervalo de confiança de 95%.

de confiança de 95% (Figura 3). Além disso, considerou-se o intervalo obtido suficientemente amplo, uma vez que para o sistema estudado não há necessidade de quantificar amostras com concentrações de ϵ -caprolactama muito elevadas.

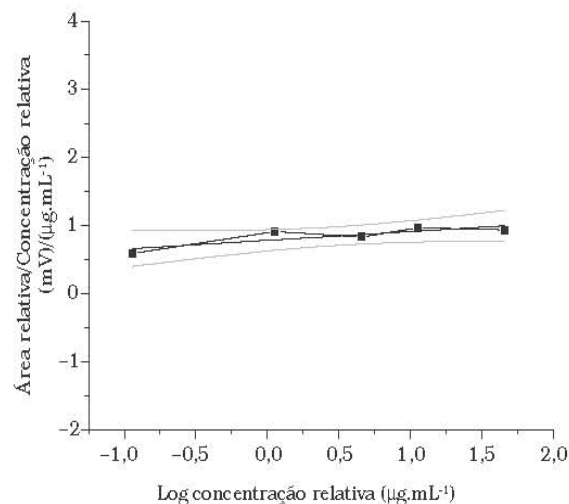


Figura 3. Curva da razão área relativa/concentração relativa da ϵ -caprolactama e 2-azociclononona versus log da concentração relativa da ϵ -caprolactama e 2-azociclononona, com intervalo de confiança de 95%.

Limite de detecção do método

O limite de detecção do método (LD) foi determinado experimentalmente utilizando sucessivas diluições a partir da solução padrão de ϵ -caprolactama de concentração 0,05 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, que foram injetadas ($n = 6$) no CG/DIC. O LD foi expresso como a quantidade de ϵ -caprolactama correspondente a 3 vezes a área do ruído de fundo ($S/R = 3$) no tempo de retenção do pico do analito^{12,16,23}. O valor obtido para LD foi 0,24 ng. Os coeficientes de variação referentes às áreas dos picos da ϵ -caprolactama e

2-azociclononona foram 5,0 e 3,1%, respectivamente, indicando boa precisão.

Precisão e exatidão do método

A precisão é um critério utilizado para avaliar o desempenho de um método analítico e expressa concordância entre os dados experimentais obtidos, ou seja, quanto mais próximos entre si maior será a precisão^{5,12}. A precisão do método foi avaliada mediante ensaio de repetibilidade e de precisão intermediária. A repetibilidade foi avaliada realizando medidas intra-dias. Para tanto, três concentrações da solução padrão (8,00; 80,00 e 400,00 µg de ε-caprolactama.mL⁻¹ de simulante solução de ácido acético 3%) foram injetadas no CG/DIC em triplicata num mesmo dia. A precisão intermediária foi avaliada realizando medidas inter-dias e as mesmas concentrações empregadas no ensaio de repetibilidade foram usadas. As soluções padrão foram injetadas no CG/DIC em dias consecutivos, totalizando 10 injeções. Durante os ensaios intra e inter-dias foram obtidos coeficientes de variação menores que 3,9 e 4,3%, respectivamente, indicando uma boa precisão (Tabela 2).

A exatidão do método foi determinada durante avaliação da precisão e foi expressa como a razão percentual entre a concentração de ε-caprolactama obtida e a concentração adicionada^{5,12,16,23}. Para tanto, soluções padrão contendo 8,00; 80,00 e 400,00 µg.mL⁻¹ de ε-caprolactama em simulante solução ácido acético 3% foram injetadas 10 vezes no CG/DIC. Verifica-se, pela Tabela 2, que foram obtidos valores de recuperação entre 100,5 e 106,0%, indicando boa exatidão do método. A porcentagem de recuperação foi elevada para todas as concentrações de ε-caprolactama adicionadas.

Limite de quantificação do método

O limite de quantificação do método (LQ), expresso como a menor quantidade de ε-caprolactama quantificada na matriz simulante solução de ácido acético 3% no tempo de retenção

do pico do analito, determinado com nível de precisão aceitável, correspondeu a 7 vezes o LD^{12,16,23}. O valor obtido para LQ foi 1,60 ng. Os coeficientes de variação referentes às áreas dos picos da ε-caprolactama e 2-azociclononona obtidos quando a solução foi injetada dez vezes no CG/DIC foram 4,2 e 4,5%, respectivamente, indicando que a precisão obtida foi muito boa.

3.3 Migração

De acordo com a Resolução nº 105, de 19 de maio de 1999, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que realiza o controle e regulamentação de materiais plásticos empregados na elaboração de embalagens e equipamentos destinados ao contato com alimentos e bebidas, o limite de migração específica (LME) estabelecido para ε-caprolactama em resinas e embalagens de PA é de 15 mg.kg⁻¹ de alimento ou de simulante de alimento¹.

Na Figura 4 estão apresentados os cromatogramas obtidos pela injeção do simulante solução de ácido acético 3% contendo ε-caprolactama migrada de filmes contendo PA-6, correspondentes a duas marcas comerciais.

Os valores obtidos no ensaio de migração da ε-caprolactama de embalagens contendo PA-6, destinadas ao acondicionamento de produtos cárneos e queijos para o simulante solução de ácido acético 3%, estão apresentados na Tabela 3.

Os resultados obtidos da migração de filmes contendo PA-6 usados para o acondicionamento de produtos cárneos demonstraram que a marca 4 apresentou o nível mais elevado de ε-caprolactama (10,46 mg.kg⁻¹ simulante), não diferindo significativamente (p ≥ 0,05) apenas da marca 6. Os níveis mais baixos de ε-caprolactama migrada foram apresentados pela marca 8 (7,75 mg.kg⁻¹ simulante), que não diferiu (p ≥ 0,05) das marcas 2 e 7 (Tabela 3).

Tabela 2. Avaliação da precisão intra e inter-ensaios e da exatidão do método para determinação da ε-caprolactama em simulante solução de ácido acético 3% utilizando CG/DIC.

Injeções	Repetibilidade (intra-ensaio)			Precisão intermediária (inter-ensaio)		
	n = 3	n = 3	n = 3	n = 10	n = 10	n = 10
Concentração real (µg.mL ⁻¹)	8,00	80,00	400,00	8,00	80,00	400,00
Concentração obtida (µg.mL ⁻¹)	8,10	82,12	414,03	8,16	87,34	412,29
	7,58	85,43	394,23	8,10	87,28	414,54
	8,12	84,21	393,40	7,58	84,23	441,78
				8,12	82,12	426,04
				8,15	85,43	414,03
				8,43	86,47	394,23
				8,31	84,21	437,64
				7,73	87,90	393,40
				7,43	82,94	425,32
				8,38	80,40	437,97
Média (µg.mL ⁻¹)	7,90	83,90	400,60	8,00	84,80	419,70
DP	0,30	1,70	11,70	0,30	2,50	17,20
CV (%)	3,90	2,00	2,90	4,30	2,90	4,10
Exatidão (%)				100,50	106,00	104,90

DP: Desvio padrão; e CV Coeficiente de variação.

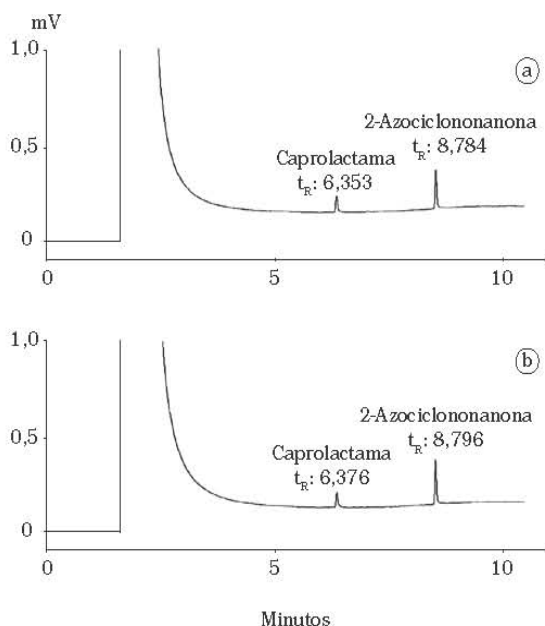


Figura 4. Cromatogramas típicos da quantificação da ϵ -caprolactama migrada de filmes contendo PA-6 para simulante solução de ácido acético 3%, obtidos por CG/DIC: a) marca 1 - produtos cárneos e b) marca 1 - queijos. Condições cromatográficas de acordo com a Tabela 1.

Tabela 3. Nível de ϵ -caprolactama (mg.kg^{-1}) migrada de filmes contendo PA-6, usados como embalagens de produtos cárneos (marcas 1-8) e de queijos (marcas 1-5) para o simulante solução de ácido acético 3% durante 10 dias a 40 °C.

Embalagem	Migração de ϵ -caprolactama (mg.kg^{-1})	
	Produtos cárneos	Queijos
1	9,49 (3,5) ^{bc}	6,92 (6,5) ^b
2	7,93 (3,3) ^e	7,59 (4,3) ^a
3	9,65 (4,1) ^b	7,01 (4,2) ^{ab}
4	10,46 (6,2) ^a	<LQ
5	8,88 (6,4) ^{cd}	ND
6	9,90 (5,0) ^{ab}	
7	8,57 (3,0) ^{de}	
8	7,75 (6,9) ^e	

Coefficiente de variação (%) entre parênteses, n = 6; médias seguidas de letras iguais na mesma coluna não diferem significativamente entre si no teste de Tukey ($p \geq 0,05$); LQ: limite de quantificação (1,6 ng); e ND: não detectada.

Entre os filmes contendo PA-6 usados para o acondicionamento de queijos, verificou-se que a marca 2 apresentou o maior conteúdo de ϵ -caprolactama migrada para o simulante solução de ácido acético 3% (7,59 mg.kg^{-1} de simulante), embora não tenha havido diferença significativa em relação à marca 3 ($p \geq 0,05$). Em uma das marcas de embalagem de queijo a ϵ -caprolactama não foi detectada e em outra, seu nível esteve abaixo do limite de quantificação do método (Tabela 3).

A literatura disponível sobre a migração de ϵ -caprolactama de filmes de PA para alimentos e simulantes é ainda restrita. Particularmente, em relação a embalagens de PA produzidas no país, não foram encontrados trabalhos descritos na literatura. No caso da solução de ácido acético 3%, Pogorzelska e Mielniczuk²² descreveram valores de ϵ -caprolactama migrada de filmes de PA para o simulante variando de 6,0 a 16,3 mg.kg^{-1} , que compreende a faixa obtida em nosso estudo para filmes

contendo PA-6, usados no acondicionamento de produtos cárneos e queijos.

Foi possível verificar que, em todas as amostras estudadas, o nível de ϵ -caprolactama migrada esteve abaixo do limite de migração específica estabelecido pela Legislação Brasileira para este monômero, que é de 15 mg.kg^{-1} de simulante¹.

4 Conclusões

O método desenvolvido e validado apresentou alta sensibilidade, boa precisão e exatidão, além de tempo máximo de análise de 11 minutos.

O método desenvolvido e validado foi eficaz para quantificar a ϵ -caprolactama migrada de filmes contendo PA-6 para simulante solução de ácido acético 3%.

Todas as embalagens estudadas atenderam às exigências da Legislação Brasileira para migração de ϵ -caprolactama.

Agradecimentos

À CAPES e ao PADC/FCF/UNESP pelo suporte financeiro.

Referências bibliográficas

1. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Regulamentos técnicos: disposições gerais para embalagens e equipamentos plásticos em contato com alimentos e seus anexos.** Resolução nº 105, de 19 de maio de 1999. Disponível em: <<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=19772&word=>>. Acesso em: 30 ago. 2006.
2. BARKBY, C. T.; LAWSON, G. Analysis of migrants from nylon 6 packaging films into boiling water. **Food Addit. Contam.**, v. 10, n. 5, p. 541-553, 1993.
3. BEGLEY, T. H.; GAY, M. L.; HOLLIFIELD, H. C. Determination of migrants in and migration from nylon food packaging. **Food Addit. Contam.**, v. 12, n. 5, p. 671-676, 1995.
4. BONIFACI, L.; FREZZOTTI, D.; CAVALCA, G.; MALAGUTI, E.; RAVANETTI, G. P. Analysis of ϵ -caprolactam and its oligomers by high-performance liquid chromatography. **J. Chromat.**, v. 585, n. 2, p. 333-336, 1991.
5. CASS, G. B.; DEGANI, A. L. G. **Desenvolvimento de métodos por HPLC: fundamentos, estratégias e validação.** São Carlos: EdUFSCar, 2001.
6. DE FUSCO, R.; MONARCA, S.; BISCARDI, D.; PASQUINI, R.; FATIGONI, C. Leaching of mutagens into mineral water from polyethyleneterephthalate bottles. **Sci. Total Environ.**, v. 90, p. 241-248, 1990.
7. GRAMSHAW, J. W.; SOTO-VALDEZ, H. Migration from polyamide 'microwave and roasting bags' into roast chicken. **Food Addit. Contam.**, v. 15, n. 3, p. 329-335, 1998.
8. GROMAN, A.; GUBERSKA, J. Gas chromatographic determination of ϵ -caprolactam migrating from plastic materials. **Polimery**, v. 44, n. 9, p. 618-622, 1999. In: Chemical Abstracts, 1997-2001. Abstract 132:22239. CD ROM.
9. GROSS, P. Biologic activity of epsilon-caprolactam. **Crit. Rev. Toxicol.** v. 13, n. 3, p. 205-216, 1984.
10. HERNANDEZ, R. J.; SELKE, S. E. M.; CULTER, J. D. **Plastics packaging: properties, processing, applications and regulations.** Cincinnati: Hanser Gardner Publications, 2000.

11. INTERNACIONAL Agency for Research on Cancer (Iarc) – **Summaries & evaluations: caprolactam (group 4)**, 1999. Disponível em: <<http://www.inchem.org/documents/iarc/vol71/010-caprolactam.html>>. Acesso em: 30 jul. 2006.
12. INTERNATIONAL Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC). **Harmonised guidelines for the in-house validation of methods of analysis (Technical Report)**. Disponível em: <<http://www.iupac.org/divisions/V/501/draftoct19.pdf>>. Acesso em: 30 ago. 2006.
13. JOINT Research Centre. **European Commission. Determination of caprolactam in food simulants**. Disponível em: <<http://cpf.jrc.it/smt/monomers/downloads/pm14200.pdf>>. Acesso em: 30 ago. 2006.
14. JOINT Research Centre. **European Commission. Index of substances: caprolactam**. Disponível em: <<http://cpf.jrc.it/smt/monomers/pm14200.htm>>. Acesso em: 30 ago. 2006.
15. Kulkarni, R.; Kanekar, P. simultaneous determination of epsilon-caprolactam and epsilon-aminocaproic acid by high-performance liquid chromatography. **Process Control Qual.**, v. 9, n. 1/3, p. 31-37, 1997.
16. LANÇAS, F. M. **Validação de métodos cromatográficos de análise**. Rima: São Carlos, 2004.
17. MONTEIRO, M.; NERÍN, C.; REYES, F. G. R. Determination of UV stabilizers in PET bottles by high performance-size exclusion chromatography. **Food Addit. Contam.**, v. 13, n. 5, p. 575-586, 1996.
18. MONTEIRO, M. **Absorvedores de radiação ultravioleta em embalagens plásticas e em óleos vegetais: metodologia analítica e estudo de migração**. Campinas, 1997, 123 f. Tese (Doutora em Ciência de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).
19. MONTEIRO, M.; NERÍN, C.; REYES, F. G. R. Migration of Tinuvin P, a stabilizer, from PET bottles into fatty-food simulants. **Pack. Tech. Sci.**, v. 12, p. 241-248, 1999.
20. NASSER, A. L. M. **Identificação de oligômeros presentes em garrafas PET destinadas ao acondicionamento de água mineral e de suco de fruta: desenvolvimento e validação do método analítico**. Araraquara, 2003, 118 f. Dissertação (Mestre em Ciência dos Alimentos), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista (UNESP).
21. NERÍN, C. Alimentos preparados para cocinar en la bolsa. In: NERÍN, C.; CACHO, J.; REYES, F. G. R.; FARIA, J. A.; ANJOS, C. A. R.; PADULA, M. **Materiais plásticos em contato com alimentos**. Campinas: CETEA/ITAL, 1995. Cap. 5, p. 1-21. (apostila).
22. POGORZELSKA, Z.; MIELNICZUK, Z. Determination of ϵ -caprolactam migration from polyamide plastics: A new approach. **Packag. Technol. Sci.**, v. 14, n. 1, p. 31-35, 2001.
23. RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Quim. Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.
24. SARANTÓPOULOS, C. I. G. L.; OLIVEIRA, L. M.; CANAVESI, E. Carnes, aves, pescados e derivados. In: SARANTÓPOULOS, C. I. G. L.; OLIVEIRA, L. M.; CANAVESI, E. **Requisitos de conservação de alimentos em embalagens flexíveis**. Campinas: CETEA/ITAL, 2001. p.151-171.
25. SARANTÓPOULOS, C. I. G. L.; OLIVEIRA, L. M.; CANAVESI, E. Queijos. In: SARANTÓPOULOS, C. I. G. L.; OLIVEIRA, L. M.; CANAVESI, E. **Requisitos de conservação de alimentos em embalagens flexíveis**. Campinas: CETEA/ITAL, 2001. p. 175-182.
26. SARANTÓPOULOS, C. I. G. L.; OLIVEIRA, M. L.; COLTRO, L.; VERCELINO, A. R. M.; CORRÊA, G. E. E. Principais materiais plásticos para embalagens flexíveis. In: SARANTÓPOULOS, C. I. G. L.; OLIVEIRA, M. L.; COLTRO, L.; VERCELINO, A. R. M.; CORRÊA, G. E. E. **Embalagens plásticas flexíveis: principais polímeros e avaliação de propriedades**. Campinas: CETEA/ITAL, 2002. p.1-43.
27. SHELDON, T. Chromosomal damage induced by caprolactam in human lymphocytes. **Mutat. Res.**, v. 224, n. 3, p. 325-327, 1989.
28. SOTO-VALDEZ, H.; GRAMSHAW, J. W.; VANDERBURG, H. J. Determination of potential migrants present in Nylon 'microwave and roasting bags' and migration into olive oil. **Food Addit. Contam.**, v. 14, n. 3, p. 309-318, 1997.
29. YAGOUBI, N.; BAILLET, A.; PELLERIN, F.; FERRIER, D. Physico-chemical behaviour of β irradiated plastic materials currently used as packaging and medical products. **Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. B**, v. 105, n.1-4, p. 340-344, 1995.
30. ZHAO, Y.; JING, Z.; LI, H.; ZHANG, H. The determination of impurities in caprolactam by capillary gas chromatography-mass spectrometry. **Microchem. J.**, v. 69, n. 3, p. 213-217, 2001.

ERRATA

Migração de ϵ -caprolactama de embalagens contendo poliamida 6 para simulante ácido acético 3% e validação do método analítico

Juliana Silva FÉLIX¹, Marisa PADULA², José Eduardo MANZOLI³, Magali MONTEIRO^{1*}

O artigo publicado contém os seguintes erros:

Página 47, Resumo, linha 5: substituir “0,24 e 1,60 ng” por “0,24 e 1,60 $\mu\text{g/mL}$ ”.

Página 47, Abstract, linha 17: substituir “0.24 ng and 1.60 ng” por “0.24 $\mu\text{g/mL}$ and 1.60 $\mu\text{g/mL}$ ”.

Página 49, Resultados e discussão, coluna direita, linha 12 , substituir: “0,24 ng” por “0,24 $\mu\text{g/mL}$ ”.

Página 50, Resultados e discussão, coluna direita, linha 3 , substituir: “1,60 ng” por “1,60 $\mu\text{g/mL}$ ”.

CAPÍTULO 4

**MIGRATION OF CAPROLACTAM FROM MULTILAYER POLYAMIDE 6 FILMS INTO
FOOD SIMULANTS
DEVELOPMENT AND VALIDATION OF A GAS CHROMATOGRAPHIC METHOD**

Migration of caprolactam from multilayer polyamide 6 films into food simulants
Development and validation of a gas chromatographic method

J.S. Félix^a, J.E. Manzoli^b, M. Padula^c, M. Monteiro^{a,*}

^a Department of Food and Nutrition/School of Pharmaceutical Science, São Paulo State University,
PO Box 502, 14801-902, Araraquara, SP, Brazil.

^b Nuclear and Energetic Research Institute (IPEN), São Paulo, SP, Brazil.

^c Packaging Technology Center/Food Technology Institute (CETEA/ITAL), Campinas, SP, Brazil.

Abstract

A gas chromatographic method was developed and validated to determine caprolactam in food simulants. Linear range was 0.96 to 642.82 µg/mL for water and 0.64-800.32 µg/mL for 15% ethanol, with correlation coefficients higher than 0.999, and limits of detection and quantification of the method lower than 0.32 and 0.96 µg/mL, respectively. Method precision showed RSD values lower than 5.45%, while method accuracy showed recovery from 89 to 111% for both simulants. Caprolactam migration from multilayer PA-6 films ranged from 1.03 to 7.34 mg/kg into water, from 1.05 to 10.17 mg/kg into 15% ethanol and from 1.38 to 11.89 mg/kg into olive oil.

Keywords: Migration; Caprolactam; Multilayer polyamide-6 films; Food simulants; Validation of analytical method; Gas chromatography.

*Corresponding author. Tel.: +55 16 33016930; fax: +55 16 33016920

E-mail addresses: jufelix78@gmail.com (J.S. Félix), monteiro@fcfar.unesp.br (M. Monteiro)

1. Introduction

Polyamide 6 (PA-6) is widely used as food packaging. Typical applications all over the world are mono or multilayer films used for sausage and meat foodstuff casings, as well as microwave and roasting bags (MRB) and boil-in-the-bag packaging used to warm, cook or bake foods inside packaging using microwave or conventional oven [1-8]. In Brazil, PA-6 films have been applied as vacuum and modified atmosphere packaging for fresh and processed meat as beef and poultry, and for cheeses. PA-6 shows good gas, aroma, oil and water vapor barrier and good mechanical and thermoforming properties, besides heat resistance [4]. Caprolactam is the monomer used in the manufacture of PA-6 [1, 2, 5, 7-10]. After polymerization, residual caprolactam can

remain in the plastic [1, 5]. Low molecular mass oligomers, additives, degradation compounds, etc., can also be present [7, 8]. All of them have the potential to migrate into food in contact [7, 11, 12].

Some authors described the migration of caprolactam [1, 2, 5-7, 9, 13, 14]. Concerning caprolactam migration from mono and multilayer PA films, PA/PE laminates, PA granulates and PA casings, the levels ranged from 0.2–56.6 mg/kg into distilled water, 6.0–48.6 mg/kg into 3% acetic acid, 6.3–46.5 mg/kg into 15% ethanol, 6.4–42.7 mg/kg into 95% ethanol and 1.5–3.8 mg/kg into olive oil, considering the different PA structures [9]. The migration of caprolactam from multilayer PA-6 films, used for meat foodstuffs and cheese, ranged from 6.9–10.5 mg/kg into 3% acetic acid, 7.5–13.0 mg/kg into water and 6.4–10.0 mg/kg into 95% ethanol [13, 14], while from PA-6/PA-66 roasting bag packaging was 0.98 mg/kg after contact with fatty simulant at 176°C for 30 min [6]. The results from the two-sided caprolactam migration experiments using PA-6/PA-12 and PA-6 films ranged from 30–250 mg/cm² into water and 0.2–2 mg/cm² into olive oil [2]. The amount of caprolactam that migrated from MRB packaging into olive oil after 1h of contact at 175°C was 6.0 mg/cm² and from films used as boil-in-the-bag packaging into boiling water after 1h of contact ranged from 0.3–1.8 mg/cm² [5, 7]. Also, caprolactam was quantified in food packaged in PA-6 films, casings and pouches, in the range of 0.8–13 mg/kg [1]

Sensitive and accurate analytical methods are required to quantify migration of substances. Chromatographic analysis of polymer extracts has been the main approach. Gas chromatography with flame ionization detection (GC-FID) [7, 9, 10, 13, 15], liquid chromatography using ultraviolet detection (HPLC-UV) [5-8, 16, 21], gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) [7, 14, 17] and liquid chromatography coupled to mass spectrometry (HPLC-MS) [1, 2, 5, 7] have been used to identify caprolactam and its oligomers in foodstuffs, in food simulants and in the packaging. GC-FID is widely used to quantify caprolactam migration levels, while HPLC-UV is used for the analysis of caprolactam and its oligomers. GC-MS and HPLC-MS are used to identify and quantify compounds in different matrixes depending on their molecular mass, polarity and volatility. Solid-phase microextraction (SPME) is a very efficient technique to extract volatile compounds from a wide range of matrixes including polymers [18]. Headspace (HS)-SPME combined with GC-MS was used to separate and identify caprolactam and volatile compounds from multilayer PA-6 films and SPME-GC-MS was used to determine their migration into aqueous solution [14].

The aim of this work was to develop and validate a gas chromatographic method for determining caprolactam in water and 15% ethanol and to study its migration from multilayer PA-6 films into water, 15% ethanol and olive oil food simulants.

2. Experimental

2.1. Samples, chemicals and reagents

Multilayer PA-6 films used for meat foodstuffs and cheese were supplied by the Brazilian packaging material companies. Virgin films from eight commercial brands used for meat foodstuffs and five brands for cheese, named brands 1-8 and 9-13, respectively, were studied. Caprolactam (purity>99%) was used as analytical standard and 2-azacyclononane (purity>98%) was used as an internal standard, both purchased from Sigma Aldrich (Buchs, Switzerland). Methanol (MeOH) and n-heptane HPLC grade were purchased from Mallinckrodt Chemicals (Phillipsburg, USA) and ethanol HPLC grade were purchased from J.T. Baker. Extra virgin olive oil (La Española), purchased at the Brazilian retail market, and distilled water were also used. Distilled water, 15% ethanol solution and extra virgin olive oil were the food simulants used during validation and migration experiments.

2.2. Instrumentation and chromatographic conditions

Chromatographic analyses were performed in a 17-A Shimadzu Gas Chromatograph (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) equipped with a flame ionization detector. A DB-1701 (J&W Scientific, Folsom, USA) capillary column (30 m x 0.25 mm and 0.25 µm film thickness) and a DB-5 (J&W Scientific) capillary column (60 m x 0.25 mm x 0.25 µm) were used.

Analytical parameters as injector, column and detector temperature, gas flow rate, injection volume and stationary phase were established on the basis of the method described by the Joint Center Research [10]. The DB-1701 capillary column was used to establish the chromatographic conditions, for validation and quantification. The DB-5 capillary column was used to confirm the identity of caprolactam in the simulants.

A DB-1701 capillary column was employed at 130°C for 1 min, programmed at 10°C/min up to 170°C for 1min, then heated to 200°C at 10°C/min and held for 2 min. Hydrogen was the carrier gas (1.0 mL/min) and nitrogen was the make up gas. Injections (1 µL) were made at 240°C in split mode (1:20). Detector temperature was 250°C.

2.3. Standard solutions

Stock solutions of caprolactam and 2-azacyclononanone at 10.000 and 350 $\mu\text{g/mL}$, respectively, were prepared in methanol. Working solutions were prepared as needed, in water or in 15% ethanol. Calibration was performed with diluted working solutions.

2.4. Validation

The gas chromatographic method to determine caprolactam in water and 15% ethanol food simulants was developed and validated using the GC-FID. Validation was carried out following the protocols reported in the literature [20, 21]. Selectivity, calibration and linearity, limit of detection and limit of quantification, precision and accuracy were evaluated. The development and validation of the analytical method to determine caprolactam in olive oil was performed following the same protocols described above and was showed in previous work [22].

2.5. Migration

For the migration assay, pieces of films ($2 \times 3 \text{ cm}^2$) were, independently, placed in contact with 10 mL of food simulants (water, 15% ethanol and olive oil) inside glass vials, which were hermetically capped. These vials were stored in an oven thermostatically set at $40 \pm 1^\circ\text{C}$ during 10 days. Triplicate samples of each commercial brand of multilayer PA-6 films were analyzed. A blank prepared only with simulant was used as reference, and exposed and analyzed under the same conditions. After contact, film samples were removed, the internal standard solution was added, and then the compounds migrated into water and 15% ethanol were analyzed using GC-FID [10]. For olive oil simulant the internal standard solution was added to an aliquot of simulant, and a liquid-liquid extraction, using two parts of n-heptane and one part of ethanol/water (1:2, v/v), was carried out. After separation of the phases, the aqueous phase was collected, filtered (PTFE, $0.22 \mu\text{m}$) and then injected ($1 \mu\text{L}$) in the GC-FID [10]. Two injections for each replicate of the migration test were made into the chromatographic system. All migration tests were carried out by total immersion. Caprolactam levels obtained were submitted to the ANOVA and Tukey test was used to compare differences among means at $p \leq 0.05$.

3. Results and discussion

3.1. Validation of the chromatographic method

Selectivity was evaluated introducing the standard solutions prepared in water and in 15% ethanol in the GC-FID equipped with a DB-1701 and a DB-5 capillary column. It was verified that caprolactam and 2-azacyclononanone were free from interfering compounds or those that matched their signals. However, the best resolution was obtained using DB-1701 column, which was chosen for validation of the method and migration assay. The retention time (t_R) of caprolactam and 2-azacyclononanone peaks were 6.4 and 8.8 min, respectively.

Calibration curve for caprolactam in water food simulant was linear over the concentration range of 0.96 to 642.82 $\mu\text{g/mL}$. Linear regression equation was $y = -0.00739 + 0.90054x$, where y is the area ratio of caprolactam/2-azacyclononanone and x is the concentration ratio of caprolactam/2-azacyclononanone. Correlation coefficient (r) was 0.9999 and relative standard deviations (RSD) obtained for all injections were less than 12.3% for all concentrations. Calibration curve for caprolactam in 15% ethanol was linear over a wide concentration range (0.64 to 800.32 $\mu\text{g/mL}$), with r of 0.9997. Linear regression equation was $y = -0.00816 + 0.90431x$, and RSD for all injections were less than 6.5% for all concentrations. Table 1 shows the analytical conditions of the method for determining caprolactam in water and in 15% ethanol food simulants. The results obtained from 3% acetic acid and from olive oil food simulants presented here were previously obtained, and also showed a large linear range ($r=0.9999$) and RSD values for all injections lower than 5.3% (Table 1) [13, 22].

Linearity was studied using the area/concentration ratio of caprolactam/2-azacyclononanone *versus* the concentration of caprolactam/2-azacyclononanone used in the calibration curve, expressed in logarithmic scale [23]. It was verified that the concentrations used in the calibration curve, for water and 15% ethanol, were within the confidence interval of 95% (Figure 1).

Precision is an important criterion for evaluating an analytical method or equipment system performance [20, 21]. The precision of the method was evaluated using repeatability and intermediary precision. Repeatability was carried out using intra-day precision, which was analyzed at three concentration levels, in triplicate. Intermediary precision was carried out using inter-day precision, which was analyzed at three concentrations levels ($n= 10$). RSD values obtained from the intra-day and inter-day precision assay were less than 1.1 and 2.1%, respectively, for water, and less than 1.1 and 5.5%, respectively, for 15% ethanol (Table 2). The results were quite good for the concentration levels investigated. The accuracy of the method was studied during the intermediary

precision evaluation, via recovery, using different spiking levels and was expressed as a percentage for the true value of the analyte in the sample and the value obtained by analysis. For the three spiking levels studied, recovery was from 89 to 105% for water, with a maximum RSD of 2.1% and 103 to 111% for 15% ethanol, with RSD values lower than 5.5% (Table 2), indicating good accuracy and precision of the method. Even when low spiking levels were used, a high recovery was obtained.

The limit of detection of the method (LOD) was determined experimentally using successive dilutions from 1.60 µg/mL of caprolactam standard solution prepared in water and in 15% ethanol, containing 14 µg/mL of 2-azacyclononane. These water and alcoholic solutions were injected into the chromatographic system ($n=6$). The LOD ($S/N=3$) values obtained were 0.32 µg/mL for water and 0.16 µg/mL for 15% ethanol, with RSD values lower than 7.2% for both food simulants (Table 1).

The limit of quantification of the method (LOQ) corresponded to the lowest quantity (2–5 LOD, $n = 10$) of caprolactam quantified in water and in 15% ethanol [19, 20]. The LOQ of the method was 0.96 µg/mL for water and 0.64 µg/mL for 15% ethanol, with RSD and accuracy values lower than 9.1% and 120%, respectively, for both food simulants (Table 1).

3.2. Migration

Once the method was validated, it was used to quantify caprolactam that migrated from multilayer PA-6 films into simulants. For olive oil, the method was previously developed and validated [22]. Typical chromatograms from caprolactam migration into water, 15% ethanol and olive oil food simulants are in Fig. 2. The chromatogram of the blank did not present any interference in the t_R band of the analyte of interest or the internal standard. The levels of caprolactam that migrated from the films into water, 15% ethanol and olive oil food simulants, under the official migration conditions (10 days at 40°C) [19, 25, 26], are in Tables 3 and 4. The levels of caprolactam that migrated into 3% acetic acid, showed in previous work [13], were also included in Tables 3 and 4 for comparison.

Water food simulant showed caprolactam migration levels from 5.3-7.3 mg/kg, and 15% ethanol and olive oil showed caprolactam migration levels from 7.3-10.2 mg/kg and 7.1-11.9 mg/kg, respectively, for films used as meat foodstuffs packaging. For water food simulant, the highest level of caprolactam migrated from brand 3 (7.3 mg/kg), which did not differ ($p>0.05$) from brands 4 and 6. For 15% ethanol, the migration of caprolactam from multilayer PA-6 films showed that the highest level migrated from brand 6 (10.2 mg/kg), which showed no difference ($p>0.05$)

from brands 3, 4 and 5. Migration results obtained from olive oil showed that the highest level of caprolactam (11.9 mg/kg) migrated from brand 6, which did not differ significantly ($p>0.05$) only from brand 4. The migration into 3% acetic acid showed that the highest level of caprolactam (10.5 mg/kg) migrated from brand 4, which did not differ significantly ($p>0.05$) only from brand 6 (Table 3).

Brands 4 and 6 showed similar behavior with higher levels of caprolactam into all the simulants when compared to the other brands. Olive oil was the simulant with the highest level of caprolactam migration. Brands 4, 6, 7 and 8 showed higher levels ($p\leq 0.05$) of caprolactam into olive oil, with no difference ($p>0.05$) only from brand 4 and 8 for 3% acetic acid and 15% ethanol, respectively. Migration of caprolactam into 3% acetic acid was higher from brands 1 and 2. Brand 3 showed no difference ($p>0.05$) between olive oil, 3% acetic acid and 15% ethanol. The lowest caprolactam level migrated into water, which showed a reduction around 21-47% on caprolactam migration when compared to the other simulants. On the other hand, Stoffers *et al.* [2] described that almost all caprolactam migrated from a monolayer PA-6 film into water instead of into olive oil, because of its hydrophilic character.

Among multilayer PA-6 films used for cheese, brand 10 showed the highest level of caprolactam migration into water (5.4 mg/kg), differing significantly ($p\leq 0.05$) from all the other brands. Brand 10 also showed the highest level of caprolactam migration into 15% ethanol (7.3 mg/kg), differing ($p\leq 0.05$) from all the other brands, and into 3% acetic acid (7.6 mg/kg), with no significant difference ($p>0.05$) from brand 11. For olive oil, it was found that the highest level of caprolactam migrated from brand 9 (4.9 mg/kg), which differed ($p\leq 0.05$) from all the other brands. Brand 12 showed caprolactam level very low in all simulants, and below LOQ of the method in 3% acetic acid, so it was not quantified. Caprolactam migration was not detected from brand 13 into water, olive oil and 3% acetic acid, and was below LOQ of the method for 15% ethanol. 3% Acetic acid was the simulant with the highest level of caprolactam migration and apparently showed no difference from 15% ethanol. In a general way, the lowest caprolactam levels migrated into water and olive oil (Table 4).

It should be pointed out that all the samples studied showed caprolactam migration levels below to the specific migration limit established for caprolactam (15 mg/kg), and therefore, they are in accordance to Legislation [19, 24].

In some cases, the results of migration tests for olive oil or other fatty food simulants, should use a reduction factor, which is 4 for meat foodstuffs and 3 for cheese [19, 27]. This is conventionally used to take into account the highest extractive capacity of some fatty food

simulants. In this work the reduction factor was not used to express the migration of caprolactam into olive oil.

Some works described caprolactam migration from PA packaging [1,2, 5-9] but few were found from Brazilian multilayer PA-6 films [13, 22]. The amount of caprolactam that migrated from multilayer PA-6 films, used for meat foodstuffs and cheese, into water ranged from 7.5-13.0 mg/kg, and was higher than the results showed in this work for films used for meat foodstuffs and similar to those obtained for the film used as cheese packaging, considering that a different volume of simulant (15 mL) and a different analytical technique were used. On the other hand, caprolactam migration from the same multilayer PA-6 films into 95% ethanol (7.7-10.0 mg/kg) was inside the interval obtained for olive oil in this work, although it had been lower for films used for meat foodstuffs and slightly higher for the film used for cheese, when the simulant volume of 15 mL was taken into account [14]. Both of them are used as fatty food simulants [19, 27]. Pogorzelska and Mielniczuk [9] described caprolactam migration from PA films into water, 15% ethanol, olive oil and 3% acetic acid ranging from 6.6-17.0, 6.3-16.4, 1.5-3.8 and 6.0-16.3 mg/kg, respectively, which included the caprolactam range obtained in our study for multilayer PA-6 films used as meat foodstuffs and cheese packaging. Begley *et al.* [6] described a caprolactam migration from PA-66/PA-6 roasting bag into Mygliol of 0.98 mg/kg, similar that we obtained for olive oil (1.03 mg/kg). Caprolactam was quantified in the range of 0.8-13 mg/kg in food samples packaged in PA-6 films, casings and pouches [1], similar to the results showed in this work, although the migration assay had been carried out with foods instead of simulants.

In contrast, other works showed caprolactam migration levels different from those obtained in this work, which should be related to the different PA structures, thickness and conditions of contact, etc. Concerning caprolactam migration from PA-6 films into water, the levels ranged from 0.3-1.8 mg/cm² [5] and from 30-250 mg/cm² for mono and multilayer films containing PA-6 [2], higher than ours (0.002-0.012 mg/cm²). For fatty food simulants, caprolactam migration from PA-6/PA-12 and PA-6 films into olive oil ranged from 0.2-2 mg/cm², respectively [2], and 6 mg/cm² of caprolactam migrated into olive oil [7], higher than caprolactam migration levels from this work (0.003-0.022 mg/cm²).

4. Conclusions

The method developed and validated was considered effective to determine caprolactam in water and 15% ethanol food simulants, showing low limit of detection, good precision and accuracy, and a maximum time of analysis of 11 minutes. The method was also efficient to quantify

caprolactam that migrated from multilayer PA-6 films into water, 15% ethanol and olive oil food simulants, which ranged from 5.3–7.3 mg/kg, 7.3–10.2 mg/kg and 7.1–11.9 mg/kg, respectively, for films used as meat foodstuffs packaging, and from 1.0–5.4 mg/kg, 1.1–7.3 mg/kg and 1.4–4.9 mg/kg, respectively, for films used for cheese. All multilayer PA-6 films were in accordance to the requirements of legislation for migration of caprolactam. The levels of caprolactam migration from multilayer PA-6 films into water, 15% ethanol and olive oil food simulants were the first reported for Brazilian multilayer PA-6 films used for meat foodstuffs and cheese.

Acknowledgements

The authors wish to thank PADC-FCF/UNESP and CAPES for supporting this work.

References

- [1] E.L. Bradley, D.R. Speck, W.A. Read, L. Castle. *Food Add. Contam.* 21 (2004) 1179.
- [2] N.H. Stoffers, M. Dekker, J.P.H. Linssen, A. Störmer, R. Franz, M.A.J.S. van Boekel. *Eur. Food Res. Technol.* 220 (2005) 156.
- [3] R.J. Hernandez, S.E.M. Selke, J.D. Culter (Editors), *Plastics packaging: properties, processing, applications and regulations*. Hanser Gardner Publications, 2000, p.425.
- [4] C.I.G.L. Sarantópoulos, M.L. Oliveira, L. Coltro, A.R.M. Vercelino, G.E.E. Corrêa (Editors), *Embalagens plásticas flexíveis: principais polímeros e avaliação de propriedades*. CETEA/ITAL, 2002, p. 267.
- [5] C.T. Barkby, G. Lawson. *Food Addit. Contam.* 10 (1993) 541.
- [6] T.H. Begley, M.L. Gay, H.C Hollifield. *Food Addit. Contam.* 12 (1995) 671.
- [7] H. Soto-Valdez, J.W. Gramshaw, H.J. Vanderburg. *Food Addit. Contam.* 14 (1997) 309.
- [8] J.W. Gramshaw, H. Soto-Valdez. *Food Addit. Contam.* 15 (1998) 329.
- [9] Z. Pogorzelska, Z. Mielniczuk. *Packag. Technol. Sci.* 14 (2001) 31.
- [10] EC 2004. Joint Research Centre. *Specific Migration Methods. Determination of Caprolactam in Food Simulants*. Available at: <http://cpf.jrc.it/smt/monomers/downloads/pm14200.pdf>.
- [11] M. Monteiro, C. Nerín, F.G.R. Reyes. *Food Addit. Contam.* 13 (1996) 575.
- [12] M. Monteiro, C. Nerín, F.G.R. Reyes. *Pack. Tech. Sci.* 12 (1999) 241.
- [13] J.S. Félix, M. Padula, J.E. Manzoli, M. Monteiro. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 27 (2007) 27.

-
- [14] J.S. Félix, M. Monteiro, J.E. Manzoli, M. Padula, D. Pezo, J. Romero, C. Nerín. *Anal. Bioanal. Chem.* (2008). DOI 10.1007/s00216-008-1893-3. Available on line: <http://www.springerlink.com/content/e666100588515j55/fulltext.pdf>.
- [15] A. Groman, J. Guberska. *Polimery* 44 (1999) 618. In: *Chemical Abstracts, 1997-2001*. Abstract 132:22239. CD ROM.
- [16] L. Bonifaci, D. Frezzotti, G. Cavalca, E. Malaguti, G.P. Ravanetti. *J. Chromatogr.* 585 (1991) 333.
- [17] Y. Zhao, Z. Jing, H. Li, H. Zhang. *Microchem. J.* 69 (2001) 213.
- [18] C. Nerín, in R. Catalá, R. Gavara (Editors) *Migración de componentes y residuos de envase en contacto con alimentos*. Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, CSIC, 2001, p.346.
- [19] ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Res. No 105, (19 May 1999). Available at: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=19772&word>.
- [20] IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry). *Pure Appl. Chem.*, 74 (2002) 835.
- [21] Guide, *The Fitness for Purpose of Analytical Methods, A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics*, EURACHEM, Teddington, UK, 1998.
- [22] J.S. Félix, M. Padula, J.E. Manzoli, M. Monteiro. *Alim. Nutr.* 17 (2006) 329.
- [23] A. L. M. Nasser, L. M. X. Lopes, M. N. Eberlin, M. Monteiro. *J. Chromatogr. A*, 1097 (2005) 130.
- [24] Commission Directive No 2002/72/EC, *Off. J. Eur. Commun.* No L 220/18 (6 August 2002).
- [25] Commission Directive No 93/8/CEE, *Off. J. Eur. Commun.* No L 090 (15 March 1993).
- [26] Commission Directive No 97/48/CE, *Off. J. Eur. Commun.* No L 222 (29 July 1997).
- [27] Council Directive No 85/572/EEC, *Off. J. Eur. Commun.* No L 372/16 (19 December 1985).

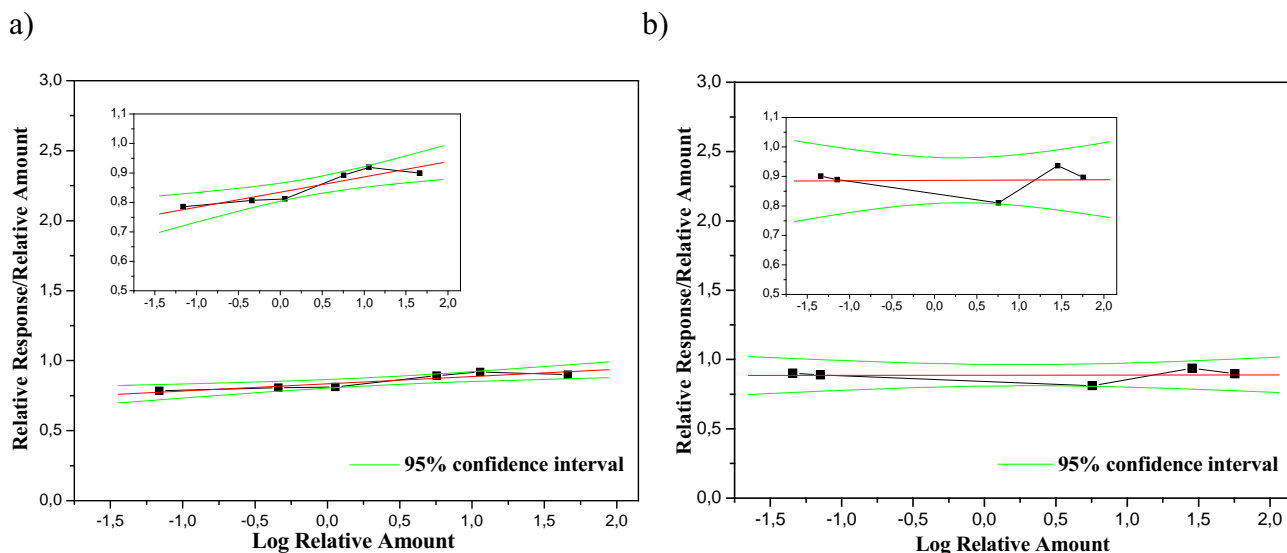


Fig. 1. Area/concentration ratio of caprolactam/2-azacyclononane *versus* concentration of caprolactam/2-azacyclononane used in the calibration curve, expressed in logarithmic scale. Values inside dash lines are between confidence interval of 95%. (a) Water and (b) 15% ethanol food simulants.

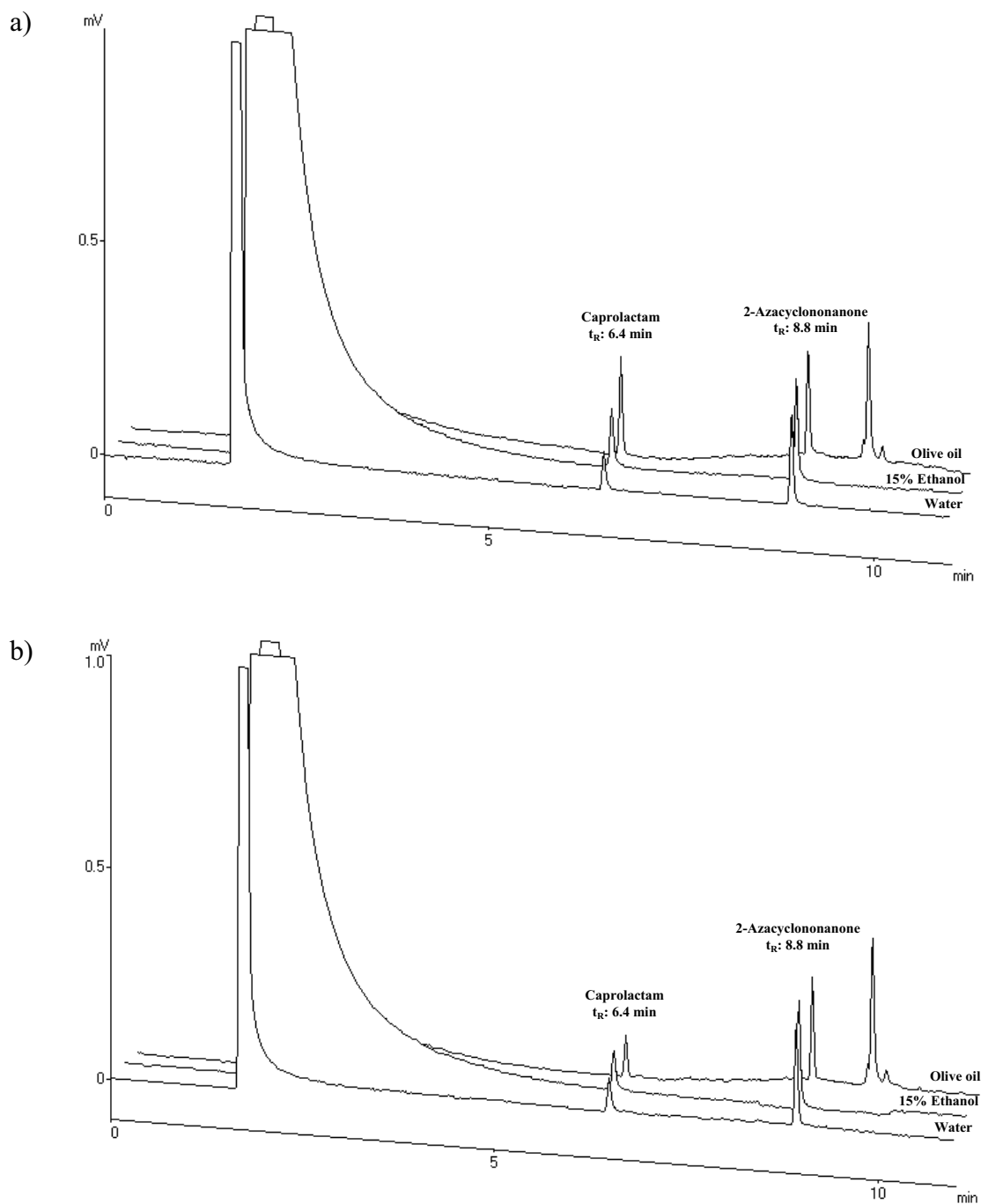


Fig. 2. Typical chromatograms of caprolactam migrated from multilayer PA-6 films into water, 15% ethanol and olive oil, using GC-FID; (a) brand 6 for meat foodstuffs and (b) brand 2 for cheese. Conditions: Column temperature was held for 1 min at 130°C, programmed at 10°C/min to 170°C and held for 1 min, and then programmed at 10°C/min to 200°C and held for 2 min. Carrier gas: Hydrogen (1 mL/min). Injections (1 μ L) were performed at 240°C in split mode (1:20). The detector temperature was 250°C.

Table 1

Validation parameters for caprolactam analysis in water, 15% ethanol, 3% acetic acid and olive oil food simulants, using GC-FID.

Food simulant	Linear Range ($\mu\text{g/mL}$)	Regression Equation	Correlation Coefficient (r)	Limit of Deteccion (LOD) ($\mu\text{g/mL}$)	Limit of Quantificacion (LOQ) ($\mu\text{g/mL}$)	LOQ Recovery (%)
Distilled Water	0.96 - 642.82	$y = -0.0074 + 0.9005x$	0.9999	0.32 (7.16)	0.96 (4.86)	99
15% Ethanol	0.64 - 800.32	$y = -0.0082 + 0.9043x$	0.9997	0.16 (6.16)	0.64 (9.11)	120
3% Acetic Acid*	1.60 - 640.00	$y = -0.0744 + 0.9346x$	0.9999	0.24 (5.06)	1.60 (6.42)	132
Olive Oil**	1.06 - 1062.34	$y = 0.0280 + 1.0661x$	0.9999	0.10 (7.56)	1.06 (6.78)	73

RSD, relative standard deviation (%) in parenthesis for LOD and LOQ.

* Results showed in Félix et al. 2007 [13]. ** Linear range, LOD and LOQ expressed as $\mu\text{g/g}$.

Table 2

Precision and accuracy of the method for determination of caprolactam in water and 15% ethanol food simulants.

<i>Water Food Simulant</i>	Repeatability (intra-day precision) (<i>n</i> =3)			Intermediary precision (inter-day precision) (<i>n</i> =10)		
Spiked level (µg/mL)	1.61	32.14	401.76	1.61	32.14	401.76
Found (mean ± SD) (µg/mL)	1.41 ± 0.02	31.57 ± 0.28	418.09 ± 2.65	1.43 ± 0.03	31.40 ± 0.32	420.06 ± 8.92
RSD ^a	1.10	0.90	0.63	2.02	1.01	2.12
Accuracy ^b				89	98	105
<i>15% Ethanol Food Simulant</i>	Repeatability (intra-day precision) (<i>n</i> =3)			Intermediary precision (inter-day precision) (<i>n</i> =10)		
Spiked level (µg/mL)	0.72	160.30	601.20	0.72	160.30	601.20
Found (mean ± SD) (µg/mL)	0.77 ± 0.01	169.56 ± 0.77	638.22 ± 6.70	0.80 ± 0.04	165.65 ± 4.50	629.21 ± 24.6
RSD ^a	0.84	0.45	1.05	5.45	2.72	3.91
Accuracy ^b				111	103	105

^a RSD, relative standard deviation (%).

^b Accuracy (%).

Table 3

Migration levels of caprolactam from multilayer PA-6 films, used for meat foodstuffs, into water, 15% ethanol, olive oil and 3% acetic acid food simulants (10 days at 40°C).

Sample	Food Simulant ^a (mg/kg)			
	Distilled Water	15% Ethanol	Olive Oil	3% Acetic Acid*
1	6.12 ± 0.30 (4.84)bcC	8.71 ± 0.49 (5.61)bAB	7.97 ± 0.32 (3.97)dB	9.49 ± 0.33 (3.51)bcA
2	5.61 ± 0.14 (2.42)cdC	7.30 ± 0.27 (3.67)cB	7.09 ± 0.16 (2.31)eB	7.93 ± 0.26 (3.28)eA
3	7.34 ± 0.33 (4.56)aB	9.66 ± 0.33 (3.38)aA	9.69 ± 0.42 (4.33)cA	9.65 ± 0.40 (4.10)bA
4	7.17 ± 0.41 (5.69)aC	10.04 ± 0.52 (5.14)aB	11.31 ± 0.68 (6.01)abA	10.46 ± 0.65 (6.19)aAB
5	6.46 ± 0.38 (5.92)bC	9.73 ± 0.23 (2.36)aA	9.06 ± 0.59 (6.49)cB	8.88 ± 0.56 (6.35)cdB
6	6.91 ± 0.37 (5.38)aC	10.17 ± 0.29 (2.84)aB	11.89 ± 0.77 (6.44)aA	9.90 ± 0.50 (5.04)abB
7	5.72 ± 0.37 (6.51)cdC	8.40 ± 0.19 (2.22)bB	10.79 ± 0.23 (2.13)bA	8.57 ± 0.25 (2.97)deB
8	5.34 ± 0.09 (1.62)dC	8.41 ± 0.35 (4.13)bAB	8.82 ± 0.53 (6.03)cdA	7.75 ± 0.53 (6.90)eB

^a Mean of six replicates of the found value ± standard deviation (SD); RSD, relative standard deviation (%) between parenthesis.

*Showed at Felix et al. 2007 [13].

Mean scores within a line followed by same capital letters (A, B, C, D) are not significantly different (p>0.05).

Mean scores within a column followed by same letters (a, b, c, d, e) are not significantly different (p>0.05).

Table 4

Migration levels of caprolactam from multilayer PA-6 films, used for cheese, into water, 15% ethanol, olive oil and 3% acetic acid food simulants (10 days at 40°C).

Sample	Food Simulant ^a (mg/kg)			
	Distilled Water	15% Ethanol	Olive Oil	3% Acetic Acid*
9	4.76 ± 0.08 (1.61)bB	6.70 ± 0.28 (4.23)bA	4.97 ± 0.11 (2.15)aB	6.92 ± 0.45 (6.52)bA
10	5.43 ± 0.37 (6.81)aB	7.30 ± 0.30 (4.11)aA	4.08 ± 0.06 (1.40)bC	7.59 ± 0.33 (4.34)aA
11	4.80 ± 0.27 (5.54)bC	6.48 ± 0.29 (4.41)bB	2.89 ± 0.05 (1.78)cD	7.01 ± 0.30 (4.25)abA
12	1.03 ± 0.08 (7.37)cB	1.12 ± 0.04 (3.61)cB	1.38 ± 0.08 (6.06)dA	<LOQ
13	ND	<LOQ	ND	ND

^a Mean of six replicates of the found value ± standard deviation (SD); RSD, relative standard deviation (%) between parenthesis.

*Shown at Felix et al. 2007 [13]. ND. Not detected; LOQ. Limit of quantification.

Mean scores within a line followed by same capital letters (A, B, C, D) are not significantly different (p>0.05).

Mean scores within a column followed by same letters (a, b, c, d, e) are not significantly different (p>0.05).

CAPÍTULO 5

**EFFECT OF GAMMA IRRADIATION ON CAPROLACTAM MIGRATION
FROM MULTILAYER POLYAMIDE 6 FILMS INTO FOOD SIMULANTS**

Effect of gamma irradiation on caprolactam migration from multilayer polyamide 6 films into food simulants

J. S. Félix^a, J. E. Manzoli^b, M. Padula^c, M. Monteiro^{a,*}

^a Department of Food and Nutrition/School of Pharmaceutical Science, São Paulo State University, PO Box 502, 14801-902, Araraquara, SP, Brazil. ^b Nuclear and Energetic Research Institute (IPEN), São Paulo, SP, Brazil. ^c Packaging Technology Center/Food Technology Institute (CETEA/ITAL), Campinas, SP, Brazil.

The effect of gamma irradiation on caprolactam migration from multilayer polyamide 6 films into water, 3% acetic acid, 15% ethanol and olive oil food simulants was studied. For migration assay, irradiated and non-irradiated film samples (6 cm²) were placed in contact with 10mL of simulant, and exposed at 40°C during 10 days (total immersion). The amount of caprolactam that migrated from the films used for meat foodstuffs into food simulants ranged from 5.7 to 11.9 mg kg⁻¹ for non-irradiated films, from 4.8 to 10.6 mg kg⁻¹ and from 3.6 to 6.0 mg kg⁻¹ for films irradiated at 3 and 7 kGy, respectively. Caprolactam migration from films used for cheese into food simulants ranged from 1.0 to 7.6 mg kg⁻¹ for non-irradiated films and from 4.0 to 7.9 mg kg⁻¹ for films irradiated at 12 kGy. The effect of irradiation showed a reduction on caprolactam levels with the increase of the irradiation dose from 0 to 7 kGy for films used as meat foodstuffs packaging, while for films used as cheese packaging almost no changes were observed in caprolactam migration from non-irradiated or irradiated films into all simulants, with the exception of olive oil which showed an increase in caprolactam level with irradiation.

Keywords: caprolactam, migration, multilayer polyamide 6 films, irradiation, food simulants, GC-FID.

*To whom correspondence should be addressed.

e-mail: monteiro@fcfar.unesp.br ; jufelix78@gmail.com

Introduction

Irradiation is used in many countries for prepackaged foodstuffs as processed meat, sauces, salad dressing, fruit juices, wine, butter, etc. In general, packaging materials must be

compatible with irradiation and food, and should not change their properties or produce toxic substances that migrate into foods (ANVISA 1999; 2001; EC 1999 a; b; FDA 2005; Chmielewski 2006).

Caprolactam is the monomer used to produce polyamide 6 (PA-6) (Barkby and Lawson 1993, Soto-Valdez *et al.* 1997, Bradley *et al.* 2004, EC 2004, Stoffers *et al.* 2005). After polymerization, residual caprolactam remains in the resin once polymerization is not complete and, can migrate into food in contact (Barkby and Lawson 1993, Monteiro *et al.* 1999; Bradley *et al.* 2004). Typical applications of PA-6 films are vacuum and modified atmosphere packaging for meat, poultry and cheese. Multilayer films containing PA-6, PA-66, PA-12 and PA MXD-6 are used for meat foodstuffs such as bologna, ham and sausage, among other products (Sarantópoulos *et al.* 2001, 2002, Bradley *et al.* 2004, Stoffers *et al.* 2005). PA-6, PA-66 microwave and roasting bags (MRB), boil-in-the-bag and cook-in packaging are also used (Begley *et al.* 1995, Soto-Valdez *et al.* 1997, Gramshaw and Soto-Valdez 1998). In addition to other advantages, PA-6 is approved for contact with prepackaged food during irradiation (EC 1999a; b, ANVISA 2001, FDA 2005).

The effect of irradiation on migration of compounds from plastic packaging into food is an important issue concerning packaging producers, food industry and researchers due to the possible reduction of the migration levels. Stoffers *et al.* (2004), Ito *et al.* (2005), Jeon *et al.* (2007), reported the reduction of additives migration from LDPE and HDPE, PVC sheet and tubing, LLDPE film, respectively.

Caprolactam migration from multilayer PA-6 films into 95% ethanol ranged from 6.1 to 9.0 $\mu\text{g g}^{-1}$ after irradiation at 3, 7 and 12 kGy, and from 7.7 to 10.0 $\mu\text{g g}^{-1}$ for non-irradiated films. For water food simulant, migration was observed only for non-irradiated films (7.5 to 13.0 $\mu\text{g g}^{-1}$). Caprolactam migration was reduced with the increase of irradiation dose from 0 to 3 kGy and remained almost the same up to 7 kGy for films used as meat foodstuffs packaging, while for films used as cheese packaging no changes were observed between non-irradiated and irradiated films (12 kGy). Besides caprolactam migration, low levels of decaldehyde (0.004 $\mu\text{g g}^{-1}$) and 2-cyclopentylcyclopentanone (0.02 $\mu\text{g g}^{-1}$) migrated from non-irradiated films into water food simulant (Félix *et al.* 2008).

It has been reported that the overall migration of LDPE/PA/Ionomer films into isooctane and 3% acetic acid, submitted to gamma radiation at 5, 10 and 30 kGy, showed no significant differences ($p>0.05$) when doses up to 10 kGy were used, therefore it was reduced *ca* 16-22% at 30 kGy (Goulas *et al.* 2003). On the other hand, no significant

differences ($p > 0.05$) were observed in the overall migration from HDPE/PA bottles into distilled water, 3% acetic acid and isooctane when irradiation at 5, 10, 30 and 60 kGy was used (Goulas *et al.* 2004).

The levels of caprolactam from PA-6 films irradiated at 5 kGy increased more than twice (164.1 mg kg^{-1}) when compared with non-irradiated films (70.8 mg kg^{-1}) and were almost the same with doses from 5 to 200 kGy (Park *et al.* 2006). Irradiation of PA-6 films (25, 50 e 100 kGy) did not change caprolactam levels, although aminocaproic acid had been produced (Yagoubi *et al.* 1995). Gamma radiation (0-54 kGy) did not affect the levels of monomers and low molecular mass oligomers from PA-6 and PA-12 films (Stoffers *et al.* 2004).

The objective of this work was to study the effect of gamma irradiation on caprolactam migration from multilayer PA-6 films, used as meat foodstuffs and cheese packaging, into distilled water, 3% acetic acid, 15% ethanol and olive oil food simulants.

Experimental

Chemicals and reagents

Caprolactam (purity > 99%) was used as analytical standard and 2-azacyclononanone (purity > 98%) was used as an internal standard, both purchased from Sigma Aldrich (Buchs, Switzerland).

Methanol (MeOH) and n-heptane HPLC grade were purchased from Mallinckrodt Chemicals (Phillipsburg, USA) and ethanol HPLC grade were purchased from J.T. Baker. Extra virgin olive oil (La Española), purchased at the Brazilian retail market, and distilled water were also used. Acetic acid (P.A. grade) was acquired from Merck (Darmstad, Germany).

Distilled water, 3% acetic acid, 15% ethanol and olive oil were food simulants used during migration experiments.

Samples

Commercially available multilayer PA-6 films were supplied by the Brazilian producing companies. Virgin films from four commercial brands used for meat foodstuffs and five brands used for cheese, named brands 1-4 and 5-9, respectively, were studied.

Methods

GC-FID analysis. Chromatographic analyses were performed in a 17-A Shimadzu Gas Chromatograph (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) equipped with a flame ionization detector. A DB-1701 (J&W Scientific, Folsom, USA) capillary column (30 m x 0.25 mm and 0.25 μm film thickness) and a DB-5 (J&W Scientific) capillary column (30 mx0.25 mmx0.25 μm) were used. A DB-1701 capillary column was used at 130°C for 1 min, programmed at 10°C/min up to 170°C for 1min, then heated to 200°C at 10°C/min and held for 2 min. Hydrogen was the carrier gas (1.0 mL/min) and nitrogen was the make up gas. Injections (1 μL) were made at 240°C in split mode (1:20). Detector temperature was 250°C.

Irradiation

The irradiation was performed at the Radiation Technology Center (CTR) of the Nuclear and Energetic Research Institute (IPEN), Brazil, using Gamacell 60 cobalt irradiator of 12 kCi. Multilayer PA-6 films (2 X 3 cm^2) were disposed in hermetically closed glass vials (20 mL) and submitted to gamma radiation in doses of 3 and 7 (meat foodstuffs) and 12 kGy (cheese) with dose rate of 3 kGy/h, in the presence of oxygen and at room temperature (IAEA 2002).

Migration

For the migration assay, pieces of irradiated and non-irradiated films (2 x 3 cm^2) were, independently, placed in contact with food simulants (water, 15% ethanol and olive oil) inside glass vials which were hermetically capped. These vials were stored in an oven thermostatically set at $40 \pm 1^\circ\text{C}$ during 10 days. Triplicate samples of each commercial brand of multilayer PA-6 films were analyzed for each irradiation dose. A blank prepared

with non-irradiated PA-6 films from each brand in contact with each simulant and another only with simulant were used as reference, and exposed and analyzed under the same conditions. After contact, film samples were removed, the internal standard solution was added, and then the compounds migrated into water, 3% acetic acid and 15% ethanol were analyzed using GC-FID (EC 2004). For olive oil simulant the internal standard solution was added to an aliquot of simulant, and a liquid-liquid extraction, using two parts of n-heptane and one part of ethanol/water (1:2, v/v), was carried out. After separation, the aqueous phase was collected, filtered (PTFE, 0.22 μm) and then injected (1 μL) in the GC-FID (EC 2004). Two injections for each replicate of the migration test were made into the chromatographic system. All migration tests were carried out by total immersion. Caprolactam levels obtained were submitted to the ANOVA and Tukey test was used to compare differences among averages at $p \leq 0.05$. The method used to determine caprolactam in food simulants was previously developed and validated in our laboratory and was used to quantify caprolactam in distilled water, 3% acetic acid, 15% ethanol and in olive oil (Félix *et al.* 2006, 2007).

Results and discussion

Migration

Typical chromatograms of caprolactam migration from irradiated and non-irradiated multilayer PA-6 films into olive oil food simulant are shown in Fig. 1. The chromatogram of the blank did not present any interference in the retention time (t_R) band of the analyte of interest or the internal standard. The levels of caprolactam that migrated from the irradiated and non-irradiated films into water, 3% acetic acid, 15% ethanol and olive oil food simulants, under the official migration conditions (10 days at 40°C) (EC 1982, 1985, 2002, ANVISA 1999), are shown in Table 1.

Caprolactam migration into distilled water ranged from 5.7-7.2 mg kg^{-1} for non-irradiated films used as meat foodstuffs packaging and from 4.8-6.5 and 3.6-4.4 mg kg^{-1} for films irradiated at 3 and 7 kGy, respectively. The highest level of caprolactam (7.2 mg kg^{-1}) migrated from non-irradiated films of brand 2, which did not differ ($p > 0.05$) from brand 3. There were statistically significant differences ($p \leq 0.05$) in caprolactam migration between irradiated (all absorbed doses) and non-irradiated films of brands 1, 2 and 4, with the

exception of brand 3 ($p > 0.05$) at 0 and 3 kGy. In general, a decrease of 6-19% between 0 and 3 kGy and 37-45% between 0 and 7 kGy occurred in caprolactam migration (Table 1). For films used for cheese, caprolactam levels ranged from 1.0-4.8 mg kg⁻¹ for non-irradiated films and from 4.8-6.8 mg kg⁻¹ for irradiated films. The highest level was 6.8 mg kg⁻¹ from irradiated films of brand 6, which differed ($p \leq 0.05$) from all the other brands. There was a significant difference ($p \leq 0.05$) from irradiated and non-irradiated films of brands 6 and 7, with the exception of brand 5 ($p > 0.05$) at doses of 0 and 12 kGy. In contrast with the films used as meat foodstuffs packaging, multilayer PA-6 films used for cheese showed an increase of 1-24% in caprolactam migration when the films were submitted to irradiation at 12 kGy. Caprolactam migration from brand 8, irradiated and non-irradiated, and brand 9 (irradiated) into water was not detected (Table 2).

Caprolactam migration from non-irradiated and irradiated (3 and 7 kGy) films used for meat foodstuffs into 3% acetic acid ranged from 8.6-10.5, 6.4-9.0 and 4.2-6.0 mg kg⁻¹, respectively. The highest level of caprolactam (10.5 mg kg⁻¹) migrated from non-irradiated films of brand 2, which did not differ ($p > 0.05$) from brands 1 and 3. Similarly for water, there were differences ($p \leq 0.05$) in caprolactam migration between non-irradiated and irradiated (3 and 7 kGy) films of brands 1, 2 and 4, with the exception of brand 3 that showed no difference ($p > 0.05$) in caprolactam migration at doses of 0 and 3 kGy. A decrease of 9-27% in caprolactam migration between 0 and 3 kGy and of 42-51% between 0 and 7 kGy was observed (Table 1). Caprolactam migration from films used for cheese into 3% acetic acid ranged from 6.9-7.6 mg kg⁻¹ for non-irradiated films and from 6.5-7.7 mg kg⁻¹ for irradiated films. The highest level was 7.7 mg kg⁻¹ from irradiated films of brand 6, which differed ($p \leq 0.05$) from all the other brands. No differences ($p > 0.05$) were observed between caprolactam migration from non-irradiated and irradiated (12 kGy) films from brands 5 and 6 while films from brand 7 ($p \leq 0.05$) showed a decrease of 8% in caprolactam levels when irradiated. For brand 8, non-irradiated films showed caprolactam level below LOQ of the method, so it was not quantified and for irradiated films caprolactam was not detected, as well as non-irradiated and irradiated films of brand 9 (Table 2).

For 15% ethanol caprolactam migration ranged from 8.4-10.2 mg kg⁻¹ for non-irradiated films used as meat foodstuffs packaging, from 6.6-8.7 and 4.0-5.1 mg kg⁻¹ for films irradiated at 3 and 7 kGy, respectively. The highest level of caprolactam (10.2 mg kg⁻¹) migrated from non-irradiated films of brand 3, which did not differ ($p > 0.05$) from brand 2.

There were significant differences ($p \leq 0.05$) in caprolactam migration between non-irradiated and irradiated from all the brands (all absorbed doses). A decrease of 15-24% between 0 and 3 kGy and of 45-52% between 0 and 7 kGy in migration levels was observed (Table 1). Caprolactam migration ranged from 1.1-7.3 mg kg⁻¹ for non-irradiated and from 6.0-7.9 mg kg⁻¹ for irradiated films used as cheese packaging. The highest level was 7.9 mg kg⁻¹ from irradiated films of brand 6, which differed ($p \leq 0.05$) from all the other brands. There were differences ($p \leq 0.05$) from irradiated and non-irradiated films of brands 5 and 6, but from brand 5, the highest caprolactam value occurred in non-irradiated films and the opposite was observed for brand 6. There was no difference ($p > 0.05$) in caprolactam migration of brand 7. For irradiated films of brand 8 and non-irradiated films of brand 9, caprolactam levels were below LOQ of the method, but for irradiated films of brand 9, caprolactam was not detected (Table 2).

Migration results obtained for caprolactam from non-irradiated and irradiated (3 and 7 kGy) films used for meat foodstuffs into olive oil ranged from 7.1-11.9, 6.7-10.6 and 4.2-5.5 mg kg⁻¹, respectively. The highest level of caprolactam (11.9 mg kg⁻¹) migrated from non-irradiated films of brand 3, which did not differ ($p > 0.05$) from brand 2. Similarly for water and 3% acetic acid, differences ($p \leq 0.05$) were observed in caprolactam migration between non-irradiated and irradiated (3 and 7 kGy) films of brands 1, 2 and 4, with the exception of brand 3 that showed no difference ($p > 0.05$) at doses of 0 and 3 kGy. A decrease of 4-38% between 0 and 3 kGy and of 37-62% between 0 and 7 kGy occurred in caprolactam migration levels (Table 1). Caprolactam migration from films used for cheese into olive oil ranged from 1.4-5.0 mg kg⁻¹ for non-irradiated films and from 4.0-7.5 mg kg⁻¹ for irradiated films. The highest level was 7.5 mg kg⁻¹, from irradiated films of brand 5, which did not differ ($p > 0.05$) from brand 6. Differences ($p \leq 0.05$) were observed from all brands of irradiated and non-irradiated films. For brands 5, 6 and 7 caprolactam migration was higher in irradiated films than in non-irradiated films. For irradiated films of brand 8 caprolactam levels were below LOQ of the method and from irradiated and non-irradiated films of brand 9 caprolactam migration was not detected (Table 2).

It should be pointed out that all the samples studied showed caprolactam migration below the specific migration limit of 15 mg/kg, and therefore, they are in accordance to the limits established by Brazilian and EC legislation (ANVISA 1999, EC 2002).

Migration of compounds into olive oil or other fatty food simulants should use a reduction factor, which is 4 for meat foodstuffs and 3 for cheese (EC 1985, ANVISA 1999). This is

conventionally used to take into account the highest extractive capacity of some fatty food simulants. In this work the reduction factor was not used to express the migration of caprolactam into olive oil.

Conclusions

The effect of gamma irradiation on caprolactam migration from multilayer polyamide 6 films into water, 3% acetic acid, 15% ethanol and olive oil food simulants showed a reduction in caprolactam levels with the increase of the irradiation dose for films used as meat foodstuffs packaging, while for films used as cheese packaging, almost no differences were observed in caprolactam levels from irradiated and non-irradiated films into water, 3% acetic acid and 15% ethanol, although most of the irradiated films showed higher caprolactam migration, especially into olive oil.

Acknowledgements

This work has been supported by CAPES and PADC/FCF/UNESP(Brazil).

References

- ANVISA, 1999. Resolution No 105 (19 May 1999). Regulamentos técnicos sobre disposições gerais para embalagens e equipamentos plásticos em contato com alimentos e seus anexos. Brasília (DF): Federal Government. Available from: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=19772&word=>
- ANVISA, 2001. Resolution No 21 (26 January 2001). Regulamento Técnico para Irradiação de Alimentos. Brasília (DF): Federal Government. Available from: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=161&word=>
- BARKBY, C. T. and LAWSON, G., 1993, Analysis of migrants from nylon 6 packaging films into boiling water. *Food Additives and Contaminants*, **10**, 541-553.
- BEGLEY, T. H.; GAY, M. L. and HOLLIFIELD, H. C., 1995, Determination of migrants in and migration from nylon food packaging. *Food Additives and Contaminants*, **12**, 671-676.

BRADLEY, E. L.; SPECK, D. R.; READ, W. A. and CASTLE, L., 2004, Method of test and survey of caprolactam migration into foods packaged in nylon-6. *Food Additives and Contaminants*, **21**, 1179-1185.

BUCHALLA, R.; BOESS, C. and BÖGL, K. W., 1999, Characterization of volatile radiolysis products in radiation-sterilized plastics by thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry: screening of six medical polymers. *Radiation Physics and Chemistry*, **56**, 353-367.

BUCHALLA, R.; BEGLEY, T. H. and MOREHOUSE, K. M., 2002, Analysis of low-molecular weight radiolysis products in extracts of gamma-irradiated polymers by gas chromatography and high-performance liquid chromatography. *Radiation Physics and Chemistry*, **63**, 837-840.

BUREAU, G. and MULTON, J. L. Ionizing treatment and packaging - preservation of foodstuffs packaged in flexible packaging. In: Bureau G, Multon JL (eds) *Food Packaging Technology*, v.2, New York: VCH, 1996, p.65-84.

CHMIELEWSKI, A.G. Packaging for food irradiation. Raporty IChTj. Seria B nr 1'/2006. Edited by Institute of Nuclear Chemistry and Technology, Warszawa, 26 p., 2006.

EC, 1982. Council Directive 82/711/EEC laying down the basic rules necessary for testing migration of the constituents of plastic materials and articles intended to come into contact with foodstuffs. *Official Journal of the European Communities*. L372/16.

EC, 1985. Council Directive 85/572/EEC laying down the list of simulants to be used for testing migration of constituents of plastic materials and articles intended to come into contact with foodstuffs. *Official Journal of the European Communities*. L372/16.

EC, 1999(a). Commission Directive 1999/2/CE on the approximation of the laws of the Member States concerning foods and food ingredients treated with ionising radiation. *Official Journal of the European Communities*. Available from: http://ec.europa.eu/food/fs/sfp/fi02_en.pdf#search=%22Directive%201999%2F2%2FEC%22.

EC, 1999(b). Commission Directive 1999/3/EC on the establishment of a Community list of foods and food ingredients treated with ionising radiation. *Official Journal of the European Communities*. Available from: http://ec.europa.eu/food/fs/sfp/fi03_en.pdf.

EC, 2002. Commission Directive 2002/72/EC relating to plastics materials and articles intended to come into contact with foodstuffs. *Official Journal of the European Communities*, L220, 18-58.

- EC, 2004. Joint Research Centre. Specific Migration Methods. Determination of Caprolactam in Food Simulants. Available from: <http://cpf.jrc.it/smt/monomers/downloads/pm14200.pdf>.
- FDA, 2005. US Code of Federal Regulations. Packaging materials for use during the irradiation of prepackaged food. 21CFR 179.45. Available from: <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?fr=179.45&SearchTerm=irradiation>.
- FÉLIX, J. S.; PADULA, M.; MANZOLI, J. E.; MONTEIRO, M., 2006, Desenvolvimento e validação de método analítico para determinação de ϵ -caprolactama em simulante de alimentos gordurosos. *Alimentos e Nutrição*, **17**, 329-335.
- FÉLIX, J. S.; PADULA, M.; MANZOLI, J. E.; MONTEIRO, M., 2007, Migração de ϵ -caprolactama de embalagens contendo poliamida 6 para simulante ácido acético 3% e validação do método analítico. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, **27**, 27-32.
- FÉLIX, J. S.; MONTEIRO, M.; MANZOLI, J. E.; PADULA, M.; PEZO, D.; ROMERO, J.; NERÍN, C., 2008, Identification and migration of degradation compounds from irradiation of multilayer polyamide 6 films for meat foodstuffs and cheese. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. DOI 10.1007/s00216-008-1893-3. Available on line: <http://www.springerlink.com/content/e666100588515j55/fulltext.pdf>.
- GRAMSHAW, J. W. and SOTO-VALDEZ, H., 1998, Migration from polyamide 'microwave and roasting bags' into roast chicken. *Food Additives and Contaminants*, **15**, 329-335.
- IAEA, 2002. TRS-409, Dosimetry for food irradiation. International Atomic Energy Agency, Vienna, Technical report series, ISSN 0074-1914; no.409.
- ITO, R.; SESHIMO, F.; HAISHIMA, Y.; HASEGAWA, C.; et al., 2005, Reducing the migration of di-2-ethylhexyl phthalate from polyvinyl chloride medical devices. *International Journal of Pharmaceutical*, **3003**, 104-112.
- JEON, D. H.; PARK, G. Y.; KWAK, I. S.; LEE, K. H.; PARK, H. J., 2007, Antioxidants and their migration into food simulants on irradiated LLDPE film. *LWT - Food Science and Technology*, **40**, 151-156.
- MONTEIRO, M.; NERÍN, C and REYES, F. G. R., 1999, Migration of Tinuvin P, as a UV stabilizer, from PET bottles into fatty-food simulants. *Packaging Technology and Science*, **12**, 241-248.
- PARK, G.Y.; CHO, S.Y.; JEON, D.H.; KWAK, I.S.; LEE, K.H.; PARK, H.J., 2006, Formation of monomer residues in PS, PC, PA-6 and PVC upon γ -irradiation. *Radiation Physics and Chemistry*, **75**, 1055-1059.

SARANTÓPOULOS, C. I. G. L.; OLIVEIRA, L. M.; CANAVESI, E. *Requisitos de conservação de alimentos em embalagens flexíveis*. Campinas: CETEA/ITAL, 2001. p.151-171; 175-182.

SARANTÓPOULOS, C. I. G. L.; OLIVEIRA, M.L.; COLTRO, L.; VERCELINO, A. R. M.; CORRÊA, G. E. E. *Embalagens plásticas flexíveis: principais polímeros e avaliação de propriedades*. Campinas: CETEA/ITAL, 2002. p.24-27.

SOTO-VALDEZ, H.; GRAMSHAW, J. W. and VANDERBURG, H. J., 1997, Determination of potencial migrants present in Nylon 'microwave and roasting bags' and migration into olive oil. *Food Additives and Contaminants*, **14**, 309-318.

STOFFERS, N. H.; LINSSEN, J., P., H.; FRANZ, R. and WELLE, F., 2004, Migration and sensory evaluation of irradiated polymers. *Radiation Physics and Chemistry*, **71**, 203-206.

STOFFERS, N. H.; DEKKER M.; LINSSEN, J. P. H.; STÖMER A.; FRANZ, R. and VAN BOEKEL, M. A. J. S., 2005, Modelling of simultaneous two-sided migration into water and olive oil from nylon food packaging. *European Food Research Technology*, **220**, 156-162.

WELLE, F.; MAUER, A. and FRANZ, R., 2002, Migration and sensory changes of packaging materials caused by ionising radiation. *Radiation Physics and Chemistry*, **63**, 841-844.

YAGOUBI, N.; BAILLET, A.; PELLERIN, F. and FERRIER, D., 1995, Physico-chemical behaviour of β irradiated plastic materials currently used as packaging and medical products. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B*, **105**, 340-344.

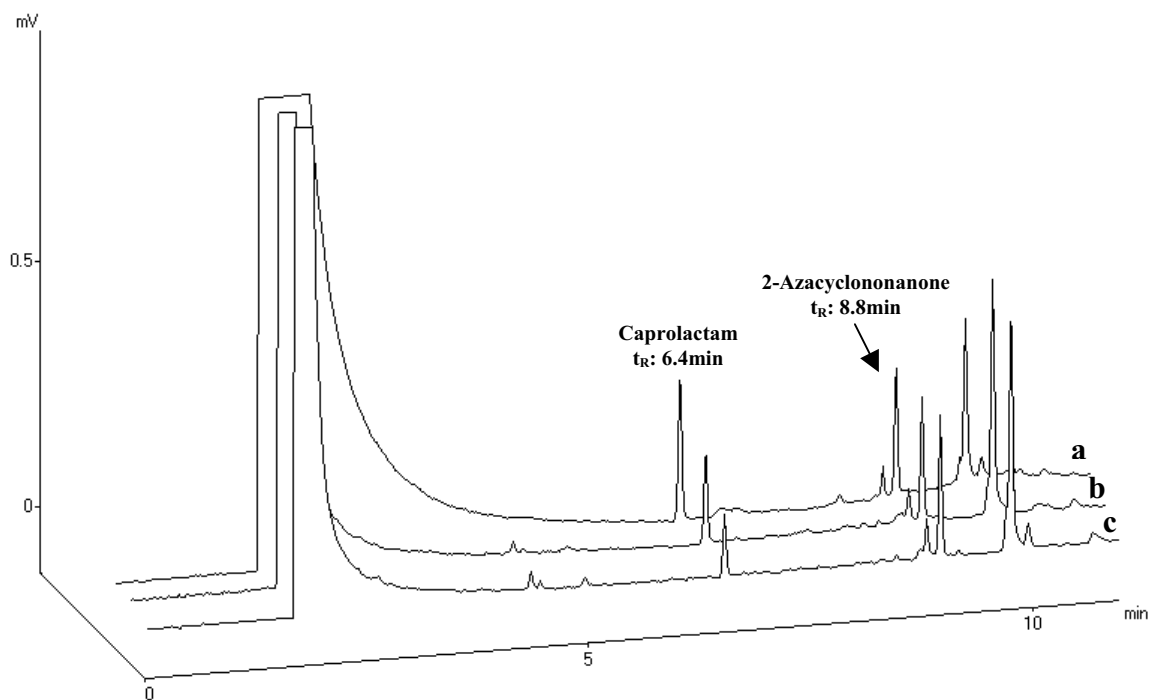


Figure 1. Typical chromatograms for caprolactam migration from irradiated and non-irradiated multilayer PA-6 films (brand 2), used for meat foodstuffs, into olive oil, using GC-FID. (a) Non-irradiated; (b) irradiated at 3 kGy and (c) irradiated at 7 kGy. Conditions: Column temperature was held for 1 min at 130°C, programmed at 10°C/min to 170°C and held for 1 min, and then programmed at 10°C/min to 200°C and held for 2 min. Carrier gas: Hydrogen (1mL/min). Injections (1 μ L) were performed at 240°C in split mode (1:20). The detector temperature was 250°C.

Table 1

Migration levels (mg kg^{-1}) of caprolactam from irradiated and non-irradiated multilayer PA-6 films, used for meat foodstuffs, into water, 3% acetic acid, 15% ethanol and olive oil food simulants (10 days at 40°C).

Brand	Dose (kGy)		
	0	3	7
<i>Water food simulant</i>			
1	6.12 \pm 0.30 (4.84)bA	5.51 \pm 0.24 (4.35)bB	3.93 \pm 0.03 (0.67)bC
2	7.17 \pm 0.41 (5.69)aA	5.81 \pm 0.36 (6.22)bB	3.93 \pm 0.07 (1.86)bC
3	6.91 \pm 0.37 (5.38)aA	6.53 \pm 0.50 (7.67)aA	4.44 \pm 0.26 (5.82)aB
4	5.72 \pm 0.37 (6.51)bA	4.80 \pm 0.31 (6.53)cB	3.62 \pm 0.08 (2.22)cC
<i>3% Acetic acid simulant</i>			
1	9.49 \pm 0.33 (3.51)aA	6.97 \pm 0.19 (2.79)cB	5.06 \pm 0.13 (2.57)cC
2	10.46 \pm 0.65 (6.19)aA	8.15 \pm 0.21 (2.58)bB	6.02 \pm 0.21 (3.48)aC
3	9.90 \pm 0.50 (5.04)aA	9.04 \pm 0.30 (3.33)aA	5.50 \pm 0.18 (3.25)bB
4	8.57 \pm 0.25 (2.97)bA	6.44 \pm 0.31 (4.75)dB	4.17 \pm 0.17 (4.03)dC
<i>15% Ethanol simulant</i>			
1	8.71 \pm 0.49 (5.61)bA	6.60 \pm 0.23 (3.47)bB	4.77 \pm 0.17 (3.67)bC
2	10.04 \pm 0.52 (5.14)aA	6.73 \pm 0.70 (10.43)bB	4.83 \pm 0.12 (2.47)abC
3	10.17 \pm 0.29 (2.84)aA	8.69 \pm 0.15 (1.74)aB	5.06 \pm 0.09 (1.77)aC
4	8.40 \pm 0.19 (2.22)bA	6.93 \pm 0.20 (2.82)bB	4.00 \pm 0.16 (4.05)cC
<i>Olive oil simulant</i>			
1	7.09 \pm 0.32 (2.31)cA	6.80 \pm 0.58 (8.53)bB	4.47 \pm 0.07 (1.64)bC
2	11.31 \pm 0.68 (6.01)abA	7.51 \pm 0.97 (12.87)bB	4.26 \pm 0.30 (7.05)bcC
3	11.89 \pm 0.77 (6.44)aA	10.60 \pm 1.21 (11.42)aA	5.48 \pm 0.07 (1.34)aB
4	10.79 \pm 0.23 (2.13)bA	6.68 \pm 0.46 (6.96)bB	4.16 \pm 0.09 (2.12)cC

Mean of six replicates of the found value \pm standard deviation (SD); RSD, relative standard deviation (%) in parenthesis. Values within a vertical column followed by different letters are significantly different ($p \leq 0.05$). Values within a horizontal line followed by different capital letters are significantly different ($p \leq 0.05$).

Table 2

Migration levels (mg kg^{-1}) of caprolactam from irradiated and non-irradiated multilayer PA-6 films, used for cheese, into water, 3% acetic acid, 15% ethanol and olive oil food simulants (10 days at 40°C).

Brand	Dose (kGy)	
	0	12
<i>Water food simulants</i>		
5	4.76 ± 0.08 (1.61)bA	4.82 ± 0.13 (2.68)cA
6	5.43 ± 0.37 (6.81)aB	6.76 ± 0.05 (0.77)aA
7	4.80 ± 0.27 (5.54)bB	5.92 ± 0.13 (2.14) bA
8	1.03 ± 0.08 (7.37)c	ND
9	ND	ND
<i>3% Acetic acid simulant</i>		
5	6.92 ± 0.45 (6.52)bA	6.99 ± 0.29 (4.16)bA
6	7.59 ± 0.33 (4.34)aA	7.73 ± 0.22 (2.89)aA
7	7.01 ± 0.30 (4.25)abA	6.46 ± 0.11 (1.71)cB
8	<LOQ	ND
9	ND	ND
<i>15% Ethanol simulant</i>		
5	6.70 ± 0.28 (4.23)bA	5.97 ± 0.14 (2.35)cB
6	7.30 ± 0.30 (4.11)aB	7.90 ± 0.26 (3.35)aA
7	6.48 ± 0.29 (4.41)bA	6.40 ± 0.19 (2.92)bA
8	1.05 ± 0.04 (3.61)c	<LOQ
9	<LOQ	ND
<i>Olive oil simulant</i>		
5	4.97 ± 0.11 (2.15)aB	7.54 ± 0.27 (3.64)aA
6	4.08 ± 0.06 (1.40)bB	6.63 ± 1.22 (18.46)aA
7	2.89 ± 0.05 (1.78)cB	4.02 ± 0.71 (17.58)bA
8	1.38 ± 0.08 (6.06)d	<LOQ
9	ND	ND

Mean of six replicates of the found value ± standard deviation (SD); RSD, relative standard deviation (%) in parenthesis. Values within a vertical column followed by different letters are significantly different ($p \leq 0.05$). Values within a horizontal line followed by different capital letters are significantly different ($p \leq 0.05$). ND, not detected; LOQ: Limit of quantification.

CAPÍTULO 6

IDENTIFICATION AND MIGRATION OF DEGRADATION COMPOUNDS FROM IRRADIATION OF MULTILAYER POLYAMIDE 6 FILMS FOR MEAT FOODSTUFFS AND CHEESE

Trabalho publicado na revista Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2008
Disponível em: <http://www.springerlink.com/content/e666100588515j55/fulltext.pdf>

DOI 10.1007/s00216-008-1893-3

Identification and migration of degradation compounds from irradiation of multilayer polyamide 6 films for meat foodstuffs and cheese

J. S. Félix · M. Monteiro · J. E. Manzoli · M. Padula ·
D. Pezo · J. Romero · C. Nerin

Received: 5 November 2007 / Revised: 10 January 2008 / Accepted: 17 January 2008
© Springer-Verlag 2008

Abstract The aim of this work was to identify the degradation compounds produced during irradiation of multilayer polyamide 6 (PA-6) films and to study their migration into water and 95% ethanol food simulant. After irradiation of multilayer PA-6 films at 3, 7 and 12 kGy, degradation compounds were extracted using solid-phase microextraction, for which the time and temperature of extraction and stirring were optimized, and identified by gas chromatography–mass spectrometry. Caprolactam, 2-cyclopentylcyclopentanone and aldehydes, among other compounds, were identified in the headspace of the films. Polydimethylsiloxane was considered the best fiber for extraction. The optimum conditions of time, temperature and stirring to extract the compounds were 20 min, 80 °C and 225 rpm. For validation purposes, the compounds were

quantified in water and 95% ethanol and the results showed high sensitivity, good precision and accuracy. Migration of compounds from irradiated and non-irradiated multilayer PA-6 films into water and 95% ethanol food simulants was carried out at 40 °C for 10 days. The method was efficient for the quantification of decaldehyde, 2-cyclopentylcyclopentanone and caprolactam that migrated from multilayer PA-6 films into food simulants.

Keywords Degradation compounds · γ radiation · Polyamide 6 · Migration · Solid-phase microextraction · Gas chromatography–mass spectrometry

Introduction

Food irradiation as an alternative to thermal and chemical preservation methods has the advantages that it can be used for prepackaged foodstuffs and allows the use of different packaging materials, especially plastic packaging. Besides the benefits conferred to foods, irradiation of polymers can produce degradation compounds of low molecular mass (radiolysis products) and can affect mechanical, thermal and barrier properties as well as the migration behavior [1–5]. Among other low molecular mass compounds, degradation compounds, monomers, additives and oligomers have the potential to migrate from packaging into food in contact with it [6–8].

Only a few works have showed the effect of irradiation on migration of compounds from plastic packaging into food [3, 9–14]. Migration levels of some additives from plastic packaging were reduced after irradiation depending on the doses and the polymer [3, 9, 10]. Irradiated polyamide (PA) films used as food and pharmaceutical packaging showed no change in the volatile compound levels when compared with non-irradiated films [10]. Also,

J. S. Félix · M. Monteiro (✉)
Department of Food and Nutrition,
School of Pharmaceutical Science, São Paulo State University,
P.O. Box 502, 14801-902 Araraquara, SP, Brazil
e-mail: monteiro@fcfar.unesp.br

J. E. Manzoli
Nuclear and Energetic Research Institute (IPEN),
05508-000 São Paulo, SP, Brazil

M. Padula
Packaging Technology Center,
Food Technology Institute (CETEA/ITAL),
13073-001 Campinas, SP, Brazil

D. Pezo · J. Romero · C. Nerin (✉)
Department of Analytical Chemistry,
Aragon Institute of Engineering Research I3A,
CPS-University of Zaragoza,
Torres Quevedo Bldg., María de Luna St. 3,
50018 Zaragoza, Spain
e-mail: cnerin@unizar.es

caprolactam levels increased more than twofold in PA-6 films irradiated at 5 kGy and remained almost the same with doses from 5 to 200 kGy [14]. Aminocaproic acid was produced after irradiation of food packaging PA-6 films (25, 50 and 100 kGy), but no changes were observed in caprolactam levels. Moreover formamide, acetamide, propanamide, butanamide, pentanamide and hexanamide were also formed, among which pentanamide was the main radiolysis product [11–13]. Besides C₉ and C₁₀ aliphatic hydrocarbons, other volatile compounds were formed during irradiation of PA-6 and PA-12 films [3].

Solid-phase microextraction (SPME) is a very efficient technique to extract volatile compounds from a wide range of matrixes, including polymers. Headspace (HS)-SPME combined with gas chromatography (GC)-flame ionization detection (FID) or GC-mass spectrometry (MS) was used to separate and identify volatile compounds from PA-66 [15–17] and polystyrene [18, 19] and to determine compounds migrating from poly(vinyl chloride) into aqueous solutions [20]. Butylated hydroxytoluene (BHT) in bottled water was analyzed using HS-SPME and direct SPME combined with GC-MS [21]. Impurities in industrial caprolactam produced from toluene were determined by SPME and GC-MS [22]. Identification and quantification of low molecular mass degradation products of antioxidants which migrated from polypropylene into 10% ethanol was carried out using SPME [23]. HS-SPME-GC-MS was also able to identify low molecular mass degradation products as hindered phenol antioxidants, cyclic imides, pyridines, chain fragments and cyclopentanones from virgin and recycled thermo-oxidized PA-66, besides migration of brominated benzenes from recycled PA-66 [24].

The aim of this work was to identify volatile compounds produced from irradiation of multilayer PA-6 films used as food packaging, especially for meat foodstuffs and cheese, and to study their migration from the packaging into food simulants.

Experimental

Chemicals and samples

Analytical standards of acetamide, propanamide, hexanamide, caprolactam, octaldehyde, decaldehyde, 1-phenylcyclohexene, diphenyl ether, tributyl phosphate (TBP), caprylic ether and BHT were from Sigma-Aldrich (Sreenheim, Germany), formamide, nonaldehyde and copaene were from Fluka (Buchs, Switzerland), pentanamide and 2-cyclopentylcyclopentanone were from Alfa Aesar (Karlsruhe, Germany) and butanamide was from Merck (Darmstadt, Germany), all of them higher than 95% purity. Stock solutions of the analytical standards were prepared in tetrahydrofuran (Merck, Darmstadt, Ger-

many) and were stored at 4 °C. Working solutions were prepared by dilution in water food simulant or 95% ethanol food simulant as necessary.

Commercially available multilayer PA-6 films were supplied by the Brazilian producing companies, two brands used for meat foodstuffs and one brand used for cheese, named M1, M2 and M3, respectively.

Irradiation

Multilayer PA-6 films were irradiated in the Radiation Technology Center (CTR) of the Nuclear and Energetic Research Institute (IPEN), Brazil, using a Gamacell 60 cobalt irradiator of 12 kCi. Multilayer PA-6 films (2×3 and 10×10 cm²) were placed in hermetically closed glass vials (20 mL) and subjected to 3 and 7 kGy (meat foodstuffs) and 12 kGy (cheese) [25].

Identification

Polydimethylsiloxane (PDMS), PDMS-divinylbenzene (PDMS/DVB) and Carbowax-DVB (CW/DVB) coated SPME fibers (Supelco, Bellefonte, PA, USA) with 100-, 65- and 65- μ m thicknesses, respectively, were used in a qualitative previous screening. The fibers were exposed for 20 min at 25 °C to the HS of the vials containing irradiated and non-irradiated film samples. Desorption was carried out in the gas chromatograph injection port for 10 min. An HP 5890 gas chromatograph (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) coupled to a 5971-A MS detector was used. An HP-5MS (30 m×0.25 mm×0.25 μ m) capillary column was utilized at 80 °C for 2 min, programmed at 20 °C/min up to 195 °C for 1 min, then heated to 320 °C at 10 °C/min and held for 2 min. Helium was the carrier gas (1.0 mL/min). Splitless mode (1 min) was used, and the injection and detection temperatures were 240 and 280 °C, respectively. The mass spectrometer was operated in electron impact mode (70 eV) and the masses were scanned over an m/z range of 45–400 amu. Compounds were identified by matching their mass spectra with the US National Institute of Standards and Technology (Gaithersburg, MD, USA) commercial library (purity criterion more than 85%). Retention time and fragmentation spectra of pure standards were obtained for confirmation.

SPME optimization

Among the parameters that can affect the extraction process, stirring, temperature and time of extraction were evaluated using PDMS fiber. The software MODDE 6.0 from Umetrics (Umeå, Sweden) was used to design the experiment and to perform the optimization. A factorial design (2³) consisting of eight experiments plus four repetitions of center point was

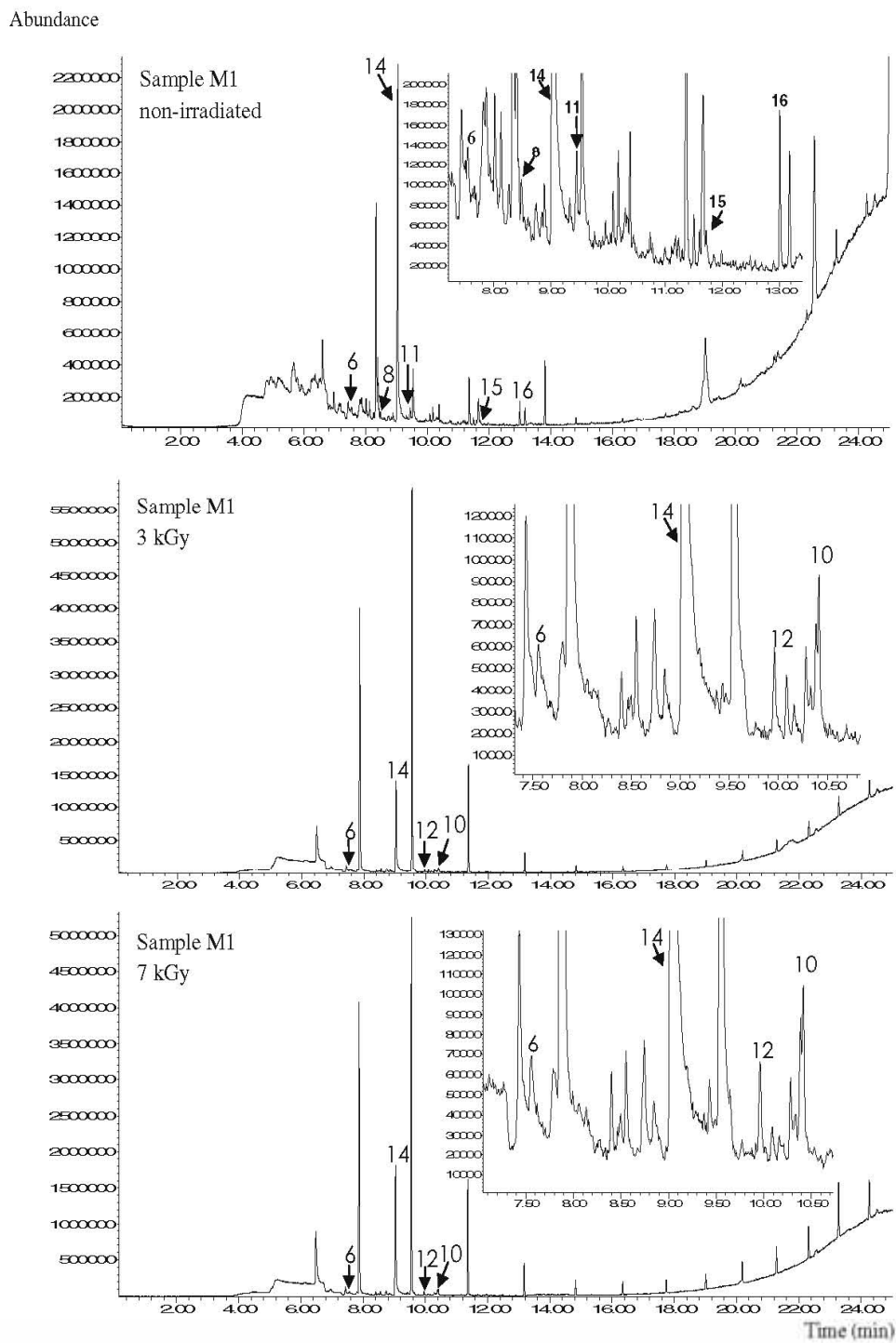


Fig. 1 Chromatograms obtained by headspace solid-phase microextraction (SPME)-gas chromatography-mass spectrometry, using polydimethylsiloxane fiber, from multilayer polyamide 6 films (sample M1) after irradiation with 0, 3 and 7 kGy. Numbered peaks are identified in Table 2

Table 1 Compounds identified in irradiated and non-irradiated multilayer polyamide 6 (PA-6) film samples, using headspace solid-phase microextraction (SPME) and gas chromatography–mass spectrometry (GC-MS)

Samples	Irradiation doses (kGy)	Compounds										
		Octaldehyde	Nonaldehyde	Decaldehyde	Copaene	4-Phenylcyclohexene	2-Cyclopentylcyclopentanone	Diphenyl ether	BHT	TBP	Caprylic ether	Caprolactam
M1	0	–	1	1	–	–	1, 2, 3	–	1, 2, 3	1, 2, 3	–	1, 2, 3
	3	–	1, 3	3	1, 2, 3	–	1, 2, 3	–	–	–	–	1, 2, 3
	7	–	1, 3	3	1, 2, 3	–	1, 2, 3	–	–	–	–	1, 2, 3
M2	0	–	1, 2, 3	1, 2, 3	–	–	2, 3	–	1, 2, 3	–	2, 3	1, 2, 3
	3	–	1	1	1, 2, 3	–	1, 2, 3	–	–	–	–	1, 2, 3
	7	–	3	3	1, 2, 3	–	1, 2, 3	–	–	–	–	1, 2, 3
M3	0	–	1, 3	1, 2, 3	–	–	1, 2, 3	–	–	1, 2, 3	1, 2, 3	1, 2, 3
	12	3	1, 3	3	1, 2, 3	–	1, 2, 3	–	–	–	–	1, 2, 3

Fibers: PDMS (1); PDMS/DVB (2); CW/DVB (3)

BHT: Butylated hydroxytoluene; TBP: Tributyl phosphate

used, totalizing 12 experiments. Time (2–20 min) and temperature of extraction (25–80 °C) and stirring (100–350 rpm) were evaluated. The sum of the chromatographic peak areas of the 17 compounds studied and also the maximization of individual areas for each one were the optimization criteria adopted.

A standard solution containing 17 compounds was prepared in aqueous medium. They were extracted by immersion of PDMS fiber and then desorbed at the injection port of a Finnigan Focus gas chromatograph (Thermo Electron) equipped with an AS 3000 autosampler and a flame ionization detector. An SGV-1701 (60 m×0.25 mm×0.25 μm) capillary column was used. The column temperature was held at 40 °C for 1 min, then programmed at 10 °C/min to 195 °C for 1 min and finally heated at 10 °C/min up to 250 °C for 1 min. Helium was the carrier gas at a flow rate of 1.5 mL/min. The injection and detection temperatures were 240 and 280 °C, respectively. Splitless mode (1 min) was used.



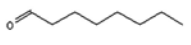


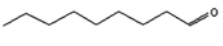
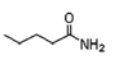
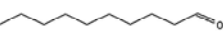
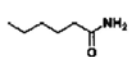



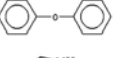


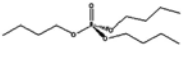
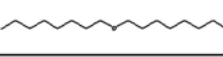
Validation

Linear range, precision, detection and quantification limits and accuracy were evaluated following the protocols reported in the literature [26–28]. Standard stock solutions containing 17 compounds were prepared in tetrahydrofuran and then diluted, as necessary, in water (ultrapure) and 95% ethanol, used as food simulants. These water standard solutions were subjected to SPME by immersion using a CTC-CombiPAL system coupled to an Agilent 6890N gas chromatograph equipped with an Agilent 5975B MS detector. An HP-5MS (30 m×0.25 mm×0.25 μm) capillary column was used, operated at 40 °C for 4 min, programmed at 10 °C/min up to 195 °C for 1 min, then heated to 250 °C at 10 °C/min and held for 1 min. The injection (splitless) and detection temperatures were 240 and 280 °C, respectively. Helium was the carrier gas at a flow rate of 1 mL/min. It was used for both scan (45–350 amu) and selected-ion monitoring (SIM) modes. Standard solutions of 95% ethanol were injected (1 μL) into the same GC system as described above. The same column was utilized at 50 °C for 4 min, programmed at 30 °C/min up to 80 °C for 1 min, and then heated to 250 °C for 1 min at 10 °C/min. The injection and detection temperatures were 250 and 280 °C, respectively. The same carrier gas was used at a flow rate of 1.5 mL/min, and the scan mode was the same as described in “Identification.” The SIM mode was also applied.

Migration

For the migration assay, pieces of irradiated and non-irradiated films (2×3 cm²) were, independently, placed in contact with water (15 mL) and 95% ethanol (15 mL) food simulants, inside glass vials which were hermetically

Table 2 Peak areas of water standard solution compounds extracted by different SPME fibers and analyzed by gas chromatography–flame ionization detection, and chemical structures of the substances

Compound	Chemical structure	Concentration ($\mu\text{g/g}$)	Peak area (mV)*		
			PDMS	CW/DVB	PDMS/DVB
Formamide (1)		34.8	ND	ND	ND
Acetamide (2)		66.7	ND	ND	ND
Octaldehyde (3)		24.4	60597540	12584860	48794340
Propanamide (4)		29.0	ND	ND	ND
Butanamide (5)		28.7	ND	ND	ND
Nonaldehyde (6)		25.6	111351100	42865650	93621740
Pentanamide (7)		26.8	ND	ND	ND
Decaldehyde (8)		25.8	108529800	50710090	80330860
Hexanamide (9)		24.4	ND	ND	ND
Copaene (10)		10.3	9130343	6247197	6311322
2-Cyclopentylcyclopentanone (11)		26.3	78138400	32167370	79202210
1-Phenylcyclohexene (12)		26.9	108549400	60057300	75222740
Diphenyl ether (13)		24.9	136650700	68711680	106518400
Caprolactam (14)		23.7	ND	ND	ND
Butylated hydroxytoluene (15)		38.2	72953500	37410030	46408510
Tributyl phosphate (16)		29.1	101691100	36616090	95223550
Caprylic ether (17)		31.3	3729200	3402816	3824276

ND, not detected

*n=1

capped. These vials were stored in an oven thermostatically maintained at 40 ± 1 °C for 10 days. Samples were analyzed in triplicate for each radiation dose. A blank prepared with non-irradiated PA-6 films in the simulant and another only with simulant were used as references, and were exposed and analyzed under the same conditions. After contact, film samples were removed and then the compounds that migrated into water were analyzed using SPME-GC-MS, while those that migrated into 95% ethanol were analyzed by GC-MS, using the same conditions described in "Validation." All migration tests were carried out by total immersion. Water simulant is generally used to simulate

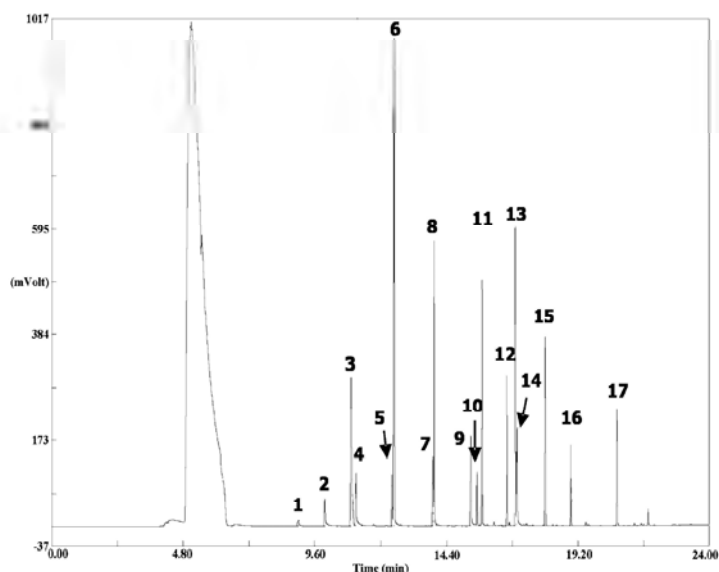
aqueous food and 95% ethanol is an alternative fatty-food simulant, used as a substitute for olive oil [29–31].

Results and discussion

Identification

After all the fibers had been exposed to the HS of the irradiated and non-irradiated multilayer PA-6 films for 20 min at 25 °C, the desorption was carried out in the injection port of the GC-MS system. The compounds identified are shown

Fig. 2 Chromatogram obtained for the 17 compounds shown in Table 2, using polydimethylsiloxane fiber and gas chromatography-flame ionization detection



in Fig. 1 and Table 1. Figure 1 also shows the chromatograms of compounds extracted from multilayer PA-6 by PDMS and analyzed by GC-MS after irradiation with 0, 3 and 7 kGy. All the analyses were carried out in duplicate.

As can be seen from Table 1, nonaldehyde and decaldehyde were identified in all film samples, mainly when PDMS and CW/DVB fibers were used. Furthermore, decaldehyde showed a higher peak area than nonaldehyde for non-irradiated film samples. Octaldehyde was detected only in the irradiated M3 sample. Caprolactam showed the same behavior as decaldehyde and it was extracted by the three different fibers. Copaene and 4-phenylcyclohexene were extracted by all the fibers and was found only in irradiated films. On the other hand, 2-cyclopentylcyclopentanone, diphenyl ether, BHT, TBP and caprylic ether were identified only in non-irradiated film samples and were extracted by all fibers, with exception of caprylic ether, which was extracted only by PDMS/DVB and CW/DVB fibers.

The results indicated that caprolactam, 2-cyclopentylcyclopentanone, copaene, 4-phenylcyclohexene, diphenyl

ether, BHT, TBP and caprylic ether could be used as irradiation markers. Copaene and 4-phenylcyclohexene could be considered as irradiation markers as they appeared only in irradiated film samples. In contrast, 2-cyclopentylcyclopentanone, diphenyl ether, BHT, TBP and caprylic ether appeared only in non-irradiated film samples. Caprolactam was found in both films, with a higher proportion in non-irradiated film samples.

In addition to the 11 compounds identified in the screening step, six amides were included as they were described as the main radiolysis products from irradiated PA-6 films [12, 13].

In the screening step it was not possible to choose which fiber showed the best extraction performance, making it necessary to carry out another experiment to select the fiber for the extraction process. To achieve this goal, all the SPME fibers were immersed in a water standard solution containing 17 compounds at 80 °C for 20 min and analyzed using GC-FID. The peak areas obtained for each fiber are shown in Table 2 as well as the chemical structures of the compounds studied.

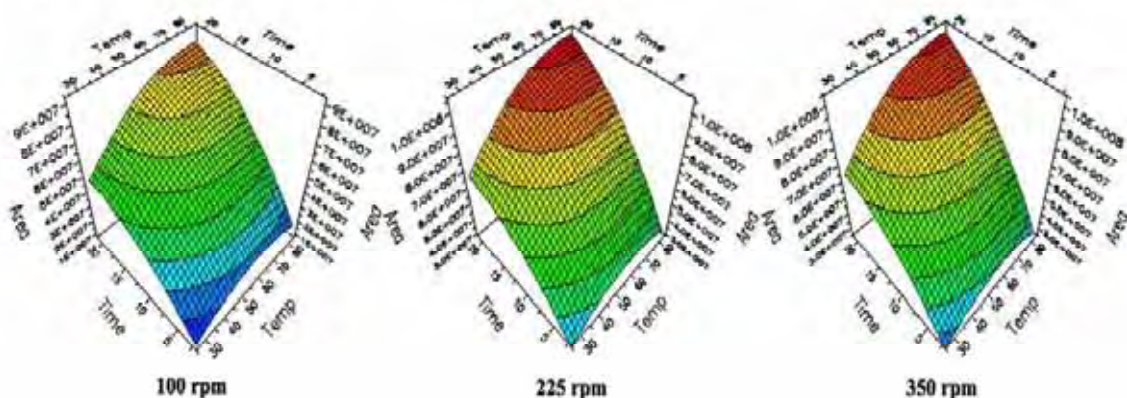


Fig. 3 Response surface methodology (RSM) total area graphics obtained from SPME optimization of 17 compounds shown in Fig. 2

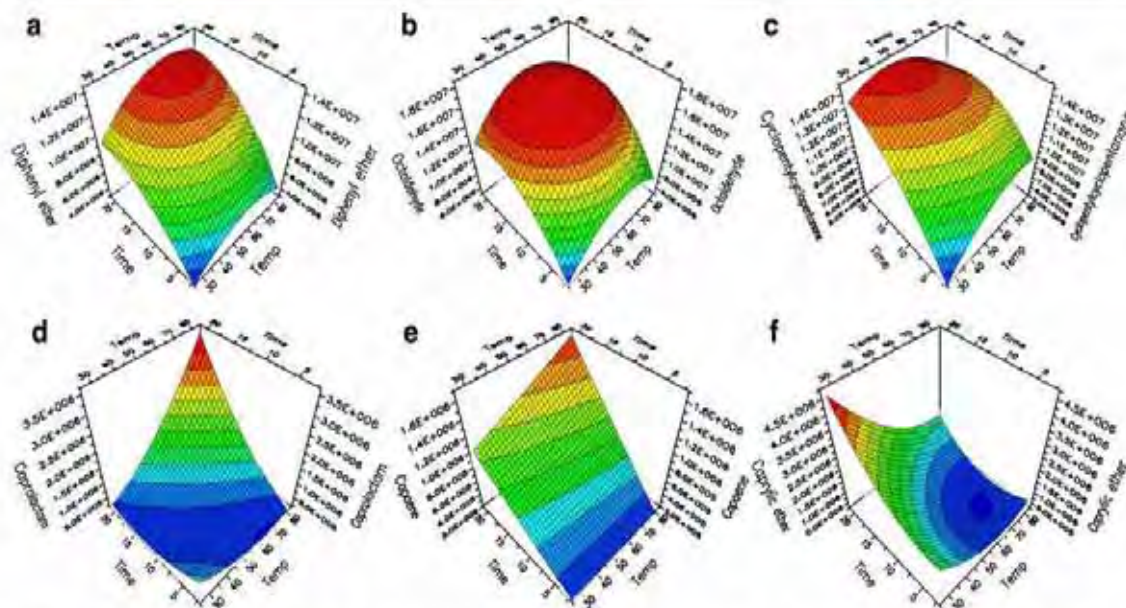


Fig. 4 RSM graphics obtained from SPME optimization for a diphenyl ether, b octanal, c 2-cyclopentylcyclopentanone, d caprolactam, e coprene and f caprylic ether at 225 rpm

As can be seen from Table 2, PDMS fiber showed higher peak area for most of the compounds when compared with PDMS/DVB and CW/DVB fibers, although the amides were not extracted under the conditions studied. On the basis of these results, PDMS was chosen to be used in the optimization step owing to its better fiber performance. Figure 2 shows the chromatogram obtained for the 17 compounds, shown in Table 2, which were extracted by PDMS and analyzed by GC-FID. It should be mentioned that all of them were extracted by PDMS, including the amides, because of the high concentrations used in this case.

Optimization

Response surface methodology (RSM) graphics obtained using MODDE indicated the extraction conditions to achieve the highest amount of compounds, expressed as total area. The highest peak areas were obtained when the extraction temperature was 80 °C, the extraction time was 20 min and stirring was at 225 rpm (Fig. 3).

Typical RSM graphics for individual compounds, caprolactam, octaldehyde, 2-cyclopentylcyclopentanone, diphenyl ether, caprylic ether and coprene, when 225 rpm was used, are shown in Fig. 4. Among 11 compounds identified in irradiated and non-irradiated multilayer PA-6 films, six (nonaldehyde, decaldehyde, 1-phenylcyclohexene, diphenyl ether, BHT and TBP) showed exactly the same behavior when 225 rpm was used. All of them showed the highest peak areas between 13.5 and 20 min and 45 and 80 °C (Fig. 4a), whereas octaldehyde showed the widest response

range for time (7–20 min) and temperature (30–80 °C) when compared with the other compounds (Fig. 4b). 2-Cyclopentylcyclopentanone revealed the highest peak area between 14 and 20 min and 30 and 60 °C (Fig. 4c). All the amides showed the same behavior as caprolactam, with the highest peak area between 18.5 and 20 min and 79.5 and 80 °C (Fig. 4d). Similar results were observed for coprene (18–20 min, 66–80 °C) (Fig. 4e). Only caprylic ether showed clearly different behavior (19–20 min, 25–30 °C) (Fig. 4f).

Validation

A total time of 18 and 27 min was enough to separate all the 17 compounds in water and 95% ethanol food simulants, respectively. The characteristic ions 44 and 73 for propanamide, 44, 59 and 72 for butanamide, 57, 69 and 84 for octaldehyde, 44, 59 and 72 for pentanamide, 57, 70 and 98 for nonaldehyde, 59, 72 and 86 for hexanamide, 57, 70 and 82 for decaldehyde, 55, 84 and 113 for caprolactam, 55, 67 and 84 for 2-cyclopentylcyclopentanone, 105, 119 and 161 for coprene, 129 and 158 for 4-phenylcyclohexene, 141 and 170 for diphenyl ether, 57, 205 and 220 for BHT, 99, 155 and 211 for TBP and 57, 71 and 84 for caprylic ether were chosen for quantitative studies. Tables 3 and 4 present the base peak (m/z) of each compound.

Regarding linearity, a wide linear range was obtained for all the compounds. Calibration curves showed correlation coefficients (r), for a linear regression model, from 0.9762 to 0.9999 for water food simulant and from 0.9831 to 0.9996 for 95% ethanol, indicating a strong positive linear correlation

Table 3 Validation parameters to determine the compounds studied in water food simulant by SPME-GC-MS

Compounds	t_R (min)	Base Peak (m/z)	Water Food Simulant		Linear Coefficient (r)	Detection Limit ($\mu\text{g.g}^{-1}$)	Quantification Limit ($\mu\text{g.g}^{-1}$)	Spiked Level ($\mu\text{g.g}^{-1}$)	Recovery ^a (%)	Precision ^a (%RSD)
			Linear Range ($\mu\text{g.g}^{-1}$)							
Propanamide	7.6	44	25.30 - 862.00		0.9961	1.52	5.07	118.8	83.9 \pm 7.7	7.8
Butanamide	9.7	59	13.18 - 893.94		0.9970	1.36	4.55	123.20	103.9 \pm 9.8	7.7
Octaldehyde	10.8	57	2.95E-04 - 3.66		0.9886	9.58E-06	3.19E-05	0.22	91.7 \pm 0.0	0.7
Pentanamide	11.7	59	9.52 - 646.13		0.9986	0.43	1.42	89.10	114.4 \pm 6.0	5.9
Nonaldehyde	12.7	57	1.06E-04 - 1.94		0.9898	1.18E-05	3.93E-05	0.13	83.6 \pm 0.0	4.5
Hexanamide	13.4	59	6.51 - 441.61		0.9975	0.12	0.39	60.90	123.4 \pm 3.9	5.1
Decaldehyde	14.3	57	2.09E-05 - 2.95		0.9999	2.63E-06	8.78E-06	0.02	106.0 \pm 0.0	8.0
Caprolactam	15.0	55	11.12 - 754.17		0.9965	0.61	2.02	104.00	132.3 \pm 8.2	5.9
2-Cyclopentylcyclopentanone	15.6	84	2.34E-04 - 4.27		0.9995	5.59E-05	1.86E-04	0.08	119.5 \pm 0.0	3.1
Copaene	16.9	119	8.84E-05 - 0.80		0.9991	9.03E-07	3.01E-06	0.04	105.7 \pm 0.0	5.9
1-Phenylcyclohexene	17.1	129	7.25E-05 - 0.66		0.9872	1.24E-05	4.14E-05	0.20	104.1 \pm 0.0	7.3
Diphenyl ether	17.2	170	6.58E-05 - 2.59		0.9972	7.92E-06	2.64E-05	0.53	106.9 \pm 0.0	3.1
Butylated hydroxytoluene	18.6	205	3.93E-06 - 0.73		0.9970	1.76E-07	5.87E-07	0.04	120.9 \pm 0.0	8.1
Tributyl phosphate	20.1	99	1.02E-05 - 1.59		0.9987	2.40E-06	7.99E-06	0.37	106.9 \pm 0.1	14.7
Caprylic ether	20.3	57	1.88E-05 - 0.29		0.9898	4.32E-07	1.44E-06	0.02	90.7 \pm 0.0	7.8

^a Mean of 6 replicates Recovery (%) \pm SD

Table 4 Validation parameters to determine the compounds studied in 95% ethanol by GC-MS

Compounds	t _R (min)	Base Peak (m/z)	95% Ethanol Food Simulant	Linear Range (µg.g ⁻¹)	Linear Coefficient (r)	Detection Limit (µg.g ⁻¹)	Quantification Limit (µg.g ⁻¹)	Spiked Level (µg.g ⁻¹)	Recovery ^a (%)	Precision ^a (%RSD)
Propanamide	5.2	44	3.30 - 259.84	0.9996	0.01	0.04	4.08	97.8±0.2	4.7	
Butanamide	6.3	59	3.42 - 306.80	0.9939	0.01	0.02	4.23	97.3±0.3	6.3	
Octaldehyde	7.0	57	0.48 - 456.72	0.9995	0.12	0.40	7.11	121.2±0.7	8.3	
Pentanamide	7.7	59	2.47 - 221.75	0.9995	0.01	0.02	3.06	86.4±0.1	5.2	
Nonaldehyde	8.5	57	0.25-242.34	0.9962	0.10	0.33	3.77	101.0±0.3	8.8	
Hexanamide	9.1	59	1.69 - 151.56	0.9971	0.03	0.11	23.94	131.9±1.5	4.7	
Decaldehyde	9.9	57	0.38 - 368.17	0.9886	0.11	0.38	7.44	91.9±0.5	7.1	
Caprolactam	10.6	55	2.89 - 258.83	0.9961	0.05	0.15	5.38	83.7±0.2	4.6	
2-Cyclopropenylcyclopentanone	11.1	84	0.17 - 2418.76	0.9978	0.03	0.09	48.91	116.0±6.2	10.8	
Copaene	12.3	119	0.10 - 99.42	0.9977	0.04	0.10	4.27	95.8±0.2	5.2	
1-Phenylcyclohexene	12.6	129	0.43 - 91.66	0.9977	0.07	0.23	1.85	97.5±0.1	6.4	
Diphenyl ether	12.6	170	0.50 - 478.47	0.9882	0.04	0.12	9.68	90.1±0.9	10.5	
Butylated hydroxytoluene	13.9	205	0.10 - 91.66	0.9831	0.03	0.11	1.43	112.4±0.1	8.0	
Tributyl phosphate	15.5	99	2.11 - 198.84	0.9973	0.13	0.43	8.54	108.7±0.5	5.0	
Caprylic ether	15.6	57	0.07 - 35.73	0.9864	0.04	0.12	0.76	100.3±0.0	4.0	

^a Mean of 6 replicates
Recovery (%) ± SD

Table 5 Levels of migration of compounds from irradiated and non-irradiated multilayer PA-6 films into water and 95% ethanol food simulants

Compounds	Migration levels ($\mu\text{g/g}$) ^a							
	M1			M2			M3	
	0 kGy	3 kGy	7 kGy	0 kGy	3 kGy	7 kGy	0 kGy	12 kGy
Decaldehyde (water simulant)	0.004±0.000	ND	ND	0.004±0.000	ND	ND	ND	ND
Caprolactam (water simulant)	12.96±2.31	ND	ND	10.22±0.02	ND	ND	7.52±1.88	ND
2-Cyclopentylcyclopentanone (water simulant)	0.02±0.00	ND	ND	0.01±0.00	ND	ND	0.01±0.00	ND
Caprolactam (ethanol 95% simulant)	9.43±1.01	6.11±0.06	6.42±2.14	10.01±0.00	8.88±0.75	8.99±0.25	7.68±0.01	6.97±0.12

ND, not detected.

^a Mean±SD value for two replicates, n=2.

between concentration and peak area. Sensitivity for amides in 95% ethanol food simulant was higher than in water food simulant. For all the other compounds, sensitivity showed the opposite behavior. Detection and quantification limits were 0.12–1.52 and 0.39–5.07 $\mu\text{g/g}$, respectively, for amides and were lower than 7.4×10^{-5} and 2.5×10^{-4} $\mu\text{g/g}$, respectively, for all the other compounds in water food simulants. For 95% ethanol detection limits were below 0.13 $\mu\text{g/g}$ and quantification limits were below 0.43 $\mu\text{g/g}$. Accuracy was studied during the precision assay and was expressed as a percentage for the true value of the analyte in the sample and the value obtained by analysis. For recovery, one concentration level of standard solution was added to the matrix. Recovery values were from 83.6 to 123.4%, with a maximum relative standard deviation (RSD) of 14.7% for water simulant (Table 3), and from 83.7 to 121.2%, with a maximum RSD of 10.8% for 95% ethanol simulant (Table 4). Exceptions were hexanamide and caprolactam, which showed a recovery of 131.9 and 132.3%, respectively. It should be mentioned that even when very low spiking levels were used, a high recovery was obtained.

The validation of the method to determine caprolactam from non-irradiated multilayer PA-6 films in 3% acetic acid food simulant also showed good precision (RSD \leq 4.3%) and accuracy (100–106% recovery) in a total time of 11 min [32], while olive oil food simulant showed a RSD of 3.8%, and a recovery of 88.6–112%, with the same time of analysis as 3% acetic acid [33].

Migration

The levels of compounds that migrated from irradiated and non-irradiated film samples into water and 95% ethanol food simulants are shown in Table 5.

Only three compounds migrated from irradiated and non-irradiated multilayer PA-6 film samples into water food simulant and one compound migrated into 95% ethanol

food simulant. Migration of decaldehyde occurred only from non-irradiated M1 and M2 film samples, at a very low level, into water food simulant. 2-Cyclopentylcyclopentanone also migrated only from non-irradiated film samples (M1, M2 and M3) into water food simulant. High levels of caprolactam migrated from non-irradiated film samples into water food simulant. Also, there were high migration levels of caprolactam into 95% ethanol from irradiated and non-irradiated multilayer PA-6 film samples (M1, M2 and M3). Besides, caprolactam levels reduced with the increase of radiation dose from 0 to 3 kGy, and stayed the same up to 7 kGy, for M1 and M2, while the caprolactam levels also reduced for M3 with increasing irradiation (Table 5). The migration level of caprolactam was in accordance with the limits established by European and Brazilian legislation (15 mg/kg) [29, 30]. The amount of caprolactam that migrated from non-irradiated multilayer PA-6 films into 3% acetic acid food simulant was 6.9–10.5 mg/kg [32], very similar to the levels obtained in this work.

Conclusions

PDMS was the best fiber for extraction of volatile compounds from irradiated and non-irradiated multilayer PA-6 films, with the highest peak area for most of the compounds. The best conditions of time, temperature and stirring to extract the compounds studied using SPME were 20 min, 80 °C and 225 rpm. The method was validated, showing high sensitivity, good precision and accuracy. It was considered very efficient for quantification of the compounds that migrated from multilayer PA-6 films into water and 95% ethanol food simulants. Decaldehyde and 2-cyclopentylcyclopentanone migrated from multilayer PA-6 film samples into water and caprolactam migrated into both food simulants.

Acknowledgements This work was supported by CAPES (Brazil) and the Government of Aragón to the GUIA Group.

References

- Chmielewski AG (2006) Packaging for food irradiation. Institute of Nuclear Chemistry and Technology, Warsaw
- Zygoura PD, Goulas AE, Riganakos KA, Kontominas MG (2007) *J Food Eng* 78(3):870–877
- Stoffers NH, Linssen JPH, Franz R, Welle F (2004) *Radiat Phys Chem* 71:203–206
- Welle F, Mauer A, Franz R (2002) *Radiat Phys Chem* 63:841–844
- Bureau G (1996) In: Bureau G, Multon JL (eds) Food packaging technology 2. VCH, New York
- Nerín C (2002) In: Catalá R, Gavara R (eds) Migración de componentes y residuos de envase en contacto con alimentos. Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, Valencia
- Monteiro M, Nerín C, Reyes FGR (1999) *Packag Technol Sci* 12:241–248
- Demertzis PG, Franz R, Welle F (1999) *Packag Technol Sci* 12:119–130
- Ito R, Seshimo F, Haishima Y, Hasegawa C et al (2005) *Int J Pharm* 3003:104–112
- Jeon DH, Park GY, Kwak IS, Lee KH, Park HJ (2006) *Lebensm Wiss Technol* 40(1):151–156
- Yagoubi N, Baillet A, Pellerin F, Ferrier D (1995) *Nucl Instrum Methods Phys Res B* 105:340–344
- Buchalla R, Boess C, Bögl KW (1999) *Radiat Phys Chem* 56(3):353–367
- Buchalla R, Begley TH, Morehouse KM (2002) *Radiat Phys Chem* 63(3–6):837–840
- Park GY, Cho SY, Jeon DH, Kwak IS, Lee KH, Park HJ (2006) *Radiat Phys Chem* 75:1055–1059
- Gröning M, Hakkarainen M (2001) *J Chromatogr A* 932(1–2):1–11
- Gröning M, Hakkarainen M (2004) *J Chromatogr A* 1052:61–68
- Gröning M, Hakkarainen M (2004) *J Chromatogr A* 1052:151–159
- Kusch P, Knupp G (2002) *J Sep Sci* 25:539–542
- Kusch P, Knupp G (2004) *J Polym Environ* 12(2):83–87
- Hakkarainen M (2003) *J Chromatogr A* 1010:9–16
- Tombesi NB, Freije RH, Augusto F (2004) *J Braz Chem Soc* 15(5):658–663
- Li N, Zou J (2006) *J Appl Polym Sci* 100:3141–3144
- Burman L, Albertsson A-C, Höglund A (2005) *J Chromatogr A* 1080:107–116
- Hakkarainen M, Gröning M, Albertsson A-C (2003) *J Appl Polym Sci* 89:867–873
- International Atomic Energy Agency (2002) TRS-409. Dosimetry for food irradiation. International Atomic Energy Agency, Vienna
- Lanças FM (2004) Validação de métodos cromatográficos de análise, Rima, São Carlos
- Ribani M, Bottoli CBG, Collins CH, Jardim ICSF, Melo LFC (2004) *Quím Nova* 27(5):771–780
- International Union of Pure and Applied Chemistry (2006) Harmonised guidelines for the in-house validation of methods of analysis. <http://www.iupac.org/divisions/V/501/draftoct19.pdf>
- European Commission (2002) Off J Eur Community L220/18
- Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (1999) Regulamentos técnicos: disposições gerais para embalagens e equipamentos plásticos em contato com alimentos e seus anexos. Resolução n.º 105, de 19 de maio de 1999. <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=19772&word>
- European Council (1997) Off J Eur Community L222:10–15
- Félix JS, Padula M, Manzoli JE, Monteiro M (2007) *Cienc Tecnol Alim* 27(Supl):27–32
- Félix JS, Padula M, Manzoli JE, Monteiro M (2006) *Alim Nutr* 17(3):329–335

CONCLUSÕES

O conjunto de resultados obtidos nos permite concluir que os objetivos deste trabalho foram atingidos, sendo apresentadas a seguir as principais conclusões de cada capítulo:

- 1) Vários compostos presentes em embalagens de poliamida 6 (PA-6), usadas para acondicionar produtos cárneos e queijos, podem migrar para o alimento em contato, como a caprolactama, monômero da PA-6. A migração da caprolactama varia dependendo da composição da embalagem, das condições de contato, do tipo de alimento ou simulante, entre outros fatores, e também da irradiação, que é capaz de reduzir a migração, conforme a dose empregada.
- 2) O método analítico desenvolvido e validado, empregando a cromatografia gasosa com detector de ionização de chama (GC-FID), foi considerado sensível e apresentou alta precisão e exatidão para determinar caprolactama nos simulantes água destilada, solução de ácido acético 3%, solução de etanol 15% e azeite de oliva, com a vantagem adicional de apresentar tempo máximo de análise de 11 minutos. A faixa linear obtida para todos os simulantes estudados foi ampla, com coeficientes de correlação maiores que 0,9997. O limite de detecção para a caprolactama em azeite de oliva foi de 0,10 µg/g e variou de 0,16 a 0,32 µg/mL em todos os outros simulantes, tendo sido obtida alta precisão ($CV \leq 5,5\%$) e recuperação de 89 a 112%.
- 3) O método desenvolvido e validado, usando GC-FID, foi eficiente para quantificar caprolactama migrada de filmes multicamada contendo PA-6 para os simulantes água destilada, solução de ácido acético 3%, solução de etanol 15% e azeite de oliva. A migração da caprolactama dos filmes usados para produtos cárneos variou de 5,34 a 11,89 mg/kg e dos filmes usados para queijos variou de 1,03 a 7,59 mg/kg, para todos os simulantes estudados.
- 4) A irradiação de filmes multicamada contendo PA-6 usados no acondicionamento de produtos cárneos reduziu a migração de caprolactama. A redução foi maior com o aumento da dose de irradiação. Por outro lado, nos filmes usados para queijos, praticamente não houve diferença na migração de caprolactama entre filmes não-irradiados e irradiados para os simulantes água, solução de ácido acético 3% e

- solução de etanol 15%, embora a maior parte dos filmes irradiados tenha apresentado níveis de migração mais elevados, especialmente para azeite de oliva.
- 5) Os níveis de caprolactama migrados dos filmes usados para produtos cárneos variaram de 5,72 a 11,89 mg/kg para filmes não-irradiados, de 4,80 a 10,60 mg/kg para filmes irradiados a 3 kGy e de 3,62 a 6,02 mg/kg para filmes irradiados a 7 kGy, para todos os simulantes estudados. A migração da caprolactama dos filmes usados para queijos variou de 1,03 a 7,59 mg/kg para filmes não-irradiados e de 4,02 a 7,90 mg/kg para filmes irradiados a 12 kGy.
 - 6) Os compostos de degradação formados pela irradiação dos filmes multicamada contendo PA-6 usando a microextração em fase sólida (SPME) e a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) foram identificados como caprolactama, 2-ciclopentilciclopentanona, tributil fosfato, alguns aldeídos, entre outros. As condições de extração foram 20 minutos, 80°C e 225 rpm, usando a fibra de polidimetilsiloxano.
 - 7) O método analítico desenvolvido e validado, usando SPME-GC-MS, para determinar a migração de compostos voláteis formados pela irradiação dos filmes multicamada contendo PA-6 para simulante água destilada foi considerado sensível e apresentou boa precisão e exatidão, além de enorme potencial para a identificação de outras substâncias presentes nos filmes irradiados e não-irradiados. Foi obtida uma ampla faixa linear para todos os compostos voláteis, com coeficientes de correlação maiores que 0,9872. Os limites de detecção para todas as substâncias identificadas estiveram na faixa de $1,76 \cdot 10^{-7}$ a 1,52 µg/g.
 - 8) O método usando SPME-GC-MS foi considerado eficiente para quantificar compostos voláteis que migraram dos filmes multicamada contendo PA-6 irradiados e não-irradiados para a água destilada. A caprolactama (7,52-12,96 µg/g), decaldeído (4 ng) e 2-ciclopentilciclopentanona (10 a 20 ng) migraram de filmes não-irradiados para água destilada.
 - 9) O método analítico desenvolvido e validado, usando GC-MS, para determinar a migração de compostos voláteis formados pela irradiação dos filmes multicamada

contendo PA-6 para simulante solução de etanol 95% foi sensível e apresentou boa precisão e exatidão. Os limites de detecção obtidos para todos os compostos voláteis estiveram na faixa de 0,01 a 0,12 µg/g.

- 10) O método usando GC-MS foi considerado eficiente para quantificar compostos voláteis que migraram dos filmes multicamada contendo PA-6 irradiados e não-irradiados para o simulante solução de etanol 95%. Apenas a caprolactama migrou dos filmes não-irradiados (7,68-10,01 µg/g) e irradiados (6,11-8,99 µg/g) para o simulante.
- 11) A migração da caprolactama dos filmes usados como embalagem de produtos cárneos para o simulante solução de etanol 95% foi reduzida com a dose de 3 kGy e se manteve praticamente a mesma até a dose de 7 kGy. Os níveis de migração da caprolactama foram similares para filmes não-irradiados e irradiados (12 kGy) usados como embalagem de queijos.
- 12) A migração de caprolactama dos filmes multicamada contendo PA-6 para todos os simulantes de alimentos avaliados atendeu às exigências da legislação Brasileira para migração desse monômero.

Estes resultados justificam a implementação de estudos que visem o uso de simulantes alternativos de alimentos gordurosos, à determinação da migração de caprolactama de filmes multicamadas contendo PA-6 para os diferentes simulantes empregando diferentes doses e taxas de dose de irradiação, assim como o estudo cinético da migração de caprolactama (concentração de caprolactama *versus* tempo de contato). Ainda, esses resultados também apontam para a necessidade de se estudar os possíveis efeitos tóxicos desse monômero devido à sua migração para os simulantes, apesar de estar abaixo do LME, ao consumo freqüente de produtos cárneos e queijos e à nova perspectiva de uso de embalagens irradiadas contendo PA-6 para contato com alimentos.

ANEXOS

Os anexos aqui apresentados são referentes às publicações e/ou prêmios recebidos durante o desenvolvimento desta Tese de Doutorado:

Anexo 1. Trabalho premiado durante o *XX Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos* em Curitiba, Brasil, em Outubro de 2006, intitulado “Migração de caprolactama de embalagens de poliamida para simulante ácido acético 3% e validação de método analítico”, desenvolvido no laboratório de Análise de Alimentos da FCF/UNESP.

Anexo 2. Este trabalho foi apresentado na *International Nuclear Atomic Conference* em Santos, SP, em Setembro de 2007. Os dados ora utilizados foram gerados a partir de dados de migração da caprolactama em simulante ácido acético 3% apresentados nessa Tese de Doutorado. As pesquisas sobre simulação numérica e cinética de migração de compostos de embalagens para simulantes de alimentos vêm sendo desenvolvidas no IPEN/USP sob a responsabilidade do Prof. Dr. José Eduardo Manzoli.

Anexo 3. Trabalho premiado durante *XIV Reunión Nacional de la Sociedad Española de Química Analítica* em Pollensa, Mallorca, Espanha, em Outubro de 2007, intitulado “Identification and migration of degradation compounds from irradiation of plastic packaging with polyamide 6 used to meat products and cheeses”, que foi desenvolvido durante o Estágio de Doutorado no Departamento de Química Analítica da Universidad de Zaragoza, Espanha, sob supervisão da Profa. Dra. Cristina Nerín.

Anexo 4. Este trabalho acaba de ser publicado na Revista *Radiation Physics and Chemistry*. Os dados ora apresentados foram realizados pelo aluno de graduação Henrique Peres Araújo e gerados a partir de estudos sobre o efeito da irradiação nos níveis de caprolactama em filmes multicamada contendo PA-6, desenvolvidos no laboratório de Análise de Alimentos da FCF/UNESP sob a responsabilidade da Profa. Dra. Magali Monteiro.

ANEXO 1



CERTIFICADO

Prêmio sbCTA-PR de Incentivo à Pesquisa **Renato João Sossela de Freitas**

Certificamos que o trabalho

"MIGRAÇÃO DE CAPROLACTAMA DE EMBALAGENS DE POLIAMIDA PARA SIMULANTE ÁCIDO ACÉTICO 3% E VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO", de autoria de JULIANA SILVA FÉLIX; MARISA PADULA; JOSÉ EDUARDO MANZOLI; MAGALI MONTEIRO; recebeu o prêmio sbCTA-PR de Incentivo à Pesquisa Renato João Sossela de Freitas – 1º LUGAR da área de EMBALAGEM no XX Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, realizado no período de 8 a 11 de outubro de 2006, no EXPO TRADE Convention & Exhibition Center, em Curitiba – PR.

Curitiba, 11 de outubro de 2006

Elza Louko Ida

Prof.^a Dr.^a Elza Louko Ida
Coordenadora da Comissão Científica do XX CBCTA

Renato João Sossela de Freitas

Prof. Dr. Renato João Sossela de Freitas
Presidente do XX CBCTA

Gláucia Maria Pastore

Prof.^a Dr.^a Gláucia Maria Pastore
Presidente da sbCTA

ANEXO 2

ϵ -CAPROLACTAM MIGRATION FROM IRRADIATED PA-6 FOOD PACKAGING: KINETIC SIMULATION AND MEASUREMENT

**Faena Machado Leite Rosa¹, Juliana Félix³, Henrique Peres Araújo³, Magali Monteiro³,
Marisa Padula⁴ and José Eduardo Manzoli^{1,2}**

¹ Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN / CNEN - SP)
Av. Professor Lineu Prestes 2242
05508-000 São Paulo, SP
jmanzoli@ipen.br

² Universidade São Judas Tadeu (USJT)
Rua Taquari 544
03166-000 São Paulo, SP

³ Departamento de Alimentos e Nutrição – Faculdade de Ciências Farmacêuticas (UNESP)
Rod. Araraquara-Jaú Km 1
14801-902 Araraquara, SP

⁴ Centro de Tecnologia de Embalagem (ITAL)
Av. Brasil 2880
13070-178 Campinas, SP

ABSTRACT

Migration of low molecular mass compounds (LMMC), such as monomers and additives, from plastic packaging into food simulants is a very important issue, concerning public health and chemical contamination of foods. Sterilization of food packaging materials with ionizing radiation is considered an alternative to other sterilization methods, but when polymers are irradiated, LMMC may be formed, as radiolysis products. According to the Brazilian legislation, specific migration tests, such as those of LMMC from packaging into simulants, should be carried out at certain temperature and time, depending on the real conditions of contact. In this work, multilayer flexible films with polyamide 6 (PA-6), used for meat foodstuffs, were studied. The ϵ -caprolactam (PA-6 monomer) specific migration into acetic acid 3% simulant at 40°C during 10 days and at 100°C during 30 minutes was performed. The initial monomer level in the irradiated and non irradiated PA-6 films was quantified by high resolution gas chromatography (HRGC). Radiation doses were 3 and 7kGy. ϵ -caprolactam specific migration was carried out only with non irradiated films. The results showed that radiation causes a significant change in the monomer level, up or down, depending on the multilayer film type. The kinetic of the ϵ -caprolactam migration at both temperatures, 40 and 100°C was clearly explained by the numerical simulation, combining an Arrhenius equation with the Fick's second law, although this kinetic was not experimentally studied. This simulation allowed to predict diffusion parameters estimates, like diffusion coefficients and activation energies of ϵ -caprolactam in the films or simulant.

1. INTRODUCTION

The migration of compounds from packaging into food is an important aspect concerning safety of foods and packaging materials. Plastic additives, frequently used to improve polymer properties, and residual monomers or oligomers, as well as plastic reaction by-products and degradation compounds, are not chemically bounded to the polymer molecules

and can, therefore, move freely within the polymer matrix [1]. Sterilization of food packaging materials with ionizing radiation is considered an alternative to other methods, e.g. chemical or heat treatment. Depending on the nature of the polymer and the specific irradiation conditions (absorbed doses, dose rate, temperature) changes in the packaging material may occur with production of free radicals, hydroperoxides, carboxylic acids, carbonyl compounds, discoloration, chain scission, crosslinking, changes in the mechanical properties etc., as reported in the literature[2-5].

In the present work, part of a major one, we simulated the effects of gamma irradiation on the migration kinetics of ϵ -caprolactam (polyamide 6 monomer) from multilayer flexible films, used for meat foodstuffs packaging. The simulation was based on the initial concentration of ϵ -caprolactam, experimentally measured in the polymer packaging, which changed according to the radiation doses. The other parameters are kept the same as those obtained for non irradiated simulation in the kinetic specific migration. The initial monomer concentration in the irradiated and non irradiated PA-6 films was quantified by high resolution gas chromatography (HRGC). Radiation doses were 3 and 7kGy. It was not possible to measure ϵ -caprolactam migration in irradiated films on current conditions, in order to compare the results with the simulation ones. The kinetic of the ϵ -caprolactam was clearly explained by the numerical simulation, combining an Arrhenius equation with the Fick's second law, although this kinetic was not experimentally studied.

2. METHODOLOGY

2.1. Materials and Solutions

It was used two different kinds (L1 and L2) of films containing polyamide 6 (PA-6), commercially available in Brazil as meat foodstuffs packaging. The monomer ϵ -caprolactam (purity >98%, Sigma Aldrich) was used as analytical standard and caprilolactam (purity 99%, Sigma Aldrich) as internal standard. Methanol, ethanol, dichloromethane and acetone, HPLC grade, were purchased from Tedia Company (Fairfield, USA).

A 1250 μ g/ml standard stock solution of ϵ -caprolactam and a 70 μ g/ml internal standard solution of caprilolactam prepared in methanol were kept at 0°C for no more than 3 months. Working methanol solutions were then prepared as needed. Calibration was performed with diluted working solutions in methanol.

2.2. Extraction and Quantification Procedure to Determine Residual Monomer in the Polymer

A solvent extraction using methanol was performed. Samples (0.5000g) of multilayer films containing PA-6 were manually cut into 1cm² pieces and extracted with 30.0ml of methanol under ultrasonic bath during 60 min. A 5ml aliquot was collected from the methanol extract and filtered in PTFE filter. A 4ml aliquot was taken from the filtered methanol extract and put into a volumetric flask. The internal standard solution was added and the volume was adjusted with methanol. Then this solution was injected in the GC-FID, as showed in the validated method, described in [6].

2.2. Migration Test Procedure

It was used a specific migration assay, well described in [7]. In a general way, non irradiated packaging films were cut in pieces of 6 cm² (2 X 3 cm²) of area and each one was put inside a glass proof tube containing 20mL of acetic acid 3% solution, and then was hermetically closed. The tubes were kept at 40 ±1°C for 10 days or at 100 ±1°C for 30 minutes [7]. After contact time, the amount of monomer in the stimulant solution was determined by HRGC.

2.3. Numerical Simulation

For this study, it was applied a numerical simulation based on mathematical model of the diffusive process of migration. Details of this method are in [9-11]. It is important to mention that initial concentration is an experimentally measuring input parameter of the simulation. Diffusive coefficients of ϵ -caprolactam in packaging film or in the simulant are not available in the literature. They had to be obtained by the simulation. Temperature effects are included by an Arrhenius term on the diffusive coefficient [12].

3. RESULTS

Table 1 shows the initial concentrations of ϵ -caprolactam in the polymer of two samples of irradiated and non irradiated plastic packaging.

Table 1. ϵ -caprolactam amount in irradiated and non irradiated plastic packaging.

ϵ -caprolactam levels (mg . kg ⁻¹ of film packaging)		
Doses	Packagings	
	L1	L2
0 kGy	2440,22 ^a	2413,87 ^a
3 kGy	2682,85 ^b	2394,13 ^b
7kGy	3362,50 ^a	2656,62 ^a

Values within a column followed by different letters are significantly different at the Tukey (p<0,05) test.

These results represents the quantity of ϵ -caprolactam present per mass unit of plastic film.

The dose of 3 kGy resulted in an increase of 10.0 % for L1 and a decrease of 0.8 % for L2, when compared with the non irradiated correspondent films. The dose of 7 kGy showed an increase of 37.8 % and 10.0% in the initial ϵ -caprolactam concentration, for both films.

Table 2 shows the ϵ -caprolactam migration results.

Table 2. ϵ -caprolactam migrated levels from packaging films into 3% acetic acid simulant.

Packagings	ϵ -caprolactam levels (mg . kg ⁻¹ of simulant)	
	40°C – 10 days	100°C – 30 minutes
L1	9,49	7,20
L2	9,65	8,38

These migration results shows the ϵ -caprolactam levels that migrated per mass unit of the simulant solution. The values obtained were lower than the maximum limit values established in the Brazilian legislation [13,14], which is 15mg ϵ -caprolactam.kg⁻¹ of simulant.

Figures 1 and 2 show the migration kinetics simulation of ϵ -caprolactam from the L1 and L2 packaging films into 3% acetic acid food simulant after irradiation with 3kGy and 7kGy, and for non irradiated ones. Current conditions of temperature were used.

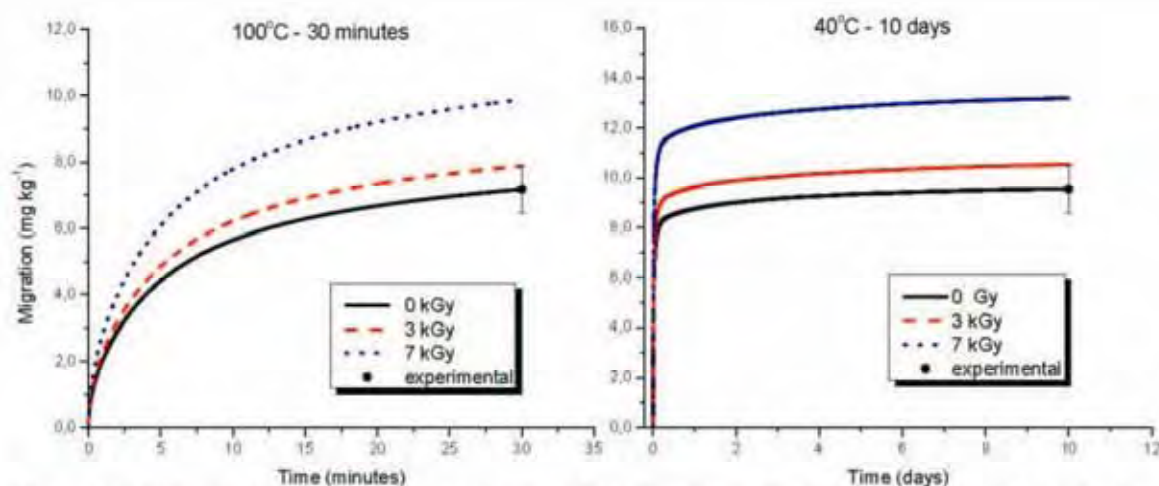


Figure 1. Simulation of the ϵ -caprolactam kinetic migration from L1 plastic packaging film into 3% acetic acid food stimulant at 100°C (left) and 40°C (right). Irradiated conditions imparted 3kGy and 7kGy to the film. Non irradiated kinetic is also shown.

As shown in the right side of Figures 1 and 2 (40°C-10 days), where there are a long time of contact, almost every amount of monomer showed enough time to left the film and drop into the simulant solution. This already happens after 1.5 days.

Simulations of L2 packaging films show a small change in migration kinetics from 0 to 3 kGy. This packaging film should have more radiation resistant components in its composition at this radiation level.

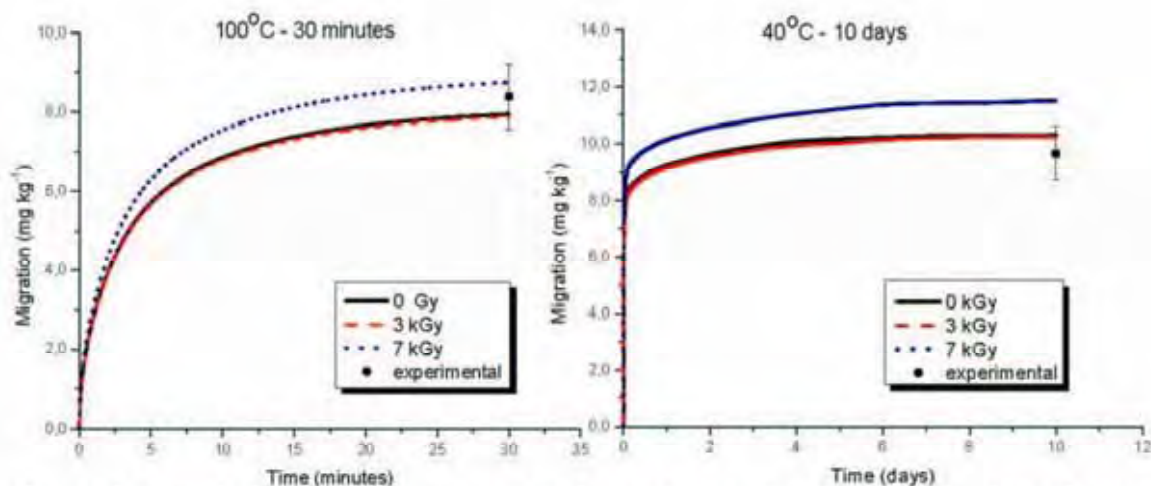


Figure 2. Simulation of the ϵ -caprolactam kinetic migration from L2 plastic packaging film into 3% acetic acid food stimulant at 100°C (left) and 40°C (right). Irradiated conditions imparted 3kGy and 7kGy to the film. Non irradiated kinetic is also shown.

3. CONCLUSION

ϵ -caprolactam levels in the irradiated or non irradiated packaging films and for non irradiated films into the simulant after normative intervals and under normative temperatures only permitted to obtain these interesting simulations shown on the migration kinetics graphics of Figures 1 and 2.

With this numerical procedure it is possible to calculate the level of monomer that migrates at any time and any temperature under which the packaging film is submitted to.

It was supposed that initial ϵ -caprolactam concentration profile is constant inside the packaging film, although any distribution is possible, as input parameter for simulation.

It is of great importance to be able to, at least, simulate possible chemical contamination, when experiments are not performed. This is more crucial when polymer radiolysis could generate dangerous substances, which can not be detected by available equipments.

ACKNOWLEDGMENTS

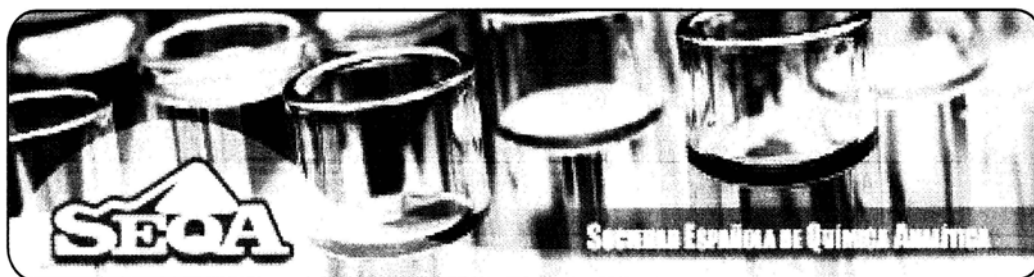
The authors thank the CTR irradiator staff Carlos, Elizabeth and Helio. Felix, Araujo, Padula and Monteiro also tanks PADC-FCF/UNESP, CAPES and FAPESP.

REFERENCES

1. A. L. Brody, & K. S. Marsh, *The Wiley Encyclopedia of packaging technology* (2nd ed.), John Wiley & Sons, New York & United States (1997).

2. R. Buchalla, C. Schottler, and K. W. Bogl, "Effects of ionizing radiation on plastic food packaging materials: A review. Part 1. Chemical and physical changes." *Journal of Food Protection*, **56**, pp. 991-997 (1993a).
3. R. Buchalla, C. Schottler, and K. W. Bogl, "Effects of ionizing radiation on plastic food packaging materials: A review. Part 2. Global migration, sensory changes and the fate of additives." *Journal of Food Protection*, **56**, pp. 991-997 (1993b).
4. S. Chytiri, A. E. Gouklas, K. A. Riganakos, A. Badeka, and M. G. Kontominas, "Volatile and non-volatile radiolysis products in irradiated multilayer coextruded food packaging films contained a buried layer of recycled low density polyethylene." *Food Additives and Contaminants*, **22(12)**, pp. 1264-1273 (2005).
5. A. E. Gouklas, K. A. Riganakos, and M. G. Kontominas, "Effect of ionizing radiation on physicochemical and mechanical properties of commercial multilayer coextruded flexible plastics packaging materials." *Radiation Physics and Chemistry*, **68**, pp. 865-872 (2003).
6. H.P. Araujo, M. Monteiro, "Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para determinação de caprolactama em embalagens de poliamida destinadas ao acondicionamento de alimentos" XXCBCTA, Curitiba, 2006
7. H. P. Araújo, M. Padula, J. E. Manzoli, and M. Monteiro, "Irradiated and non-irradiated multilayer polyamide 6 films: development and validation of a HRGC method to determine caprolactam." *Polymer Sci A*, 2007 (submitted).
8. J. S. Félix, M. Padula, J. E. Manzoli, and M. Monteiro, "Migração de caprolactama de embalagens de poliamida para simulante ácido acético 3%. Parâmetros de Validação do Método Analítico." *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 2006 (in press).
9. J. E. Manzoli, M. Monteiro, P. Rela, and J. S. Félix, "Initial concentration profile influence on migration measurements from plastic packaging: A simulation study," *Proceeding of XVIII IMEKO World Congress*, Rio de Janeiro, 2006, CDROM.
10. J. E. Manzoli and M. Monteiro, "Mathematical Model for the migration of Tinuvin-P from bottles into N-Heptane," *Proceeding of Macro 2006 - World Polymer Congress*, Rio de Janeiro, 2006, CDROM.
11. J. E. Manzoli, F. M. L. Rosa, J. S. Félix, and M. Monteiro, "Migration measurements from plastic packaging: a simulation study on influence of initial concentration profile," *Metrology and Measurements Systems*, **VXII**, pp.117-124 (2007).
12. L. L. Kathan, *Migration from Food Contact Materials*, Blackie Academic & Professional, London & England (1996).
13. ANVISA, National Health Surveillance Agency, Resolution n^o. 105, Brazil, 1999.
14. ANVISA, National Health Surveillance Agency, Decree n^o .55.871, Brazil, 1965.

ANEXO 3



Premio al mejor póster del área de

ALIMENTOS


presentado en la

XIV REUNIÓN NACIONAL DE LA SOCIEDAD
ESPAÑOLA DE QUÍMICA ANALÍTICA

Pollensa, (Mallorca), Octubre 2007

**Título: IDENTIFICATION AND MIGRATION OF
DEGRADATION COMPOUNDS FROM
IRRADIATION OF PLASTIC PACKAGING
WITH POLYAMIDE 6 USED TO MEAT
PRODUCTS AND CHEESES**

Autores: *J. Félix, M. Monteiro, M. Padula,
J. Manzolim, Davinson Pezo,
Joaquín Romero, C. Nerín*


Prof. Carmen Cámara
Presidenta de la SEQA

ANEXO 4



Contents lists available at ScienceDirect

Radiation Physics and Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/radphyschem

Effects of γ -irradiation on caprolactam level from multilayer PA-6 films for food packaging: Development and validation of a gas chromatographic method

Henrique Peres Araújo^a, Juliana Silva Félix^a, José Eduardo Manzoli^b, Marisa Padula^c, Magali Monteiro^{a,*}

^a Department of Food and Nutrition, School of Pharmaceutical Science, São Paulo State University, PO Box 502, 14801–902 Araraquara, SP, Brazil

^b Nuclear and Energetic Research Institute (IPEN), São Paulo, SP, Brazil

^c Packaging Technology Center/Food Technology Institute (CETEA/ITAI), Campinas, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:
Received 29 October 2007
Accepted 1 March 2008

Keywords:
 γ -irradiation
Caprolactam
Food-packaging multilayer films
Polyamide 6
GC
Validation

ABSTRACT

A gas chromatographic method to determine caprolactam in multilayer PA-6 films used for meat foodstuffs and cheese was developed and validated. A wide linear range (0.8–400 $\mu\text{g/ml}$), RSD \leq 4.1% and recovery higher than 90.0% were obtained for the chromatographic system, while precision and accuracy of the method showed RSD \leq 3.8%, recovery from 95.5–100.0% and LOQ of 32 $\mu\text{g/g}$. Irradiated (3, 7 and 12 kGy) and non-irradiated commercial films were analyzed. Most of them increased caprolactam levels with the increase of irradiation doses.

© 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Polyamide 6 (PA-6) is a very versatile polymer used mainly as mono- and multilayer films. Polyolefins, ethylene-vinyl acetate (EVA) copolymer or ionomers in laminated or coextruded structures provide sealing and water vapor barrier to PA (Saranopoulos et al., 2002). PA-6 is widely used as food packaging, particularly due to the mechanical, thermal, chemical and fatty resistance, besides gas and aroma barriers (Begley et al., 1995). PA-6 films have been used in Brazil as vacuum and modified atmosphere packaging for cheese and meat foodstuffs, and also as cook-in packaging for processed meat and foodstuffs, which may be cooked inside the package. PA-6 microwave and roasting bags and boil-in-the-bag are also used over the world to warm, cook or bake foods inside the packaging using microwave or conventional oven (Soto-Valdez et al., 1997).

Caprolactam is the monomer used for manufacturing PA-6 synthetic fibers as well as films used for food contact. This monomer remains inside the resin once polymerization reaction is not complete (Barkby and Lawson, 1993; Begley et al., 1995). Low molecular mass oligomers, reaction by-products and degra-

dation compounds can also be formed during polymerization and all of them have the potential to migrate into the food in contact (Soto-Valdez et al., 1997; Nerin, 2002).

Irradiation is used as a food preservation method to destroy micro-organisms and increase shelf-life. Irradiation doses usually range from 10 to 1 kGy for sprouting inhibition of potatoes, onions, garlic, etc., 1–10 kGy for fresh meat and seafood, as well as vegetables and fruits, and 10–100 kGy, mainly for food sterilization (IAEA, 2002). Irradiation of foodstuffs has an additional advantage. It can be used in pre-packaged foodstuffs to avoid microbial recontamination, besides allowing the use of different packaging materials (EC, 1999; ANVISA, 2001; USFDA, 2005).

Sterilization of pre-packaged foodstuffs with ionizing radiation is considered an alternative to other sterilization methods (USFDA, 2007). But when polymers are irradiated, low molecular mass compounds (radiolysis products) are formed (Stoffers et al., 2004) as a result of molecular excitation, ionization and chemical reactions that can affect the polymer physicochemical structure. Changes in the mechanical, thermal and barrier polymer properties may also occur, as well as in the migration behavior (Luchalla et al., 1999).

The aim of this work was to determine caprolactam in multilayer PA-6 films used for cheese and meat foodstuffs, and to develop an analytical HRGC method to determine caprolactam in these films.

* Corresponding author. Tel.: +55 1633016930; fax: +55 1633016920.
E-mail address: monteiro@cfar.unesp.br (M. Monteiro).

2. Experimental

2.1. Chemicals, standards and PA-6 films

Caprolactam monomer, 98% pure quality, was used as analytical standard as well as caprylolactam, 99% pure quality, used as internal standard, both purchased from Sigma Aldrich (Buchs, Switzerland).

Commercially available multilayer PA-6 films were supplied by the Brazilian producing companies, eight brands used for meat foodstuffs, named 1–8, and five brands used for cheese, named 9–13. Multilayer PA-6 films for meat foodstuffs were constituted by PA-6 and PA-6/PA-66 (67% of homopolymer, 20% of copolymer) layers, and a masterbatch of additives. All of them were from different companies. Multilayer PA-6 films for cheese showed structures basically formed by PA/adhesive/PA/Sealant layer (PE or EVA structure). They were also from different companies.

Methanol, ethanol, dichloromethane and acetone, HPLC grade, were purchased from Tedia Company (Fairfield, USA).

2.2. Solutions

A standard stock solution of caprolactam (1250 µg/ml) and an internal standard solution of caprylolactam (70 µg/ml), both prepared in methanol, were kept at 0 °C for not more than 3 months. Working methanol solutions were then prepared as needed. Calibration was performed with diluted working solutions in methanol.

2.3. Irradiation of PA-6 films

Multilayer PA-6 films were irradiated in the Radiation Technology Center (CTR) of the Nuclear and Energetic Research Institute (IPEN), SP, Brazil, using a Gamacell 60 cobalt irradiator of 12 kCi. Multilayer PA-6 films (10 × 10 cm²) were disposed in hermetically closed glass vials (50 ml) and submitted to 3, 7 and 12 kGy (IAEA, 2002).

2.4. Chromatographic conditions

Chromatographic analyses were performed in a 17-A Shimadzu gas chromatograph (GC) (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) equipped with a flame ionization detector (FID). A DB-1701 (J&W Scientific, Folsom, USA) capillary column (30 m × 0.25 mm and 0.25 µm film thickness) was used. The column temperature started at 110 °C, programmed at 10 °C/min up to 180 °C for 1 min, then heated to 260 °C at 10 °C/min and held for 2 min. Hydrogen was the carrier gas and nitrogen was the make-up gas. Injections (1 µl) were made at 240 °C in split mode (1:20). Detector temperature was 250 °C.

A Varian Saturn 2000 GC/MS/MS workstation equipped with a CP-3800 gas chromatograph coupled to a Model 2000 Ion-Trap Tandem Mass Spectrometer, Model 1079, a programmable injector and a CP-8200 Autosampler (Varian, Walnut Creek, CA, USA) was used in scan mode (30–350 m/z). A Factor Four VF5-MS capillary column (30 m × 0.25 mm × 0.25 µm film thickness) (Varian, Walnut Creek, CA, USA) was also used under the same conditions of the GC/FID. Helium was the carrier gas. Injections (1 µl) were made at 240 °C in splitless mode. Detector temperature was 250 °C.

2.5. Extraction of caprolactam from PA-6 films

Samples (0.5000 g) of multilayer PA-6 films were manually cut into pieces (1 cm²), extracted with methanol (30.0 ml) under an

ultrasonic bath for 60 min and filtered (PTFE). An aliquot (4 ml) of this filtered methanol extract was put in a volumetric flask, the internal standard solution was added and the volume was adjusted with methanol. Then this solution was injected in the GC-FID.

2.6. Recovery

Standard solutions containing caprolactam in methanol (64, 200, 1005 µg/ml) were placed in contact with multilayer PA-6 film samples (0.5000 g) for 2 h and then the extraction procedure described was undertaken.

2.7. Quantitation

For quantitation, peak area was measured and internal standard procedure was used for both calibration and real sample analysis.

Caprolactam levels from commercial films were submitted to ANOVA. Tukey test was used to compare differences among means at $p \leq 0.05$.

3. Results and discussion

The chromatographic conditions used to separate caprolactam and caprylolactam provided good resolution. The identity of caprolactam in the multilayer PA-6 film extracts was confirmed by GC/MS/MS. The presence of interferent compounds or those that overlap the caprolactam and caprylolactam signals was not observed.

In order to establish a suitable step for the extraction of caprolactam from the multilayer films, ethanol, methanol, acetone, dichloromethane and water were investigated as solvent extractors. According to literature (Barkby and Lawson, 1993; Stoffers et al., 2004), water and ethanol/water (95%V/V) were efficient to extract caprolactam. On the other hand, ethanol 10–15% (V/V), water, acetic acid 3% (V/V) and olive oil are used as simulants in migration studies as recommended by legislations (EC, 1990; ANVISA, 1999; USFDA, 2005). Methanol was included due to its polarity that is close to ethanol and also because it was used as solvent to prepare the standard solutions (EC, 2004). Acetone was used because of its intermediate polarity, and dichloromethane because it was described as a good extractor of intermediate polarity compounds from plastic packaging (Monteiro et al., 1996, 1998; Costley et al., 1997). Samples of multilayer PA-6 film (brand 5) were submitted to the extraction procedure, as described before, using all these solvents. An aliquot taken from each solvent extract after 0, 15, 30, 45 and 60 min of extraction was filtered PTFE, added to internal standard and then the extract was analyzed in the GC/FID, in triplicate. Peak areas obtained for each solvent extraction at each extraction period were submitted to ANOVA and Tukey test. A significant difference ($p \leq 0.05$) appeared depending on the solvent. The higher the extraction time, the higher the peak area and the amount of caprolactam extracted. Among the studied extraction periods, methanol was considered the best solvent showing the highest caprolactam amount ($p \leq 0.05$) at 60 min of extraction.

3.1. Validation

Validation was carried out following the protocols reported in literature (Currie, 1999; Lanças, 2004; Ribani et al., 2004; IUPAC, 2006). The calibration curve for caprolactam was linear over a wide concentration range (0.8–400 µg/ml), with a correlation

coefficient (r) of 0.99999. Ten replicates of each calibration curve concentration (0.8, 3.2, 40, 80, 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$) were performed and relative standard deviations (RSD) were less than 5.9% for all of them.

Linearity was also studied using the concentration/area ratio of caprolactam/caprylolactam versus the concentration of the caprolactam/caprylolactam used in the calibration curve, expressed in logarithmic scale. It was verified that the solution concentrations used in the calibration curve were within the confidence interval of 95% (Fig. 1).

Precision is an important criterion to evaluate an analytical method or equipment system performance (Currie, 1999; Ribani et al., 2004; IUPAC, 2006). The precision of the chromatographic system was evaluated using repeatability and intermediate precision. Repeatability was carried out using an intra-day precision assay, which was analyzed at three concentration levels, in triplicate. Intermediate precision was carried out using an inter-day precision assay, which was analyzed at three concentrations, in septuplicate. The RSD values obtained from the intra- and inter-day precision assays were less than 2.7% and 4.1%, respectively (Table 1). The results were fairly good for the concentration levels investigated.

The accuracy of the chromatographic response was studied during the intermediate precision evaluation and was expressed as the percentage between the true value of the analyte in the sample and the value obtained by analysis. Table 1 shows that the values obtained were higher than 90.0%, indicating good accuracy from the chromatographic system.

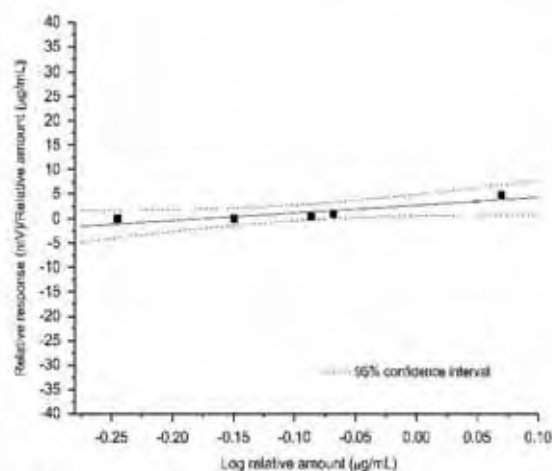


Fig. 1. Concentration/area ratio of caprolactam/caprylolactam versus concentration of caprolactam/caprylolactam used in the calibration curve, expressed in logarithmic scale. Values inside dash lines are between confidence interval of 95%.

Table 1
Precision and accuracy of the chromatographic system

Spiked level ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Repeatability (intra-day precision) $n = 3$			Intermediate precision (inter-day precision) $n = 7$		
	Found ^a ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	RSD ^b	Accuracy ^c	Found ^a ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	RSD ^b	Accuracy ^c
1.6	1.5 \pm 0.0	0.6	93.3	1.5 \pm 0.1	2.5	94.3
10.0	9.3 \pm 0.3	2.7	93.0	10.0 \pm 0.4	4.1	90.1
160.0	149.2 \pm 0.7	0.5	93.3	146.4 \pm 2.6	1.8	91.5

^a Mean of six replicates of the found value \pm standard deviation (SD).

^b RSD, relative standard deviation (%).

^c Accuracy (%).

The precision of the method and the accuracy were evaluated via recovery using different spiked levels. Recovery was measured as the response of a processed spiked matrix standard, expressed as the percentage of the response of a pure standard, which had not been subjected to sample pretreatment. It indicates whether the method provides a response for the entire amount of analyte that is present in the sample (Currie, 1999; Lanças, 2004; Ribani et al., 2004). Recovery was calculated as the ratio between the response after extraction and response of pure standard and was expressed as a percentage (%). For recovery, three concentration levels of standard solution were added to the matrix. One brand of multilayer PA-6 film for meat foodstuffs (brand 5) was used in the recovery assay. For each concentration level added, two extractions were carried out, where two injections were made in reference to each extraction. Recovery values for the three spiked levels studied were from 95.5% to 100.0%, having a maximum RSD of 3.8% (Table 2), indicating good accuracy and precision of the method.

The limit of detection (LOD) of the chromatographic system was determined experimentally using successive dilutions of a caprolactam stock solution of 0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$, which were injected into the chromatographic system ($n = 6$). The LOD ($S/N = 3:1$) value obtained was 0.2 ng.

The LOQ of the method was determined using the recovery study. The LOQ corresponded to the lowest quantity of caprolactam, determined with accuracy and precision, in the linear response interval of the detector and within the confidence interval of 95%. The LOQ of the method was 32 $\mu\text{g}/\text{g}$ (RSD = 1.6%).

3.2. Quantitation

The method was used to quantify caprolactam in multilayer PA-6 films from eight commercial brands used for meat foodstuffs and other five used for cheese, both irradiated and non-irradiated. The extraction from the PA-6 films was carried out in triplicate and two injections of each extraction were made into the chromatographic system. The chromatogram of the blank did not show any interference in the t_R band of the analyte of interest nor the internal standard, indicating the quality of the solvent and the efficiency of the procedure used to clean the glassware. The blank test was constituted by submitting the solvent used to the same procedure used for the sample, for all analytical steps.

Table 2
Recovery (%) of caprolactam from multilayer PA-6 film

	Spiked level ($\mu\text{g}/\text{g}$)		
	64	200	1005
Recovery ^a	100.0 \pm 1.6	97.6 \pm 3.7	95.6 \pm 2.3
RSD ^b	1.6	3.8	2.4

^a Mean of recovery (%), $n = 4$.

^b RSD, relative standard deviation (%).

Typical chromatograms for quantitation of caprolactam in multilayer PA-6 films, non-irradiated ones (0kGy) and irradiated at 3 and 7kGy for meat foodstuffs are in Fig. 2.

The ANOVA and Tukey test results (Tables 3 and 4) showed significant differences ($p \leq 0.05$) between the levels of caprolactam in multilayer PA-6 films. For non-irradiated multilayer PA-6 films for meat foodstuffs brand 6 was higher ($p \leq 0.05$) than brands 1, 3 and 5, which showed no difference among themselves ($p > 0.05$), but were higher than brands 2, 4, 7 and 8 ($p \leq 0.05$). For non-irradiated multilayer PA-6 films for cheese, brand 10 was higher ($p \leq 0.05$) than brand 11, which showed significant difference ($p \leq 0.05$) from brand 9. Non-irradiated multilayer PA-6 films of brand 6 for meat foodstuffs and brand 10 for cheese showed the highest level of caprolactam ($p \leq 0.05$), 2773.3 and 3015.5 mg/kg PA-6 film, respectively.

When 3 kGy irradiation dose was used in multilayer PA-6 films for meat foodstuffs brand 5 showed higher caprolactam level ($p \leq 0.05$) than brands 1 and 6, which were different ($p \leq 0.05$) from brands 2, 3, 7 and 8. Brand 4 showed the lowest caprolactam level ($p \leq 0.05$). Multilayer PA-6 films for meat foodstuffs submitted to 7 kGy showed a caprolactam level difference ($p \leq 0.05$) between brand 1 and brands 2, 3 and 5 ($p > 0.05$), which were higher ($p \leq 0.05$) than brands 4, 6 and 8. Brand 7 showed the lowest caprolactam level ($p \leq 0.05$). Multilayer PA-6 films for cheese irradiated with 12 kGy showed a difference ($p \leq 0.05$) between caprolactam levels of brand 10 and brands 9 and 11, which did not differ between each other ($p > 0.05$). Brands 12 and 13 showed values of caprolactam levels below the LOQ of the method, avoiding quantification. Despite the differences between the brands, all of them showed the same magnitude of caprolactam levels.

Considering the effect of irradiation in multilayer PA-6 films for meat foodstuffs, brands 1, 2, 3 and 8 showed the same behavior, an increase in caprolactam levels with the increase of irradiation doses. Caprolactam levels of these brands improved from zero to 7 kGy ($p \leq 0.05$). On the other hand, brand 6 showed the opposite behavior, a decrease in caprolactam levels ($p \leq 0.05$) with irradiation doses, while there was no effect on brand 4, that is, the increase of irradiation doses did not promote differences ($p > 0.05$) in caprolactam levels. Brands 5 and 7 improved caprolactam levels from zero to 3 kGy and then showed a reduction up to 7 kGy.

Table 3
Quantities of caprolactam (mg/kg) found in multilayer PA-6 films used for meat foodstuffs

	Irradiation doses		
	0kGy	3 kGy	7 kGy
Brand 1*	2440.2 ^{b,c} ± 102.8	2682.9 ^b ± 68.2	3362.5 ^a ± 44.9
Brand 2*	2076.0 ^c ± 46.6	2370.1 ^b ± 12.4	2724.7 ^b ± 87.8
Brand 3*	2413.9 ^b ± 64.1	2394.1 ^b ± 41.8	2656.6 ^a ± 115.9
Brand 4*	2136.1 ^a ± 13.2	2162.9 ^a ± 16.6	2221.4 ^a ± 37.1
Brand 5*	2455.7 ^{b,c} ± 29.3	3012.1 ^a ± 20.3	2611.9 ^b ± 20.4
Brand 6*	2773.3 ^a ± 38.9	2530.2 ^b ± 84.1	2229.7 ^c ± 57.9
Brand 7*	2144.4 ^b ± 42.5	2236.6 ^c ± 50.9	1819.7 ^c ± 27.5
Brand 8*	2054.5 ^b ± 0.9	2263.4 ^a ± 102.6	2342.9 ^a ± 63.4

Mean of four replicates of the found value ± standard deviation (SD).

Means within the same columns followed by the same small letters are not significantly different ($p \leq 0.05$).

Means within the same lines followed by the same capital letters are not significantly different ($p \leq 0.05$).

* Multilayer PA-6 films containing PA-6 and PA-6/PA-66 (67% of homopolymer, 20% of copolymer) layers and masterbatch of additives, all from different companies.

Table 4
Quantities of caprolactam (mg/kg) found in multilayer PA-6 films used for cheese

	Irradiation doses	
	0kGy	12 kGy
Brand 9**	1816.3 ^a ± 6.7	1840.9 ^a ± 38.1
Brand 10**	3015.6 ^a ± 59.3	2507.6 ^b ± 167.4
Brand 11**	2450.7 ^a ± 35.7	1886.9 ^b ± 75.8
Brand 12**	-*	-*
Brand 13**	-*	-*

Mean of four replicates of the found value ± standard deviation (SD).

Means within the same columns followed by the same small letters are not significantly different ($p \leq 0.05$).

Means within the same lines followed by the same capital letters are not significantly different ($p \leq 0.05$).

* Lower than LOQ.

** Multilayer PA-6 films like PA/Adhesive/PA/Adhesive/Sealant layer (PE or EVA structure) from different companies.

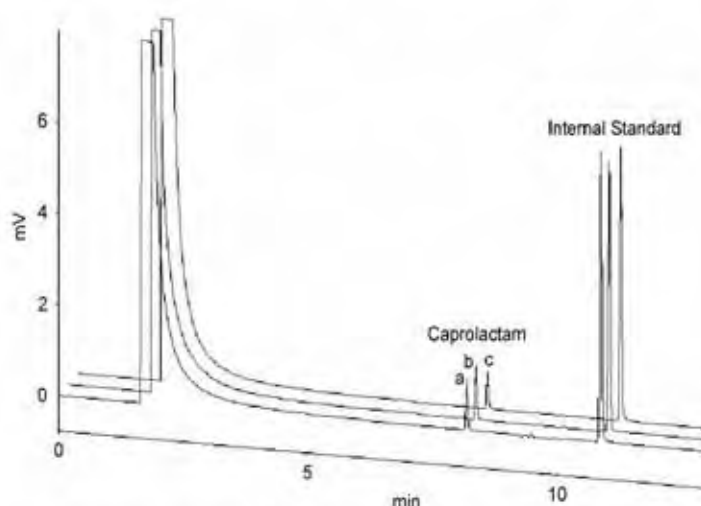


Fig. 2. Typical chromatograms for quantitation of caprolactam in multilayer PA-6 films for meat foodstuffs: (a) non-irradiated (0kGy); (b) irradiated at 3kGy; and (c) irradiated at 7kGy. Conditions: column temperature started at 110 °C, programmed at 10 °C/min up to 180 °C for 1 min, then heated to 200 °C at 10 °C/min and held for 2 min. Hydrogen was the carrier gas and nitrogen was the make-up gas. Injections (1 µl) were made at 240 °C in split mode (1:20). Detector temperature was 250 °C.

Irradiation of multilayer PA-6 films for cheese showed reduction in caprolactam levels ($p < 0.05$) of brands 10 and 11, while there was no effect in caprolactam levels ($p > 0.05$) of brand 9.

The results showed that the effect of irradiation in the multilayer PA-6 films might promote increase, reduction or no modification of the residual level of caprolactam when compared to non-irradiated multilayer PA-6 films used for meat foodstuffs and cheese. The increase of caprolactam level could be explained by degradation of polymer, while reduction could be due to the crosslinking of residual caprolactam with other compounds. The different behavior of multilayer PA-6 films may occur due to the different constitutions of the packaging and, especially, due to the doses and dose rates. Thus, to elucidate such questions, studies with this approach should be carried out. It should be mentioned that the results obtained in this work were the first reported for Brazilian PA-6 films used for meat foodstuffs and cheese.

4. Conclusion

The method developed can be successfully used to determine caprolactam in multilayer PA-6 films used for meat foodstuffs and cheese.

Irradiation affected caprolactam levels of the multilayer PA-6 films used for meat foodstuffs and cheese, pointing out the necessity of more detailed studies on the influence of rate and dose irradiations over food plastic packaging.

The levels of caprolactam were the first reported for Brazilian multilayer PA-6 films used for meat foodstuffs and cheese.

Acknowledgment

The authors wish to thank FAPESP for supporting this work.

References

- ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), 1999. Regulamentos técnicos: disposições gerais para embalagens e equipamentos plásticos em contato com alimentos e seus anexos. Resolução no. 105, de 19 de maio de 1999. Available at: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=197728word>.
- ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), 2001. Regulamento Técnico para Irradiação de Alimentos. Resolução RDC no. 21, de 26 de janeiro de 2001. Available at: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=1618word> – irradiac33a73c33a30.
- Barkóy, C.T., Lawson, G., 1993. Analysis of migrants from nylon 6 packaging films into boiling water. *Food Addit. Contam.* 10 (5), 541–553.
- Begley, T.H., Gay, M.L., Hollifield, H.C., 1995. Determination of migrants in and migration from nylon food packaging. *Food Addit. Contam.* 12, 671–676.
- Buchalla, R., Boess, C., Bögl, W., 1999. Characterization of volatile radiolysis products in radiation-sterilized plastics by thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry: screening of six medical polymers. *Radiat. Phys. Chem.* 56, 353–367.
- Costley, C.T., Dean, J.R., Newton, I., Carrol, J., 1997. Extraction of oligomers from poly(ethyleneterephthalate) by microwave-assisted extraction. *J. Anal. Commun.* 34, 89–91.
- Currie, L.A., 1999. Detection and quantification limits: origins and historical overview. *Anal. Chim. Acta* 391, 105–126.
- EC, 1990. Commission directive 90/128/EEC of 23 February 1990 relating to plastics materials and articles intended to come into contact with foodstuffs. *Off. J. Eur. Community* L75/349, 19–47.
- EC, 1999. Directive 1999/2/EC of 22 February 1999, on the approximation of the laws of the member states concerning foods and food ingredients treated with ionising radiation. *Off. J. Eur. Community* <http://ec.europa.eu/food/fs/isp/>.
- EC, 2004. Joint Research Centre. Specific migration methods. Determination of caprolactam in food simulants. Available at: <http://cpf.jrc.it/smt/monomers/downloads/pm14200.pdf>.
- IAEA, 2002. Dosimetry for food irradiation: Technical Report Series of International Atomic Energy Agency, TRS-409, Vienna.
- IUPAC, 2006. Harmonised guidelines for the in-house validation of methods of analysis (Technical Report). Appendix 1: Requirements for individual parameters by which a Method may be characterised.
- Lanças, F.M., 2004. Validação de Métodos Cromatográficos de Análise. Rima, São Carlos, 62pp.
- Monteiro, M., Nerin, C., Reyes, F.G.R., 1996. Determination of UV stabilizers in PET bottles by high performance-size exclusion chromatography. *Food Addit. Contam.* 13, 575–586.
- Monteiro, M., Nerin, C., Rubio, C., Reyes, F.G.R., 1998. A GC/MS method for determining UV stabilizers in polyethyleneterephthalate bottles. *High Resolution Chromatogr.* 21, 317–320.
- Nerin, C., 2002. Nuevas técnicas analíticas para la evaluación de la migración específica. In: Catalá, R., Gavara, R. (Eds.), *Migración de Componentes y Residuos de Envases en Contacto con Alimentos*. Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, España, pp. 163–183.
- Ribani, M., Bottoli, C.B.G., Collins, C.H., Jardim, L.C.S.F., Melo, L.F.C., 2004. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Quim. Nova* 27, 771–778.
- Sarantópoulos, C.I.G.L., Oliveira, L.M., Coltro, L., Vercelino, A.R.M., Corrêa, G.E.E., 2002. Embalagens Plásticas Flexíveis: Principais Polímeros e Avaliação de Propriedades. Campinas, Cetea/Ital, pp. 24–27.
- Soto-Valdez, H., Gramshaw, J.W., Vanderburg, H.J., 1997. Determination of potential migrants present in Nylon 'microwave and roasting bags' and migration into olive oil. *Food Addit. Contam.* 14, 309–318.
- Stoffers, N.H., Linssen, J.P.H., Franz, R., Welle, F., 2004. Migration and sensory evaluation of irradiated polymers. *Radiat. Phys. Chem.* 71, 203–206.
- USFDA, 2005. US Code of Federal Regulations. Packaging materials for use during the irradiation of prepackaged food. 21 CFR § 179.45. Available at: <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?fr=179.45&SearchTerm=irradiation>.
- USFDA, 2007. US Code of Federal Regulations. Irradiation in the production, processing and handling of food. 21 CFR § 179. Proposed rule. [Docket no. 2005N-0272] RIN 0910-ZA29. Available at: <http://www.cfsan.fda.gov/~lrd/fr070404.html>.