

Extração de sujidades leves em farinha de trigo integral: validação de metodologia

Extraction of light filth from whole wheat flour: methodology validation

RIALA6/981

Márcia Nogueira DIMOV^{1*}, Vivian Regina SILVEIRA¹, Silvia Nagib ELIAN², Marilene De Vuono Camargo PENTEADO³

* Endereço para correspondência: Instituto Adolfo Lutz – Av. Dr. Arnaldo, 355 CEP 01246-902 – São Paulo - SP

¹ Seção de Microscopia Alimentar– e-mail: dimonog@ial.sp.gov.br

² Instituto de Matemática e Estatística –USP

³ Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental –FCF-USP

Recebido: 11/03/2004 – Aceito para publicação: 26/10/2004

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo conhecer o desempenho do método modificado de extração de sujidades leves em farinha de trigo integral no laboratório de Microscopia Alimentar do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo, por meio de um estudo intralaboratorial. O método é normatizado e publicado nos Métodos Oficiais da AOAC Internacional (AOAC, 2000) e foi modificado suprimindo-se o refluxo para o desengorduramento da amostra. Para o estudo foram aplicados três níveis de contaminação para fragmentos de insetos (fi) e para pêlos de roedor, com seis replicatas em cada concentração. Dois analistas realizaram a metodologia independentemente em três meses. A modificação do método não alterou a recuperação dos fragmentos de insetos. Os resultados quanto à recuperação de fragmentos de insetos foram maiores nesse estudo (97%, 96%, e 94% em média) quando comparados com os dados da AOAC (estudo interlaboratorial 94%, 86% e 86%). Para pêlos de roedor houve uma recuperação inferior (78%, 77% e 70% em média) aos dados da AOAC (95%, 91% e 96%). Verificou-se que uma possível explicação para essa baixa recuperação seria a agitação magnética, na recuperação do contaminante biológico pêlo de roedor.

Palavras-Chave. fragmentos de insetos, pêlos de roedor, matérias estranhas, precisão, recuperação, sujidades leves.

ABSTRACT

This investigation aimed to evaluate the modified method performance of extraction of light filth from whole wheat flour, which was carried out at Food Microscopy Laboratory of Instituto Adolfo Lutz, São Paulo-SP by means of intra-laboratory study. For performing this study, the technique standardized and published by International AOAC, 2000 was modified by suppressing the reflux step for defatting the flour. The experimental design was as following: three spiked levels for insect fragments - FI (5, 15, and 30 FI per 50 g), and three for rodent hairs - RH (5,10, and 15 RH per 50 g) with six replicates for each level. Two analysts independently were performed the techniques. No change was observed in insect fragments recovery by means of the modified technique. Our results were of 97%, 96%, and 94% in average for FI, and of 78%, 77%, and 70% for RH in average. These results were higher when compared with AOAC interlaboratorial study data for FI (94%, 86%, and 86%), but lower for RH recovery comparing to AOAC RH data (95%, 91%, and 96%). A possible explanation for the low RH recovery in the present study might be on account of the use of magnetic stirring.

Key Words. insect fragment, rodent hair, extraneous materials, light filth, accuracy, precision.

INTRODUÇÃO

A definição de matéria estranha apresentada pelos Métodos Analíticos Oficiais da “Association of Official of Analytical Chemists International” (AOAC) é qualquer material diferente, não pertencente ao alimento, que possa estar nele contido devido à ocorrência anormal, ou de condições e práticas inadequadas durante a fase de produção, armazenagem ou de distribuição⁴. Dentre as matérias estranhas estão as sujidades, que são substâncias originadas pela contaminação animal do produto e que possam contribuir para condições higiênicas insatisfatórias, e sujidades leves definidas como partículas de sujidades mais leves, oleofílicas, separadas dos alimentos pela flutuação, numa mistura líquida óleo-água, exemplos: fragmentos de insetos, insetos inteiros, ácaros, pêlo de roedor e bárbulas de aves⁵.

O alimento contaminado com sujidades leves tem aparência normal, não permitindo que o consumidor as identifique a olho desarmado. A fim de possibilitar essa separação foram desenvolvidos métodos microanalíticos de flutuação que são técnicas de separação baseadas em propriedades físicas e químicas, dependentes do grau de diferencial de molhabilidade da cutícula dos insetos e dos pêlos de mamíferos pelo óleo. As marchas analíticas desses métodos requerem grande número de etapas visando preparação da amostra para a extração final, onde há separação óleo em água.

O princípio do método de flutuação da farinha de trigo integral é a digestão ácida do amido constituinte, restando apenas os elementos histológicos vegetais. Essa hidrólise ácida não ataca o exoesqueleto dos insetos e nem os pêlos de mamíferos. Os constituintes vegetais restantes são preparados para absorverem água, têm seu peso elevado e assim precipitam no fundo do frasco. As sujidades leves são atraídas para a fase oleosa, extraídas e filtradas em papel de filtro riscado propriamente e examinada em microscópio estereoscópico.

Na marcha analítica estudada foi suprimida a fase do refluxo, onde se faz o desengorduramento da amostra (pré-tratamento) e em substituição foi colocado o béquer tampado com vidro relógio na chapa aquecedora. A montagem do refluxo não seria prática para a rotina do serviço no laboratório e tomaria espaço na capela o que demandaria mais tempo na realização deste ensaio.

Este é o primeiro trabalho desenvolvido nesta área com parâmetros de validação no Brasil. O objetivo desse trabalho foi de estudar a modificação introduzida ao método de extração de sujidades leves em farinha de trigo integral publicado nos Métodos Analíticos Oficiais da AOAC 2000, através de um estudo intralaboratorial para conhecer a acurácia analítica do método modificado.

MATERIAL E MÉTODOS

Matéria Prima

Foram obtidas 36 amostras de farinha de trigo integral, pela mistura de farinha branca (75 %) e farelo de trigo (25 %),

processadas em moinho localizado na cidade de São Paulo.

Técnica n° 993.26 descrita nos Métodos Analíticos Oficiais da AOAC⁶ para extração de sujidades leves em farinha de trigo integral, modificada na etapa de desengorduramento da amostra:

Pesar 50g (+ 0,5g) de farinha de trigo integral em béquer de 250mL.

ADIÇÃO DE PADRÃO

Pré-tratamento

↓
Em béquer de 2000mL adicionar 800mL de solução ácida de HCl a 3% , levar a chapa aquecedora à agitação magnética

↓
Transferir quantitativamente a farinha de trigo integral em porções para a solução ácida, lavar o béquer de 2L com solução ácida de HCl a 3%

↓
Cobrir o béquer com vidro relógio e levar a ebulição por 15 minutos sempre com agitação magnética.

MODIFICAÇÃO

↓
Transferir quantitativamente o conteúdo do béquer para tamis 230 (em porções) e tamisar a úmido com jatos de água filtrada quente (50-70°C) até o eluente sair claro.

↓
Transferir quantitativamente o resíduo para o béquer anterior com o auxílio de álcool isopropílico

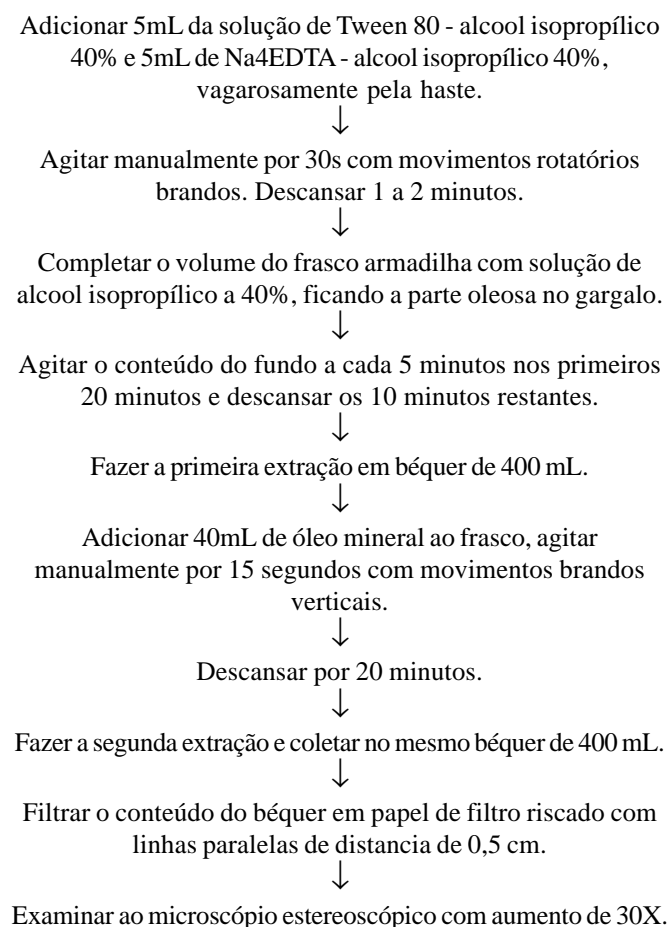
↓
Elevar o volume a marca de 400mL, cobrir com o vidro relógio ferver por 5 minutos com agitação magnética.

↓
Transferir quantitativamente o conteúdo do béquer para o tamis 230, tamisar a úmido com jatos de água filtrada quente (50-70°C) até o eluente sair claro.

↓
Enxaguar o resíduo com solução de álcool isopropílico a 40% e transferi-lo para o frasco armadilha utilizando solução de álcool isopropílico a 40% . Elevar o volume 600mL com solução de álcool isopropílico a 40% prender a haste do frasco e ferver por 5 minutos com agitação magnética.

Isolamento

↓
Remover do calor e adicionar 65 mL de óleo mineral e agitar magneticamente por 3 minutos. Descansar 1 a 2 minutos.



Contaminação das amostras

O padrão microanalítico para fragmentos de insetos e pêlos de roedor foi elaborado no próprio laboratório empregando-se a técnica descrita por Brickey et al.¹, foi utilizado *Sitophilus oryzae*, a praga mais abundante do trigo que deu origem à farinha como relatado por Nogueira⁷, e pêlos de roedor *Mus musculus*, obtidos no biotério do IAL para contaminação de amostras.

Análise Estatística

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado. Efetuou-se a comparação de médias das recuperações obtidas entre os analistas A e B e os dados publicados no estudo interlaboratorial da AOAC, utilizando-se a Análise de Variância (ANOVA). Valores extremos foram detectados pelo teste de Grubbs. Utilizou-se o pacote estatístico Minitab.

Estudo intralaboratorial

O estudo foi realizado por 2 analistas independentemente num período de três meses. Foram analisadas 18 amostras de 50g de farinha de trigo integral, por analista, contaminadas em 3 níveis (5,15 e 30 fi/50g) para fragmentos de insetos e 3 níveis (5,10 e 15 pêlos /50g) para pêlo de roedor.

RESULTADOS E DICUSSÃO

Para avaliar o desempenho de um método analítico, pode-se utilizar certos parâmetros de validação como: precisão, recuperação e coeficiente de variação (CV) que serão guias da variabilidade do método analítico.

O período utilizado para o estudo foi de 3 meses, pois a confecção de padrões analíticos é demorada e exige certa habilidade de quem os prepara, e as marchas analíticas são longas levando em média 12 horas para completá-las. A natureza analítica do método é uma separação física num sistema óleo-água (Figura 1).

O analito possui propriedades oleofílicas e assim, é separado da matriz alimentar, que anteriormente sofre um pré-tratamento, neste caso uma hidrólise ácida e desengorduramento. A análise depende do reconhecimento dos fragmentos de insetos e pêlos de roedor por parte do analista, utiliza uma lupa para seu isolamento e identificação.

Os métodos microanalíticos utilizados para o isolamento de sujidades leves não são específicos para cada analito, o método separa toda substância oleofílica que o alimento contenha, dependendo somente do poder de atração de cada analito pela fase oleosa. O desengorduramento nesta marcha analítica tem o objetivo de retirar a matéria gordurosa contida nos tecidos vegetais da farinha de trigo integral, localizada em seu germe, e aumentar a penetração da água nos tecidos vegetais constituintes do trigo para que estes precipitem para o fundo do frasco armadilha e assim não sejam atraídos pela fase oleosa. Esta última ação é auxiliada pela adição de Na₄EDTA + Tween 80 e a fervura com álcool isopropílico.

Por essa razão, os pré-tratamentos realizados são importantes para cada separação e devem ser seguidos minuciosamente, como a metodologia recomenda.

Na metodologia empregada neste estudo, o desengorduramento (pré-tratamento) através do refluxo

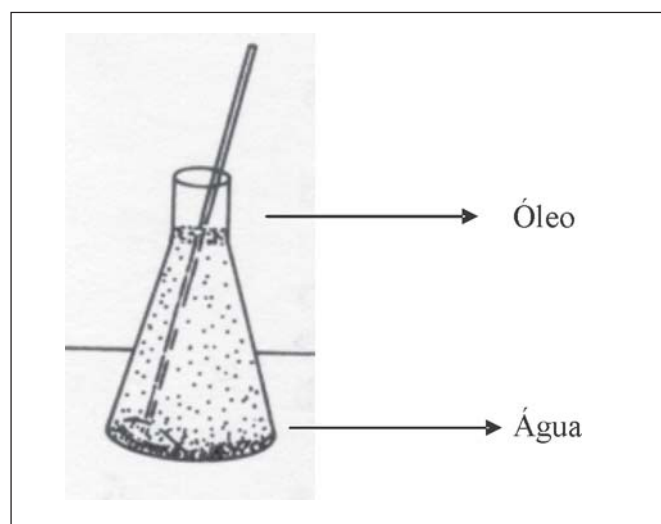


Figura 1. Frasco de Wildman (FDA Technical Bulletin nº2, 1978)

consistiria em aumentar o tempo da marcha analítica e compartilhar espaço dentro da capela, dificultando assim as atividades corriqueiras do laboratório. Preferimos realizar esta etapa no próprio bquer tampado por vidro relógio com o solvente.

Na Tabela 1 estão apresentados os resultados gerais das contagens de fragmentos de insetos e de pêlos de roedor obtidos pelos dois analistas, nos três níveis de concentração. Para fragmentos de inseto, o valor 11 do nível de concentração 15 foi considerado um dado extremo pelo teste de Grubbs a um nível de significância de 5%. Tal dado, no entanto não foi retirado da posterior análise pois se verificou ser um possível valor da variável, não sendo consequência de falha na execução do experimento ou erro de medida. As médias de recuperação

para os 3 níveis de contaminação variaram de 94 a 97%. Nos resultados das contagens de pêlos de roedor obtidos pelos dois analistas nenhum dado foi considerado extremo pelo teste simples de Grubbs ($\alpha=5\%$), o percentual de recuperação variou de 70 a 78 %.

Ao compararmos os coeficientes de variação obtidos para os analitos estudados nota-se a grande variabilidade dos dados na recuperação de pêlos de roedor. A fim de entender esta variabilidade construiu-se a Tabela 2. Comparando os resultados, o analista B mostrou uma recuperação inferior: 65% e 60% nas concentrações 10 e 15 respectivamente e o analista A conseguiu 88% e 80% nos mesmos níveis, sendo que A tinha menos experiência que o B na condução da marcha analítica. Pesquisando as ações

Tabela 1. Desempenho do método realizado para isolamento de fragmento de inseto e pêlo de roedor

| Análise | Analista | Fragmento de Inseto (fi/50g) | | | Pêlo de Roedor (pêlos/50g) | | |
|---------------|----------|------------------------------|--------|--------|----------------------------|---------|---------|
| | | resp 5 | resp15 | resp30 | resp 5 | resp 10 | resp 15 |
| 1 | A | 5 | 15 | 28 | 4 | 9 | 14 |
| 2 | A | 4 | 15 | 28 | 2 | 9 | 12 |
| 3 | A | 5 | 15 | 25 | 4 | 9 | 13 |
| 4 | A | 5 | 15 | 31 | 5 | 11 | 11 |
| 5 | A | 5 | 11* | 30 | 4 | 8 | 12 |
| 6 | A | 5 | 14 | 28 | 4 | 7 | 10 |
| 7 | B | 5 | 15 | 28 | 5 | 5 | 13 |
| 8 | B | 5 | 14 | 27 | 4 | 5 | 11 |
| 9 | B | 4 | 13 | 26 | 4 | 8 | 7 |
| 10 | B | 5 | 15 | 29 | 5 | 6 | 6 |
| 11 | B | 5 | 14 | 29 | 3 | 8 | 7 |
| 12 | B | 5 | 14 | 30 | 3 | 7 | 10 |
| Média | | 4,8 | 14,5** | 28,3 | 3,9 | 7,7 | 10,5 |
| Desvio Padrão | | 0,4 | 0,7 | 1,7 | 0,9 | 1,7 | 2,5 |
| CV % | | 8,3 | 4,8 | 5,7 | 23 | 22 | 24 |
| Recuperação% | | 96 | 97 | 94 | 78 | 77 | 70 |

* Dado considerado extremo pelo teste de Grubbs ($\alpha = 5\%$, $n = 12$). **média sem dado extremo.

Tabela 2. Comparação entre os dois analistas do estudo intralaboratorial para pêlos de roedor.

| | Analista A | | | Analista B | | |
|-----------------|------------|------|------|------------|------|------|
| | 5 | 10 | 15 | 5 | 10 | 15 |
| | 4 | 9 | 14 | 5 | 5 | 13 |
| | 2 | 9 | 12 | 4 | 5 | 11 |
| | 4 | 9 | 13 | 4 | 8 | 7 |
| | 5 | 11 | 11 | 5 | 6 | 6 |
| | 4 | 8 | 12 | 3 | 8 | 7 |
| | 4 | 7 | 10 | 3 | 7 | 10 |
| média = | 3,8 | 8,8 | 12,0 | 4,0 | 6,5 | 9,0 |
| DP = | 1,0 | 1,3 | 1,4 | 0,9 | 1,4 | 2,8 |
| CV% = | 26,3 | 14,7 | 11,7 | 22,5 | 21,5 | 31,1 |
| Recuperação % = | 76 | 88 | 80 | 80 | 65 | 60 |

realizadas, o analista B tomou uma decisão de continuar o experimento ao quebrar o agitador magnético, substituindo-o pela agitação manual (ver técnica descrita), através da haste do Frasco de Wildman, fato este às vezes corriqueiro nos procedimentos analíticos. Isto poderia justificar a baixa recuperação obtida para pêlo de roedor, não ocorrendo o mesmo fato para fragmentos de insetos que foram colocados simultaneamente em teste cego para os analistas.

Brickey² relatou que a agitação desempenha um papel importante na recuperação desse tipo de analito, uma vez que individualmente ou grupos de analistas não agitam da mesma maneira, na mesma velocidade. Assim necessita-se de uma padronização como determina a metodologia.

Apesar do analista A apresentar um resultado melhor em relação ao B nos níveis 10 e 15, teve uma recuperação inferior ao estudo interlaboratorial desenvolvido por Glaze e Bryce³, o que não seria esperado, por se tratar de um estudo com menores condições de variabilidade. Estes dados indicam a necessidade de se avaliar os agitadores magnéticos do laboratório para recuperação de pêlo roedor. Evidenciando que este analito está sendo subestimado nas análises de rotina do laboratório em questão.

Os resultados obtidos pelo estudo colaborativo da AOAC, analista A e analista B estão resumidos na tabela 3. As

médias das recuperações foram comparadas para avaliar o desempenho do método. Utilizou-se a Análise de Variância Paramétrica (ANOVA) e Não Paramétrica, obtendo-se concordância em ambas. Esta análise exibiu fortes evidências para não rejeitar a igualdade das médias das recuperações do estudo da AOAC, analista A e analista B, nos três níveis de concentração, para variável dependente fragmento de inseto, a um nível de significância de 0,05.

Comparando-se os coeficientes de variação, para fragmentos de insetos, vê-se que houve uma melhora na variabilidade dos resultados no método desempenhado pelos analistas A e B, resultado já esperado uma vez que o estudo foi de precisão dentro do mesmo laboratório, mesmos equipamentos (intra-laboratorial) enquanto que o estudo da AOAC envolveu 8 laboratórios (interlaboratorial) diferentes. Portanto, a decisão de suprimir o refluxo não afetou o desempenho do método para recuperação dos fragmentos de insetos.

Para a variável dependente pêlo de roedor, a Análise de Variância demonstrou evidências para não rejeitar a igualdade de médias somente na concentração 5. Nos níveis 10 e 15 a média do analista B é diferente (contrastes pelo método de Tukey, $\alpha=0,05$). Isto vai de acordo com as observações feitas anteriormente sobre a baixa recuperação de pêlos de roedor para o analista B. Comparações dos CV entre analista A e estudo AOAC nos mesmos

Tabela 3. Comparação nos desempenhos do método modificado e o estudo interlaboratorial da AOAC.

| FRAGMENTOS DE INSETOS | | | | | |
|-----------------------|----------|-------------|---------------|-------------|-----------------|
| nível de contaminação | analista | média | Desvio Padrão | CV (%) | Recuperação (%) |
| 5 | A | 4,8 | 0,4 | 8,3 | 96,6 |
| | B | 4,8 | 0,4 | 8,3 | 96,6 |
| | AOAC | 4,7 | 0,8 | 16,0 | 94,0 |
| 15 | A | 14,2** | 1,6 | 11,3 | 94,4 |
| | B | 14,2 | 0,8 | 5,6 | 94,4 |
| | AOAC | 12,6(13,8)* | 1,1 (1,9) | 8,9 (10,8) | 85,9 (91,9) |
| 30 | A | 28,3 | 2,1 | 7,4 | 94,3 |
| | B | 28,2 | 1,5 | 5,3 | 94,0 |
| | AOAC | 25,9 | 3,6 | 14,0 | 86,2 |
| PÊLOS DE ROEDOR | | | | | |
| nível de contaminação | analista | média | Desvio Padrão | CV (%) | Recuperação (%) |
| 5 | A | 3,8 | 1,0 | 26,3 | 76,0 |
| | B | 4,0 | 0,9 | 22,5 | 80,0 |
| | AOAC | 4,8 (4,4) | 1,4 (1,5) | 29,8 | 95,0 (87,4) |
| 10 | A | 8,8 | 1,3 | 14,7 | 88,0 |
| | B | 6,5 | 1,4 | 21,5 | 65,0 |
| | AOAC | 9,1 (9,0) | 1,2 | 13,5 (13,0) | 90,7 (90,0) |
| 15 | A | 12,0 | 1,4 | 11,7 | 80,0 |
| | B | 9,0 | 2,8 | 31,1 | 60,0 |
| | AOAC | 14,4 (14,1) | 1,2 (1,0) | 8,3 (6,9) | 96,0 (94,0) |

* especialista na área do estudo da AOAC, ** dado extremo não retirado.

níveis indicam que a variabilidade dos dados foi maior no estudo *in-house*, o que não seria esperado, indicando algum problema na condução da metodologia para recuperação de pêlos de roedor. Sugere-se que a agitação magnética utilizada não foi suficiente para o desempenho do método.

CONCLUSÃO

O método proposto para extração de sujidades leves em farinha de trigo integral tem acurácia, indicando que a modificação introduzida não afetou o desempenho do método para recuperação de fragmentos de inseto.

A agitação magnética deve ser objeto de estudo futuro porque houve indícios que poderia ter influência na acurácia do método para recuperação de pêlo de roedor. A recuperação desta variável foi subestimada nesta marcha analítica.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Biotério do IAL que forneceu pêlos de

roedor de diversas linhagens, para elaborarmos testes e para que esse estudo pudesse ser realizado.

REFERÊNCIAS

1. Brickey, P.M. Jr. - Extraneous Materials in Ground Cocoa Bean Products. **J. Assoc. Anal. Chem** v. 48(3), p.:543-5, 1965
2. Brickey, P.M. et al. - Analytical Entomology of Foods and Drugs. **J. Assoc. Anal. Chem.**, 51(4): 872-6, 1968.
3. Glaze, L.E. e Bryce, J.R. - Extraction of Light Filth from Whole Wheat Flour, Flotation Method: Collaborative Study. **J. Assoc. Anal. Chem Int.** 77, (5): 1150-2, 1994
4. Horwitz, W. (ed) ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS **Official Methods of Analysis** método 945.75 A. 17 ed. Gaithersburg, 2000.
5. _____ Método 970.66 A(a)(c). 17 ed. Gaithersburg, 2000.
6. _____ Método 993.26. 17 ed. Gaithersburg, 2000.
7. Nogueira Dimov, M. - **Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle no Processamento de Farinha de Trigo Integral**. São Paulo, 2000. [Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo].