



Comparação entre métodos de pré-tratamento para determinação de sujidades leves em amostras de cúrcuma (*Curcuma longa* L.) e páprica (*Capsicum annuum* L.)

Comparing pretreatment methods for determination of light filth in turmeric (*Curcuma longa* L.) and paprika (*Capsicum annuum* L.) samples

Sonia de Paula Toledo PRADO^{1*} , Maria Helena IHA¹ , Matheus Leandro RODRIGUES¹ 

¹ Núcleo de Ciências Químicas e Bromatológicas, Centro de Laboratório Regional de Ribeirão Preto, Instituto Adolfo Lutz, Ribeirão Preto, SP, Brasil.

RESUMO

O estudo teve como objetivo modificar, otimizar e avaliar através de estudo comparativo um método para a extração de sujidades leves em amostras de cúrcuma (*Curcuma longa* L.) e páprica (*Capsicum annuum* L.). Foram analisadas dez amostras de cúrcuma e vinte de páprica. As etapas de pré-tratamento dos métodos da AOAC, 975.49 (16.14.05) para cúrcuma e 977.25b (16.14.22) para páprica, foram modificadas, com adição do extrator Soxhlet. A avaliação do desempenho analítico foi realizada pela comparação entre os resultados das recuperações dos métodos. A recuperação média para cúrcuma utilizando o método AOAC foi 91,9% para fragmentos de insetos e 97,0% para pelos de roedor, enquanto que para o método modificado foi de 89,6% e 97,4%, respectivamente. Para páprica, usando método original a recuperação foi de 93,1% para os fragmentos de insetos e 96,5% para pelos de roedor, e para o método modificado, 92,2% e 93,1%, respectivamente. A análise estatística mostrou que não houve diferença significativa entre os métodos. Apesar do maior tempo de análise, o método modificado apresenta vantagens tais como: permitir realização de análises simultâneas, baixa complexidade, economia de 57% de solvente e desempenho satisfatório, sendo uma alternativa para pesquisa de sujidades leves nas especiarias estudadas.

Palavras-chave. Especiarias, Contaminação de Alimentos, Química Verde, Microscopia, Estudo de Validação, Metodologia.

ABSTRACT

The study aimed to modify, optimize and evaluate through a comparative study a method for extraction of light filth from turmeric (*Curcuma longa* L.) and paprika (*Capsicum annuum* L.) samples. Ten samples of turmeric and twenty samples of paprika were analyzed. The pretreatment steps of the AOAC methods, 975.49 (16.14.05) for turmeric and 977.25b (16.14.22) for paprika, were modified by adding the Soxhlet extractor. The evaluation of the analytical performance was carried out by comparing the results of the method recoveries. The average recovery for turmeric using the AOAC method was 91.9% for insect fragments and 97.0% for rodent hair. While using modified method, it was 89.6% and 97.4%, respectively. For paprika, using the original method, the average recovery was 93.1% for fragments and 96.5% for hair; and after the modifications, the average was, 92.2% and 93.1%, respectively. Statistical analysis showed that there was no significant difference between the methods. Despite the longer analysis time, the modified method has advantages such as: allowing simultaneous analysis, low complexity, 57% solvent economy and satisfactory performance; proving to be an alternative for light filth research in the studied spices.

Keywords. Spices, Food Contamination, Green Chemistry, Microscopy, Validation Study, Methodology.

*Autor de correspondência/Corresponding author: sonia.prado@ial.sp.gov.br

Recebido/Received: 24.02.2021 - Aceito/Accepted: 30.12.2021

INTRODUÇÃO

Algumas especiarias apresentam atividades nutraceuticas, por exemplo, a cúrcuma possui atividade anti-inflamatória e anticoagulante¹, enquanto a páprica é rica em ácido ascórbico, e carotenoides². Porém, estas especiarias, podem conter matérias estranhas, dentre elas sujidades leves como fragmentos de insetos, insetos inteiros, ácaros, pelos de roedor e bárbulas de aves. Uma forma de verificar a qualidade destas especiarias quanto às sujidades, é através da microscopia alimentar, que pesquisa matérias estranhas, macroscópicas e/ou microscópicas^{3,4}. Os métodos oficiais da AOAC⁵ e recomendados pela RDC ANVISA nº 14/2014⁶ para determinação de sujidades leves em cúrcuma (*Curcuma longa* L.) e páprica (*Capsicum annuum* L.), utilizam volume elevado de solvente orgânico, utilizando para a realização da etapa de lavagem (ou pré-tratamento) das especiarias, cerca de 1.200 mL de isopropanol, (3 etapas de fervura e sucção) gerando elevada quantidade de resíduo químico.

A etapa de pré-tratamento é importante para o método, pois as sujidades leves apresentam caráter lipofílico e a retirada de gorduras da amostra propicia uma melhor extração das matérias estranhas, diminuindo interferentes e perdas⁷.

A Química Verde foi idealizada e definida em 1998 por Anastas e Warner⁸: “A invenção, *design* e aplicação de produtos químicos e processos para reduzir ou eliminar o uso e geração de substâncias perigosas”. Possui 12 princípios, contendo orientações para o desenvolvimento de novos produtos e/ou processos químicos empregando a sustentabilidade. Preza pela busca por meios de reduzir riscos, com intuito de diminuir o impacto de possíveis acidentes⁹ ao meio ambiente.

Levando em conta a Química Verde, a quantidade de isopropanol utilizada para a pesquisa de matérias estranhas deve ser diminuída. Existem outras técnicas para a extração de gordura como a extração por Soxhlet, desenvolvida em 1879 por Franz von Soxhlet com o intuito de determinar gorduras em leite. É empregada em extrações do tipo sólido-líquido e ocorre continuamente¹⁰. A extração por Soxhlet é uma técnica simples para extrações de compostos voláteis, por exemplo, compostos fenólicos¹¹. Como é um sistema de refluxo, que reutiliza o solvente, é econômico, não consumindo muito solvente e nem gerando resíduo químico em grande volume.

Existem poucos trabalhos na área da microscopia de alimentos relacionados à validação de metodologia, sendo que o primeiro desenvolvido no Brasil foi realizado por Dimov et al¹² no qual estudaram a modificação introduzida ao método de extração de sujidades leves em farinha de trigo integral publicado nos métodos analíticos da AOAC⁵. O presente trabalho teve como objetivo modificar, otimizar e avaliar através de estudo comparativo um método para análise de sujidades leves em amostras de cúrcuma e páprica levando em consideração, principalmente, a geração de resíduos químicos.

MATERIAL E MÉTODOS

Material

As amostras foram adquiridas em estabelecimentos comerciais ou coletadas por agentes da Vigilância Sanitária, sendo 10 amostras de cúrcuma (*Curcuma longa* L.) e 20 de páprica (*Capsicum annuum* L.).

Os fragmentos de insetos foram obtidos a partir de asas de baratas *Periplaneta americana* cedidas pelo Instituto Biológico de São Paulo/SP. Os pelos de *Mus musculus* foram cedidos pelo Biotério Geral da Universidade de São Paulo, *campus* de Ribeirão Preto/SP.

A extração de gordura foi realizada utilizando um balão de fundo chato, um extrator Soxhlet, um condensador de refluxo do tipo bola e chapa de aquecimento.

Para a pesquisa de sujidades empregou-se o microscópio estereoscópico Leica S9 D, com zoom de 9:1 e ampliação de 6.1x – 55x (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha).

Métodos

Método padrão da AOAC

As amostras foram analisadas de acordo com os métodos da AOAC⁵ 975.49 (16.14.05) para cúrcuma e 977.25b (16.14.22) para páprica.

Preparação dos padrões para contaminação das amostras

Os padrões de fragmentos de insetos e pelos de roedor foram obtidos de maneira análoga ao descrito por Brickey et al¹³. Os fragmentos de insetos foram cortados com auxílio de bisturi e papel milimetrado, com tamanho aproximado de 0,25 x 0,25 mm e para os pelos de roedor, comprimento aproximado de 2 mm, **Figura 1B (a) e (b)**. A **Figura 1** apresenta o esquema do procedimento otimizado neste estudo.

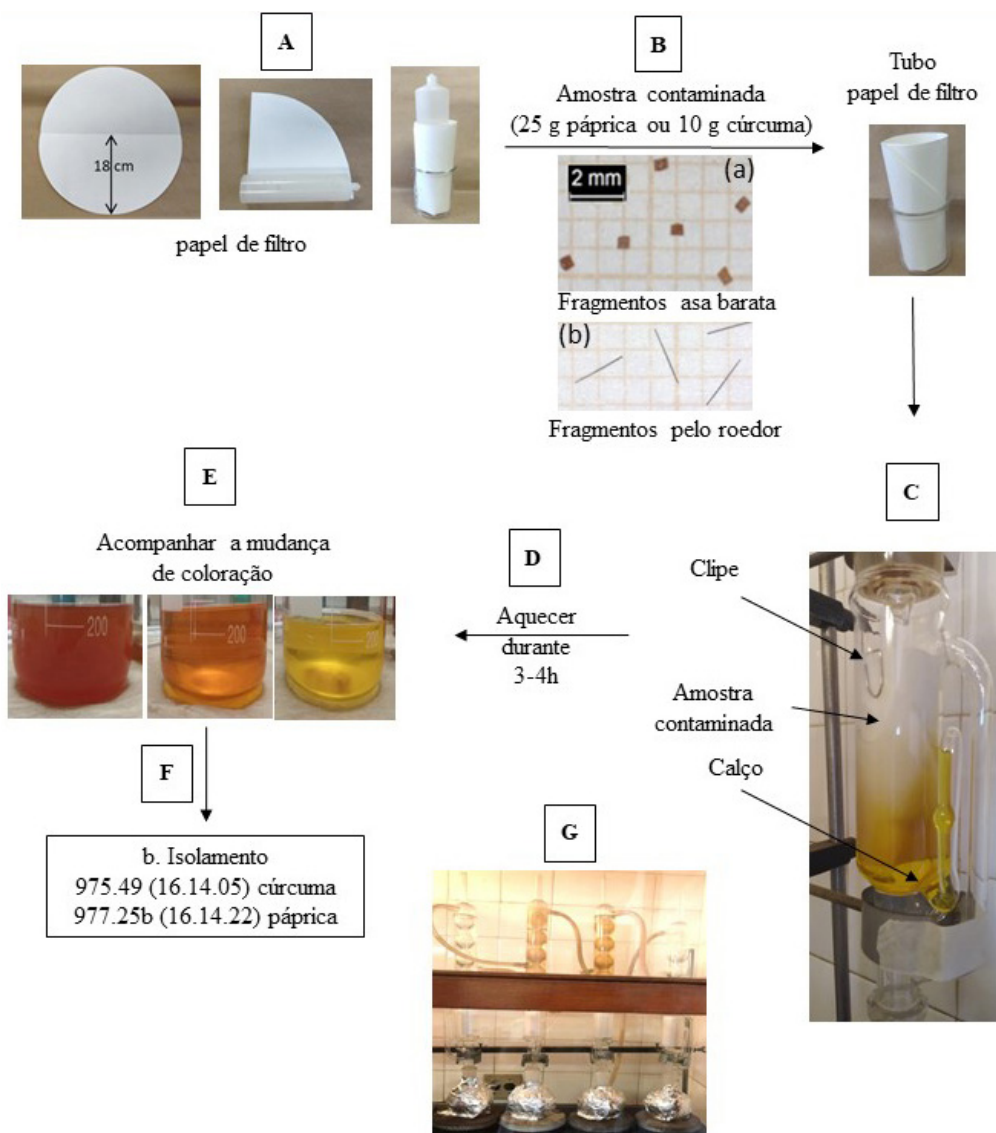


Figura 1. Procedimento do pré-tratamento modificado da AOAC⁵ para análise de sujidades leves em páprica e cúrcuma. A) Moldagem do tubo; B) Pesagem da amostra contaminada com (a) fragmentos de asas de barata e (b) fragmentos de pelos de roedor no tubo de papel; C) Posicionamento da amostra no Soxhlet; D) Aquecimento do sistema; E) Mudança de coloração da amostra de páprica; F) Amostra preparada para próxima fase; G) Sistemas de extração funcionando simultaneamente

A identificação dos pelos foi feita de acordo com Teerink¹⁴, por meio do reconhecimento do padrão medular característico de *Mus musculus*.

Método para extração de sujidades leves modificado e otimizado a partir do método oficial da AOAC⁵

O método de determinação de sujidades leves por flutuação padrão da AOAC⁵ é composto de duas etapas: um pré-tratamento, nas quais as impurezas são desengorduradas e o isolamento e identificação das sujidades realizado no microscópio estereoscópio. Foi realizada modificação somente na parte de pré-tratamento. A etapa de isolamento não sofreu alterações, sendo realizado de acordo com as respectivas metodologias oficiais da AOAC⁵, para a cúrcuma e para a páprica. A etapa modificada, pré-tratamento da amostra, foi realizada utilizando um sistema para a extração de gordura (**Figura 1**).

Foram testadas várias formas para a colocação da amostra no extrator de Soxhlet, como por exemplo, diferentes formas de dobrar o papel de filtro e posições do papel de filtro no Soxhlet, de forma que o solvente ficasse em contato com toda a amostra e a extração da gordura e impurezas lipossolúveis fossem bem-sucedidas.

Procedimento do método modificado

A moldagem (**Figura 1A**) do papel de filtro (diâmetro 33 cm), que foi utilizado para desengordurar a amostra, foi feita usando uma seringa de 60 mL de 13 cm de comprimento e 3 cm de diâmetro. O papel foi dobrado como mostra a **Figura 1A**, depois foi moldado do lado de fora da seringa, ficando com o formato cilíndrico, com papel duplo. Para poder pesar a amostra, este papel duplo foi aberto formando um tubo, depois o tubo de papel foi cortado para ficar no tamanho ideal para encaixar corretamente no extrator Soxhlet (aproximadamente, 10 cm), e foi colocado um clipe para manter o formato do tubo (**Figura 1C**).

As amostras foram pesadas (**Figura 1B**) de acordo com o respectivo método: 25 g de páprica e 10 g de cúrcuma no papel de filtro moldado em formato de tubo. A amostra foi contaminada com os fragmentos de asas de barata cortados em quadrados e fragmentos de pelos de roedor, de acordo com a **Tabela** (procedimento item *Contaminação das amostras*). Depois o tubo foi posicionado (**Figura 1C**), cuidadosamente, no interior do extrator Soxhlet, evitando a obstrução da passagem do líquido do extrator para o balão de fundo chato.

Tabela. Distribuição dos níveis de contaminação para a comparação dos métodos e resultado da recuperação da análise de sujidades leves em cúrcuma e páprica

Contaminação		Recuperação páprica				Recuperação cúrcuma			
		Fragmentos de insetos		Pelos de roedor		Fragmentos de insetos		Pelos de roedor	
FI*	PR**	AOAC ⁵	Modificado	AOAC ⁵	Modificado	AOAC ⁵	Modificado	AOAC ⁵	Modificado
30	10	93,3	90	100	80	100	100	100	100
15	5	93,3	93,3	100	100	93,3	93,3	100	100
15	10	86,7	93,3	100	90	86,7	86,7	80	100
5	15	80	100	93,3	100	100	100	100	86,7
30	5	100	93,3	100	60	90	90	100	100
5	10	100	80	100	100	80	80	100	90
0	15	0	0	93,3	100	0	0	93,3	100
5	5	100	100	100	100	80	60	100	100

Continua na próxima página

Continuação

Contaminação		Recuperação páprica				Recuperação cúrcuma			
		Fragmentos de insetos		Pelos de roedor		Fragmentos de insetos		Pelos de roedor	
FI*	PR**	AOAC ⁵	Modificado	AOAC ⁵	Modificado	AOAC ⁵	Modificado	AOAC ⁵	Modificado
15	15	-	-	-	-	100	100	100	100
30	0	-	-	-	-	96,7	96,7	0	0
5	15	100	80	100	93,3	-	-	-	-
0	5	0	0	100	100	-	-	-	-
30	15	93,3	90	93,3	100	-	-	-	-
15	10	66,7	80	100	80	-	-	-	-
5	0	100	100	0	0	-	-	-	-
5	15	100	100	86,7	93,3	-	-	-	-
30	5	100	96,7	100	100	-	-	-	-
30	15	100	90	93,3	100	-	-	-	-
15	5	86,7	93,3	100	100	-	-	-	-
15	0	86,7	93,3	0	0	-	-	-	-
30	15	96,7	86,7	86,7	80	-	-	-	-
15	10	93,3	100	90	100	-	-	-	-
Média		96	93	94	97	92	90	97	97
DP		5,7	6,9	5,8	6,8	8,2	13,1	6,8	5,2
CV		6,0	7,4	6,1	7,0	8,9	14,6	7,0	5,3

*FI = Fragmentos de insetos

**PR = Pelo de roedor

Utilizou-se um calço (tampa de vidro de balão 1,5 x 3,8 cm) no fundo do extrator de modo que o tubo cônico de papel com a amostra ficou suspenso como mostra a **Figura 1C** e o solvente conseguiu atravessar a amostra antes de ficar parada no tubo; foi adicionado isopropanol no extrator Soxhlet até o líquido encher o reservatório no nível do tubo lateral que leva o solvente ao balão de fundo chato. Depois de escoado o líquido, foi repetido o procedimento mais uma vez e deixado o extrator com mais metade do isopropanol (150 – 170 mL). O balão de fundo chato foi embrulhado com papel alumínio para ajudar a manter o aquecimento do isopropanol.

Ao iniciar o aquecimento (**Figura 1D**), aguardou-se o isopropanol ferver, até início da condensação do solvente no condensador e seu gotejamento na amostra que estava no extrator. O extrator foi preenchido gradualmente com o solvente recém-evaporado proveniente do balão de fundo chato, até que o líquido chegasse ao nível de transbordamento e retornasse ao balão através do tubo lateral. Por isso o conteúdo do papel de filtro foi mantido abaixo do nível do sifão lateral, evitando perdas do sólido. Mais uma vez deu-se início a esta etapa, evaporando o solvente, com os ciclos se repetindo para desengoduramento da amostra, sempre com o solvente puro proveniente da evaporação e condensação.

Este ciclo permaneceu de 3 a 4 horas. Foi acompanhado a mudança de cor no solvente do Soxhlet, a cúrcuma iniciando em um amarelo claro e turvo, finalizando a extração com amarelo claro e límpido; a páprica iniciando com um alaranjado turvo, finalizando com amarelo claro (**Figura 1E**). Foi retirado a amostra do Soxhlet e procedido o isolamento de acordo com os métodos oficiais da AOAC⁵, para a cúrcuma e para a páprica.

Estudo comparativo

Para avaliar o desempenho analítico do método, foi realizado o teste de recuperação: as amostras foram contaminadas com fragmentos de insetos e pelos de roedor, sendo cada amostra analisada pelo método da AOAC⁵ e pelo método modificado. Os resultados foram comparados utilizando estudos estatísticos.

Contaminação das amostras

Os níveis de contaminação utilizados para fragmentos de insetos foram 5, 15 e 30 e para pelos de roedor 5, 10 e 15. A divisão de níveis e amostras para a cúrcuma foi de 3 amostras por nível de contaminação e 1 amostra como branco, utilizando 10 gramas de amostra (**Tabela**) e para a páprica, 6 amostras para cada nível de contaminação e 2 amostras utilizadas como branco, utilizando 25 gramas de amostra (**Tabela**). A contaminação foi realizada da mesma maneira descrita por Glaze e Bryce¹⁵. Após a preparação dos padrões, a contaminação foi feita a partir da contagem das sujidades em uma ponta de espátula contendo gotas de água, ou seja, os fragmentos de insetos e pelos de roedor selecionados foram colocados em uma gota de água, que posteriormente foi adicionada na amostra. Este procedimento foi realizado para auxiliar na transferência das matérias estranhas e evitar a perda dos fragmentos, devido a ação do vento ou por queda dos mesmos, e por serem diminutos ficaria difícil visualizar se a contaminação foi realizada corretamente. Foi realizado o teste cego, o analista que realizou a contagem de sujidades não tinha conhecimento sobre os níveis de contaminação.

Tratamento estatístico

A comparação entre os métodos padrão da AOAC⁵ e o método modificado foi realizado utilizando os resultados das recuperações obtidas nos dois métodos. Foi utilizado o Excel para o cálculo das médias das recuperações, desvio padrão, coeficiente de variação e teste *t* pareado, bi-caudal, com nível de significância, $\alpha = 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Levando em consideração os princípios da Química Verde, a utilização de um grande volume de solvente gerando resíduo químico é uma preocupação que deve ser levada em consideração na escolha de um método de análise. A técnica para determinação de sujidades da AOAC⁵ para a cúrcuma e para a páprica utiliza um grande volume de isopropanol gasto durante a preparação da amostra, gerando, além de um alto custo, resíduo químico em grande quantidade.

O objetivo do pré-tratamento no método da AOAC⁵ é a remoção de gorduras e impurezas lipossolúveis. A extração utilizando extrator de Soxhlet pode ser empregada quando um composto sólido apresenta baixa solubilidade em determinado solvente, mas as impurezas são solúveis. Portanto, a técnica de extração por Soxhlet é propícia para aplicação na determinação de sujidades de cúrcuma e páprica, pois estas especiarias apresentam baixa solubilidade no isopropanol, enquanto as gorduras ou outras impurezas lipossolúveis contidas na fase sólida diluem facilmente no solvente. Além do mais, o extrator Soxhlet economiza solvente, pois o processo de desengorduramento é realizado através do refluxo do solvente extrator, o líquido condensado passa várias vezes puro pela amostra, extraindo as gorduras e impurezas lipossolúveis, que são coletadas no balão de fundo chato (**Figura 1**).

Foi adicionado quantidade de isopropanol no balão de fundo chato de modo que, mesmo com as perdas por evaporação, o sistema de refluxo tivesse solvente suficiente para funcionar até o final da extração. Juntou-se ao balão de fundo chato, pérolas de vidro para evitar a ebulição turbulenta.

O método analítico da AOAC⁵ é constituído por três lavagens, a quente, de 400 mL cada, contabilizados 10 minutos após o início da fervura do solvente. Deste modo, a lavagem via extrator Soxhlet foi finalizada comparando as cores finais após as três lavagens do método oficial AOAC⁵. O tempo da

extração utilizando o extrator de Soxhlet foi de 3 a 4 horas, devido à diferença entre as cores das amostras (**Figura 1E**). A cúrcuma apresentou pouca variação de coloração, iniciando em um amarelo claro e turvo, finalizando a extração com amarelo claro e límpido. No caso da páprica, a alteração de cor foi nítida como se pode verificar na **Figura 1E** cujo processo iniciou-se com um alaranjado turvo, finalizando com amarelo claro, após cada etapa de lavagem da páprica pelo método padrão AOAC⁵.

Foram avaliadas 10 amostras de cúrcuma e 20 de páprica em ambos os métodos, a **Tabela** mostra os resultados da avaliação do desempenho dos métodos da AOAC⁵ padrão e o modificado.

Na análise de cúrcuma, como podemos ver na **Tabela**, as médias de recuperação dos fragmentos de insetos e pelos de roedor foram semelhantes para os métodos, da AOAC⁵ e o método modificado. O teste *t* pareado, bicaudal foi escolhido para avaliar a comparação dos resultados, pois, foi realizado análise em alíquota de uma mesma amostra usando métodos diferentes. O limite utilizado foi valor de $p > 0,05$, ou seja, se p for maior que 0,05 não há diferença significativa entre os métodos. No caso dos fragmentos de insetos, o valor de p encontrado foi de 0,34, e para pelos de roedor o valor de p encontrado foi de 0,91, portanto não houve diferença estatisticamente significativa entre os resultados dos dois métodos para análise microscópica em cúrcuma.

Para a páprica, **Tabela**, tanto as médias de recuperação como os coeficientes de variação dos fragmentos de insetos e pelo de roedor foram semelhantes para ambos os métodos. Para fragmentos de insetos o valor de p encontrado foi de 0,71, e para pelos de roedor o valor de p foi de 0,28, portanto, neste caso também, não houve diferença estatisticamente significativa entre os resultados dos dois métodos para pesquisa de sujidades.

Uma desvantagem do método modificado foi o tempo longo para realização do pré-tratamento, sendo necessário 3 a 4 horas de refluxo, enquanto que a metodologia original da AOAC⁵ leva entre 50 a 60 minutos. Porém, o pré-tratamento modificado permite o acoplamento em sistema, ou seja, realizar mais de uma extração com extrator Soxhlet ao mesmo tempo, interligando os sistemas de refluxo. Deste modo, ao invés de utilizar o tempo de extração somente para uma amostra, mais amostras poderiam ser realizadas no intervalo de tempo, **Figura 1G**. Outra vantagem é que durante o pré-tratamento não é necessário o analista manipular a amostra, pois o extrator de Soxhlet, depois de controlada a temperatura, extrai a gordura sem necessidade de manipulação e exposição do analista ao solvente. No método original da AOAC⁵ o analista precisa manipular a amostra durante o pré-tratamento: adicionando o isopropanol, esperando o tempo de aquecimento e retirando o solvente no final do aquecimento.

A vantagem do método modificado foi com relação a redução do volume de solvente utilizado, aproximadamente 85-87,5% do volume original do pré-tratamento e 56-58% do volume total de isopropanol utilizado no método. Consequentemente, um menor gasto com aquisição de solvente e uma menor geração de resíduo químico. Tal redução respeita o primeiro dos doze princípios da Química Verde, conhecido como “Prevenção”, no qual recomenda evitar a geração de resíduos ao invés de tratamentos e limpezas posteriores após sua formação⁹.

Apesar do fator tempo, a técnica modificada não demonstrou complexidade para execução e mostrou-se como um método satisfatório para pesquisa de sujidades leves nas especiarias estudadas, principalmente devido aos resultados comparados com os da técnica padrão não serem estatisticamente significantes.

CONCLUSÃO

Os valores obtidos nas análises estatísticas demonstraram que os métodos modificados para análise de sujidades em cúrcuma e páprica não apresentaram diferenças significativas quando comparados com os resultados dos métodos padrões, indicando que a modificação feita na etapa de pré-tratamento não alterou o desempenho do método.

Portanto, a substituição da lavagem a quente para o extrator Soxhlet, possibilita a diminuição de custos e de geração de resíduos sem que haja prejuízo na performance do método analítico. Apesar de

requerer maior período de execução, é possível o acoplamento de sistemas com a perspectiva de realizar as lavagens em amostras de cúrcuma e páprica simultaneamente, não havendo necessidade de manipulação da amostra na fase de pré-tratamento.

CONFLITO DE INTERESSE

Os autores declaram não existir conflitos de interesse.

FINANCIAMENTO

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Processo FAPESP: 2018/07009-7).

AGRADECIMENTO

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

1. Ganjre A, Kathariya R, Bagul N, Pawar V. Anti-carcinogenic and anti-bacterial properties of selected spices: implications in oral health. Clin Nutr Res. 2015;4(4):209-15.
<https://doi.org/10.7762/cnr.2015.4.4.209>
2. Mathew AG. Natural food flavors and colorants. 2.ed. John Wiley & Sons; 2017.
3. Atui MB, Castejon MJ, Yamashiro R, De Lucca T, Flinn PW. Condições higiênico-sanitárias da pimenta do reino em pó (*Piper nigrum* L.) com o emprego de duas diferentes técnicas para detecção de sujidades leves. Rev Inst Adolfo Lutz. 2009;68(1):96-101. Disponível em:
<https://periodicos.saude.sp.gov.br/index.php/RIAL/article/view/32748>
4. Correia M, Daros VSMG, Silva RP. Matérias estranhas em canela em pó e páprica em pó, comercializadas no estado de São Paulo. Cienc Tecnol Aliment. 2000;20(3):375-80.
<https://doi.org/10.1590/S0101-20612000000300016>
5. Association of Official Analytical Collaboration (AOAC) International – AOAC International. Extraneous Materials: Isolation. In: Latimer GW, organizador. Official Methods of Analysis of AOAC International; 2016.
6. Ministério da Saúde (BR). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 14, de 28 de março de 2014. Dispõe sobre matérias estranhas macroscópicas e microscópicas em alimentos e bebidas, seus limites de tolerância e dá outras providências. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 31 mar 2014. Seção 1(61):58-61.
7. Dent RG. Elements of filth detection. In: Gorham JR, editor. Principles of food analyses for filth decomposition and foreign matter. 2.ed. Washinton, DC: FDA; 1981.
8. Anastas PT, Warner JC. Green chemistry: theory and practice. New York: Oxford University Press; 1998.
9. Anastas P, Eghbali N. Green chemistry: principles and practice. Chem Soc Rev. 2010;39(1):301-12.
<https://doi.org/10.1039/B918763B>

10. Luque de Castro MD, Priego-Capote F. Soxhlet extraction: past and present panacea. J Chromatogr A. 2010;1217(16):2383-9.
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.11.027>
11. Alara OR, Abdurahman NH, Ukaegbu CI. Soxhlet extraction of phenolic compounds from Vernonia cinerea leaves and its antioxidant activity. J Appl Res Med Aromat Plants. 2018;11:12-7.
<https://doi.org/10.1016/j.jarmp.2018.07.003>
12. Dimov MN, Silveira VR, Elian SN, Penteado MVC. Extração de sujidades leves em farinha de trigo integral: validação de metodologia. Rev Inst Adolfo Lutz. 2004;63(1):91-6. Disponível em:
<https://periodicos.saude.sp.gov.br/index.php/RIAL/article/view/34799>
13. Brickey PM, Gecan JS, Thrasher JJ, Eisenberg WV. Notes on Microanalytical Techniques in the Analysis of Foods for Extraneous Materials. J Assoc Off Anal Chem. 1968;51(4):872-6.
<https://doi.org/10.1093/jaoac/51.4.872>
14. Teerink BJ. Hair of West-European Mammals. Cambridge (UK): Cambridge University Press; 1991.
15. Glaze LE, Bryce, JR. Extraction of light filth from whole wheat flour, flotation method: collaborative study. J AOAC Int. 1994;77(5):1150-2.

