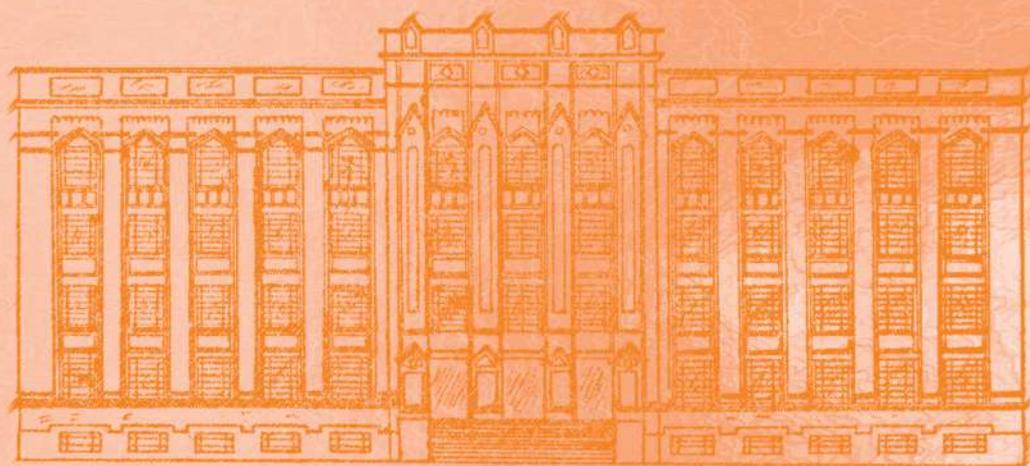


REVISTA DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ

ISSN 0073-9855

RIALA6



Volume 63 número 1, 2004



GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO
SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE



GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO
SECRETARIA DE ESTADO DE SAÚDE
COORDENAÇÃO DOS INSTITUTOS DE PESQUISA
INSTITUTO ADOLFO LUTZ

**REVISTA
DO
INSTITUTO ADOLFO LUTZ**

Volume 63 número 1, 2004

ISSN 0073-9855

Janeiro - Junho - 2004

INSTITUTO ADOLFO LUTZ

Diretor Responsável

Carlos Adalberto de Camargo Sannazzaro
Diretor Geral do Instituto Adolfo Lutz

Comissão de Redação

Janete Alaburda – Presidente
Cecília Cristina Marques dos Santos – Secretária
Ângela Cristina Ghilardi
Cristina Adelaide Figueiredo
Cristina Takami Kanamura
Luz Marina Trujillo
Marina Yoshiê Sakamoto Maeda
Raquel dos Anjos Fazioli
Sabria Aued Pimentel
Thaïs Valéria Milanez – Membro Convidado
Claydes de Quadros Zamboni – Membro Emérito

Setor de Publicações

Rocely Aparecida de Souza Bueno



REVISTA DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ
(Secretaria de Estado de Saúde)
São Paulo, SP – Brasil, 1941

1941-2004,
2004, 63 (1)

ISSN 0073-9855
RIALA 6

CDD₁₈ 614.07205

(*) ASSOCIAÇÃO PAULISTA DE BIBLIOTECÁRIOS. Grupo de Bibliotecários Biomédicos.
Normas para catalogação de publicações seriadas especializadas, São Paulo, Ed. Polígono, 1072.

Os artigos publicados na REVISTA DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ são indexados por Abstracts on Hygiene and Communicable Diseases, AGRINDEX., Analytical Abstracts, Bibliografia Brasileira de Medicina Veterinária e Zootécnica, Biological Abstracts, Chemical Abstracts, Food Science and Technology Abstracts, Index Medicus Latino-americano, LILACS, SP: Saúde Pública, Microbiology Abstracts, Sumários Correntes Brasileiros, Toxicology Abstracts, Tropical Diseases Bulletin, Virology Abstracts e outros.

Acesso on line / on line access. Texto integral / full text. <http://www.ial.sp.gov.br>

Endereço / Adress
Biblioteca do Instituto Adolfo Lutz
Av. Dr. Arnaldo, 355 – São Paulo / SP - Brasil
01246-902
Tel/Fax: (11) 3082-9939
Email: rial@ial.sp.gov.br

CARTA AO LEITOR

A Revista do Instituto Adolfo Lutz, criada em 1940, publicada semestral e ininterruptamente, tem como objetivo principal divulgar informações científicas nas áreas de interesse da Saúde Pública. A partir de 2001, esta Revista conta com a publicação dos resumos dos Encontros do Instituto Adolfo Lutz e da Pós-Graduação da Coordenação dos Institutos de Pesquisas (CIP/SES/SP), na forma de suplementos.

Todo esse sucesso tem sido possível devido ao esforço conjunto da Comissão Editorial, Setor de Publicações/Diretoria de Serviços Básicos e Diretoria Geral do Instituto Adolfo Lutz, bem como pela colaboração de todos os funcionários deste Instituto e pesquisadores externos.

Visando um aperfeiçoamento contínuo de nosso trabalho para melhorar a qualidade da divulgação científica, estamos editando nossa Revista num novo formato, alteramos as normas de publicação que deverão ser implantadas a partir de 2005 e que estão publicadas no final deste fascículo.

Comissão de Redação das Publicações Oficiais do
Instituto Adolfo Lutz

SUMÁRIO/CONTENTS

Artigo de Revisão/ Review

- 967 Testes *in vitro* como alternativa aos testes *in vivo* de Draize**
In vitro tests used as an alternative to Draize *in vivo* tests
Áurea Silveira CRUZ; Maria Luisa BARBOSA; Terezinha de Jesus Andreoli PINTO 1-9

Artigo/Article

- 968 Validação de metodologia para a determinação de ácido fólico em margarina enriquecida e avaliação da estabilidade da vitamina durante estocagem**
Validation of methodology for determination of folic acid enriched margarine and evaluation of the stability of the vitamin during stockage
Juliana. A. LIMA; Rodrigo R. CATHARINO; Helena T. GODOY 10-14
- 969 Avaliação intralaboratorial e otimização de método para determinação de tricotecenos em milho por cromatografia a gás-espectrometria de massas**
Intralaboratorial evaluation and optimization of a method for determination of trichothecenes in corn by gas chromatography-mass spectrometry
Thaís Valéria MILANEZ; Lúcia M. VALENTE SOARES; Gisleine Gomes BAPTISTA 15-23
- 970 Monitoramento de resíduos de agrotóxicos em leite consumido pela população do estado de São Paulo, Brasil, 2000 e 2002**
Monitoring of pesticide residues in milk consumed by the population of the State of São Paulo, Brazil, 2000 and 2002
Vera R.R LEMES; Tereza A.KUSSUMI; Sônia O B.ROCHA 24-30
- 971 Resíduos de pentaclorofenol em água de consumo de uma região próxima a madeireira**
Pentachlorophenol residues in drinking water from an area close to a lumberyard.
Tereza A. KUSSUMI; Vera R.R. LEMES; Sonia B. ROCHA; Heloisa H.C.BARRETTO 31-34
- 972 Validação do método espectrofotométrico para quantificação do aminoácido hidroxiprolina em conservas de carne**
Spectrophotometric method validation for hydroxyproline amino acid determination in canned meat
Jussara C. de M. DELLA TORRE; Jaim LICHTIG; Nelson J. BERAQUET 35-42
- 973 Otimização da determinação da aflatoxina M₁ em leite, utilizando coluna de imunoafinidade e cromatografia em camada delgada**
Performance of determination for Aflatoxin M₁ in milk by immunoaffinity column and thin layer chromatography
Luzia SHUNDO; Valter RUVIERI, Sandra A. NAVAS; Myrna SABINO 43-48

- 974 Aceitabilidade sensorial de suco de manga adicionado de polpa de banana (*Musa sp*) verde**
Sensory Acceptance of mango juice added with green banana (*Musa sp*) pulp
Magda Sinigallia TAIPINA; Victor Haim COHEN; Nélide Lucia DEL MASTRO; Maria Auxiliadora de Brito RODAS; Jussara Carvalho de Moura DELLA TORRE 49-55
- 975 Determinação de metais presentes em corantes e pigmentos utilizados em embalagens para alimentos**
Determination of metals present in dyes and pigments used in food packaging.
Odair ZENEBON; Lúcia Tieco Fukushima MURATA; Neus Pascuet; Maria Rosa da Silva de ALCÂNTARA; Maria Cecília Depieri NUNES; Eliani Rosa RIBEIRO; Paulo TIGLEA 56-62
- 976 Comportamento do óleo de milho em frituras**
Functioning of corn oil in frying processes
Neuza JORGE; Bruno Bellei Prazeres SOARES 63-69
- 977 Descarte de resíduos de laboratório contendo metais pesados (Hg, Pb, Cd) por adsorção em hidróxido de ferro (III)**
Disposal of laboratory waste containing heavy metals (Hg, Pb, Cd) by adsorption on iron (III) hydroxide
Jaim LICHTIG; Maria de Fátima H. CARVALHO; Carmen S. KIRA; Franca D. MAIO 70-72
- 978 Testes rápidos utilizados na avaliação da qualidade de óleos e gorduras de fritura**
Rapid tests for evaluating the quality of fats and oils used in frying process
Maria do Rosário Vigea LOPES; Neuza JORGE 73-79
- 979 Avaliação da qualidade sensorial de batata frita, óleo de soja e gordura parcialmente hidrogenada de soja em tempos de fritura variáveis¹**
Sensory quality evaluation of French fries, soy oil, and partially hydrogenated soy fat at variable length of frying time
Elaine Abrão Assef SANIBAL; Maria Auxiliadora de Brito RODAS; Jussara Carvalho de Moura DELLA TORRE; Jorge MANCINI FILHO 80-86
- 980 Chumbo em alimentos produzidos no entorno de uma empresa recicladora de baterias no município de Bauru, estado de São Paulo, Brasil**
Lead in food grown in the surroundings of a recycling battery company in the county of Bauru, state of São Paulo, Brazil
Isaura Akemi OKADA; Maria Cristina DURAN; Carmen Silvia KIRA; Franca Durante de MAIO; Alice Momoyo SAKUMA, Paulo TIGLEA; PEREIRA, M.L.S 87-90
- 981 Extração de sujidades leves em farinha de trigo integral: validação de metodologia**
Extraction of light filth from whole wheat flour: in-house study
Márcia Nogueira DIMOV; Vivian Regina SILVEIRA; Silvia Nagib ELIAN; Marilene De Vuono Camargo PENTEADO 91-96
- 982 Infecção simultânea por Dengue 1 e 3 em Itapevi, SP, Brasil**
Concurrent infection by Dengue 1 and 3 in Itapevi, SP, Brazil
Iray Maria ROCCO; Fabíola Maiumi OSHIRO; Cecília Luiza Simões SANTOS 97-99
- 983 Citologia de base líquida associada à captura de híbridos para DNA-HPV pode otimizar a qualidade diagnóstica do método de Papanicolaou?**
Could liquid based cytology associated with hybrid capture II assay for HPV-DNA optimize the cytological diagnosis?
Maria Lúcia UTAGAWA; Sônia Maria Miranda PEREIRA; Adhemar LONGATTO FILHO; Cecília Roteli-MARTINS; Luciana Silva AGUIAR; Janaína Érika PITTOLI; Celso DI LORETO; Marina Yoshiê Sakamoto MAEDA; Laura MARTINS; Janice O. GALVANE; Kari SYRJÄNEN 100-103
- 984 Avaliação da qualidade de Albumina 20% e Imunoglobulina G 5% produzidas pelo método de cromatografia líquida, no período de 5 anos**
Quality evaluation of Albumin 20% and Immunoglobulin G 5% by means of liquid chromatography method: data from five years period-study
KimiYuki TANAKA; Eiko SAWATANI; Emília M. SHIGUEOKA; Georgia A. DIAS; Fernando ARASHIRO 104-110

985	Avaliação dos testes empregados no diagnóstico laboratorial da tuberculose pulmonar em pacientes HIV positivos Assessment of the laboratory tests employed for pulmonary tuberculosis diagnosis in HIV positive patients. Andréa G. V. COELHO; Liliana A. ZAMARIOLI; Clemira M. P. V. REIS; Teresa Á. R. FIGUEIREDO	111-115
986	Atuação do laboratório de Saúde Pública na elucidação do surto de diarreia causado por <i>Cyclospora cayetanensis</i> no município de General Salgado - SP. Public Health Laboratory Action For Elucidation of Diarrhea Outbreak by <i>Cyclospora cayetanensis</i> in General Salgado Municipality , SP. Rosa Maria ZINI; Cecília Cristina M. SANTOS; Ivete Aparecida Z. C. ALMEIDA; Jacqueline T. M. PERES; Cristiano C.A. MARQUES	116-121

RESUMOS DE TESES E DISSERTAÇÕES

Evaluation of dithiocarbamate and ethylenethiourea (ETU) residues in fruit and their implication for public health. Lemes, V. R. R.	122
Contaminação por matérias estranhas e microrganismos em farináceos vendidos a granel e embalados em Ribeirão Preto-SP Prado, S.P.T	122
Estudo comparativo entre métodos analíticos tradicionais e testes rápidos utilizados na avaliação da qualidade dos óleos e gorduras de frituras. Lopes, M. R. V.	123
Seed characterization of six species of the genus <i>Theobroma</i> as compared to that of <i>Theobroma cacao</i> L. Martini, M. H.	124
Bioluminescence method for high-throughput screening of compounds against <i>Mycobacterium tuberculosis</i>. Sato, D. N.	125
Intestinal carriage of yeasts by children in hospitalar setting. Talarico, C.	125
Contribution to the immunodiagnosis of human leptospirosis: emphasis to monoclonal antibodies. Ribeiro, M. A	126
Experimentação Animal: princípios éticos e legislação. Sarmiento, E. O	127

Testes *in vitro* como alternativa aos testes *in vivo* de Draize

In vitro tests used as an alternative to Draize *in vivo* tests

RIALA6/967

Áurea Silveira CRUZ^{1*}, Maria Luisa BARBOSA, Terezinha de Jesus Andreoli PINTO²

* Endereço para correspondência: Instituto Adolfo Lutz Av. Dr. Arnaldo, 355 CEP. 01246-902 – São Paulo -SP - Seção de Culturas Celulares – Virologia - 1- Instituto Adolfo Lutz - 2- Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo - e-mail auracruz@ial.sp.gov.br

Recebido: 19/09/2003 – Aceito para publicação: 01/04/2004

RESUMO

Os procedimentos descritos por Draize deram origem aos testes de irritação ocular e cutânea adotados internacionalmente para avaliar produtos e substâncias. Entretanto, eles são criticados por motivos éticos, devido à crueldade com os animais, mesmo após diferentes modificações terem sido propostas nos protocolos originais. Metodologias alternativas têm sido estudadas para avaliar a toxicidade de produtos usados em seres humanos. Entre as mais citadas encontram-se as que utilizam organismos inferiores, células vivas de mamíferos, sistemas organotípicos e substratos inertes, além de bancos de dados informatizados e programas que avaliam a toxicidade pela determinação de relação estrutura-atividade. Os métodos utilizando células vivas têm sido muito utilizados para prever com segurança a irritação, contribuindo para a redução do número de animais utilizados nos testes *in vivo*. Até o momento, não existem métodos validados para substituir os ensaios de irritação ocular e cutânea, mas somente para avaliar substâncias corrosivas.

Palavras-Chave. teste de Draize, irritação ocular, irritação cutânea, citotoxicidade, testes *in vitro*

ABSTRACT

The procedures described by Draize have generated both eye and cutaneous irritation tests, which have been internationally adopted to evaluate products and substances. However, they have been criticized for ethical reasons, due to their cruelty towards animals, even after the proposal of different modifications in the original methods. Thus, alternative techniques have been studied to evaluate the toxicity of products used for human beings. Those, which utilize inferior organisms, mammal living cells, organotypic systems and inert substances, besides computerized databanks and programs that evaluate toxicity by determining the structure-activity relationship. Methods using living cells have been widely used to safety predict irritation, what contributes to the reduction of animals use for *in vivo* tests. So far, there are no validated methods to replace the ocular and cutaneous irritation assays, except for the evaluation of corrosive substances.

Key Words. Draize tests, ocular irritation, cutaneous irritation, cytotoxicity, *in vitro* tests.

INTRODUÇÃO

O potencial irritante de várias substâncias e produtos de uso humano vem sendo avaliado, desde a década de 40, em experimentos que utilizam animais de laboratório. Alguns dos ensaios adotados para tal finalidade, denominados testes de irritação ocular ou cutânea, ainda hoje adotados pelos órgãos oficiais, foram inicialmente descritos por Draize.

Procedimentos severos que afetam a segurança dos animais resultam em críticas e discussões por parte de entidades não governamentais. Métodos alternativos vêm sendo investigados para tentar minimizar este conflito.

TESTES *IN VIVO*

Desde a antiguidade, várias espécies animais foram utilizadas como modelos vivos, em estudos de situações de risco, principalmente do gás mostarda empregado durante a guerra, e no desenvolvimento da indústria farmacêutica no século XX. O efeito prejudicial para os olhos, ocasionado por algumas substâncias, resultou no desenvolvimento da toxicologia ocular que utilizava principalmente o coelho, como modelo de estudo, para as avaliações de irritação⁹⁹.

No início da década de 40, Jonas S. Friendenwald propôs a graduação de níveis de severidade, dos diferentes

componentes da irritação ocular, em escalas numéricas. Este método foi modificado e adotado para avaliar quantitativamente substâncias perigosas, bem como garantir a segurança dos produtos de aplicação tópica que eram aplicados sobre pele e mucosas ocular e peniana de coelhos albinos da raça Nova Zelândia. Os coelhos em relação aos outros animais possuem pele permeável, olhos grandes com anatomia e fisiologia bem descrita, são fáceis de manusear, apresentam vantagens no aspecto econômico, além de fácil aquisição^{35,99}.

O teste de irritação cutânea, seja do tipo primária ou cumulativa, estabelece graduações para reações como edema e eritema. O teste de irritação ocular estabelece graduações para as reações observadas na córnea, íris e conjuntiva. Os protocolos definem o volume, forma de administração, intervalos de observação e número de animais a serem utilizados. Estes ensaios, denominados testes de Draize, foram adotados por muitos laboratórios e tornaram-se a base para os métodos oficiais de avaliação de irritação dérmica e ocular. Aplicam-se a produtos químicos, de higiene, cosméticos, perfumes e correlatos, que podem ser, conforme resultados obtidos, classificados em irritantes e não irritantes^{2,35,70}.

Kay e Calandra⁵⁴ propuseram modificações quanto ao critério de avaliação, estabelecendo oito classificações para o potencial irritante, com graduações intermediárias entre não irritante e maximamente irritante, ao contrário de Draize que estabeleceu somente dois tipos de classificação, irritante e não irritante.

O conceito dos três Rs (3 Rs), *reduction, refinement e replacement*, para o uso de animais, em ensaios ou no desenvolvimento de pesquisas, foi definido após a publicação do livro "The Principle of Humane Experimental Technique" de Russel e Burch em 1959. Este conceito tem como objetivo a redução do número de animais, o refinamento dos métodos e a reposição ou troca destes métodos por ensaios substitutos ou alternativos *in vitro*. Com a publicação do livro de Singer em 1975, sobre a ética no tratamento dos animais, o teste ocular de Draize tornou-se alvo para as críticas das sociedades protetoras dos animais⁹⁹.

Diferentes modificações vêm sendo propostas por pesquisadores de todo mundo envolvendo desde o número de animais, quantidade do produto aplicado, tempo de irrigação após aplicação do produto, período de observação, graduação e interpretação dos resultados. As mais aceitas são as que não alteram a precisão dos resultados obtidos nos ensaios de irritação ocular e cutânea⁹⁹.

A modificação mais citada refere-se ao número de animais, originalmente nove e atualmente nos protocolos oficiais variando de três a seis coelhos, a exemplo dos protocolos da Organization for Economic Cooperation and Development (OECD), da Food and Drug Administration (FDA) e do Ministério da Saúde do Japão^{70,99}.

Springer et al.⁸⁶ analisaram a redução do número de animais praticada no teste de irritação ocular, por diferentes entidades internacionais e sugeriram que o uso de seis animais

evita, na maioria dos casos, resultados falsos positivos ou negativos, além de muitas vezes eliminar a necessidade de uma segunda bateria de testes. Estas recomendações foram adotadas pelos órgãos americanos, enquanto que os europeus recomendam o emprego de até três animais, dependendo do tipo de produto a ser avaliado.

Diversos estudos sugerem diminuir a quantidade do produto a ser aplicado no olho do animal, passando de 0,1 mL como no método de Draize para 0,01 mL, sem alterar a sensibilidade do método. A redução do volume sugerida visa, ainda, tornar o ensaio mais próximo do emprego do produto, passando a refletir o modo de uso real em humanos^{43,45}.

Roggeband et al.⁷⁴, após avaliarem detergentes líquidos nas mesmas condições, em voluntários humanos e coelhos, confirmaram que o teste de irritação ocular com baixo volume em coelhos permite prever o perigo de irritação ocular no ser humano, pois a sensibilidade geralmente é maior que a observada no homem.

Das propostas sugeridas para diminuir o incômodo causado pelos produtos, nos animais experimentais, encontra-se ainda, a recomendação do uso de anestésicos, embora estes possam contribuir para alterar a permeabilidade da córnea^{42,44,82}.

O teste de irritação dérmica vem sendo modificado por diferentes agências reguladoras, porém sua essência continua sendo a aplicação do produto sob oclusão na pele dorsal do coelho, por período de 24 horas. Após, a retirada do produto, os animais são observados por intervalos de 24 e 72 horas. A modificação mais citada e adotada como oficial pela OECD, é o tempo de exposição da amostra que passou a ser de quatro horas, além do número reduzido de animais que passou de seis para pelo menos três coelhos. As diferentes variações no procedimento formam a base da classificação de corrosão ou irritação, dependendo da severidade da reação da pele, sua persistência e reversibilidade⁷³.

Mesmo com algumas modificações já estabelecidas, o teste de Draize continua sendo muito combatido por organizações não governamentais de proteção animal. Os cientistas não têm medido esforços para que haja uma harmonização dos ensaios e a implementação dos 3Rs, nas instituições de pesquisa e educacionais dos países da Europa⁹⁷.

A FDA já aceita sem a necessidade de correlação com teste *in vivo*, o teste *in vitro* Limulus amebócito lisado (LAL) para detecção de endotoxinas bacterianas nos produtos injetáveis de uso humano e animal, como substituto do teste de pirogênio em coelhos. Os testes de irritação ocular e cutânea de Draize, para a FDA, continuam sendo considerados os mais confiáveis para avaliar a segurança das substâncias introduzidas no olho ou aplicadas ao seu redor, assim como aquelas aplicadas na pele. Já a União Européia, em suas emendas diretas, estabelece prazos para o término do uso de animais nos ensaios de produtos acabados, ingredientes ou combinação de ingredientes. Entretanto, estes prazos poderão ser adiados se os métodos alternativos não forem validados pelo European Center for Validation of Alternatives Methods (ECVAM)³⁸.

TESTES *IN VITRO*

O questionamento quanto ao uso de animais de laboratório, na avaliação de risco dos produtos de uso humano, resultou em vários estudos a partir da década de 60, direcionados a metodologias que utilizam tecidos e células vivas de mamíferos, organismos inferiores e substratos inertes²³. Bancos de dados informatizados e programas que avaliam a toxicidade pela determinação de relação estrutura-atividade, também foram desenvolvidos, por exemplo o Quantitation Structure Activity Relationship (QSAR), cujo protocolo relaciona a estrutura físico-química de um componente com sua toxicidade^{5,7,11,31}. Estes estudos têm por finalidade principal obter metodologias rápidas, baratas, de fácil execução e reprodutibilidade que possam ser padronizadas e validadas, situação imprescindível para que os métodos *in vitro* alcancem a aceitação científica internacional.

As metodologias que utilizam tecidos e células vivas são as mais empregadas, pois a intrínseca complexidade celular é mantida. As células utilizadas podem ser de vários tecidos, tanto de origem humana quanto animal, sendo que a sobrevivência e/ou proliferação celular podem ser avaliadas por contagem do número de células ou pelo uso de corantes vitais. A incorporação de radioisótopos, formação de colônias, aderência celular, produtos de metabolismo entre outros são parâmetros que também podem ser utilizados^{33,37,50,57,64,69,71,80,81}.

A verificação da viabilidade celular pelo uso de corantes vitais é um dos parâmetros empregados e dentre os mais citados na literatura encontramos o brometo de 3 (4,5-dimetiltiazol-2-il) 2,5 difeniltetrazólio (MTT) e o vermelho neutro (3-amino-7-dimethylamino-2-methylphenazine hydrochloride). O MTT é um sal amarelo solúvel, metabolizado pela succinato desidrogenase presente na mitocôndria, transformando-se em um produto azul insolúvel. O vermelho neutro em pH fisiológico passa facilmente através da membrana plasmática e se concentra no interior dos lisossomos. A perda deste gradiente de pH por mortalidade/morbididade da célula ou a perda da permeabilidade da membrana inibe a incorporação destes corantes⁴⁸.

Uma das primeiras metodologias descritas para avaliação *in vitro* foi sugerida por Rosenbluth et al.⁷⁷, que propuseram o teste da biocompatibilidade para avaliar plásticos empregados em artigos médico-hospitalares. Neste ensaio os materiais eram colocados diretamente sobre uma monocamada de células de mamífero e após 24 horas estas células eram observadas, quanto à presença ou não de algum efeito tóxico. No mesmo ano, Guess et al.⁴⁷ descreveram o método de difusão em ágar, onde a monocamada celular era sobreposta por uma camada de ágar e os materiais a serem testados eram colocados sobre esta camada evitando assim, os problemas apresentados quando colocados diretamente em contato com a monocamada celular. Este método é citado na American Society for Testing and Materials (ASTM), Farmacopéia Americana e pelas normas da International Organization for Standardization (ISO) para avaliação de polímeros de uso médico^{1,51,90,91,92,93,94}.

Comber e Castelli²⁸ compararam o teste de irritação ocular

de Draize e o método de difusão em ágar utilizado como alternativo. Algumas modificações no protocolo original do método *in vitro* foram introduzidas, a lise em relação à toxicidade foi definida por um método planimétrico, onde o tamanho da área das células mortas é desenhado em papel, que após ser pesado pode fornecer quatro classificações diferentes. Neste estudo, os resultados foram agrupados em duas classes, designadas como não irritante e irritante e a correlação observada entre os dois métodos foi de 86% de concordância. O método de difusão em ágar, segundo os autores pode ser incluído na bateria de testes para avaliar o potencial de irritação dos produtos cosméticos.

No início da década de 80, Mosmann⁶³, Borenfreud e Puerner¹⁵ descreveram outra técnica para quantidades elevadas de amostras. Nesta técnica, as células são semeadas em microplacas e a viabilidade celular é avaliada por métodos colorimétricos, utilizando a redução do MTT ou a incorporação do vermelho neutro, os quais são quantificados por espectrofotometria. Esta técnica é rápida e quantitativa, pois permite avaliar várias concentrações do produto e calcular a concentração que causa 50% de morte celular. Desde então, vários estudos comparando o uso do vermelho neutro com o MTT ou estudos utilizando um destes corantes têm sido realizados para a determinação do índice médio de citotoxicidade de muitas substâncias^{3,4,14,16,49,68,88}.

Chiba et al.²⁵ desenvolveram um estudo, onde analisaram na mesma célula a viabilidade e o crescimento celular usando simultaneamente vermelho neutro, MTT e cristal violeta. O método pode ser útil na avaliação da citotoxicidade de substâncias mediadas por diferentes mecanismos, levando a diferentes respostas e ainda, o uso de vários tipos de avaliação evitaria resultados duvidosos. Estudos comparando simultaneamente a viabilidade e o crescimento celular utilizando os corantes vermelho neutro e o *amino black* respectivamente, mostraram boa correlação com a combinação dos dois métodos no mesmo ensaio, resultando em informações tanto sobre a viabilidade como sobre o número de células²⁶.

Com o propósito de se encontrar um protocolo que substituísse os ensaios *in vivo* vários outros modelos foram desenvolvidos, dentre eles os chamados organotípicos, os quais empregam órgãos isolados do animal, mantidos por curto período de tempo *in vitro* preservando suas funções fisiológicas e bioquímicas. Os mais conhecidos são ensaios com olho isolado de coelho (IRE), olho isolado de galinha (CEET), opacidade e permeabilidade de córnea bovina (BCOP) e cristalino bovino. Todos estes métodos foram elaborados com o propósito de selecionar e avaliar o potencial irritante de várias substâncias, antes de serem aplicadas no método tradicional de irritação ocular de Draize²².

No estudo realizado por Chamberlain et al.²², concluiu-se que os métodos de olhos isolados e o BCOP podem ser usados para seleção prévia de substâncias severamente irritantes, antes da sua avaliação *in vivo*. O BCOP é o mais recente dentre os ensaios organotípicos e, apesar de apresentar

uma boa correlação com os ensaios *in vivo*, seu uso como metodologia seletiva deve ser prudente, devido aos resultados falso-negativos apresentados. Este aspecto foi discutido por outro autor que sugere ajustes no protocolo⁴¹. Cooper et al.²⁹ demonstraram que o BCOP é menos sensível que o IRE, talvez devido ao maior número de camadas epiteliais no olho do boi em relação ao encontrado na córnea do coelho.

Jester et al.⁵³, em seus estudos sobre os mecanismos de lesão da córnea, avaliaram o processo de irritação ocular utilizando córnea de coelho cultivada *in vitro*. O modelo apresentou boa correlação com os testes *in vivo* e facilitou o conhecimento dos mecanismos de danos na córnea causados por substâncias promotoras de diferentes graus de irritação. Este conhecimento pode ainda, ser aplicado no desenvolvimento de modelos alternativos para avaliação de irritação ocular.

Sistemas organotópicos, utilizando membrana córion-alantóica de ovos embrionados de galinha, resultaram em dois tipos de protocolos, o CAMVA (teste de membrana vascular córion-alantóica) desenvolvido por pesquisadores americanos que usavam ovos embrionados de 10 a 14 dias e o HET-CAM (teste de membrana córion-alantóica de ovo de galinha) desenvolvido por pesquisadores alemães com ovos embrionados de nove dias. Estes protocolos foram baseados na observação da vascularização da membrana córion-alantóica que é praticamente similar àquela dos tecidos da mucosa ocular. No CAMVA os parâmetros de avaliação são os efeitos vasculares como hemorragia, no HET-CAM além destes efeitos vasculares observa-se a desnaturação de proteínas⁸⁵.

Os estudos realizados por Spielmann et al.⁸⁵ mostram que o protocolo do HET-CAM prediz melhor o método *in vivo*, para avaliar agentes tensoativos ou formulações baseadas nestes compostos, enquanto o CAMVA tem melhor desempenho com formulações alcoólicas. Estes modelos muitas vezes geram polêmica, já que em alguns países os ovos embrionários de 14 dias são incluídos na categoria de experimentos *in vivo*⁶.

Métodos baseados nas funções celulares são também utilizados, tais como o teste da passagem de fluoresceína e o teste da medida do metabolismo celular. O teste da passagem de fluoresceína reflete os aspectos funcionais das células epiteliais como barreira, nas regiões das ligações intercelulares e na integridade da membrana plasmática. Neste teste, as linhagens celulares mais utilizadas são a MDCK (cultura de células de rim de cachorro) e a NHEK (cultura de células de queratinócitos humanos) porque mantêm estas funções *in vitro*. O teste do metabolismo celular é realizado por meio de um aparelho que detecta alterações metabólicas celulares semelhantes à resposta local, das células oculares, frente aos produtos irritantes. Muitas linhagens celulares têm sido usadas para esta medida de atividade metabólica. Os estudos realizados por Botham et al.¹⁷ indicam que estes testes podem ser utilizados como substitutos do teste de irritação ocular de Draize para irritantes severos e que respondem melhor a determinados tipos de formulações. Os autores sugerem a

necessidade de mais estudos intra e interlaboratoriais para avaliar a reprodutibilidade destes métodos.

Clothier et al.²⁷ desenvolveram um protocolo utilizando o teste de passagem de fluoresceína combinado com o método de viabilidade celular utilizando o corante azul de alamar. O objetivo foi avaliar a resposta irritante e o perfil de recuperação do dano ocasionado nas células, simulando os mesmos acontecimentos e os mesmos valores observados no protocolo de Draize. A combinação dos efeitos iniciais e a taxa de recuperação permitiram discriminar o potencial de irritação das substâncias e a sua concentração.

Como alternativo ao teste de irritação ocular de Draize, a In Vitro International, Inc (USA) desenvolveu o Sistema Eytex[®] que consiste de múltiplos protocolos, cada qual específico para um tipo de amostra. Este sistema é baseado nas respostas físicas e bioquímicas de um conjunto de macromoléculas, a qual consiste em uma matrix protéica, que produz turbidez similar à opacidade da córnea em resposta a irritantes químicos. Estudos revelam que a maior vantagem deste sistema é a habilidade de testar vários tipos físicos de materiais, sendo também rápido e barato, apresenta ainda, boa correlação com o método de Draize, segundo os resultados obtidos em vários laboratórios americanos^{21,32,46}.

Sistemas alternativos como o Microtox[®] estão disponíveis comercialmente. Bactérias luminescentes são usadas como alvo e a medida da redução de luminosidade como indicador de toxicidade. Este método é proposto como pré-triagem para alguns produtos e para outros mostra-se inadequado³².

Nos testes de pele-equivalente que são modelos de culturas tridimensionais de fibroblastos e queratinócitos humanos, vários parâmetros podem ser observados, tais como: viabilidade com MTT ou vermelho neutro, PGE2 (prostaglandina) como medida de resposta inflamatória e dosagem de lactato desidrogenase (LDH). Este tecido construído *in vitro* é estratificado, mas não corneificado e por isso se assemelha ao epitélio humano da córnea ou conjuntiva. Foi demonstrada ainda, uma boa correlação com os ensaios de irritação *in vivo*^{32,56,75}.

Diferentes metodologias têm sido propostas como substitutas aos testes de Draize, desta forma muitos estudos comparando-as vêm sendo realizados. Alguns autores procuram relacionar todos os eventos clínicos que ocorrem na córnea e na conjuntiva durante o processo de irritação ocular⁷⁸.

Vários autores comparam diferentes metodologias com os resultados dos testes de irritação ocular. Dentre as metodologias foram consideradas diferentes linhagens celulares e os resultados comparados com distintos métodos *in vitro*, tais como HET-CAM, BCOP, hemólise de células vermelhas do sangue, Microtox[®], Eytex[®], entre outros. Após a avaliação dos resultados foi sugerida a utilização de uma bateria de testes para prever melhor o potencial irritante, pois cada método reflete determinada etapa do efeito ou aplica-se mais adequadamente a determinado grupo de substâncias^{6,36,52,55,58,65,78,98}. Na maioria destes estudos, o produto avaliado caracteriza-se por ser um

agente tensoativo, utilizado como ingrediente de diferentes formulações de xampus, sabonetes líquidos e outros. Tais produtos são, na maioria das vezes, os responsáveis pela irritação no olho do coelho.

Roguet e Schaefer⁷⁶ fizeram uma revisão sobre vários tipos de células cultivadas *in vitro* e culturas de pele reconstituídas. Segundo os autores, a evolução das técnicas de culturas celulares poderá contribuir muito para a aplicação nos estudos fármaco-toxicológicos *in vitro*, proporcionando o refinamento de métodos alternativos aos animais de laboratório.

Majmudar e Smith⁶² compararam vários tipos de células da pele utilizadas nos testes *in vitro*. Fizeram referências aos modelos tridimensionais da epiderme e derme humana como sistemas *in vitro* eficazes para a detecção bioquímica e histológica de irritação, corrosão e fototoxicidade da pele, apesar de serem dispendiosos e de difícil manutenção.

Em 1993, o Interagency Regulatory Alternative Group (IRAG) conduziu um Workshop com a intenção de examinar a importância dos métodos alternativos quando comparados com o teste de irritação ocular de Draize. Neste estudo foram identificadas cinco categorias de métodos agrupados com base em princípios gerais, biológicos ou bioquímicos. Os grupos de trabalho formados foram de modelos organotípicos, testes baseados na membrana córion-alantóica, testes baseados na função celular, testes de citotoxicidade e outros sistemas. Cerca de 26 tipos diferentes de métodos foram revistos, concluindo-se que os dados eram insuficientes para decidir pela total substituição do teste *in vivo*. Os métodos alternativos podem, porém ser usados nas indústrias como triagem no processo de avaliação de risco dos produtos em desenvolvimento e os resultados de alguns modelos podem levar a redução do número de animais, quando conduzidos sob condições bem definidas. Recomendações adicionais foram sugeridas, tais como: aumentar o número de pesquisas básicas voltadas para identificação de mecanismos alvo de resposta da injúria ocular humana; estabelecer banco de dados com substâncias padrão; selecionar baterias de testes para identificar substâncias novas; identificar métodos promissores para facilitar os estudos de validação; dar prioridade à padronização internacional¹⁸.

Com o intuito de fornecer para as indústrias de cosméticos informações suficientes sobre o desempenho dos métodos alternativos, a Cosmetic Toiletry and Fragrance Association (CTFA) desenvolveu um programa para avaliação das limitações e da aplicabilidade de cada método alternativo. Estudos de correlação *in vivo/in vitro* permitiram concluir que a maioria dos métodos utilizados apresentou sensibilidade e especificidade adequadas, com exceção dos métodos de liberação de vermelho neutro e da dosagem de lactato desidrogenase^{42,44}.

Com base nos resultados obtidos no estudo desenvolvido pelo CTFA, Lordo et al.⁵⁹ discutiram que embora a preocupação fundamental seja quanto ao desempenho dos métodos alternativos, a variabilidade dos resultados do teste de Draize deve ser considerada. Esta variação dificulta a

validação dos métodos alternativos, uma vez que o objetivo é prever o grau de irritação do olho do coelho.

No início da década de 90, um grupo de pesquisadores, financiados pelo Ministério da Saúde do Japão, propôs um projeto intitulado “Study on Test Methods to Evaluate the Safety of Cosmetics Containing New Ingredients”. O objetivo do projeto foi investigar a possibilidade de substituir os testes *in vivo* de Draize por métodos *in vitro*. Após rever os métodos alternativos para ingredientes de cosméticos, decidiu-se conduzir um estudo de validação interlaboratorial. Os métodos foram selecionados com base nos princípios científicos, considerações éticas e na possibilidade do método ser usado no Japão. O estudo foi dividido em três etapas e 12 métodos foram aplicados para o mesmo grupo de 38 substâncias^{24,67,87,89}. Todos os resultados gerados pelo projeto foram avaliados e comparados por Ohno et al.⁶⁶, que discutiram as vantagens e as desvantagens de cada metodologia, juntamente com os seus coeficientes de variação interlaboratorial e suas correlações com o método *in vivo*. Estes autores concluíram que não é indicado um único método para avaliar todos os tipos de substâncias, enquanto vários métodos podem prever melhor o potencial de irritação ocular, desde que usados com claro entendimento de suas características. Por exemplo, os testes de citotoxicidade proporcionam informações a respeito dos efeitos tóxicos dos mecanismos bioquímicos básicos da célula, enquanto os testes de membranas córion-alantóica avaliam reações nos vasos sanguíneos, e assim distintos métodos se complementam.

Com o mesmo propósito de validar os métodos alternativos ao teste de Draize, uma comissão formada pelo governo britânico e membros da comunidade europeia, “European Commission/British Home Office” (EC/HO) desenvolveram um estudo interlaboratorial com o objetivo de sugerir às autoridades reguladoras um ou mais métodos a serem adotados como substitutos dos ensaios *in vivo*. Sessenta substâncias foram avaliadas por nove métodos e quatro etapas foram determinadas. Os métodos deveriam identificar todas as substâncias severamente irritantes, substâncias irritantes pertencentes a uma classe específica, todos os níveis de irritação das substâncias, sem observar a classe química e todos os níveis de irritação das substâncias pertencentes a classes químicas específicas. Após avaliarem todos os resultados, concluiu-se que alguns métodos poderiam prever o potencial de irritação ocular, mas com precisão muito baixa e utilidade prática questionável. A baixa precisão poderia estar relacionada com a escolha das substâncias testes, com os protocolos usados no estudo e com a variabilidade dos dados *in vivo*. A comissão sugere que para solução deste problema mais pesquisas básicas sejam desenvolvidas⁹.

A “European Cosmetic, Toiletry and Perfumery Association” (COLIPA) órgão que representa a indústria de cosméticos, desenvolveu um estudo de validação dos métodos alternativos com o objetivo de avaliar sua habilidade em prever o potencial de irritação ocular. Neste estudo 10 diferentes

métodos alternativos foram avaliados para analisar 55 amostras, sendo 23 ingredientes e 32 formulações. Os resultados preliminares indicam que os métodos alternativos utilizados não poderiam ser considerados como válidos para substituir o teste de Draize, pois nenhum apresentou confiabilidade em demonstrar as variações da escala de irritação ocular¹⁹.

Os detalhes sobre determinados métodos, do estudo realizado pela COLIPA, foram comentados em publicações posteriores. Southee et al.⁸³ descreveram os resultados do ensaio de tecido equivalente (TEA) e verificaram que apesar deste método apresentar boa correlação com os resultados *in vivo* e não ser limitado aos materiais líquidos e solúveis, não apresentou boa reprodutibilidade. As técnicas de aplicação das amostras, o manuseio e os tempos utilizados pelos dois laboratórios onde este método foi realizado podem estar relacionados com as diferenças observadas.

Courtellemont et al.³⁰ utilizaram o Predisafe®, um protocolo disponível comercialmente para avaliar a citotoxicidade, utilizando a linhagem celular SIRC e a medida de liberação do vermelho neutro (NRR). As análises estatísticas mostraram que o método pode prever o potencial irritante de uma grande categoria de produtos acabados. Ainda, associado à sua facilidade de uso oferece vantagens relevantes para ser utilizado na rotina das indústrias de cosméticos, como método de triagem na avaliação da irritação ocular.

Lovell⁶¹, com o objetivo de diminuir a variabilidade dos resultados *in vivo* durante o estudo de validação dos métodos *in vitro* da COLIPA, buscou a correlação entre os valores de irritação ocular e os valores individuais dos danos observados nos tecidos oculares dos coelhos, obtidos na avaliação das 55 amostras utilizadas. O autor realizou uma análise estatística utilizando o método de multivariáveis e concluiu que há poucas evidências de que os valores individuais dos danos no tecido possam melhorar a habilidade de prever o potencial de irritação ocular pelos métodos alternativos.

Métodos que adotam discos de pele de coelho, mantidos *in vitro* por até sete dias, para avaliar substâncias irritantes ou corrosivas foram desenvolvidos com o objetivo de substituir os testes de irritação cutânea de Draize. O modelo é aplicável na avaliação da toxicidade dérmica, podendo utilizar vários parâmetros de avaliação^{79,95,96}.

Segundo Dickson et al.³⁴, as culturas de queratinócitos podem ser importantes na avaliação do potencial de irritação dérmica. A atividade da fosfatase alcalina, tomada como parâmetro pode ser considerada como indicador sensível, principalmente quando a substância testada altera as funções das membranas dos lisossomos.

Até o momento não existem métodos validados para substituir os ensaios de irritação cutânea. No entanto, o ECVAM concluiu, para produtos corrosivos, a validação de dois métodos *in vitro*. Neste estudo, em que foram analisados quatro métodos, o objetivo foi verificar a capacidade de discriminar entre substâncias corrosivas e não corrosivas, além de identificar corretamente certas classes de substâncias. O primeiro foi o

teste de resistência elétrica transcutânea (TER), que utiliza discos de epiderme de rato para avaliar a integridade do estrato córneo, afetada após exposição às substâncias corrosivas. O segundo teste foi o Corrositex® que emprega uma matriz de colágeno reconstituída, elaborada para apresentar propriedades físico-químicas semelhantes à da pele de rato, que em contato com substâncias corrosivas é alterada. O terceiro e o quarto testes foram o EPISKIN® e o SKIN²®, modelos de peles tridimensionais reconstituídas, onde a ação corrosiva é avaliada pela diminuição da viabilidade celular, constatada pela redução do MTT.

Cada método foi avaliado em três laboratórios e frente a 60 substâncias de diferentes categorias de corrosividade, já classificadas *in vivo* e com informações de relação estrutural-atividade. Todos os testes apresentaram reprodutibilidade intra e interlaboratorial, mas somente os testes de TER e o EPISKIN® atenderam aos principais objetivos do estudo, discriminando as substâncias corrosivas das não corrosivas. O Corrositex® só identificou alguns tipos de substâncias e o SKIN²® não evidenciou resultados que permitissem sua validação^{12,13,39}.

O ECVAM, devido ao sucesso da validação dos métodos alternativos para avaliação de substâncias corrosivas, apontou a necessidade urgente de validar testes *in vitro* para avaliar irritação cutânea. Com este objetivo, Fentem et al.⁴⁰ elaboraram um estudo de pré-validação, no qual foram avaliados cinco métodos. Observaram que dentre os métodos utilizados, os de pele equivalente, EpiDERM® e EPISKIN® apresentaram a melhor reprodutibilidade intralaboratorial, mas só o EPISKIN® foi aceitável quanto a reprodutibilidade interlaboratorial. Concluíram que nenhum dos métodos utilizados poderia ser indicado no estudo formal de validação, mais estudos deveriam ser feitos para melhorar os protocolos e os modelos de predição dos testes EPISKIN® e EpiDERM®.

Robinson et al.⁷² fizeram uma revisão de todos os resultados obtidos nos estudos de alguns métodos alternativos utilizados para avaliação do potencial de corrosão e irritação da pele. Neste trabalho verificaram que há várias ferramentas básicas disponíveis para que avaliações seguras de corrosão/irritação cutânea possam ser conduzidas sem a realização de novos testes em animais.

O grande desafio, atualmente, é a validação dos métodos alternativos, que tem gerado muita preocupação e discussão, tanto por parte da comunidade científica quanto dos órgãos reguladores. A utilização de métodos validados busca garantir o mesmo nível de proteção oferecido pelos métodos oficiais.

Sendo assim, alguns autores baseiam seus estudos na definição de que validação “é um processo no qual os parâmetros como confiança e relevância de um método alternativo são estabelecidas para um propósito particular”. A confiança refere-se às condições de reprodutibilidade e capacidade com que um método pode prever o resultado *in vivo*. O método, para ser incluído no estudo de validação requer estabelecimento de certos elementos, como a relevância, procedimentos operacionais padrão e as medidas de confiança

que serão confirmadas durante o processo de validação²⁰.

A importância da validação, pré-validação, do conceito três Rs e outras questões foram abordadas por Balls e Fentem¹⁰, na regulamentação dos testes toxicológicos "*in vitro*". A validação deve ser vista como uma etapa essencial no desenvolvimento do teste e sua aceitação não deve ser encarada como barreira, mas como uma oportunidade para acelerar o uso dos testes *in vitro* na avaliação de risco dos produtos de uso humano ou que possam causar danos no meio ambiente⁸.

Spielmann e Liebsch⁸⁴ fazem referências à evolução dos estudos de validação, comentam que eles têm custo elevado e consomem um tempo médio de 10 anos. Segundo os autores, o progresso e a aceitação internacional dos testes de toxicidade *in vitro*, só será alcançado se a Europa, Japão e os Estados Unidos encontrarem maneiras de coordenar os estudos. Comentam, ainda, que os protocolos elaborados pelo ECVAM e OECD são os mais apropriados para a validação destes testes. Estes protocolos observam alguns critérios básicos com relação ao método avaliado, tais como a relação entre a resposta *in vivo* e *in vitro*, demonstração de variabilidade, repetibilidade e reprodutibilidade, desempenho do teste frente a substâncias de referência e, ainda, que seja de domínio público⁶⁰.

REFERÊNCIAS

- American Society for Testing and Materials. Standard test method for agar diffusion cell culture screening for cytotoxicity: designation: F 895-84. Philadelphia: ASTM, 1995, p.276-9.
- Azevedo, J.C. **Avaliação de metodologia alternativa *in vitro* ao teste de irritação ocular de Draize**. São Paulo, 1998. 145p. (Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP).
- Babich, H.; Babich, J.P. Sodium lauryl sulfate and triclosan: *in vitro* cytotoxicity studies with gingival cells. **Toxicol. Lett.**, 91: 189-96, 1997.
- Babich, H.; Borenfreund, E. Cytotoxic and morphological effects of phenylpropanolamine, caffeine, nicotine, and some of their metabolites studied *in vitro*. **Toxicol. In Vitro**, 6 (6): 493-502, 1992.
- Bagley, D.M. et al. Eye irritation: reference chemicals data bank. **Toxicol. In Vitro**, 6: 487-91, 1992b.
- Bagley, D.M. et al. An evaluation of five potential alternatives *in vitro* to the rabbit eye irritation test *in vivo*. **Toxicol. In Vitro**, 6 (4): 275-84, 1992a.
- Bagley, D.M. et al. Skin irritation: reference chemicals data bank. **Toxicol. In Vitro**, 10:1-6, 1996.
- Balls, M. Scientific validation: a crucial and unavoidable prerequisite to the acceptability of new tests and testing strategies. **ATLA, Altern. Lab. Anim.**, 23: 474-9, 1995.
- Balls, M. et al. The EC/HO international validation study on alternatives to the Draize eye irritation test. **Toxicol. In Vitro**, 9 (6): 871-929, 1995.
- Balls, M.; Fentem, J.H. The validation and acceptance of alternatives to animal testing. **Toxicol. In Vitro**, 13: 837-46, 1999.
- Barratt, M.D. QSARS for the eye irritation potential of neutral organic chemicals. **Toxicol. In Vitro**, 11: 1-8, 1991.
- Barratt, M.D. et al. The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 1. Selection and distribution of the test chemicals. **Toxicol. In Vitro**, 12: 471-82, 1998.
- Barrela, C., Roque, J.; Silva, T. **Métodos alternativos à experimentação animal na indústria de cosméticos**. [http://www.fmv.utl.pt/democ/sft/sem0001/G23.html]. 16 janeiro 2002.
- Borenfreund, E.; Babich, H.; Martin-Alguacil, N. Comparisons of two *in vitro* cytotoxicity assays- the neutral red (NR) and tetrazolium MTT tests. **Toxicol. In Vitro**, 2 (1): 1-6, 1988.
- Borenfreund, E.; Puerner, J.A. A simple quantitative procedure using monolayer cultures for cytotoxicity assays (HTD/NR-90). **J. Tissue Cult. Methods**, 9 (1): 7-9, 1984.
- Borenfreund, E.; Puerner, J.A. Toxicity determined *in vitro* by morphological alterations and neutral red absorption. **Toxicol. Lett.**, 24: 119-24, 1985.
- Botham, P. et al. Cell function-based assays. **Food Chem. Toxicol.**, 35: 67-77, 1997.
- Bradlaw, J.A.; Wilcox, N.L. Workshop on eye irritation testing: Practical applications of non-whole animal alternatives. **Food Chem. Toxicol.**, 35: 1-11, 1997.
- Brantom, P.G. et al. A summary report of the COLIPA international validation study on alternatives to the Draize rabbit eye irritation test. **Toxicol. In Vitro**, 11: 141-79, 1997.
- Bruner, L.H. et al. Validation of alternative methods for toxicity testing. **Toxicol. In Vitro**, 10: 479-501, 1996.
- Cade, P. Avaliação da ação antiirritante, comparação entre métodos *in vivo* e *in vitro*. **Cosmet. Toiletries, Ed. Port.**, 2: 13-7, 1990.
- Chamberlain, M. et al. Organotypic models for the assessment/prediction of ocular irritation. **Food Chem. Toxicol.**, 35: 23-37, 1997.
- Chamberlain, M.; Parish, W.E. Hazard and risk based on *in vitro* test data. **Toxicol. In Vitro**, 4 (4/5): 694-7, 1990.
- Chiba, K. et al. Interlaboratory validation of the *in vitro* eye irritation tests for cosmetic ingredients (9): evaluation of cytotoxicity test on Hela cells. **Toxicol. In Vitro**, 13: 189-98, 1999.
- Chiba, K., Kawakami, K., Tohyama, K. Simultaneous evaluation of cell viability by neutral red, MTT and crystal violet staining assays of the same cells. **Toxicol. In Vitro**, 12: 251-8, 1998.
- Ciapetti, G. et al. Application of a combination of neutral red and amido black staining for rapid, reliable cytotoxicity testing of biomaterials. **Biomaterials**, 17 (13): 1259-64, 1996.
- Clothier, R. et al. Assessment of initial damage and recovery following exposure of MDCK cells to an irritant. **Toxicol. In Vitro**, 13: 713-7, 1999.
- Combrier, E., Castelli, D. The agarose overlay method as a screening approach for ocular irritancy: application to cosmetic products. **ATLA, Altern. Lab. Anim.**, 20 (3): 438-44, 1992.
- Cooper, K.J. et al. Prediction of ocular irritancy of prototype shampoo formulations by the isolated rabbit eye (IRE) test, and bovine corneal opacity and permeability (BCOP) assay. **Toxicol. In Vitro**, 15: 95-103, 2001.
- Courtellemont, P. et al. Relevance and reliability of the PREDISAFE assay in the COLIPA eye irritation validation program (phase 1). **Toxicol. In Vitro**, 13: 305-12, 1999.
- Cronin, M.T.D.; Basketter, D.A., York, M. A quantitative structure-activity relationship (QSAR) investigation of a Draize eye irritation database. **Toxicol. In Vitro**, 8 (1): 21-8, 1994.
- Curren, R.D. et al. Other assays. **Food Chem. Toxicol.**, 35: 127-58, 1997.
- De Angelis, I. et al. *In vitro* toxicity of some cosmetic ingredients. **Food Chem. Toxicol.**, 24 (6/7): 477-9, 1986.
- Dickson, F.M., Lawrence, J.N.; Benford, D.J. Surfactant-induced cytotoxicity in cultures of human keratinocytes and a commercially available cell line (3T3). **Toxicol. In Vitro**, 7 (4): 381-4, 1993.
- Draize, J.H.; Woodard, G.; Calvery, H.O. Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 82: 377-90, 1944.
- Earl, L.K. et al. Comparison of five potential methods for assessing ocular irritation *in vitro*. **Toxicol. In Vitro**, 9 (3): 245-50, 1995.
- Eisenbrand, G. et al. Methods of *in vitro* toxicology. **Food Chem. Toxicol.**, 40: 193-236, 2002.
- FDA.U.S. Food and Drug Administration. **Animal testing**. [http://vm.cfsan.fda.gov/~dms/cos-205html]. 8 março 2001.
- Fentem, J.H. et al. The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the management team. **Toxicol. In Vitro**, 12: 483-524, 1998.

40. Fentem, J.H. et al. A prevalidation study on *in vitro* tests for acute skin irritation: results and evaluation by the management team. **Toxicol. In Vitro**, 15: 57-93, 2001.
41. Gautheron, P. et al. Interlaboratory assessment of the bovine corneal opacity and permeability (BCOP) assay. **Toxicol. In Vitro**, 8 (3): 381-92, 1994.
42. Gettings, S.D. et al. The CTFA evaluation of alternatives program: an evaluation of *in vitro* alternatives to the Draize primary eye irritation test. (Phase II) oil/water emulsions. **Food Chem. Toxicol.**, 32 (10): 943-76, 1994.
43. Gettings, S.D. et al. Comparison of low-volume, Draize and *in vitro* eye irritation test data. I. Hydroalcoholic formulations. **Food Chem. Toxicol.**, 34: 737-49, 1996b
44. Gettings, S.D. et al. The CFTA evaluation of alternatives program: an evaluation of *in vitro* alternatives to the Draize primary eye irritation test. (Phase III) Surfactant-based formulations. **Food Chem. Toxicol.**, 34 (1): 79-117, 1996a.
45. Gettings, S.D. et al. A comparison of low volume, Draize and *in vitro* eye irritation test data. II. Oil/water emulsions. **Food Chem. Toxicol.**, 36: 47-59, 1998.
46. Gordon, V.C. The scientific basis of the EYTEX system. **ATLA, Altern. Lab. Anim.**, 20: 537-48, 1992.
47. Guess, W.L. et al. Agar diffusion method for toxicity screening of plastics on cultured cell monolayers. **J. Pharm. Sci.**, 54: 1545-7, 1965.
48. Harbell, J.W. et al. Cell cytotoxicity assays. **Food Chem. Toxicol.**, 35: 79-126, 1997.
49. Hockley, K.; Baxter, D. Use of the 3T3 cell-neutral red uptake assay for irritants as an alternative to the rabbit (Draize) test. **Food Chem. Toxicol.**, 24 (6/7): 473-5, 1986.
50. Husoy, T.; Syversen, T.; Jenssen, J. Comparisons of four *in vitro* cytotoxicity tests: the MTT assay, NR assay, uridine incorporation and protein measurements. **Toxicol. In Vitro**, 7 (2): 149-54, 1993.
51. International Organization for Standardization. **ISO 10.993-5: Biological evaluation of medical devices. Part 5. Test for cytotoxicity: *in vitro* methods.** Geneva: ISO, 1992. 7p.
52. Itagaki, H. et al. An *in vitro* alternative to the Draize eye-irritation test: evaluation of the crystal violet staining method. **Toxicol. In Vitro**, 5 (2): 139-43, 1991.
53. Jester, J.V. et al. Extent of initial corneal injury as a basis for alternative eye irritation tests. **Toxicol. In Vitro**, 15: 115-30, 2001.
54. Kay, J.H.; Calandra, J.C. Interpretation of eye irritation tests. **J. Soc. Cosmet. Chem.**, 13: 281-9, 1962.
55. Kojima, H. et al. Evaluation of seven alternative assays on the main ingredients in cosmetics as predictors of Draize eye irritation scores. **Toxicology in Vitro**, 9 (3): 333-40, 1995.
56. Lawrence, J.N. Application of *in vitro* human skin models to dermal irritancy: a brief overview and future prospects. **Toxicol. In Vitro**, 11: 305-12, 1997.
57. LEE, J.K. et al. *In vitro* cytotoxicity tests on cultured human skin fibroblasts to predict skin irritation potential of surfactants. **Toxicol. In Vitro**, 14: 345-9, 2000.
58. Lewis, R.W.; Mccall, J.C.; Botham, P.A. A comparison of two cytotoxicity tests for predicting the ocular irritancy of surfactants. **Toxicol. In Vitro**, 7 (2): 155-8, 1993.
59. Lordo, R.A.; Feder, P.I.; Gettings, S.D. Comparing and evaluating alternative (*in vitro*) tests on their ability to predict the Draize maximum average score. **Toxicol. In Vitro**, 13: 45-72, 1999.
60. Louekari, K. *In vitro* toxicology and the test guidelines. **ATLA, Altern. Lab. Anim.**, 24: 435-8, 1996.
61. Lovell, D.P. Principal component analysis of tissue scores from substances used in the COLIPA eye irritation validation study. **Toxicol. In Vitro**, 13: 491-503, 1999.
62. Majmudar, G., Smith, M. Técnicas de screening *in vitro* em dermatologia. **Cosmet. Toiletries, Ed. Port.**, 10: 44-9, 1998.
63. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods**, 65: 55-63, 1983.
64. Noser, F. Cultura de células a serviço da cosmetologia. **Cosmet. Toiletries, Ed. Port.**, 3: 46-7, 1991.
65. O'Brien, K.A.F. et al. An *in vitro* study of the eye irritation potential of new shampoo formulations. **Toxicol. In Vitro**, 8 (2): 257-61, 1994.
66. Ohno, Y. et al. Interlaboratory validation of the *in vitro* eye irritation tests for cosmetic ingredients. (1) overview of the validation study and Draize scores for the evaluation of the tests. **Toxicol. In Vitro**, 13: 73-98, 1999.
67. Okumura, H. et al. Interlaboratory validation of the *in vitro* eye irritation tests for cosmetic ingredients. (10) evaluation of cytotoxicity test on CHL cells. **Toxicol. In Vitro**, 13: 199-208, 1999.
68. Olivier, P. et al. Effect of high polyol concentrations on the neutral red absorption assay and tetrazolium- MTT test of rat hepatocytes in primary culture. **Toxicol. In Vitro**, 9 (2): 133-8, 1995.
69. Pinto, T.J.A.; Azevedo, J.C.; Cruz, A.S. Comparative study of epithelial and fibroblastic cell lines as an alternative cytotoxicity test to the Draize method. **J. AOAC Int.**, 83 (3): 665-8, 2000.
70. Pinto, T.J.A.; Kaneko, T.M.; Ohara, M.T. **Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos.** São Paulo: Atheneu, 2000. 309p.
71. Riddell, R.J.; Clothier, R.H.; Balls, M. An evaluation of three *in vitro* cytotoxicity assays. **Food Chem. Toxicol.**, 24 (6/7): 469-71, 1986.
72. Robinson, M.K. et al. Non-animal testing strategies for assessment of the skin corrosion and skin irritation potential of ingredients and finished products. **Food Chem. Toxicol.**, 40: 573-92, 2002.
73. Robinson, M.K.; Osborne, R.; Perkins, M.A. Strategies for the assessment of acute skin irritation potential. **J. Pharmacol. Toxicol. Methods**, 42: 1-9, 1999.
74. Roggeband, R. et al. Eye irritation responses in rabbit and man after single applications of equal volumes of undiluted model liquid detergent products. **Food Chem. Toxicol.**, 38: 727-34, 2000.
75. Roguet, R. et al. An interlaboratory study of the reproducibility and relevance of Episkin, a reconstructed human epidermis, in the assessment of cosmetics irritancy. **Toxicol. In Vitro**, 12: 295-304, 1998.
76. Roguet, R.; Schaefer, H. Overview of *in vitro* cell culture technologies and pharmaco-toxicological applications. **Toxicol. In Vitro**, 11: 591-9, 1997.
77. Rosenbluth, S.A. et al. Tissue culture method for screening toxicity of plastic materials to be used in medical practice. **J. Pharm. Sci.**, 54: 156-9, 1965.
78. Rougier, A. et al. The use of *in vitro* methods in the ocular irritation assessment of cosmetic products. **Toxicol. In Vitro**, 8 (4): 893-905, 1994.
79. Ruten, A.A.J.J.L., Van de Sandt, J.J.M. *In vitro* dermal toxicology using skin organ cultures. **Toxicol. In Vitro**, 8 (4): 703-5, 1994.
80. Saotome, K.; Morita, H.; Umeda, M. Cytotoxicity test with simplified crystal violet staining method using microtitre plates and its application to injection drugs. **Toxicol. In Vitro**, 3 (4): 317-21, 1989.
81. Sasaki, T. et al. Detergent cytotoxicity simplified assay of cytolysis by measuring LDH activity. **Toxicol. In Vitro**, 6 (5): 451-7, 1992.
82. Seabaugh, V.M. et al. Use of ophthalmic topical anesthetics. **Food Chem. Toxicol.**, 31: 95-8, 1993.
83. Southee, J.A. et al. The performance of the tissue equivalent assay using the skin ZK 1200 model in the COLIPA international validation study on alternatives to the Draize eye irritation test. **Toxicol. In Vitro**, 13: 355-73, 1999.
84. Spielmann, H.; Liebsch, M. Lessons learned from validation of *in vitro* toxicity test: from failure to acceptance into regulatory practice. **Toxicol. In Vitro**, 15: 585-90, 2001.
85. Spielmann, H. et al. CAM-based assays. **Food Chem. Toxicol.**, 35: 39-66, 1997.
86. Springer, J.A. et al. Number of animals for sequential testing. **Food Chem. Toxicol.**, 31: 105-9, 1993.
87. Tani, N. et al. Interlaboratory validation of the *in vitro* eye irritation tests for cosmetic ingredients. (8): evaluation of cytotoxicity tests on SIRC cells. **Toxicol. In Vitro**, 13: 175-87, 1999.

88. Tsutsui, T. et al. Quantitative comparison of cytotoxicity of dental antiseptics to normal human oral keratinocytes *in vitro*. **Toxicol. In Vitro**, 8 (6): 1253-8, 1994.
89. Uchiyama, T. et al. Interlaboratory validation of the *in vitro* eye irritation tests for cosmetic ingredients (7): evaluation of cytotoxicity test by CornePack. **Toxicol. In Vitro**, 13: 163-73, 1999.
90. United States Pharmacopeia. 22.ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 1990. p.1495-7.
91. United States Pharmacopeia. 23.ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 1995. p.1697-9.
92. United States Pharmacopeia. 24.ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 1999. p.1831-2.
93. United States Pharmacopeia. 25.ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2002. p.1893-5.
94. United States Pharmacopeia. 26.ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2003. p.2026-8.
95. Van de Sandt, J.J.M.; Rutten, A.A.J.J.L. Differential effects of chemical irritants in rabbit and human skin organ cultures. **Toxicol. In Vitro**, 9 (2): 157-68, 1995.
96. Van de Sandt, J.J.M.; Rutten, A.A.J.J.L.; Koeter, H.B.W.M. Cutaneous toxicity testing in organ culture: neutral red uptake and reduction of tetrazolium salt (MTT). **Toxicol. In Vitro**, 7 (1): 81-6, 1993.
97. Van Zutphen, L.F.M.; Van der Valk, J.B.F. Developments on the implementation of the three Rs in research and education. **Toxicol. In Vitro**, 15: 591-5, 2001.
98. Vian, L. et al. Comparison of three *in vitro* cytotoxicity assays for estimating surfactant ocular irritation. **Toxicol. In Vitro**, 9 (2): 185-90, 1995.
99. Wilhelmus, K.R. The Draize eye test: therapeutic reviews. **Surv. Ophthalmol.**, 45 (6): 493-515, 2001.

Validação de metodologia para a determinação de ácido fólico em margarina enriquecida e avaliação da estabilidade da vitamina durante estocagem

Validation of methodology for determination of folic acid enriched margarine and evaluation of the stability of the vitamin during stockage

RIALA6/968

Juliana. A. LIMA, Rodrigo R. CATHARINO, Helena T. GODOY*

* Endereço para correspondência: Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Caixa Postal 6121, 13083-970, Campinas, SP, Brasil.

* e-mail: helenaa@fea.unicamp.br Telefone: +55-19-37884024 FAX: +55-19-37882159

RESUMO

Com a finalidade de amenizar os problemas relacionados à carência de ácido fólico, muitos produtos alimentícios estão sendo submetidos ao processo de enriquecimento. Portanto, tornam-se necessárias metodologias analíticas capazes de avaliar o comportamento dessa vitamina, quando adicionada a esses produtos. O objetivo deste trabalho foi a validação de uma metodologia para a determinação de ácido fólico adicionado à margarina, utilizando-se a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência. A vitamina foi extraída da matriz com solução de KOH, seguida por etapa de limpeza com ácido tricloroacético. O ácido fólico foi separado utilizando-se coluna de C₁₈ e solução acidificada e acetoneitrila. A detecção foi feita a 290nm e a quantificação por padronização externa. A metodologia mostrou-se eficiente com taxas de recuperação entre 94 e 97%, boa repetibilidade (CV de 0,5 a 1,4) e limites de detecção e quantificação de 1,3ng/g e 2,6ng/g, respectivamente. No estudo de vida-de-prateleira realizado, durante 4 meses de estocagem, resultou em perda de grande parte da vitamina, aproximadamente 55%.

Palavras-Chave. ácido fólico, cromatografia líquida de alta eficiência, estabilidade, margarina.

ABSTRACT

With the purpose to brighten up the problems related to the folic acid deficiency, many foods are being enriched. Analytical methodologies are necessary to evaluate the behavior of this vitamin when added into these products. The aim of the work was the validation of methodology for folic acid analysis in enriched margarine. The vitamin was extracted from enriched margarine using KOH solution and the extract was cleaned with trichloroacetic acid. The vitamin was separated in a C₁₈ column, with acid solution and acetonitrile as mobile phase. The ultraviolet detection was at 290nm and the quantification was by external standardization. The methodology was efficient showed recovery rates among 94 and 97%, good repeatability (V.C. 0.5 to 1.4%) and detection and quantification limits were 1.3ng/g and 2.6ng/g, respectively. Shelf life study, during 4 storage months, resulted in loss of great portion about vitamin, approached 55%.

Key Words. folic acid, high performance liquid chromatography, stability, margarine.

INTRODUÇÃO

A indústria brasileira de alimentos vem promovendo um grande aumento do emprego de vitaminas para o enriquecimento de vários produtos⁴, entre elas o ácido fólico, uma vitamina do complexo B, que atua bioquimicamente em importantes reações de transporte de carbono⁷ essenciais para o bom funcionamento do organismo. Atualmente, os pesquisadores, estão convencidos que o ácido fólico é indispensável à dieta humana

e animal, sendo considerado como a “vitamina do futuro”.

Os possíveis efeitos adversos diretamente ligados a dietas carentes de ácido fólico, e que tem surtido repercussão mundial, são as malformações congênitas, os defeitos no tubo neural de fetos e a espinha bífida, entre outros^{6,7}. Além disso, muitos estudos apresentam evidências de que o ácido fólico previne o câncer, a anemia e as doenças cardíacas^{6,11,13,18}.

A preocupação com a carência de ácido fólico na alimentação de gestantes é tão grande nos EUA, que em 1998

foi criada uma campanha nacional de incentivo à ingestão de ácido fólico, cujo principal objetivo é a redução das malformações congênitas¹⁵.

O processo de enriquecimento aumenta a qualidade dos alimentos e pode vir a ser uma das soluções para a ingestão insuficiente de ácido fólico^{1,14,17,19}. No Brasil, o leite, produtos lácteos, cereais, biscoitos, farinhas, entre outros, são os alimentos preferencialmente escolhidos para o enriquecimento com esta vitamina. Muitos desses alimentos são destinados ao público infantil, além de gestantes que têm suas necessidades de ingestão da vitamina aumentadas. Outro produto que está sendo enriquecido com ácido fólico é a margarina, bastante consumida pela população em geral, entretanto, com características muito diferentes dos alimentos até então enriquecidos com essa vitamina.

Embora cada vez mais aumente o número de alimentos que estão sendo enriquecidos com ácido fólico, o controle desses produtos é bastante dificultado pela ausência de metodologias confiáveis destinadas a esse fim. A metodologia desenvolvida e validada por Catharino e Godoy⁵ parece ser bastante promissora, no sentido de tentar solucionar esse problema.

A avaliação da qualidade dos produtos enriquecidos com ácido fólico, inclui também a averiguação da estabilidade dessa vitamina durante o processamento e estocagem dos alimentos. Essa pesquisa é de grande importância, também para a indústria, pois pode proporcionar o conhecimento da viabilidade da adição das vitaminas a determinados produtos. Uma fonte alimentar a ser enriquecida, deve apresentar consumo significativo e homogêneo pelas diversas camadas da população e os nutrientes adicionados devem ser estáveis e biodisponíveis após o processamento e durante o período de estocagem³.

Na literatura são descritos poucos trabalhos que avaliam a estabilidade do ácido fólico adicionado a alimentos, em geral. Essas pesquisas mostram, em sua maioria, dados sobre a resistência de folatos, naturalmente presentes em determinados alimentos e submetidos a alguns tipos de processamentos.

Os objetivos do presente trabalho foram a validação de um método para a determinação de ácido fólico em margarina enriquecida e sua aplicação em teste de estabilidade da vitamina nesse tipo de alimento, durante estocagem.

MATERIAL E MÉTODOS

Produto avaliado

No Brasil, apenas uma empresa fabrica margarina enriquecida com ácido fólico. Três diferentes amostras foram adquiridas em supermercados da cidade de Campinas-SP, com a preocupação de se obter lotes com data de fabricação o mais recente possível, para um posterior estudo de vida de prateleira. Cada lote foi composto por duas embalagens de 250g, que tiveram o seu conteúdo homogeneizado antes da retirada de

amostra para análise. As determinações foram realizadas em duplicatas.

Reagentes

O padrão de ácido fólico foi gentilmente cedido pela M.Cassab Comércio e Indústria LTDA, (SIGMA cód. F-7876, lote 40H321). A acetonitrila grau cromatográfico, ácido acético, ácido fosfórico e hidróxido de potássio, grau analítico, foram adquiridos da MERCK, Brasil. O ácido tricloroacético, grau analítico foi obtido da Synth. A água utilizada para o preparo das fases móveis foi purificada no sistema Milli-Q (MILLIPORE). As fases móveis, antes de serem utilizadas, foram filtradas em filtros MILLIPORE (HAWP e HVLPO4700), com poros de 0.45µm de diâmetro.

Equipamento

Utilizou-se um cromatógrafo a líquido HEWLETT PACKARD (HP) série 1100, com injetor automático com de 1 a 100µL de capacidade, degaseificador, bomba quaternária, equipado com detector de arranjo de diodos. O sistema é controlado pelo software HP-Chemstation, que permitiu análise da pureza do pico de interesse e o melhor tratamento dos dados. A coluna Microsorb-MV, ODS-2, 5µm, 150X4,6mm d.i. (Raimin Instrument Company) foi utilizada para o processo cromatográfico, protegida por uma coluna de guarda Bondesil C₁₈, 5µm, 10X4,6mm d.i (Varian).

Determinação de ácido fólico

Para a análise do ácido fólico em margarina enriquecida, seguida do estudo de vida-de-prateleira, utilizou-se a metodologia desenvolvida por Catharino e Godoy⁵, validada para produtos lácteos e cereais.

O conteúdo de duas embalagens (250g) foi fundido em forno de microondas convencional, por aproximadamente 15 segundos e tomado 1,0g de margarina, após homogeneização total da amostra. O ácido fólico foi extraído com 3,0mL de solução de hidróxido de potássio (0,1mol/L) em banho ultra-sônico por 10 minutos. O extrato foi transferido quantitativamente para um balão volumétrico de 10mL, adicionando-se 3,0mL de ácido fosfórico (0,1mol/L), 2,0mL de tampão fosfato, composto por Na₂HPO₄ (0,25mol/L)/KH₂PO₄ (0,37mol/L), 350µL de ácido tricloroacético (TCA), aferindo-se o volume final com tampão fosfato. Seguiram-se então as etapas de filtração, a primeira em papel de filtro comum e a outra em membrana Durapore (HAWP 01300 MILLIPORE), com poros de 0,45µm. O filtrado foi injetado, imediatamente, no cromatógrafo a líquido (100µL).

O ácido fólico foi separado em sistema de eluição por gradiente, com 90% de solução acidificada (SA:0,166mol/L de ácido acético e 0,01mol/L de hidróxido de potássio, a pH 2,8), e 10% de acetonitrila (ACN)(v/v) no início da corrida, chegando em 8,5 minutos a 76% de SA e 24% de ACN, mantendo-se essa proporção até 9,0 minutos. As condições iniciais foram retomadas e a coluna re-equilibrada durante 10 minutos, antes da próxima injeção. A detecção foi feita em detector de arranjo

de diodos (DAD), utilizando-se o comprimento de onda de leitura a 290nm. A identificação da vitamina foi feita por comparação dos tempos de retenção, obtidos com padrões analisados nas mesmas condições, co-cromatografia e pela comparação dos espectros de absorção obtidos no DAD. A pureza do pico foi determinada pelo sistema ploter disponível no software HP-Chemstation. A quantificação do ácido fólico foi feita por padronização externa, através da curva analítica construída com 7 níveis de concentração (0,01; 0,05; 0,10; 0,15;

0,30; 0,50; 1µg/mL), sendo cada ponto representado pela média de três determinações.

Validação da metodologia

Testes de recuperação e repetibilidade foram realizados com as amostras analisadas neste trabalho, uma vez que a metodologia sofreu algumas modificações em relação ao método original. Limites de detecção e quantificação também foram determinados para essa nova matriz.

Tabela 1. Taxas de recuperação do padrão de ácido fólico adicionado em dois diferentes níveis de concentração à margarina.

Produto	Nível I (µg/g)	Recuperação (%)	Nível II (µg/g)	Recuperação (%)
Margarina	0,8	94 ± 1	1,5	97 ± 2

Os resultados são médias de 5 determinações para cada nível avaliado.

Tabela 2. Repetibilidade do ácido fólico adicionado a pão, farinha e margarina, em 2 diferentes níveis de concentração.

Alimento	Concentração Nível I (µg/g)	Repetibilidade (r)	Concentração Nível II (µg/g)	Repetibilidade (r)
Margarina	1,443	0,56	0,749	0,33
	1,433		0,759	
	1,433		0,766	
	1,472		0,761	
	1,461		0,766	
Média dos valores	1,45 ± 0,02		0,760 ± 0,007	
Limite de confiança de 95% (t= 2,78),				

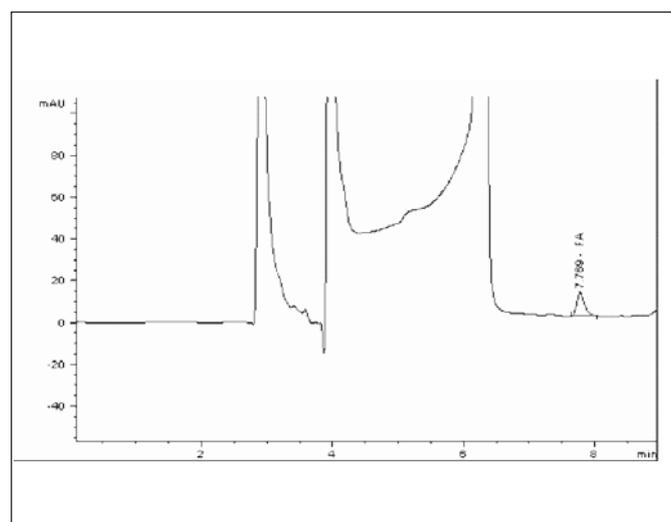


Figura 1. Perfil cromatográfico do extrato de margarina enriquecida com ácido fólico. Coluna Microsorb-MV, ODS-2, 5mm, 150X4.6mm. Fase móvel: 10% de acetonitrila e 90% de solução acidificada no início da corrida, chegando em 8.5 minutos a 24% de acetonitrila e 76% de solução acidificada (v/v), mantendo-se as condições até 9.0 minutos. Vazão de 0.5 mL/ minuto. Detecção a 290nm.

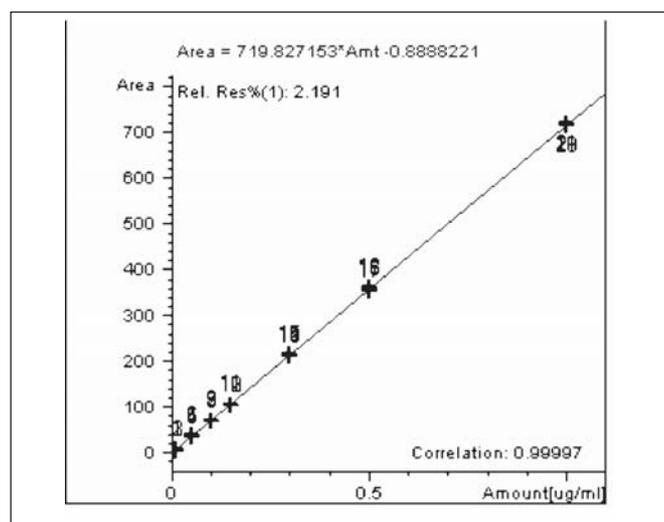


Figura 2. Curva analítica do ácido fólico, obtida por padronização externa, traçada com média de triplicatas.

Tabela 3. Teores de ácido fólico em margarina enriquecida durante estocagem.

Lotes/Data de fabricação	Concentração de ácido fólico(µg/g)			
	Após a fabricação		Após estocagem	
	M±DP	CV(%)	M±P	CV(%)
1	0,91±0,01	1	0,44±0,01	6
2	0,84±0,02	2	0,39±0,01	2
3	0,79±0,01	1	0,45±0,03	2
M ± DP	0,85±0,06	7	0,43±0,05	13

M ± DP – média e estimativa do desvio padrão das determinações em duplicatas. CV – coeficiente de variação.

Recuperação de Padrões

Para a avaliação da exatidão do método, foram realizados testes de recuperação de padrões adicionados aos produtos não enriquecidos, em dois níveis diferentes de concentração 1,5 e 0,8µg/g. Esses valores foram escolhidos de acordo com o teor de ácido fólico declarado no rótulo 1,12µg/g. Para as análises foi utilizado 1,0g de margarina.

Repetibilidade

A avaliação desse parâmetro foi realizada através de dez determinações, nos dois níveis de concentração de ácido fólico adicionado à matriz. A repetibilidade foi calculada de acordo com Caucutt e Boddy² através da equação:

$$r = t\sqrt{2}.sr$$

r = repetibilidade
sr = estimativa do desvio padrão
t = t de Student

Limites de Detecção e Quantificação

Os limites de detecção foram estimados pela adição de quantidades conhecidas de padrão às amostras. Foi considerado o limite de detecção a menor quantidade detectável na matriz que produziu um sinal com uma amplitude três vezes maior que a do ruído (3S/R). O limite de quantificação foi considerado como sendo duas vezes o limite de detecção⁸.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Validação da metodologia

A metodologia foi validada para a margarina, produto com alto teor de gordura, verificando-se as taxas de recuperação e repetibilidade para as amostras analisadas neste trabalho.

As taxas de recuperação obtidas estão apresentadas na Tabela 1. Os valores variaram entre 94 e 97% nos dois níveis de enriquecimento. As taxas de recuperação aqui obtidas são superiores aos relatados por Konings¹² e Osseyi et al.¹⁶ que obtiveram níveis de recuperação de ácido fólico de 90% para farinha e 93% para cereais. Esses valores indicam uma boa taxa de recuperação para os níveis vitamínicos presentes nos alimentos enriquecidos aqui analisados.

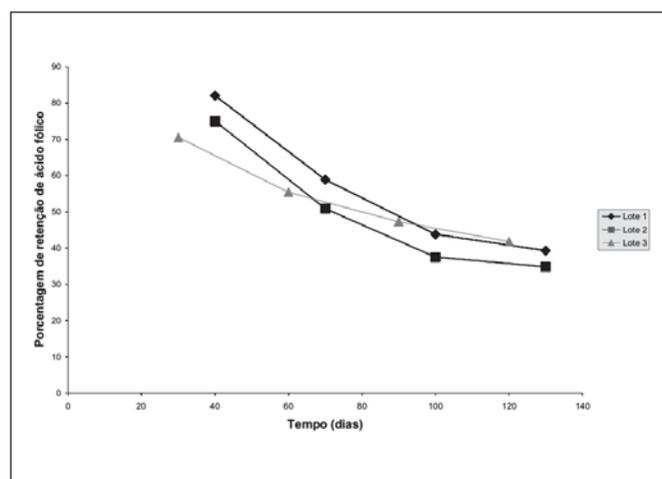


Figura 3. Perfil da degradação de ácido fólico em margarina enriquecida.

A Tabela 2 apresenta as faixas de repetibilidade esperadas entre cinco determinações, em duplicata, de ácido fólico, em dois diferentes níveis de concentração. Desta forma, espera-se que valores fornecidos por determinações em duplicata difiram dentro dos limites fornecidos pela repetibilidade, com a confiança indicada.

Observou-se que a maior diferença, entre os valores obtidos nas 5 determinações, nos dois níveis de enriquecimento, são menores que o valor de “r” calculado, comprovando a boa repetibilidade do método, quando aplicado à matriz estudada.

O limite de detecção obtido foi 1,3µg/g, sendo, portanto, considerado o limite de quantificação de 2,6µg/g. Os valores foram os mesmos obtidos por Catharino e Godoy⁵ e Konings¹² que determinaram esses parâmetros em leites enriquecidos.

Etapa Analítica

A Figura 1 apresenta o cromatograma referente à avaliação de ácido fólico em amostras de margarina. Nele, o pico do ácido fólico aparece isolado, com tempo de retenção de aproximadamente 8 minutos. A pureza dos picos foi verificada através dos parâmetros de pureza, fornecidos pelo software HP-Chemstation, que confirmou a eficiência do sistema cromatográfico.

Os teores de ácido fólico foram avaliados por padronização externa, tendo a curva analítica apresentado boa linearidade nas faixas de concentração pré-estabelecidas. O coeficiente de correlação obtido foi de 0,99997 (Figura 2).

Na Tabela 3 estão os teores encontrados nas amostras de margarina recém fabricadas e após 4 meses de estocagem. Os valores iniciais (0,85µg/g, em média) já se apresentavam abaixo do declarado no rótulo do produto (1,12µg/g). Verificou-se que a taxa de retenção média ficou em torno de 39%. A Figura 2 ilustra a porcentagem de retenção do ácido fólico na margarina durante os 4 meses de estocagem. A instabilidade observada pode ser devida aos processos oxidativos decorrentes da matriz lipídica que, segundo, Gregory⁹ e Hawkes e Villota¹⁰, seriam os principais responsáveis pela degradação do ácido fólico. Não foi encontrado na literatura nenhum artigo a respeito da adição de ácido fólico em qualquer produto com altos teores de gordura, para fins de comparação.

CONCLUSÕES

O método avaliado mostrou-se apropriado para a determinação do ácido fólico em um alimento gorduroso como a margarina, como demonstram a alta recuperação e a repetibilidade, assim como, os limites de detecção e quantificação alcançados.

Os testes conduzidos com a margarina enriquecida durante a estocagem demonstraram que em um período de quatro meses, mais da metade da vitamina desapareceu, não sendo recomendado, portanto, esse alimento como um bom veículo para o enriquecimento.

REFERÊNCIAS

1. Augustin, J., Tassinari, P.D, Fellman, J.K., et al. B vitamin content of selected cereals and baked products. **Cer. Foods World**, 27(4): 159-161, 1982.
2. Calcutt, R., Brody, R. **Statistic for Analytical Chemists**. 1ed. Londres, 1983.
3. Carvalho, P. R. N. **Enriquecimento de Alimentos**. Primeiro seminário brasileiro de alimentos enriquecidos. Campinas: Instituto de Tecnologia de Alimentos, 1-7, 1994.
4. Carvalho, P.R.N. **Estudos de vida-de-prateleira de Alimentos Enriquecidos**. Segundo seminário brasileiro de alimentos enriquecidos. Campinas: Instituto de Tecnologia de Alimentos, 5-8, 1996.
5. Catharino, R. R., Visentainer, J.V., Godoy, H. T. Avaliação das condições experimentais de CLAE na determinação de ácido fólico em leites enriquecidos. **Ciênc. Tecnol. Alimen.**, 23(3): 389-395, 2003.
6. Daly, S. et al. Minimum effective dose of folic acid for food fortification to prevent neural-tube defects. **Lancet.**, 350(9092): 1666-1669, 1997.
7. Devlin, T. M. **Manual de Bioquímica com correlações clínicas**. Ed. Edgard Blücher, 1ed., 1997, 527p.
8. Green, J.M. 1996. A practical Guide to Analytical Method Validation. **Anal. Chem.**, 68, 1197-1203.
9. Gregory III, J. F. Chemical and nutritional aspects of folate research: analytical procedures, methods of folate synthesis, stability, and bioavailability of dietary folates. **Adv. Food Nutr. Res.**, 33: 1-101, 1989.
10. Hawkes, J. G., Villota, R. Foliates in Foods: reactivity, stability during processing, and nutritional implications. **Food Sci. Nutr.**, 28 (6): 439-538, 1989.
11. Katzung, B. G. **Farmacologia básica e clínica**. São Paulo: Guanabara Koogans, 5ed, 1994, 295p.
12. Konings, E. J. M. A validated liquid chromatographic method for determining folates in vegetables, milk powder, liver and flour. **JAOAC Inter.**, 82(1): 119-127, 1999.
13. Malinow, M. R. et al. Reduction of plasma homocyst(e)ine levels by breakfast cereal fortified with folic acid in patients with coronary disease. **New Engl. J. Med.**, 338(15): 1009-1015, 1998.
14. Maxwell, D. P. E. Cost-control implications of nutrients fortification. **Prep. Food**, 87-88, 1990.
15. Moshfegh, A. J. et al. **Folate intakes**. Food Surv. Res. Group. BHNRC, ARS, USDA, Riverdale, MD, USA, 1998.
16. Osseyi, E. S., Wehling, R. L., Albrecht, J. A. Liquid chromatographic method for determination added folic acid in fortified cereal products. **J. Chromatogr. A**, 826(2): 235-240, 1998.
17. Ranum, P. **Cereal enrichment**. In: Handbook of Cereals Science and Technology. Ed. Lowrenz, New York, 882, 1991.
18. Tsai, M. Y. et al. Genetic cause of mild hiperhomocysteinemia in patients with premature occlusive coronary artery disease. **Atherosc.**, 143: 163-165, 1999.
19. Walter, P. Vitamin requirements and enrichment of foods. **Food Chem.**, 49: 113-117, 1994.

Avaliação intralaboratorial e otimização de método para determinação de tricotecenos em milho por cromatografia a gás-espectrometria de massas

Intralaboratorial evaluation and optimization of a method for determination of trichothecenes in corn by gas chromatography-mass spectrometry

RIALA6/969

Thaís Valéria MILANEZ^{1*}, Lúcia M. VALENTE SOARES, Gisleine Gomes BAPTISTA¹

* Endereço para correspondência: ¹Seção de Química Biológica, Instituto Adolfo Lutz, Av. Dr. Arnaldo, 355, CEP 01246-902, São Paulo, SP

² Departamento de Ciência de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos/UNICAMP, Campinas/SP
Recebido: 31/10/2003 – Aceito para publicação: 12/02/2004

RESUMO

Tricotecenos são micotoxinas produzidas por diferentes espécies de *Fusarium*. Estas micotoxinas formam um grupo de cerca de mais de cem compostos caracterizados pela presença em suas estruturas do mesmo sistema de anéis tetracíclicos cirpenol. Alguns deles são contaminantes naturais em trigo e milho, como o desoxinivalenol (DON), o nivalenol (NIV), a toxina T-2 (T2), o diacetoxiscirpenol (DAS) e a toxina HT-2 (HT2). No presente trabalho foram avaliados e otimizados sistemas de limpeza, extração e derivação para determinação simultânea de DON, NIV, DAS, HT2 e T2 em amostras de milho e seus produtos por cromatografia a gás associada à espectrometria de massas (CG/EM). A extração com acetoneitrila:água (84:16) seguida de limpeza com coluna MycoSep 227 apresentou os melhores resultados para as cinco toxinas estudadas. A derivação com anidrido trifluoroacético / bicarbonato de sódio mostrou-se melhor tanto para a detecção como para quantificação dos tricotecenos estudados por CG/EM. As recuperações obtidas variaram de 83,3 a 113,3% para DON, 84,6 a 114,5% para NIV, 52,1 a 122,7% para DAS, 71,1 a 95,9% para T2 e de 81,8 a 155,4% para HT2. Os limites de detecção variaram de 20 a 50 ng/g para DON, de 10 a 40 ng/g para NIV, de 30 a 120 ng/g para DAS, de 20 a 100 ng/g para T2 e de 20 a 50 ng/g para HT2. A repetitividade do método mostrou desvios padrão relativos variando de 4,5 a 18,1 para DON, 2,9 a 15,4 para NIV, 3,4 a 48,1 para DAS, 3,1 a 14,4 para HT2 e de 6,4 a 47,3 para T2.

Palavras-Chave. tricotecenos, micotoxinas, milho, cromatografia a gás, espectrometria de massas.

ABSTRACT

Trichothecenes are the mycotoxins produced by different *Fusarium* species. Some of them, such as deoxynivalenol (DON), nivalenol (NIV), diacetoxiscirpenol (DAS), toxins T-2 (T2) and HT-2 (HT2), are natural contaminants of wheat and corn. Extraction, clean-up and derivatization steps were evaluated and optimized for simultaneous determination of DON, NIV, DAS, HT2 and T2 in corn and corn products samples by gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS). Extraction with acetonitrile : water (84:16) followed by clean-up through MycoSep 227 column presented the best results for the five toxins analysed. Trifluoroacetic anhydride / sodium bicarbonate derivatization showed better detection and quantification for the trichothecenes studied by GC/MS. The recoveries ranged from 83.3 to 113.3% for DON, 84.6 to 114.5% for NIV, 52.1 to 122.7% for DAS, 71.1 to 95.9% for T2 and from 81.8 to 155.4% for HT2. The detection limits ranged from 20 to 50 ng/g for DON, from 10 to 40 ng/g for NIV, from 30 to 120 ng/g for DAS, from 20 to 100 ng/g for T2 and from 20 to 50 ng/g for HT2. The repeatability of the method had relative standard deviations ranging from 4.5 to 18.1 for DON, 2.5 to 15.4 for NIV, 3.4 to 48.1 for DAS, 3.1 to 14.4 for HT2 and from 6.4 to 47.3 for T2.

Key Words. mycotoxins, trichothecenes, corn, gas chromatography, mass spectrometry.

INTRODUÇÃO

Tricotecenos são micotoxinas de ampla ocorrência em cereais. Isolados e caracterizados como contaminantes naturais em trigo e milho estão o desoxinivalenol (DON), o nivalenol (NIV), o diacetoxiscirpenol (DAS) e as toxinas T-2 (T2) e HT-2 (HT2). Todos produzidos exclusivamente por espécies de *Fusarium*²⁷. Dentre todos, o DON é o de maior ocorrência em alimentos e rações animais e também o menos tóxico²⁴. Os tricotecenos apresentam efeitos tóxicos tais como vômito, angina necrótica, diarreia, anorexia^{22,28}. Ainda, a presença de toxina T2 em grãos está relacionada à doença humana chamada Aleucia Tóxica Alimentar (ATA)³¹.

O milho é um dos substratos mais susceptíveis a este tipo de contaminação, porém os dados são ainda escassos sobre a ocorrência de tricotecenos em milho brasileiro.

A detecção e a determinação destas micotoxinas deve ser realizada por métodos sensíveis e específicos, pois além de ocorrerem em níveis de ng/g (ppb), constituem também um grupo de estruturas muito semelhantes exigindo métodos que além de as separar, também confirme suas identidades. Inicialmente foi utilizada a cromatografia em camada delgada auxiliada por agentes reveladores⁹. A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) vem sendo usada para tricotecenos do grupo B, os quais apresentam uma pequena absorção no ultravioleta. Já para tricotecenos do grupo A, técnicas de derivação tem sido empregadas para determiná-los por CLAE¹⁵, bem como por cromatografia a gás (CG). Atualmente CG é das técnicas a mais utilizadas principalmente acoplada à espectrometria de massas (EM). ACG, devido à sua capacidade superior de resolução, permite a separação e a determinação simultânea dos tricotecenos dos grupos A e B. Entretanto esta técnica requer, em geral, etapas de limpeza mais trabalhosas, envolvendo freqüentemente partição em conjunto com colunas de extração em fase sólida.

Os sistemas de extração de tricotecenos utilizam misturas de solventes polares, como acetonitrila e metanol, misturados com água. No processo de clarificação, um dos precipitantes mais utilizados é o sulfato de amônio e se a amostra for gordurosa faz-se uma etapa extra de desengorduramento seja com hexano ou isotano por exemplo. Para limpeza são muito utilizadas colunas de extração em fase sólida e os adsorventes utilizados são os mais variados, como carvão ativo, Celite, alumina e Florisil^{3,8,17}.

O processo de derivação se faz necessário quando se utiliza a CG, pois reduz a polaridade de grupamentos livres, aumenta a volatilidade, introduz grupos que tornam o composto adequado para o sistema de detecção e, além de tudo, possibilita a separação de substâncias muito semelhantes entre si no seu estado natural. Para os tricotecenos as derivações mais usuais são a siliilação, a fluoroacetilação e a fluoroalquilação^{2,5,7}.

Neste trabalho foram avaliados e otimizados sistemas de extração, limpeza e derivação para determinação simultânea de DON, NIV, DAS, HT2 e T2 utilizando cromatografia a gás associada à espectrometria de massas. A metodologia otimizada

foi avaliada intralaboratorialmente através da verificação da recuperação, repetitividade e limite de detecção para os tricotecenos estudados em milho e produtos de milho.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras

Amostras de milho e produtos de milho, entre eles farinha de milho, canjica, fubá, sêmola, quirera, milho verde em lata e flocos de milho, provenientes do estado de São Paulo, foram moídas até 16 mesh, embaladas em sacos plásticos duplos e armazenadas em congelador a -18°C até o momento da análise.

Padrões

Foram preparadas soluções estoque ao redor de 100µg/ml de desoxinivalenol (DON), nivalenol (NIV) (SIGMA) em acetonitrila, e de diacetoxiscirpenol (DAS), toxinas T-2 (T2) e HT-2 (HT2) (SIGMA) em metanol, e soluções de trabalho em cerca de 10 µg/mL, todas acondicionadas em frascos bem fechados, protegidos da luz e armazenados a -18°C.

Padrões internos

Soluções de alfa-cloralose 80 µg/mL (SIGMA) em metanol e de éster metílico do ácido araquídico (Poly Science) 100 µg/mL em hexano, foram preparadas e acondicionadas em frasco âmbar a -18°C.

Solventes e Reagentes

Trimetilclorosilano, n-trimetilsilimidazol, anidrido trifluoroacético, 4-dimetil aminopiridina, imidazol (SIGMA) e anidrido pentafluoropropiônico (Pierce). Colunas de extração em fase sólida MycoSep 225 e 227 (Romer Labs).

Cromatógrafo a gás com espectrômetro de massas

Equipamento modelo GCQ (Finnigan MAT) com *ion trap* operando com impacto de elétrons (70 eV). Processador de dados Xcalibur 1.1. Coluna capilar Rtx-5MS (5% difenil-95% dimetil polisiloxano) com 30m de comprimento, 0,25mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura de fase estacionária (Restek). Temperatura do injetor: 260°C. Programação do forno: 80°C/0,20 min, 22°C/min, 205°C/0,25min, 2°C/min até 270°C, fluxo constante, velocidade 40,0 cm/s.

Condições fixadas: modo *full scan* (cromatograma com os íons totais-TIC) e cromatograma do íon reconstituído (RIC). Temperatura da fonte de íons: 200°C e da linha de transferência: 275°C. Volume de injeção: 1 µL, modo de injeção *splitless* e tempo de *splitless* 1 min.

Avaliação de sistemas de derivação

Foram testados três tipos de derivação: siliilação com trimetilsilimidazol (TMSI), fluoroacetilação com anidrido trifluoroacético (TFAA) e com anidrido pentafluoropropiônico (PFPA).

Derivação com trimetilsililimidazol (TMSI): de acordo com Tanaka et al.²³, foram adicionados 200 µL da mistura de n-trimetilsililimidazol (TMSI), trimetilclorosilano e acetato de etila (1:0,2:9). Após 20 min em temperatura ambiente (cerca de 25°C), adicionou-se 2800 µL de acetato de etila, à mistura. Após homogeneização realizou-se injeção de 1 µL no cromatógrafo.

Derivação com anidrido pentafluoropropiônico (PFFA): de acordo com Solfrizzo (1997) (comunicação pessoal) foi adicionado 1 mL de benzeno ao resíduo, homogeneizado e a mistura evaporada sob fluxo de nitrogênio. Ao resíduo foram adicionados 500 µL da mistura tolueno-acetonitrila (85+15, v/v) contendo imidazol 0,4 M, seguido de 100 µL de PFFA. As soluções foram misturadas e derivadas por 1h a 60°C. Em seguida a solução foi resfriada até cerca de 25°C e foram adicionados 500 µL de hexano. A fase orgânica foi lavada com solução de bicarbonato de sódio 5% e em seguida com água. A fase aquosa foi removida e a fase orgânica seca com sulfato de sódio anidro. A fase orgânica foi transferida para outro frasco seco e 1 µL desta fase foi injetado no cromatógrafo.

Derivação com anidrido trifluoroacético (TFAA): para este sistema de derivação foram testadas duas bases, bicarbonato de sódio e dimetil amino piridina.

Reação em presença de 4-dimetil aminopiridina (DMPA): foram adicionados 1mL de solução de DMPA, 1,5 mg/mL da mistura tolueno: acetonitrila (95+5, v/v) e 200 µL de TFAA. A derivação se deu a 60°C por 30min. Após atingir temperatura ambiente, foi adicionado 1mL de solução de KH₂PO₄ 5%. O frasco fechado foi homogeneizado. Após a separação das camadas, a camada superior foi transferida para um segundo frasco contendo 1mL de KH₂PO₄ 5%. Após nova agitação, a fase superior foi transferida para frasco limpo e foi injetado 1 µL no cromatógrafo.

Reação em presença de bicarbonato de sódio: de acordo com Schwadorf e Muller²¹ e Schollenberger et al.²⁰ foi adicionado 1 mL de metanol, com breve sonificação, para garantir ausência de umidade, e evaporado a 40°C. Ao resíduo foram adicionados 200 µL de TFAA e cerca de 20mg de bicarbonato de sódio. O frasco foi fechado, agitado e levado a 80°C por 30 min. Após esta etapa, o frasco foi aberto e evaporado até securo. Ao resíduo foram adicionados 100 µL de tolueno e em seguida foram acrescentados 400 µL de água. Após leve agitação, a fase superior de tolueno foi transferida para outro frasco e foram adicionados cerca de 5-10mg de sulfato de sódio anidro. Após cerca de 15 min, a fase de tolueno foi transferida para outro frasco seco e 1µL foi injetado no cromatógrafo.

Avaliação de padrão interno

Foram testados o éster metílico do ácido araquídico, utilizado por Furlong e Valente Soares³ e Oliveira¹², e alfa-cloralose, recomendado por Solfrizzo (1997) (comunicação pessoal), Langseth e Rundberget⁷ e Schothorst e Jekel¹⁹.

Avaliação de sistema de extração e limpeza

Teste do sistema de extração e limpeza de Oliveira e Valente Soares¹³ utilizando coluna MycoSep 225: extração de 50g de

amostra foi executada com 270mL de metanol e 30 mL de cloreto de potássio 4% aquoso, por 5 min em liquidificador. Do extrato filtrado foi tomada uma alíquota de 150 mL para clarificação com sulfato de amônio 30% aquoso. Após clarificação e filtração foi tomada outra alíquota de 150 mL a qual foi transferida para um funil de separação já contendo 150 mL de água destilada. Duas partições com 15 mL de diclorometano foram realizadas. As fases orgânicas foram reunidas e daí foram retirados 15 mL, que foi levado à securo a 50°C sob corrente de nitrogênio. O resíduo foi levado a uma segunda etapa de limpeza em uma coluna MycoSep 225. O resíduo seco foi redissolvido em 8 mL da mistura acetonitrila:água (84:16,v/v) e aplicado na coluna. Foram coletados 4mL do eluato e evaporados a 80°C. O extrato seco foi submetido à derivação.

Teste do sistema de extração e limpeza usando coluna MycoSep 225: a 25g da amostra triturada e homogeneizada foram adicionados 100mL da mistura de acetonitrila/água (84+16, v/v) e colocados em agitação em liquidificador por 5 min. Após decantação da mistura foi colhida uma alíquota de cerca de 6-8 mL para um tubo de vidro. A coluna MycoSep foi inserida como um êmbolo neste tubo. Uma alíquota de 4 mL do extrato limpo foi colhida e transferida para um frasco âmbar onde foi evaporada à securo. A seguir foi executada a derivação.

Teste de extração usando concentração da amostra antes da coluna MycoSep 225: com o intuito de aumentar a sensibilidade do método foi testada uma etapa de concentração antes da limpeza na coluna. Assim após extração descrita em 7.2 foram retiradas alíquotas de 50, 30 e 20 mL que foram evaporadas a 60°C até cerca de 5mL. As alíquotas tiveram o volume completado para 8 mL com acetonitrila/água (84+16, v/v). E a limpeza foi realizada com coluna MycoSep 225. Foram retirados 4 mL para frasco âmbar e executada a derivação com TFAA.

Teste de extração usando coluna MycoSep 227: idem como em 7.2. utilizando coluna MycoSep 227, versão da 225 com o dobro da quantidade de recheio.

Validação intralaboratorial

Os testes de recuperação, repetitividade e limites de detecção e quantificação foram conduzidos em amostras, livres de tricotecnos, artificialmente contaminadas com 0,5 µg/g de padrão de cada tricoteceno estudado (DON, NIV, DAS, T2 e HT2).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Escolha do melhor agente de derivação e das melhores condições de derivação

A silição é um processo de derivação utilizado principalmente para tricotecnos do grupo B, como DON e NIV¹¹, neste caso tricotecnos dos grupos A e B foram derivados, porém T2 e HT2 ficaram muito próximos, não houve resolução para estes tricotecnos do grupo A.

A silição traz uma vantagem que é a maior estabilidade dos derivados, que podem ser estocados por pelo menos dez

dias a -18°C , porém, o excesso de reagente pode danificar a coluna e podem aparecer picos duplos no cromatograma (derivação incompleta)¹⁴ (Figura 1).

A pentafluoroacetilação gerou cromatogramas com muito ruído e linha de base instável. Além disso, a sensibilidade foi pequena, não sendo possível calcular a recuperação. Desta forma este processo foi descartado.

Dois métodos de trifluoroacetilação foram testados: o de Armstrong et al.¹ e de Schwadorf e Muller²¹ modificado por Schollenberger et al.²⁰. A trifluoroacetilação de forma geral gerou cromatogramas mais limpos, tricotecenos mais bem resolvidos e com maior sensibilidade inclusive perante a sililação. A trifluoroacetilação segundo Schwadorf e Muller²¹ quando comparada à utilizada por Armstrong et al.¹ envolve menos etapas e, portanto, está menos sujeita a perdas na etapa final quando se trabalha com volumes menores que 100 μL . Com trifluoroacetilação todos os tricotecenos foram obtidos bem resolvidos (Figura 2). Os fragmentos mais característicos obtidos estão na Tabela 1.

Alguns dos fragmentos observados na Tabela 1 se repetem nos vários tricotecenos por se tratarem de substâncias

semelhantes. Além disso, o processo de fragmentação usado, que foi o impacto de elétrons, gera muitos fragmentos pequenos sendo que muitas vezes nem se observa o íon molecular. Fragmentos menores podem levar este processo a estar mais sujeito às interferências de contaminantes e ao efeito matriz. Estes fragmentos são pouco confiáveis para identificação e podem ser ocultados numa quantificação. Usualmente os fragmentos de massa maiores são mais característicos.

A trifluoroacetilação trouxe derivados cujos fragmentos apresentaram melhores relações sinal/ruído e os tricotecenos bem resolvidos.

Outro parâmetro avaliado foi a sensibilidade (s) do detector com relação a cada tricoteceno. Como o detector utilizado responde a massa, definiu-se s como a área do pico cromatográfico integrado/massa do analito que passa pelo detector. Desta forma observou-se que (Tabela 2) o detector apresentava maior sensibilidade para os derivados-TFAA do que os derivados-TMSI. A sensibilidade para DON-TFA foi cerca de 1,7 e para NIV-TFA e T2-TFA praticamente o dobro do que seus derivados sililados. Para HT2, a sensibilidade foi quase

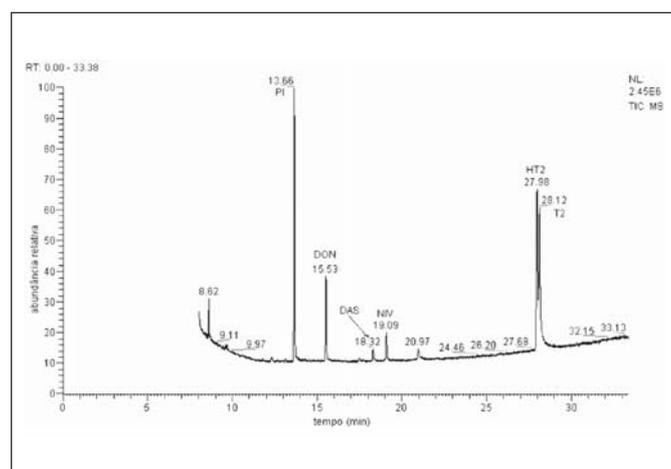


Figura 1. Cromatograma obtido por cromatografia gasosa/espectrometria de massas de 2,4 ng de desoxinivalenol (DON), 2,1 ng de nivalenol (NIV), 2,2 ng de diacetoxiscirpenol (DAS), 22 ng de toxina HT-2 (HT2) e 10 ng de toxina T-2 (T2), todos sililados, utilizando-se coluna Rtx-5MS, 30 m x 0,25 mm e 0,25 μm de espessura de fase estacionária (Restek Corp.,PA). Programação: $80^{\circ}\text{C}/0,20$ min, para 205°C a $18^{\circ}\text{C}/\text{min}$, $205^{\circ}\text{C}/0,25$ min, até 270°C a $2^{\circ}\text{C}/\text{min}$.

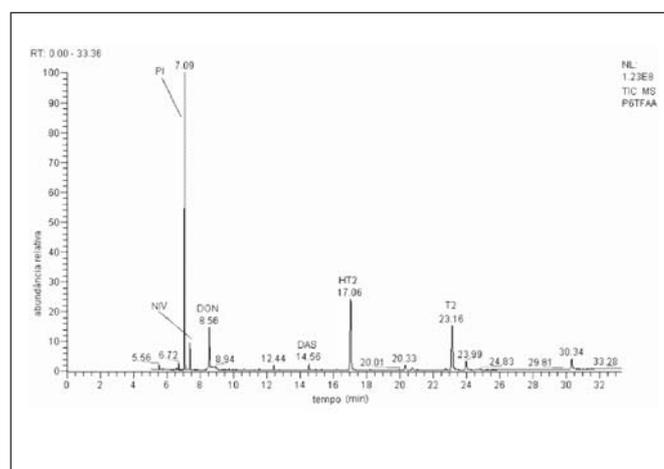


Figura 2. Cromatograma obtido por cromatografia gasosa/espectrometria de massas de 4 ng de cada um dos tricotecenos trifluoroacetilados: desoxinivalenol (DON), nivalenol (NIV), diacetoxiscirpenol (DAS), toxina T-2 (T2), toxina HT-2 (HT-2) e alfa-cloralose (PI), utilizando-se coluna Rtx-5MS, 30 m x 0,25 mm e 0,25 μm de espessura de fase estacionária (Restek Corp.).

Tabela 1. Massas características dos tricotecenos de acordo com a derivação realizada.

Tricotecenos	Fragmentos m/z considerados mais característicos	
	com sililação	com fluoracetilação
DON	73, 207, 235, 259, 333, 393, 422, 512	117, 145, 194, 205, 231, 259, 373, 470, 584
NIV	73, 191, 231, 261, 289, 349, 379, 482, 510, 585	194, 229, 257, 359, 371, 485, 696
DAS	73, 124, 159, 197, 244, 272, 290, 350, 378	91, 105, 124, 201, 229, 296, 359, 329, 402
T2	73, 122, 185, 244, 272, 290, 350, 436	121, 138, 180, 205, 227, 327, 401, 418, 462
HT2	73, 157, 185, 203, 245, 275, 347, 466	121, 138, 180, 205, 341, 455, 472

DON = desoxinivalenol; NIV = nivalenol; DAS = diacetoxiscirpenol, HT2 = toxina HT-2; T2 = toxina T-2

cinco vezes maior e para DAS a sensibilidade foi praticamente semelhante com relação aos derivados sililados.

Escolha do padrão interno

Na escolha do melhor padrão interno levou-se em consideração o fato de que o éster metílico do ácido araquídico não era derivado como os tricotecenos, ele era simplesmente adicionado no extrato final com o intuito de controlar distorções do volume de injeção. Notou-se que cumpriu sua função com quatro dos tricotecenos, porém, seu tempo de retenção coincidia exatamente com o do DON. Já o alfa-cloralose funcionou para todas as derivações testadas com pequenos ajustes na programação de temperatura da coluna, desta forma também controlando a etapa de derivação uma vez que sua quantidade é sempre constante. Langseth e Rundberget⁷ já haviam verificado que esta substância preenchia todos os requisitos de um padrão interno tanto para derivados sililados como para os pentafluoroacetilados e provavelmente funcionaria para os heptafluoroacetilados. Neste estudo verificou-se que também pode ser usado para os trifluoroacetilados. O alfa-cloralose apresentou tempo de retenção de 13,63 min quando sililado e de 7,17 min quando trifluoroacetilado. Seus fragmentos mais característicos foram 73, 147, 191, 205, 217, 245 com a sililação e 81, 109, 223, 251, 319, 479 com a fluoracetilação.

Confirmação dos resultados

Para confirmação dos resultados geralmente três íons são considerados suficientes para confirmação de um espectro de impacto de elétrons^{16,30}. Neste trabalho a identidade dos tricotecenos foi determinada comparando-se tempos de retenção, espectros de massas e presença de cinco a seis fragmentos de massas mais característicos.

Na Tabela 3 estão os fragmentos de massas selecionados^{10,11} para detecção e quantificação dos tricotecenos derivados tanto por sililação quanto por fluoroacetilação.

Para a quantificação foram utilizados de cinco a seis íons/fragmentos para cada tricoteceno, conforme Tabela 3, a fim de se diminuir oscilações observadas, provavelmente originárias da própria estrutura do equipamento *ion trap* (armadilha de íons).

Avaliação de sistema de extração e limpeza

Nesta etapa foram utilizadas amostras de milho artificialmente contaminadas com 0,5 µg/g de DON, NIV, DAS, T2 e HT2 e foram observadas a recuperação dos tricotecenos e aspecto dos cromatogramas (eliminação de ruído e de interferentes). A técnica de extração testada descrita por Furlong e Valente Soares³ modificada por Oliveira e Valente Soares¹³ acrescida da limpeza em coluna MycoSep 225 não apresentou nenhuma recuperação, de nenhum dos tricotecenos, para as matrizes farinha de milho, milho verde em lata e sêmola. As amostras de fubá mostraram recuperação para DON (150%), DAS (32%), HT2 (133%), e T2 (190%). Para a canjica e flocos de milho, houve recuperação de DON (116% e 83%, respectivamente) e T2 (30% e 84%, respectivamente), todos valores médios de duas análises. NIV não foi recuperado em nenhum grau e em nenhuma das amostras. Devido a esta incapacidade de recuperar NIV e DAS e as recuperações de DON, HT2 e T2 em todos os tipos de amostras serem inadequadas, este sistema de extração foi descartado.

No teste do sistema de extração e limpeza usando coluna MycoSep 225, com concentração antes de limpeza em coluna MycoSep 225, foram empregadas amostras de canjica, fubá, milho em lata, flocos e farinha de milho. A concentração teve o intuito de aumentar a quantidade de amostra no extrato final, consequentemente aumentando a sensibilidade do método. Porém não houve recuperação para NIV e DAS na concentração de alíquota de 50 mL e para DON, HT2 e T2 as recuperações foram abaixo de 20%. Para alíquotas de 20 e 30mL, após concentração, as recuperações foram especialmente elevadas, acima de 200%, para DAS, HT2 e T2. Para DON e NIV, ocorreu o oposto, as recuperações foram baixas, menos de 10%, com exceção da alíquota de 20mL para amostras de canjica, cujos valores médios de recuperação para DON, NIV, DAS e HT2 foram 61, 77, 200 e 118% respectivamente. A recuperação para T2 ficou abaixo de 10%. O efeito matriz foi decisivo, mesmo usando a reconstituição do cromatograma apenas com os íons característicos das micotoxinas. É provável que muitos destes íons também fizessem parte da fragmentação dos extratos de amostra. Estes resultados mostraram que a coluna MycoSep não era apropriada para limpeza de extratos concentrados de nenhuma forma.

Tabela 2. Sensibilidade (relação área integrada / massa) para cada um dos tricotecenos derivados por sililação e trifluoroacetilação

TRICOTECENOS	SENSIBILIDADE (C.s/ ng) *	
	derivados sililados **	derivados trifluoroacetilados **
DON	1,06 x 10 ⁶	1,77 x 10 ⁶
NIV	0,44 x 10 ⁶	0,92 x 10 ⁶
DAS	0,17 x 10 ⁶	0,19 x 10 ⁶
HT2	0,29 x 10 ⁶	1,39 x 10 ⁶
T2	0,43 x 10 ⁶	0,93 x 10 ⁶

DON = desoxinivalenol; NIV = nivalenol; DAS = diacetoxiscirpenol, HT2 = toxina HT-2; T2 = toxina T-2

* cálculo baseado na concentração de padrões 6 ng/µL

** valores médios

Tabela 3. Fragmentos m/z derivados mais freqüentemente usados na quantificação e selecionados para este trabalho

Tricotecenos e PI	Fragmentos m/z derivados					Referências
Alfa-cloralose (PI)						
Sililação	73	191	205	217	245	
Fluoroacetilação	81	109	223	251	319	
DON						
Sililação	73	235	393	422	512	Mirocha et al. 1986
Fluoroacetilação	117	145	231	259	584*	Mclachlan et al.1992
NIV						
sililação	73	191	261	289	510	Mirocha et al. 1986
Fluoroacetilação	229	257	359	371	696*	Mclachlan et al.1992
DAS						
sililação	73	244	290	350	378	Mirocha et al. 1986
fluoroacetilação	91	124	229	329	402	Mclachlan et al.1992
HT2						
sililação	73	185	157	203	466	Mirocha et al. 1986
Fluoroacetilação	121	138	180	341	455	Mclachlan et al.1992
T2						
Sililação	73	185	244	290	350	Mirocha et al. 1986
Fluoroacetilação	121	138	180	227	327 e 401	Mclachlan et al.1992

DON = desoxinivalenol; NIV = nivalenol; DAS = diacetoxiscirpenol, HT2 = toxina HT-2; T2 = toxina T-2

* íon molecular

PI = padrão interno

O mesmo método executado sem nenhuma concentração antes da limpeza com coluna MycoSep 225 apresentou cromatogramas com alguns picos interferentes, porém, nenhum em tempo de retenção que pudesse interferir na detecção e quantificação dos tricotecenos ou do padrão interno. Porém não se obteve recuperação para NIV em canjica (Tabela 4). A Figura 3 traz os cromatogramas obtidos por cromatografia gasosa/espectrometria de massas de amostra de farinha de milho sem contaminação e contaminada artificialmente com 0,5 µg/g de cada tricoteceno testado.

O teste de extração e purificação foi também efetuado com a coluna MycoSep 227, que tem o dobro do material de recheio da 225, portanto destinada à amostras mais complexas. Os valores obtidos nos testes com adição de 0,5µg/g de cada tricoteceno nas amostras, com cinco repetições, estão na Tabela 4.

Observando os dados da Tabela 4 verifica-se que de forma geral os resultados estão dentro da faixa aceitável estabelecida por Horwitz et al.⁴ para análise de traços (ppb), de 70 a 120%. Usando a coluna 227 conseguiu-se recuperar NIV de canjica, o que não havia sido possível com a coluna 225. Porém, continuou impossível recuperar DON e NIV das amostras de milho verde em lata, inclusive porque há uma grande região no início do cromatograma totalmente coberta pelos co-extrativos, que encobrem não apenas os tricotecenos que possuem os tempos de retenção menores, mas também o PI. Neste caso para calcular a concentração de DAS, HT2 e T2 foi necessário usar calibração externa.

De forma geral a coluna 227 foi considerada a mais adequada para limpeza dos extratos das amostras de milho e produtos de milho.

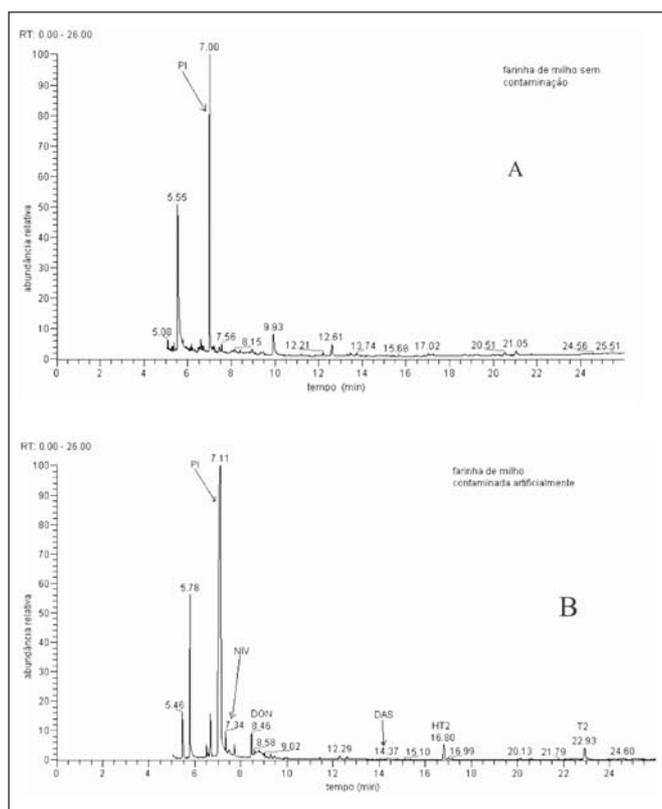


Figura 3. Cromatogramas obtidos por cromatografia gasosa/espectrometria de massas de amostra de farinha de milho com alfa-cloralose (PI) (A) sem contaminação e (B) contaminada artificialmente com 0,5 µg/g de desoxinivalenol (DON), nivalenol (NIV), diacetoxiscirpenol (DAS) e toxinas T-2 (T2) e HT-2 (HT2). Amostra extraída e limpa por método usando 4 mL do extrato concentrado antes de passagem pela coluna MycoSep 225 e submetida à derivação com TFAA.

Validação intralaboratorial da metodologia escolhida

A recuperação e a repetitividade foram realizadas cinco repetições em amostras de milho e produto de milho artificialmente contaminadas com 0,5 µg/g de cada tricoteceno, DON, NIV, DAS, HT2 e T2. As amostras contaminadas foram extraídas com acetonitrila + água (84+16,v/v) e seus extratos passados pelas colunas MycoSep 227. Os extratos limpos foram derivados com TFAA/bicarbonato de sódio sólido.

As recuperações (Tabela 5) variaram de 83,3 a 113,3 % para DON, 84,6 a 114,5% para NIV, 52,1 a 122,7% para DAS, 71,1 a 95,9 % para T2 e de 81,8 a 155,4 % para HT2.

A repetitividade do método mostrou desvios padrão relativos (DPR) variados de acordo com o tipo de amostra e o tricoteceno avaliado, variando de 4,5 a 18,1 para DON, 2,5 a 15,4 para NIV, 3,4 a 48,1 para DAS, 3,1 a 14,4 para HT2 e de 6,4 a 47,3 para T2. As curvas de calibração interna foram lineares de 0,8 a 10,0 ng/µL para DON e NIV, de 0,8 a 6,0 ng/µL para DAS, de 0,8 a 20,0 ng/µL para T2 e de 0,8 a 35,0 ng/µL para HT2. Foram traçadas curvas de calibração externa para utilização nas amostras de milho verde em lata. As curvas de calibração externa foram lineares de 0,8 a 10,0 ng/µL DON, DAS, HT2 e T2 e de 0,8 a 8,0 ng/µL para NIV.

Os resultados das recuperações e dos limites de detecção e quantificação em amostras de produtos de milho foram superiores aos obtidos nas amostras de milho em grão. O efeito matriz foi muito grande. Segundo Plattner et al.¹⁶ na maioria dos casos é o ruído químico, e não a sensibilidade, o fator limitante na análise de uma micotoxina, em particular num sistema CGEM. Ruído químico é considerado como os sinais interferentes produzidos por constituintes estranhos da amostra.

Os limites de detecção foram calculados baseando-se nas recomendações de Taylor²⁶, sendo verificadas as concentrações que originaram picos com um sinal pelo menos três vezes o DPR, e que o pico cromatográfico do tricoteceno gerasse seu espectro coincidente nos cinco fragmentos selecionados, assegurando desta forma a comprovação de sua identidade. Os limites de quantificação foram considerados como quinze vezes o desvio padrão relativo, os resultados para as diferentes matrizes estão na Tabela 6.

Os resultados obtidos quando comparados aos da literatura para matrizes como milho apresentam certa proximidade. Rosen e Rosen¹⁸ obtiveram recuperação variando de 80 a 100% e DPR entre 1,6 e 14,2%, usando CGEM com modo SIM. Tanaka et al.²⁵ obteve recuperação de 81 a 92% e DPR de 4,4 a 5,7 também utilizando CGEM com SIM.

Este trabalho utilizou impacto de elétrons (IE) e foi aplicada a técnica de reconstituição de íons do cromatograma. Os altos valores obtidos em algumas recuperações podem ser devidos a uma coincidência dos íons escolhidos para RIC também fazerem parte da amostra. Além disso, é importante dizer que no instrumento com íon trap pode ocorrer auto-ionização dos íons, que pode prejudicar a quantificação, alterando a quantidade de amostra e consequentemente mudar drasticamente a sensibilidade²⁹. Este é um motivo pelo qual equipamentos com íon trap são mais indicados para quantificação com ionização química e não com impacto de elétrons²⁰. Entretanto, este estudo superou, pelo menos em parte, estes problemas e os resultados obtidos se assemelham a outros citados na literatura.

Duas revisões mais recentes, Langseth e Rundberger⁷ e Krska et al.⁶ concluíram que a detecção por espectrometria de

Tabela 4. Valores médios de recuperação (%) de amostras de milho e produtos de milho artificialmente contaminadas (0,5 µg/g) de DON, NIV, DAS, HT2 e T2 usando limpeza com colunas MycoSep 225 e 227.

Amostras	Recuperação*					Coluna usada
	DON	NIV	DAS	HT2	T2	
Canjica	81,0	Nr	75,0	81,0	108,0	225
	105,7	99,2	122,7	115,9	92,9	227
Fubá	86,0	64,0	62,8	105,2	103,9	225
	113,3	112,5	69,4	129,2	88,4	227
Farinha de milho	95,1	68,1	102,6	100,7	118,9	225
	99,8	89,9	83,5	155,4	95,9	227
Quirera	111,0	80,0	69,0	82,0	106,0	225
	83,3	84,8	74,2	102,6	74,5	227
Flocos de milho	140,0	84,0	68,0	124,0	108,0	225
	87,2	86,7	112,3	105,4	71,7	227
Milho em lata	nr	nr	122,0	76,0	124,0	225
	nr	nr	116,8	81,8	71,1	227
Milho em grão	85,4	84,1	109,3	108,4	69,6	225
	86,1	84,6	101,6	89,1	71,1	227

*Valores médios de cinco repetições; nr = não recuperado; DON = desoxinivalenol; NIV = nivalenol; DAS = diacetoxiscirpenol, HT2 = toxina HT-2; T2 = toxina T-2

Tabela 5. Valores médios de recuperação, desvio padrão e desvio padrão relativo, para DON, NIV, DAS, HT2 e T2 para amostras de produtos de milho, utilizando coluna MycoSep 227

		milho em grão	canjica	flocos de milho	farinha de milho	fubá	quirera	sêmola	milho em lata
DON	%R média*	86,1	105,7	87,2	99,8	113,3	83,3	102,5	nr
	DP	5,6	4,8	11,1	18,1	8,0	4,8	14,8	
	DPR	6,5	4,5	12,7	18,1	7,1	11,5	14,4	
NIV	%R média*	84,6	99,2	86,7	89,9	112,5	84,8	114,5	nr
	DP	2,5	8,2	13,4	12,2	5,5	3,5	5,0	
	DPR	2,9	8,3	15,4	13,6	4,9	4,1	4,4	
DAS	%R média*	101,6	122,7	112,3	83,5	69,4	74,2	52,1	116,8
	DP	11,8	11,8	3,8	20,1	8,3	35,7	9,7	9,9
	DPR	11,6	9,6	3,4	24,1	12,0	48,1	18,7	8,5
HT2	%R média*	89,1	115,9	105,4	155,4	129,2	102,6	140,9	81,8
	DP	12,9	6,1	3,3	16,0	9,9	14,6	8,9	10,2
	DPR	14,4	5,2	3,1	10,3	7,7	14,2	6,3	12,5
T2	%R média*	71,1	92,9	71,7	95,9	88,4	74,5	83,6	71,1
	DP	4,5	18,1	5,0	6,7	11,1	11,9	14,5	33,6
	DPR	6,4	19,5	7,0	7,0	12,5	16,1	17,3	47,3

%Rmédia* = porcentagem de recuperação média de cinco determinações; DPR = desvio padrão relativo; DP = desvio padrão; nr = não recuperado

Tabela 6. Limites de detecção e quantificação (ng/g) de derivados trifluoroacetilados de DON, NIV, DAS, T2e HT2 determinados em milho em grão e produtos de milho por CG-EM

Tricoteceno	DON		NIV		DAS		HT2		T2	
	LD	LQ								
milho em grão	20	90	10	50	40	180	40	200	20	70
Canjica	20	70	30	120	40	180	20	100	60	300
Quirera	20	70	20	60	120	550	50	220	40	200
flocos de milho	40	170	40	200	20	60	20	50	20	80
farinha de milho	60	300	40	200	60	300	50	250	20	100
Fubá	30	120	30	90	30	150	30	150	40	170
Sêmola	50	220	20	80	30	150	30	150	50	220
milho verde em lata	nd	nd	nd	nd	30	150	30	150	100	500

NOTA: valores médios de 5 repetições; nd = não determinado; LD = limite de detecção; LQ = limite de quantificação; DON = desoxinivalenol; NIV = nivalenol; T2 = toxina T-2; HT2 = toxina HT-2; DAS = diacetoxiscirpenol

massas é essencial para obtenção de resultados confiáveis a respeito de tricotecenos presentes em pequenas concentrações. E há uma vantagem neste método que é a determinação simultânea de vários tricotecenos.

CONCLUSÕES

Extração utilizando acetonitrila e água (84 + 16, v/v) e limpeza com coluna MycoSep 227 mostrou-se a mais adequada para determinação dos tricotecenos DON, NIV, DAS, HT2 e T2 em milho e produtos de milho por cromatografia a gás associada à espectrometria de massas. Em termos de derivação o uso de

anidrido trifluoroacético em presença de bicarbonato de sódio sólido produziu resultados mais sensíveis, menos interferentes e boa estabilidade.

Os cromatogramas foram reconstituídos com os fragmentos mais característicos para reduzir o efeito matriz com bons resultados. Para quantificação, foi empregada a padronização interna para a maioria das amostras, e padronização externa para amostras de milho verde enlatado.

As recuperações variaram para os diversos produtos de milho de 83,3 a 113,3 % para DON, 84,6 a 114,5% para NIV, 52,1 a 122,7% para DAS, 71,1 a 95,9 % para T2 e de 81,8 a 155,4 % para HT2. Os limites de detecção variaram de 20 a 50 ng/g para DON, de 10 a 40 ng/g para NIV, de 30 a 120 ng/g para DAS, de 20 a 50

para HT2 e de 20 a 100 para T2. Os limites de quantificação variaram de 70 a 300 ng/g para DON, de 50 a 200 ng/g para NIV, de 60 a 300 ng/g para DAS, de 50 a 250 ng/g para HT2 e de 70 a 500 ng/g para T2.

A repetitividade do método mostrou desvios padrão relativos (DPR) variados de acordo com o tipo de amostra e de tricoteceno, variando de 4,5 a 18,1 para DON, 2,5 a 15,4 para NIV, 3,4 a 48,1 para DAS, 3,1 a 14,4 para HT2 e de 6,4 a 47,3 para T2. As amostras que mostraram maiores valores de DPR e de limites de detecção e quantificação foram aquelas que apresentaram maior quantidade de co-extrativos nos seus cromatogramas, em especial milho verde em lata e farinha de milho.

AGRADECIMENTO

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo auxílio à pesquisa concedido.

REFERÊNCIAS

1. Armstrong, J.F. et al. Determination of vomitoxin and other trichothecene mycotoxins in feeds by GC/ion trap MS with acetonitrile chemical ionization. Comunicação pessoal referente a poster apresentado em Montreal/ Canada no AOAC Meeting de 1998.
2. Furlong, E.B. **Tricotecenos em trigo: um estudo de metodologia analítica, incidência, contaminação simultânea por outras micotoxinas e de alguns fatores que influem na produção no campo**. Campinas, 1992. 120p. Tese (Doutor em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
3. Furlong, E.B.; Valente Soares, L.M. Gas chromatographic method for quantification and confirmation of trichothecenes in wheat. **JAOAC Int.**, 78 (2): 386-90, 1995.
4. Horwitz, W.; Kamps, L.R.; Boyder, K.W. Quality assurance in the analysis of foods for trace constituents. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, 63 (6): 1344-54, 1980.
5. Kientz, C.E.; Verweij, A. Trimethylsilylation and trifluoroacetylation of a number of trichothecenes followed by gas chromatographic analysis on fused-silica capillary columns. **J. Chromatogr.**, 355: 229-40, 1986.
6. Krska, R. Performance of modern samples preparation techniques in the analysis of *Fusarium* mycotoxins in cereals. **J. Chromatogr. A**, 815: 49-57, 1998.
7. Langseth, W.; Rundberget, T. Instrumental methods for determination of non macrocyclic trichothecenes in cereals, foodstuffs and cultures (review). **J. Chromatogr. A**, 815: 103-21, 1998.
8. Marochi, M.A., Valente Soares, L.M. Metodologia para determinação de tricotecenos e zearalenona em grãos. **Bol. SBCTA**, 27(1):1-8, 1993
9. Marochi, M.A.; Valente Soares, L.M.; Furlani, R.P.Z. Testes confirmatórios para tricotecenos. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 56 (2): 17-20, 1996.
10. McLachlan, A. et al. Production of trichothecene mycotoxins by Australian *Fusarium* species. **Food Addit. Contam.**, 9(6): 631-7, 1992.
11. Mirocha, C.J. et al. Mass spectra of selected trichothecenes. In: **Modern methods in the analysis and structural elucidation of mycotoxins**; Cole, R.J., Ed.; Academic Press: New York, 1986; pp.53-392.
12. Oliveira, A.Q. Tricotecenos em milho: uma avaliação de métodos analíticos e da incidência em milho pipoca. 2001. 132f. Dissertação (mestrado)-Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2001.
13. Oliveira, A.Q.; Valente Soares, L.M. Avaliação de métodos para determinação de tricotecenos em milho por cromatografia gasosa. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 60(2): 129-34, 2001.
14. Onji, Y. et al. Direct analysis of several *Fusarium* mycotoxins in cereals by capillary gas chromatography-mass spectrometry. **J. Chromatogr. A**, 815: 59-65, 1998.
15. Pascale, M.; Haidukowski, M.; Visconti, A. Determination of T-2 toxin in cereal grains by liquid chromatography with fluorescence detection after immunoaffinity column clean-up and derivatization with 1-anthroylnitrile. **J. Chromatogr. A**, 989(2): 257-64, 2003.
16. Plattner, R.D.; Beremand, M.N.; Powell, R.G. Analysis of trichothecene mycotoxins by mass spectrometry and tandem mass spectrometry. **Tetrahedron**, 45(8):2251-62, 1989.
17. Romer, T.R. Use of small charcoal/alumina cleanup columns in determination of trichothecene mycotoxin in food and feeds. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, 69(4): 599-703, 1986
18. Rosen, R.T.; Rosen, J.D. Quantification and confirmation of four *Fusarium* mycotoxins in corn by gas chromatography-mass spectrometry-selected ion monitoring. **J. Chromatogr.**, 283: 223-30, 1984.
19. Schothorst, R.C.; Jekel, A.A. Determination of trichothecenes in wheat by capillary gas chromatography with flame ionization detection. **Food Chem.**, 73: 111-7, 2001.
20. Schollenberger, M. et al. Determination of eight trichothecenes by gas-chromatography-mass spectrometry after sample clean-up by a two-stage solid-phase extraction. **J. Chromatogr. A**, 815: 123-32, 1998.
21. Schwadorf, K.; Müller, H-M. Determination of trichothecenes in cereals by gas-chromatography with ion-trap detection. **Chromatographia**, 32 (3/4): 137-42, 1991
22. Snyder, A.P. Qualitative, quantitative and technological aspects of the trichothecenes mycotoxins. **J. Food Prot.**, 49(7):544-69, 1986.
23. Tanaka, T. et al. A survey of the occurrence of nivalenol, deoxynivalenol and zearalenone in foodstuffs and health foods in Japan. **Food Addit. Contam.**, 2: 259-65, 1985.
24. Tanaka, T. et al. Worldwide contamination of cereals by the *Fusarium* mycotoxins nivalenol, deoxynivalenol and zearalenone. 1. Survey of 19 countries. **J. Agric. Food Chem.**, 36: 979-83, 1988.
25. Tanaka, T. et al. Simultaneous determination of trichothecene mycotoxins and zearalenone in cereals by gas chromatography-mass spectrometry. **J. Chromatogr. A**, 882: 23-8, 2000.
26. Taylor, J.K. **Quality Assurance of Chemical Measurements**. Chelsea/EUA: Lewis Publishers, Inc. 1987. 329p.
27. Ueno, Y. Trichothecene: chemical, biological and toxicological aspects. In: UENO, Y. (Ed.). **Development in Food Science**. Tokyo: Elsevier, v.4, 1983.
28. Ueno, Y. Trichothecenes as environmental toxicants. **Review in Environmental Toxicology** 2, p.303-41, 1986.
29. Vékey, K. Mass Spectrometry and mass-selective detection in chromatography. **J. Chromatogr. A**, 921: 227-36, 2001.
30. Webb, K.; Sargent, M. The reliability of mass spec. for identification purposes. **VAM Bull.**, 22:12-4, 2000.
31. World Health Organization. Environmental Health Criteria 105. **Selected Mycotoxins: Ochratoxins, Trichothecenes, Ergot**. IPCS (International Programme on Chemical Safety). Geneva, 1990. Trichothecenes cap. 2, 1990, p: 71-164.

Monitoramento de resíduos de agrotóxicos em leite consumido pela população do estado de São Paulo, Brasil, 2000 e 2002

Monitoring of pesticide residues in milk consumed by the population of the State of São Paulo, Brazil, 2000 and 2002

RIALA6/970

Vera R.R. LEMES^{1*}, Tereza A. KUSSUMI^{1*}, Sônia O. B. ROCHA^{1*}

* Endereço para correspondência: 1. Instituto Adolfo Lutz – São Paulo, Brasil.

Seção de Aditivos e Pesticidas Residuais, Av. Dr. Arnaldo, 355 -01246-902 – São Paulo – SP – Brasil – telefone: (11)30682945

Fax: (11)30625363 e-mail: lemesvrr@ial.sp.gov.br

Recebido: 13/03/2003 - Aceito para publicação: 06/05/2004

RESUMO

O leite é um importante constituinte da dieta alimentar do homem e apresenta um consumo elevado, principalmente pela população infantil. Os resíduos de agrotóxicos não intencionais e seus metabólitos podem ser encontrados no leite em decorrência do consumo de água, pastagens e rações com resíduos pelo gado ou pelo uso de agrotóxicos para controle de ectoparasitas. Com o objetivo de avaliar os níveis desses resíduos foram analisadas 73 amostras de leite, coletadas pela Vigilância Sanitária em diversos estabelecimentos comerciais do Estado de São Paulo nos anos de 2000 e 2002. A análise dos agrotóxicos foi efetuada por cromatografia a gás e cromatografia a líquido de alta eficiência. Para verificar a exatidão e precisão do método foram realizados estudos de recuperações cujos resultados variaram de 71 a 105%, todos dentro dos limites aceitáveis, com coeficientes de variação entre 1,2 e 17,8%. O limite de quantificação do método foi de 0,01 mg/kg para hexaclorobenzeno, α HCH, β HCH, γ HCH, aldrin, heptacloro, heptacloro epóxido, endosulfan I, endosulfan II, sulfato de endosulfan, dieldrin, endrin, pp'DDE, pp'DDD, op'DDT, pp'DDT; 0,02 mg/kg para λ cialotrina, a cipermetrina, deltametrina e 0,10 mg/kg para carbendazim e tiabendazol. Nenhum dos agrotóxicos avaliados foram encontrados na amostras de leite analisadas.

Palavras-Chave. resíduos de agrotóxicos, organoclorados, piretróides, benzimidazóis, leite, cromatografia.

ABSTRACT

Milk is an important constituent of human diet, and its consumption rate is high especially among children. Unintentional pesticide residues and their metabolites may be found in milk as a result from the consumption of water, grazing ground, and residues-containing foods by cattle, or from the use of pesticides on cattle for controlling ectoparasites. With the objective of evaluating the levels of these residues, 73 milk samples collected in 2000 and 2002 by the Sanitary Surveillance authorities from diverse commercial establishments in the State of São Paulo were analyzed. Pesticides analysis were carried out by means of gas chromatography and high performance liquid chromatography. Recovery studies were performed in order to assess the accuracy and the precision of the method. Recovery results ranged from 71 to 105%, all of them within the acceptable limits, with coefficients of variation from 1.2 to 17.8%. Quantification limit of the method was 0.01 mg/kg for hexachlorobenzene, α HCH, β HCH, γ HCH, aldrin, heptachlor, heptachlor epoxide, endosulfan I, endosulfan II, endosulfan sulfate, dieldrin, endrin, pp' DDE, pp' DDD, op' DDT, pp' DDT; and 0.02 mg/kg for λ cyhalothrin, α cypermethrin and deltamethrin; and 0.10 mg/kg for carbendazim and thiabendazol. None of evaluated pesticides were found in any of the analyzed milk samples.

Key Words. pesticide residues, organochlorine, pyrethroids, benzimidazoles, milk, chromatography.

INTRODUÇÃO

O leite apresenta um consumo elevado pela população, principalmente pela infantil, com valor estimado de 160g por dia para adultos e 1450g para crianças de até 6 anos⁷ na América Latina. Embora a legislação brasileira não permita o uso dos organoclorados persistentes na agricultura desde 1985⁴, eles foram utilizados até 1998 em campanhas de saúde pública para controle de vetores de doença. Os resíduos destes compostos podem fazer parte da nossa biosfera ainda por anos, devido à alta persistência e lipossolubilidade.

Dentre os organoclorados, o hexaclorobenzeno, os isômeros alfa HCH, gama HCH e o metabólito beta HCH, os isômeros op'DDT e pp'DDT e os metabólitos op'DDE, pp'DDE, op'DDD, pp'DDD, dieldrin e endrin são persistentes no ambiente, acumulam em tecidos gordurosos de mamíferos e são excretados no leite. O principal metabólito do heptacloro em plantas é o heptacloro epóxido, encontrado, também, em tecidos, fezes e urina de animais. Há uma forte tendência do heptacloro epóxido se acumular na gordura²⁹. A meia vida de heptacloro no solo é de 9 a 10 meses²⁹. O problema ambiental dos pesticidas organoclorados não se restringe a compostos orgânicos com cloro na molécula, mas àqueles que apresentam cadeia cíclica de carbonos, incluindo cadeias aromáticas, compostos apolares e lipofílicos, pouco reativos quimicamente e conseqüentemente muito estáveis no meio ambiente¹⁹.

Atualmente têm sido utilizados agrotóxicos de outras classes químicas como os piretróides, benzimidazóis e éster do ácido sulfuroso de um diol cíclico clorado. Os piretróides deltametrina, alfacipermetrina e lambdacialotrina são inseticidas não sistêmicos e não persistentes. Os fungicidas da classe dos benzimidazóis benomil, carbendazim e tiabendazol são sistêmicos. Carbendazim é metabólito de benomil e tiofanato metílico. Endosulfan é um éster do ácido sulfuroso de um diol cíclico clorado não persistente e acumulativo como os outros compostos organoclorados do grupo de ciclodienos^{19, 29}.

Resíduos de agrotóxicos não intencionais e seus metabólitos podem ser encontrados no leite em decorrência do consumo de água, pastagens e rações com resíduos ou pelo uso dos mesmos no gado para controle de ectoparasitas. Alguns agrotóxicos, como os da classe dos benzimidazóis, são utilizados na pecuária para controlar os ectoparasitas do gado e podem ser absorvidos via cutânea, contribuem para o aparecimento de resíduos tanto no leite como na carne.

A legislação brasileira⁵ estabelece limites de 0,006 mg/kg para aldrin, 0,008 mg/kg para dieldrin, 0,004 mg/kg para heptacloro, 0,04 mg/kg para DDT e metabólitos em leite e de 0,2 mg/kg para aldrin, alfa HCH, beta HCH, HCB, dieldrin, heptacloro, 2,0 mg/kg para gama HCH, 1,0 mg/kg para DDT e metabólitos, 0,5 mg/kg para Endrin, Clordano e 0,1 mg/kg para Mirex⁵ em carnes.

A Organização Mundial da Saúde através da Comissão do Codex Alimentarius¹² estabelece para leite e derivados limites máximos de resíduos de 0,006 mg/kg para aldrin e dieldrin; 0,006

mg/kg para heptacloro; 0,02 mg/kg para DDT e 0,004 mg/kg para endosulfan. Os LMRs referentes ao uso de agrotóxicos para tratamento externo do animal são: 0,01 mg/kg para gama HCH, 0,02 mg/kg para deltametrina e 0,05 mg/kg para cipermetrina e os decorrentes do uso veterinário 0,1 mg/kg para tiabendazol e 0,1 mg/kg para carbendazim decorrentes do uso de benomil, carbendazim ou tiofanato metílico¹².

A presença de resíduos de agrotóxicos e seus produtos de transformação no leite podem representar um risco para a saúde dos consumidores.

O leite bovino tem sido adotado em alguns países como indicador para medir de persistência de substâncias químicas na agricultura e poluentes do meio ambiente.

Esta pesquisa tem por objetivo avaliar a qualidade do leite consumido e distribuído à população do Estado de São Paulo quanto aos resíduos de agrotóxicos.

MATERIAL E MÉTODOS

As amostras foram coletadas em estabelecimentos comerciais de diferentes Municípios do Estado de São Paulo pela equipe técnica da Vigilância Sanitária. Foram coletadas 73 amostras de leite, sendo 52 em 2000 e 21 em 2002. Em 2000, 41 referem-se a leite UHT integral, 9 de leite pasteurizado tipo B, 2 de leite desnatado. As 21 amostras coletadas no ano de 2002 eram de leite tipo C para determinação dos seguintes princípios ativos organoclorados HCB, alfa HCH, beta HCH, gama HCH, aldrin, heptacloro, heptacloro epóxido, dieldrin, endrin, pp'DDE, pp'DDD, op'DDT e pp'DDT; piretróides lambdacialotrina, alfacipermetrina e deltametrina; benzimidazóis: carbendazim e tiabendazol; e éster do ácido sulfuroso de um diol cíclico clorado: alfa endosulfan, beta endosulfan e sulfato de endosulfan, totalizando 1481 determinações.

Princípio do Método

Foi adotado o método de Steiwandter²⁸ para análise de resíduos de pesticidas organoclorados, piretróides e éster do ácido sulfuroso de um diol cíclico clorado. A determinação qualitativa e quantitativa foi realizada por cromatografia a gás com detetor de captura de elétrons.

A análise de resíduos de benzimidazóis foi feita pelo método utilizado por Arenas¹ e Long et al.²⁰, com alterações, conforme descrito por Barretto et al.³, seguida de determinação por cromatografia a líquido de alta eficiência.

Procedimento

Para determinação dos organoclorados, piretróides e éster do ácido sulfuroso de um diol cíclico clorado

Macerar 10,0g de leite e 15,0g de sílica gel calcinada até resultar em pó. Transferir para uma coluna cromatográfica 15,0g de sílica gel desativada a 10%. Adicionar aproximadamente 1g de sulfato de sódio anidro, e posteriormente, a mistura da sílica

com leite. Empacotar muito bem. Eluir com 200mL da mistura de n-hexano e diclorometano na proporção de 4:1 e em seguida com 200mL da mistura de n-hexano e diclorometano na proporção de 1:1. Recolher os dois eluatos em balões de fundo chato de 350mL e concentrar com o emprego de evaporador rotativo à 40°C até quase à secura. Adicionar aproximadamente 5mL de n-hexano e concentrar novamente até que o todo o diclorometano seja evaporado. Transferir quantitativamente para tubo graduado, completando o volume a 5mL com n-hexano. Transferir os extratos para frascos de amostrador automático e injetar 2µL em cromatógrafo a gás com detector de captura de elétrons.

Para determinação de benzimidazóis

Pesar 10,0g da amostra de leite em um tubo de centrífuga de 50mL. Adicionar 20mL de acetato de etila para HPLC. Tampar e agitar. Deixar em repouso por 30 minutos. Centrifugar a aproximadamente 4000 rpm por 5 minutos. Transferir 10mL do extrato orgânico para um tubo graduado com tampa. Concentrar até quase à secura em banho-maria sob corrente de Nitrogênio e ressuspender a 2mL com fase móvel. Filtrar em membrana de 0,45 µm de porosidade através de seringa de vidro de 5mL. Recolher em tubo de vidro com tampa. Transferir o extrato para o frasco de amostrador automático e injetar 20µL em cromatógrafo a líquido de alta eficiência, devidamente otimizado.

Condições cromatográficas:

Para determinação de organoclorados, piretróides e endossulfan:

cromatógrafo a gás com detector de captura de elétrons; coluna capilar (30m x 0,32mm x 0,25µm de filme); fase estacionária: 5% de fenil metil siloxano; fluxo do gás de arraste: Nitrogênio: 1,0mL/min; temperatura do forno: 60°C por 1 min.; 10°C/min. até 220°C por 6 min.; 33°C/min. até 280°C por 17 min.; temperatura do injetor: 250°C; modo de injeção: *splitless* e temperatura do detector: 300°C.

Para determinação de benzimidazóis:

cromatógrafo a líquido de alta eficiência com detector U.V. ($\lambda=286\text{nm}$); coluna: aço inox, 125mm x 4mm; fase estacionária: Spherisorb ODS-2, 5µm; fase móvel: solução de KH_2PO_4 a 1%: metanol, 35:65; fluxo da fase móvel: 0,60 mL/min; temperatura: 25°C.

Estudos de recuperações

Para avaliar a exatidão e precisão do método, amostras de leite sem agrotóxicos foram fortificadas em triplicata com os princípios ativos estudados nos níveis do limite de quantificação e duas vezes o limite de quantificação. Foram calculados a média,

desvio padrão e o coeficiente de variação para cada nível estudado.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As amostras de leite analisadas não apresentaram resíduos de agrotóxicos. O limite de detecção do método foi de 0,003 mg/kg para hexaclorobenzeno, alfa HCH, gama HCH, aldrin, heptacloro, endossulfan I, endossulfan II; 0,004 mg/kg para beta HCH, heptacloro epóxido, pp' DDE, dieldrin, endrin, sulfato de endossulfan; 0,006 mg/kg para pp' DDD, op' DDT, pp' DDT; 0,008 para lambdacialotrina, alfacipermetrina, deltametrina; 0,05 mg/kg para carbendazim e tiabendazol.

As médias das recuperações no nível do limite de quantificação (LQ) variaram de 71 a 105%, dentro dos limites aceitáveis¹¹, e os coeficientes de variação entre 1,2 e 16,5%. No nível de 2 L.Q. as recuperações variaram de 83 a 99% e os coeficientes de variação entre 5,2 e 17,8. O limite de quantificação do método foi de 0,01 mg/kg para hexaclorobenzeno, alfa HCH, beta HCH, gama HCH, aldrin, heptacloro, heptacloro epóxido, endossulfan I, endossulfan II, sulfato de endossulfan, dieldrin, endrin, pp' DDE, pp' DDD, op' DDT, pp' DDT; 0,02 mg/kg para lambdacialotrina, alfacipermetrina, deltametrina e 0,10 mg/kg para carbendazim e tiabendazol.

O método avaliado neste trabalho²⁸ tem sido também utilizado em Programas de Controle de Qualidade Analítica Interlaboratorial, apresentando resultados satisfatórios⁸.

O resultado do monitoramento de resíduos de agrotóxicos nas amostras de acordo com o tipo de leite nos anos de 2000 e 2002 encontram-se nas Tabelas 1 e 2, respectivamente.

Em estudos realizados por Lara et al.^{15,16,18} foram encontrados resíduos de organoclorados em leite bovino consumido na cidade de São Paulo nos anos de 1971, 1979, 1980 e 1981.

Em 1999, Barretto et al.³ pesquisaram resíduos de organoclorados, piretróides, benzimidazóis e éster do ácido sulfuroso de um diol cíclico clorado em 109 amostras de leite, coletadas em diferentes cidades do Estado de São Paulo, e não encontraram resíduos nos respectivos limites de quantificação do método.

Na Figura 1 encontram-se os níveis médios de organoclorados encontrados em leite bovino consumido pela população de São Paulo de acordo com os resultados obtidos por Lara et al.^{15,16,18} em anos anteriores, Barretto et al.³ em 1999 e os dados do presente estudo.

Comparando os resultados de estudos anteriores de resíduos de agrotóxicos organoclorados em leite, realizados por Lara et al.^{15,16,18}, observa-se um aumento do nível médio de HCH total em 1979 (0,21 mg/kg)¹⁶ e 1980 (0,27 mg/kg)¹⁸ referente a média encontrada em 1970 (0,03 mg/kg)¹⁵ por outro lado observaram um decréscimo em 1981 (0,18mg/kg)¹⁸. Em relação aos níveis médios de DDT, foram praticamente os mesmos, entre

os estudos realizados em 1979¹⁶, 1980¹⁸ e 1981¹⁸. Em 1998/99, Barreto et al.³ e na presente pesquisa não foram encontrados resíduos de HCH e DDT nos respectivos limites de quantificação do método.

Por sua importância na alimentação, trabalhos de monitoramento têm sido realizados em leite e seus subprodutos

em muitos países. Krauthacker e Reiner¹⁴ estudaram DDT total, PCBs, HCB e isômeros de HCH por várias décadas em alimentos (leite, carne, peixe) e leite humano da Croácia e observaram um decréscimo dos níveis de resíduos na maioria dos compostos analisados. John et al.¹⁰ realizaram um estudo no período de 1993-1996 na cidade de Jaipur- Índia para investigar a

Tabela 1. Resultado do monitoramento de resíduos de agrotóxicos nas amostras de leite no ano de 2000

Classe de Agrotóxico de acordo com o grupo Químico	Agrotóxicos analisados (n = 14)	LQ do Método (mg/kg)	Número de amostras sem resíduos de agrotóxicos			
			Tipo de Leite			
			B (n = 9)	UHT (n = 41)	Desnatado (n = 2)	Total (n = 52)
Organoclorados	Hexaclorobenzeno	0,01	9 (100%)	41 (100%)	2 (100%)	52 (100%)
	HCH total					
	DDT total					
	Heptacloro					
	Heptacloro epóxido					
	Dieldrin					
Piretróides	Endrin	0,02	9 (100%)	41 (100%)	2 (100%)	52 (100%)
	Lambdacialotrina,					
	Alfacipermetrina,					
	Deltametrina					
Benzimidazóis	Carbendazim	0,10	9 (100%)	41 (100%)	2 (100%)	52 (100%)
	Tiabendazol					
Éster de um Diol Cíclico Clorado	Endosulfan total	0,01	9 (100%)	41 (100%)	2 (100%)	52 (100%)

n: número de amostras

Tabela 2. Resultado de monitoramento de resíduos de agrotóxicos nas amostras de Leite no ano de 2002

Classe de Agrotóxico de acordo com o grupo Químico	Agrotóxicos analisados (n = 14)	LQ do Método (mg/kg)	Número de amostras sem resíduos de agrotóxicos	
			Leite tipo C	Total (n = 52)
Organoclorados	Hexaclorobenzeno	0,01	21 (100%)	21 (100%)
	HCH total			
	DDT total			
	Heptacloro			
	Heptacloro epóxido			
	Dieldrin			
Piretróides	Endrin	0,02	21 (100%)	21 (100%)
	Lambdacialotrina			
	Alfacipermetrina			
	Deltametrina			
Benzimidazóis	Carbendazim	0,10	21 (100%)	21 (100%)
	Tiabendazol			
Éster de um Diol Cíclico Clorado	Endosulfan total	0,01	21 (100%)	21 (100%)

n: número de amostras

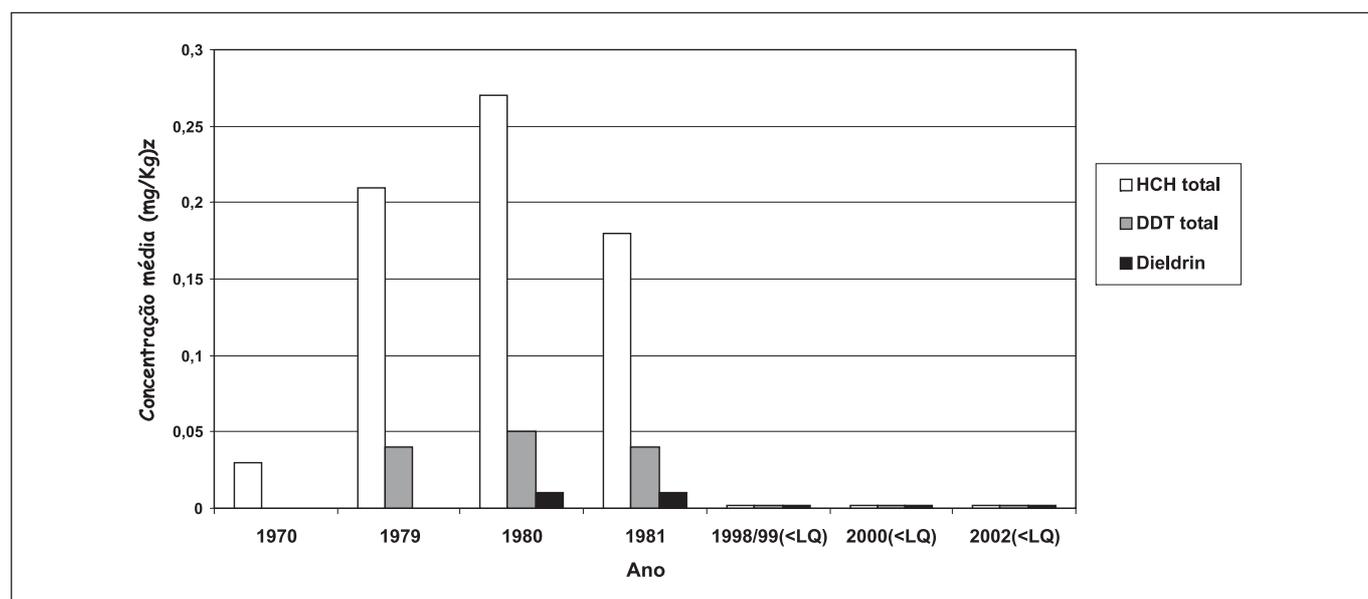


Figura1. Distribuição de média de HCH total, DDT total e Dieldrin, em mg/Kg, segundo ano, São Paulo, Brasil.

contaminação por resíduos de agrotóxicos organoclorados em leite bovino e de búfalo e encontraram resíduos de DDT e seus metabólitos DDE e DDD, isômeros de HCH (alfa, beta e gama), heptacloro e seu epóxido. Em um estudo publicado em 1996 por Losada e Fenández²¹ na Espanha foram encontrados HCH, DDT e metabólitos, heptacloro epóxido, dieldrin em leite bovino em níveis menores que 0,01 mg/kg.

Outros estudos demonstraram a presença de agrotóxicos organoclorados em carne e gordura bovina. Na década de 80, Maia e Brant²² estudaram a ocorrência de resíduos de pesticidas organoclorados em amostras de carne bovina provenientes de diversas regiões de Minas Gerais e as médias encontradas foram: 0,29 mg/Kg de HCH total; 0,02 mg/Kg de Dieldrin e 0,01 mg/Kg de DDT, sendo que as oriundas das regiões de maior desenvolvimento agrícola foram aquelas que apresentaram os valores mais elevados. Nishikawa et al.²⁴ (1982) detectaram organoclorados em 211 (96,8%) das 218 amostras de conservas de carnes bovina do Estado de São Paulo, sendo que em 91,3% das amostras foram encontrados DDT e seus metabólitos e 80% delas apresentaram valores acima dos limites máximos de resíduos. Carvalho et al.⁶ 1984, analisaram 2959 amostras de gordura bovina provenientes de carcaças de frigoríficos. Destas, 95,4% apresentaram resíduos de DDT e metabólitos, 92,5% de HCH, 69,6% de dieldrin, 57,9% de heptacloro e seu metabólito, 52,8% de HCB, 42,3% de lindano, 10,8% de endrin e 11,4% de mirex

Nishikawa, em 1985²³, encontrou resíduos de organoclorados em todas as 2653 amostras de gordura bovina, provenientes de carcaças de frigoríficos, sendo que em 49 (1,8%) delas os níveis de resíduos estavam acima dos limites de tolerância e os valores mais altos foram 2,43 mg/kg de mirex, 1,44 mg/kg de HCH e 1,00 mg/kg de dieldrin.

Este estudo e os demais relatados apresentaram decréscimo dos níveis de organoclorados quando comparados com os pesquisados em décadas passadas. Nos últimos anos não têm sido encontrados resíduos de organoclorados, ou, quando presentes, apresentam baixos níveis.

Desde a década de 70 tem sido constatada a presença de resíduos de agrotóxicos organoclorados no leite materno, constituindo-se como principal via de transferência destes resíduos da mãe para a criança, além daquela representada pela passagem transplacentária²⁷. A criança que realmente está no ápice desta cadeia recebe maior carga de contaminantes pelo fenômeno da biomagnificação. Oliveira et al.²⁶ constataram no leite humano concentrações mais elevadas que no leite bovino, devido ao fato da mulher estar em nível trófico acima na cadeia alimentar. Outros trabalhos mais recentes têm encontrado organoclorados em leite materno. Konishi et al.¹³ (1972 a 1988) demonstraram que após mais de 10 anos de proibição de uso no Japão os organoclorados continuam a ser encontrados em leite humano em baixos níveis. Ntow²⁵ encontrou resíduos de organoclorados em leite materno, sendo que a média de HCB e pp'DDT foi respectivamente 0,04 mg/kg na gordura do leite e de 0,0175 mg/kg no leite total. Lara et al.¹⁷ encontraram HCH em níveis que variaram de 0,003 a 0,758 mg/L e DDT de 0,010 a 2,610 mg/L em amostras de leite humano.

Na Hungria, Turi et al.³⁰ determinaram resíduos em leite de vacas tratadas com os ectoparasiticidas piretróides e diazinon, sendo que foi encontrado diazinon em apenas uma amostra no primeiro dia após o tratamento (0,025mg/kg) e os piretróides não foram detectados em nenhuma das demais amostras analisadas.

Este estudo contribuiu para o conhecimento quanto à qualidade do leite consumido no Estado de São Paulo em relação

aos resíduos de agrotóxicos. Todas as amostras de leite estudadas não apresentaram resíduos dos agrotóxicos estudados.

As medidas regulamentadoras tomadas pelos Ministérios da Saúde e da Agricultura, visando restrição de uso dos organoclorados persistentes, pode ser uma causa da diminuição dos níveis desses resíduos nos últimos anos.

Por outro lado, o fato de não ter sido encontrado resíduos de agrotóxicos das outras classes de agrotóxicos pesquisadas neste estudo, pode ser explicado pelas suas características de persistência e metabolismo. Endosulfan é metabolizado rapidamente em mamíferos, principalmente para sulfato de endosulfan. Endosulfan I e II é degradado no solo DT_{50} , 30 a 70 dias. Sulfato de endosulfan, em solo, degrada mais lentamente, de 5 a 8 meses^{19,29}. A degradação de deltametrina em solo e água ocorre entre 1 e 2 semanas. A DT_{50} é de 13 semanas para alfacipermetrina e de 4 a 12 semanas em solo para lambdacialotrina²⁹. Benomil é rapidamente convertido a carbendazim no meio ambiente, com meias vidas de 2 a 19h em água e solo, respectivamente. Tiofanato metílico em plantas, solo e em solução aquosa, na presença de raios ultravioleta, é transformado em carbendazim que degrada a 2-aminobenzimidazole e 5-hidroxi-2-aminobenzimidazole²⁹. Carbendazim decompõe no meio ambiente com meia vida de 3 a 12 meses em solo e de 2 a 25 meses em água em condições aeróbica e anaeróbica, respectivamente. É relativamente estável em animais com lenta degradação para 2-aminobenzimidazole, não tóxico²⁹. Tiabendazol, em mamíferos, se transforma principalmente para 5-hidroxitiabendazol, sendo que 87% é eliminado na urina em 24 horas, após administração oral². Portanto, os agrotóxicos das classes éster de um ácido sulfuroso de um diol cíclico clorado, os piretróides e os benzimidazóis são menos persistentes e degradam mais rapidamente quando comparados com os organoclorados. O resultado obtido nas amostras de leite pode ser devido à ausência de resíduos dos agrotóxicos estudados nos produtos consumidos pelo gado, ao não uso ou uso adequado dos mesmos.

O uso de agrotóxicos deve ser efetuado de acordo com as Boas Práticas Agrícolas para evitar que pastagens, forragens e grãos destinados à alimentação do gado contenha níveis de agrotóxicos em desacordo com os níveis estabelecidos para a segurança do consumidor. Por outro lado, também deve existir um controle em relação ao uso veterinário.

O uso de agrotóxicos deve ser efetuado de acordo com as Boas Práticas Agrícolas para evitar que todo tipo de alimentação consumida pelo gado contenha níveis de agrotóxicos acima dos estabelecidos para a segurança humana. Deve existir também um controle em relação ao uso veterinário.

CONCLUSÕES

Todas as amostras de leite estudadas não apresentaram resíduos dos agrotóxicos estudados. Deve-se salientar a

importância da continuidade de programas de monitoramento do leite para avaliação dos níveis de resíduos de agrotóxicos e do meio ambiente.

Os dados de níveis de agrotóxicos podem ainda subsidiar cálculos da ingestão diária aceitável e permitir que medidas preventivas e de controle, quando necessárias, possam ser efetuadas antes que a contaminação se torne um risco para a saúde pública.

REFERÊNCIAS

1. Arenas, R.V.; Johnson, N. A. Liquid chromatographic fluorescence method for the determination of thiabendazole residues in green bananas and banana pulp. **J. AOAC Int.**, 77(3): 710-3, 1994.
2. Arenas, R.V.; Johnson, N.A. Liquid-chromatographic fluorescence method for multiresidue determination of thiabendazole and 5-hydroxythiabendazole in milk. **J. AOAC Int.**, 78(3): 642-6, 1995.
3. Barretto, H.H.C. et al. Níveis de pesticidas organoclorados, piretróides, benzimidazóis e endosulfan em leite no período de 1998 a 1999. In: Livro de Resumos do **III Encontro do Instituto Adolfo Lutz Laboratório de Saúde Pública Pesquisa e Desenvolvimento**, 18 a 21 de outubro de 1999, Centro de Convenções Rebouças, São Paulo-SP, vol.1, pág.129, 1999.
4. Brasil. Portaria nº 329, Ministério da Agricultura, de 02 de setembro de 1985. **Diário Oficial da União**, Brasília, 03 de setembro de 1985, Seção I, p.12941.
5. Brasil. Instrução Normativa nº 3, de 22 de janeiro de 1999. Defesa Agropecuária do Ministério da Agricultura e Abastecimento Ministério da Agricultura e do Abastecimento, **Diário Oficial da União**, Brasília, 17 de fevereiro de 1999, Seção I, p.28-9.
6. Carvalho, J.P.P. et al. Resíduos de praguicidas organoclorados em gordura bovina. **Biológico**, 50(2): 39-48, 1984.
7. FAO/WHO- Plant Production and Protection Paper. **Pesticide residues in food**. Report 2000, 225 Rome, 2001.
8. FAPAS- Food Analysis Performance Assessment Scheme. **Reports to participants in food analysis performance assessment scheme FAPAS – Organochlorine pesticides**, CSL – Central Science Laboratory, MAFF, 1994-2002.
9. Jaramillo, P.A.; Eslava, P. E.; Rosiles, M. R. Niveles de pesticidas organoclorados en grasa de canales bovinas procedentes del centro y sureste mexicanos. **Vet. Mex.**, 25(2): 105-8, 1994.
10. John, P. J.; Bakore, N.; Bhatnagar, P. Assessment of organochlorine pesticide residue levels in dairy milk and buffalo milk from Jaipur City, Rajasthan, India. **Environ. Int.**, 26: 231-6, 2001.
11. JOINT FAO/WHO – Food Standards Programme CODEX Alimentarius Commission. **Good laboratory practice on pesticide residue in food**. Supplement 1, v.2. Section 4.2, 164, 1993.
12. JOINT FAO/WHO – Food Standards Programme CODEX Alimentarius. **Commission. pesticide residues in food – maximum residue limits**. Volume 2B, 2 ed., 533, Rome, 2000.
13. Konishi Y; Kuwabara K; Hori, S. Continuous surveillance of organochlorine compounds in human breast milk from 1972 to 1998 in Osaka, Japan. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.**; 40(4): 571-8, 2001.
14. Krauthcker B; Reiner E. Organochlorine compounds in human milk and food of animal origin in samples from Croatia. **Arth. Hig. Rada Toksidol.**, 52(2): 217-27, 2001.
15. Lara, W.H.; Barretto, H.H.; Inomata, O.N.K. Resíduos de pesticidas clorados em leite consumido em São Paulo. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 31: 13-20, 1971.
16. Lara, W.H.; Barretto, H.H.; Inomata, O.N.K. Variação dos níveis de resíduos de pesticidas organoclorados em leite consumido na cidade de São Paulo em 1979. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 40: 65-73, 1980.

17. Lara, W.H.; Barretto, H.H.; Inomata, O.N.K. Resíduos de pesticidas organoclorados em leite humano, São Paulo, Brasil, 1979-1981. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 42: 45-52, 1982.
18. Lara, W.H.; Barretto, H.H.; Inomata, O.N.K. Variação dos níveis de resíduos de pesticidas organoclorados em leite pasteurizado tipo B, distribuído na cidade de São Paulo, de 1980 a 1981. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 45: 43-52, 1985.
19. Lemes, V.R.R.; Inomata, O.N.K.; Barretto, H.H.C. Resíduos de endossulfan em tubérculos e frutos. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 53 (1/2): 49-54, 1993.
20. Long, A.R. et al. Multiresidue method for isolation and liquid chromatographic determination of seven benzimidazole anthelmintics in milk. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, 72(5): 739-741, 1989.
21. Losada, A.; Fenández, N. Organochlorine pesticide residues in bovine milk from León (Spain). **Sci. Total Environ.**, 181: 133-5, 1996.
22. Maia, R.; Brant, P.C. Estudo comparativo de contaminação da carne bovina para resíduos de pesticidas clorados nas regiões do Estado de Minas Gerais, Brasil. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 40 (1):15-21, 1980.
23. Nishikawa, A. M. **Praguicidas organoclorados em gordura bovina**. São Paulo, 1985. [Dissertação de mestrado – Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo].
24. Nishikawa, A. M. et al. Níveis de resíduos de praguicidas organoclorados em conservas de carnes bovina. **Biológico**, 48(8): 189-193, 1982.
25. Ntow, W. J. Organochlorine pesticides in water, sediment, crops, and human fluids in a farming community in Ghana Arch. Environ. Contam. Toxicol, 40(4):557-63, 2001.
26. Oliveira, M.A.G.; Dores, E.F.G.C. Níveis de praguicidas organoclorados no leite materno de uma população de Cuiabá- Mato Grosso. **Pesticidas: R. Ecotox. e Meio Ambiente**, 8: 77-9, 1998.
27. Spadotto, C.A.; Gomes M.A.; Rodrigues, G.S. Uso de agrotóxicos nas diferentes regiões brasileiras. **Pesticidas: R. Ecotox. e Meio Ambiente**, 8: 111-126, 1998.
28. Steiwandter, H. Contributions to silica gel application in pesticide residue analysis. **Fresenius Z Anal. Chem.**, 312: 342-5, 1982.
29. Tomlin, C. (editor). **The Pesticide Manual: incorporating the agrochemicals handbook**, 10th ed. Cambridge: British Crop Protection Council, the Royal Society of Chemistry, 1994, 1341p.
30. Túri, MS; Soós K; Végh E. Determination of residues of pyrethroid and organophosphorus ectoparasiticides in foods of animal origin. **Acta Vet. Hung**, 48 (2): 139-49, 2000.

Resíduos de pentaclorofenol em água de consumo de uma região próxima a madeireira

Pentachlorophenol residues in drinking water from an area close to a lumberyard

RIALA6/971

Tereza A. KUSSUMI*, Vera R.R. LEMES*, Sonia B. ROCHA*, Heloisa H.C. BARRETTO*

* Endereço para correspondência: 1. Instituto Adolfo Lutz – São Paulo, Brasil - Seção de Aditivos e Pesticidas Residuais, Av. Dr. Arnaldo, 355 – 01246-902 – São Paulo –SP – Brasil, telefone (11) 30682945 – fax: (11) 30625363

e-mail: tkussumi@hotmail.com.br

Recebido: 13/03/2003 – Aceito para publicação: 06/05/2004

RESUMO

O pentaclorofenol (PCP), usado como fungicida e herbicida no Brasil, teve seu uso proibido na agricultura em 1985. Atualmente tem permissão de uso para tratamento de madeira. A alta volatilidade do PCP e a solubilidade de sua forma ionizada são os principais fatores para sua propagação no ambiente. A exposição crônica ao PCP pode causar danos ao fígado e rins. Em relação à ação carcinogênica, o PCP é classificado no grupo B2, com evidência suficiente em estudo com animais, porém os dados em humanos são escassos. O objetivo deste estudo foi avaliar os resíduos de pentaclorofenol em oito amostras de água de consumo coletadas próxima a uma madeireira em Belém do Pará. A extração foi feita com solvente em meio ácido, seguida de derivatização e a determinação por cromatografia a gás com detector de captura de elétrons. O limite de quantificação foi de 0,5 µg/L. O método avaliado apresentou resultados satisfatórios para análise de resíduos, com recuperações que variaram de 80 a 103% e coeficiente de variação de 2,1 a 3,9%, dependendo do nível fortificado. As amostras estudadas não apresentaram resíduos de pentaclorofenol acima do limite de quantificação do método, sendo adequadas para o consumo.

Palavras-Chave. pentaclorofenol, organoclorados, clorofenóis, agrotóxicos, água, contaminação ambiental, cromatografia a gás.

ABSTRACT

Pentachlorophenol (PCP) was employed as fungicide and herbicide in Brazil. Its use for agricultural purposes has been prohibited since 1985, and nowadays it has been permitted for wood treatment. High volatility of PCP and solubility of its ionized form are the principal factors in its dissemination in the environment. Chronic exposure to PCP may cause damage to liver and kidneys. Regarding to its carcinogenic activity, PCP has been classified into group 2B, and this activity has sufficiently evidenced from animal studies, but still scanty in human beings. The objective of the present study was to evaluate the PCP residues in eight samples of drinking water collected from a locality close to a lumberyard in Belém, State of Pará. The PCP extraction was performed using solvent in an acidic medium, followed by derivatization and determination by means of gas chromatography with an electron capture detector. The quantification limit was of 0.5 µg/L. The evaluated procedure exhibited satisfactory results for residue analysis with recovery rate ranging from 80 to 103% , and a coefficient of variation ranged from 2.1 to 3.9%, depending on the fortified level. The analyzed water samples have not presented PCP residues above the method quantification limit, therefore they have been suitable for consumption.

Key Words. water, pentachlorophenol, chlorophenols, pesticides, environment contamination, gas chromatography.

INTRODUÇÃO

O pentaclorofenol (PCP), conhecido como pó da China, é uma substância do grupo de compostos fenólicos que foi introduzido na década de 1930. O PCP e seus sais foram usados como agrotóxicos com uma variedade de aplicações na indústria, na agricultura e em uso doméstico. Hoje são ainda utilizados contra fungos, como preservativo de madeira. Podem conter outros clorofenóis como impurezas, principalmente os isômeros de tetraclorofenóis e alguns microcontaminantes como as policlorodibenzodioxinas (PCDDs) e policlorodibenzofuranos (PCDFs), entre outros. Sua alta volatilidade e a solubilidade de sua forma ionizada são os principais fatores para propagação da contaminação no ambiente. Dependendo do solvente, temperatura, pH e tipo de madeira, mais de 80% do PCP pode evaporar da madeira tratada após 12 meses.³⁰

A adsorção de PCP no solo decresce com o aumento de pH e é mais móvel em solos minerais e menos móvel em solos ácidos e arenosos³⁰. Na Holanda, Wegman e Van den Broek²⁸, relataram uma mediana de 8,4 µg /kg peso seco de pentaclorofenol e a água de superfície continha 0,41 µg/L. Sedimentos monitorados por Pierce e Victor²¹ apresentaram média de 364 µg/kg de sedimento seco, comparado com níveis na água de apenas 0,1 µg/L. Zheng et al³² encontraram pentaclorofenol em água, sedimento e peixe do Lago Dongting na China em níveis de até 103,7 µg/L em água, de 48,3 mg/kg em sedimento de até 9,3 mg/kg em peixe.

O PCP ainda é fortemente ligado à matéria orgânica e seus produtos de degradação podem ser formados naturalmente, contaminando águas subterrâneas. Traços de PCDDs são formados fotoquimicamente pela irradiação de Na-PCB em solução aquosa³⁰.

A alta volatilidade do PCP e a solubilidade de sua forma ionizada são os principais fatores para propagação da contaminação no ambiente. O uso de incineração não controlada de PCP é uma das mais importantes fontes de PCDDs e PCDFs no ambiente³⁰.

A exposição crônica ao PCP pode causar danos ao fígado e rins. Um estudo de toxicologia crônica oral em ratos revelou um NOEL de 3 mg/kg/dia e a ingestão diária aceitável de 0,03 mg/kg/dia^{11,25}. Em relação à carcinogenicidade o PCP é classificado no grupo B2, ou seja, possui evidência suficientes em estudo com animais²⁰ e inadequada em humanos^{10,13}. A estimativa quantitativa de risco de carcinogenicidade através da exposição oral pela água de consumo na concentração de 0,3 µg/L é de 1 em 1 milhão de pessoas; na concentração de 3 µg/L é de 1 em 100.000 pessoas e no nível de 30 µg/L o risco de 1 em 10.000 pessoas¹¹. De acordo com Guidelines for Pesticides in Drinking Water²⁹ é estabelecido um valor provisório de 9 µg/L para água potável e representa 10% da Ingestão Diária Tolerável (TDI), ou seja, 0,3 µg/kg p.c./dia, considerado o consumo diário de 2L/pessoa/dia e 60kg como peso corpóreo (p.c). Pelas características toxicológicas e alta persistência no meio ambiente¹⁶ teve seu uso restringido na agricultura em muitos países, sendo considerado como poluente prioritário no meio ambiente aquático pela União Européia (EU), Programa Ambiental das Nações Unidas (UNEP) e Agência de Proteção Ambiental (EPA)^{5,14,24}. A legislação brasileira² permite a utilização de pentaclorofenato de sódio no

tratamento de madeira e estabelece valor máximo permitido de 10 µg/L para pentaclorofenol em algumas classes de água³ e de 9 µg/L para a água potável⁴.

O objetivo desse estudo foi avaliar e adaptar um método simples e rápido, com limite de quantificação que permite avaliar águas com suspeita de contaminação por pentaclorofenol e avaliar os níveis de resíduos de pentaclorofenol em água de consumo de uma região próxima a madeireira em Belém do Pará, Brasil, 2002.

MATERIAL E MÉTODO

No presente trabalho foi adaptado o método descrito por Polese²², Siqueira²⁶ e Rudling²⁴ em diferentes matrizes, para determinação de pentaclorofenol em água.

Princípio do método

Extração com solvente orgânico em meio ácido, seguida de derivatização do pentaclorofenol com anidrido acético para acetato de pentaclorofenol e quantificação por cromatografia a gás com detector de captura de elétrons.

Amostras

Para análise de possíveis interferentes da matriz foi coletada amostra de água controle, isenta de pentaclorofenol.

Foram coletadas em janeiro de 2002, oito amostras de água de consumo com suspeita de contaminação em uma região próxima à madeireira em Belém do Pará, Brasil, para verificar possível contaminação por pentaclorofenol. Dessas amostras, uma foi coletada diretamente na fonte, e as demais provenientes de poços tubulares, sendo que quatro dessas foram coletadas diretamente dos poços e três em diferentes pontos após tratamento.

As amostras foram coletadas em frascos de vidro com tampa, previamente lavadas no mínimo três vezes com a água a ser amostrada, e foram enviadas ao laboratório sob refrigeração em caixa de isopor com gelo reciclável.

Procedimento

Transferiu-se 200mL de amostra para um funil de separação de 500mL. Ajustou-se o pH a 2 com HCl 2 N. Adicionou-se duas vezes 20mL de n-hexano, agitou-se e extraiu-se a fase orgânica. As fases orgânicas foram particionadas com duas vezes 50mL de solução e K₂CO₃ 0,1M. Adicionou-se 1mL de anidrido acético aos extratos aquosos e agitou-se vagarosamente o funil de separação, até o desprendimento total de gases. Extraiu-se a fase aquosa com 20mL de n-hexano, recolheu-se em balão volumétrico, completando o volume a 20mL. Injetou-se em cromatógrafo a gás.

Analisou-se o branco de reagentes e água controle para certificar a ausência de interferentes no tempo de retenção de interesse.

Parâmetros cromatográficos

Cromatógrafo a gás HP 6890, com detetor de captura de elétrons ⁶³Ni;

coluna capilar OV 5 (30 m x 0,32 mm x 0,25 µm de espessura do filme);
gás de arraste: nitrogênio (Pureza: 99,999%); fluxo: 1 mL/min;
temperatura do detector: 330 °C;
temperatura do injetor: 240 °C;
temperatura da coluna: 60 °C (1 minuto), 60-220 °C 10 °C/min (6 minutos), 220 - 280 °C 20 °C/min (7 minutos).

Curva de calibração

Foi utilizado o padrão de pentaclorofenol (99% de pureza) EPA. Preparou-se soluções padrão nas seguintes concentrações: 5, 10, 25, 50, 100, 150, 250 µg/L em n-hexano e construiu-se a curva de calibração para avaliar a linearidade de resposta e realizar as análises quantitativas.

Estudos de recuperação

Para avaliação do método, fortificou-se a amostra controle cinco vezes para cada nível, adicionando-se padrão de pentaclorofenol em 200 mL de amostra nas seguintes concentrações: 0,5 µg/L ; 1,0 µg/L e 5,0 µg/L . As amostras foram homogeneizadas e as análises foram realizadas de acordo com o método descrito. Calculou-se a média, o desvio padrão e o coeficiente de variação para cada nível estudado.

RESULTADOS

Encontram-se na literatura vários métodos de determinação de fenóis em água^{1,9,15,17,19,27}, pentaclorofenol em urina²⁶ e solo^{8,22}. Muitos dos métodos utilizados envolvem acidificação e conversão do PCP para suas formas não ionizáveis, extração com solventes orgânicos, possíveis purificações através da extração em solução básica e determinação por cromatografia com derivatização, sendo que alguns utilizam CG com detector seletivo de massa^{8,33}.

O método estudado²⁴ foi escolhido por ser de fácil execução, usar equipamento compatível com o existente no laboratório e ser específico e sensível para análise de água. A determinação é feita por derivatização do pentaclorofenol para acetato de pentaclorofenol por cromatografia a gás com detector de captura de elétrons e o limite de quantificação foi de 0,5 µg/L.

A análise do branco de reagentes e a água controle não apresentaram interferentes no tempo de retenção de interesse.

Nas condições cromatográficas otimizadas, o

cromatograma apresentou uma boa resolução para a análise de acetato de pentaclorofenol com curva de calibração com boa linearidade (correlação = 0,998). A Tabela 1 mostra os resultados da avaliação do método como exatidão e precisão, através dos estudos de recuperações com as médias (%), desvios padrão e coeficientes de variação (%).

Nenhuma das amostras apresentaram resíduos de pentaclorofenol no limite de quantificação do método que foi de 0,5 µg/L.

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

As médias das recuperações variaram de 84 a 99% e o coeficiente de variação de 2,1 a 3,9%, conforme pode ser observado na Tabela 1, com todos os resultados dentro dos limites aceitáveis para análise de resíduos que é de 70 a 120% para recuperações e de até 20% para os coeficientes de variação¹², apresentando uma boa exatidão e precisão.

Autores de diversos estudos em águas superficiais têm relatado a presença de pentaclorofenol. Em águas de superfície no Canadá¹⁰ que receberam efluentes de indústria de tratamento de madeira foram encontrados níveis que variaram de ND (não detectado) até 7,3 µg/L e as concentrações no sedimento variaram de ND a 590 µg/kg. Wong e Crosby³¹ relataram concentrações de PCP que variaram de 1 a 800 µg/L em água de superfície próxima ao local de tratamento de madeira e aproximadamente 20 µg/L em água de drenagem de agricultura. No Brasil, foi realizado um estudo de monitoramento de água em Tucuruí, em áreas de serrarias e tratamento de madeira. As amostras foram coletadas antes da inundação do reservatório e foram encontrados níveis de PCP que variaram de 5 a 14 µg/L. Após a inundação a área foi coberta com 46 bilhões de m³ de água e o PCP não foi detectado no LD de 4 µg/L^{23,30}. Zuin et al³³ analisaram pentaclorofenol e hexaclorobenzeno em águas superficiais de poços utilizadas para abastecimento em Samaritã-São Vicente-SP, localidade contaminada com lixo industrial. Encontraram PCP em apenas três amostras de água de poço superficial coletadas próximas ao chorume em níveis de até 26,6ng/L, explicado por uma contaminação direta e em nenhuma das demais amostras coletadas em distâncias e profundidades maiores. Ken et al¹⁸ analisaram PCP em poços em diferentes profundidades os valores vararam de 0,10 a 20,2 mg/L e em profundidades maiores de 0,006 a 3,32 mg/L, demonstraram que

Tabela 1. Resultados das recuperações de pentaclorofenol em água

Níveis de fortificação(µg/L)	Recuperações ** (%)		Desvio padrão (±)	Coeficiente de variação (%)
	Variação	Média		
0,5 *	81-87	84	2,8	3,4
1,0	98-103	99	2,1	2,1
5,0	89-97	94	3,7	3,9

* Limite de quantificação do método = 0,5 µg/L

** Média de cinco determinações

o nível de PCP decresce com a profundidade.

Fox e Joshi¹³ analisaram água e sedimento em região proveniente de tratamento de madeira e os níveis de PCP no sedimento variaram de 1 a 60 µg /kg peso seco enquanto as águas superficiais continham apenas 0,015 µg/L.

Buhlet et al.⁶ encontraram 0,06 µg/L de PCP em água de consumo e 0,7µg/L em rio.

O valor mais alto reportado pelo *Committee of Drinking Water*⁷ em água potável nos Estados Unidos da América foi de 1,4 µg/L.

Nos estudos^{10,13,18,33} têm sido relatados a presença pentaclorofenol em águas superficiais provenientes de áreas contaminadas, o que nem sempre ocorre em águas mais profundas³³. A possibilidade de migração de PCP pode decrescer com a distância e profundidade³³ e depende da composição do solo e das condições físico-químicas³⁰.

Concluímos que o método avaliado foi satisfatório pela facilidade de execução, sensibilidade e aplicabilidade, permite avaliar níveis de traços de pentaclorofenol em amostras ambientais e de consumo. Todas as amostras de água analisadas estão próprias ao consumo em relação ao pentaclorofenol. É de fundamental importância o monitoramento de PCP em áreas com suspeita de contaminação, principalmente em locais de tratamento e estocagem da madeira e sugerimos que em avaliações ambientais futuras sejam incluídas amostras de solo, sedimento e organismos aquáticos.

REFERÊNCIAS

- [APHA] American Public Health Association. **Standard Method for the Examination of Water and Wastewater**, 19^a ed. Washington, DC., p. 97 –102, 1995.
- Brasil. Portaria SNVS nº 10. **Diário Oficial da União**, Brasília, 10 de janeiro de 1985. Seção I, pt I. Relação das Substâncias com ação tóxica. Sobre animais ou plantas cujo registro pode ser autorizado no Brasil, em atividades agropecuárias e em produtos domissanitários.
- Brasil. Portaria nº 20 do Ministério do Desenvolvimento Urbano e Meio Ambiente. **Diário Oficial da União**, Brasília, 30 de julho 1986. Seção I, pt.I, p. 11356-113661. Estabelece classificação das águas doces, salobras e salinas no território nacional.
- Brasil. Portaria nº 1469 do Ministério da Saúde. **Diário Oficial da União**, Brasília, 10 de jan. 2001. Seção I, p.26-28. Estabelece normas e padrão de potabilidade de água destinada ao consumo humano.
- Bruzzoniti M.C. et al. Preconcentration of contaminants in water analysis. **J. Chromatogr. A**, 902: 289-309, 2000.
- Buhlet D.R.; Rasmusson, M.E.; Nakame, H.S. Occurrence of hexachlorophene and pentachlorophenol in sewage and water. **Environ. Sci. Technol.**, 929, 1973. In: **CRC-Critical Reviews in Toxicology**, Vol.7, Issue 1, CRC Press Incorporation, Boca Raton, Florida, 1980.
- Committee on Drinking Water, Nation Research Committee. **Drinking Water and Health**, National Academy of Sciences, Washington D.C., 1878. In: **CRC-Critical Reviews in Toxicology**, Vol.7, Issue 1 , CRC Press Incorporation, Boca Raton, Florida, 1980.
- Cordoba, M.S. et al. Soxhlet extraction of pentachlorophenol from soil with in situ derivatization. **Bol. Soc. Chil. Quím.**, 46: 1-9, 2001.
- Eksperiandova, L.P. et al. Determination of small quantities of phenol in water. **Anal. Chim. Acta**, 396: 317-20,1999.
- Environmental Protection Bureau, Environmental Protection Service, Pacific and Yukon Region, Canadá. Monitoring environmental contamination from chlorophenol contaminated wastes generated in the wood preservation industry, Ottawa, p.74, 1979. In: **Environmental Health Criteria**, 71, Pentachlorophenol, WHO, Geneva, 1987, 236p;
- [EPA] Environmental Protection Agency - Pentachlorophenol, [http://www.epa.gov/iris/subst/0086.htm]. 07 março 2003.
- [FAO/WHO] Food and Agriculture Organization of the United Nations/ World Health Organization. Food Standards Programme Codex Alimentarius Commission. **Good laboratory practice on pesticide residues in food**. Rome, 1993. Suppl. 1, v.2, Section 4.2, 164.
- Fox, M.; Joshi, S.R. The fate of pentachlorophenol in the Bay of Quinte, Lake Ontario, Canada, USA. **J. Great Lakes Res.**, 10: 190-96,1984.
- Gilbert, F. Effects of pentachlorophenol and other chemical preservatives on the health of wood-treating workers in Hawaii. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.** 19(4) : 603-09, 1990.
- Gonzalez, G. et al. Biodegradation of phenolic industrial wastewater in a fluidized bioreactor with immobilized cells of *Pseudomonas putida*. **Bioresource Technol.**, 60: 137-42, 2001.
- [IARC] International Agency for Research on Cancer. **Summary & evaluation**. Lyon, 53, 371, 1991.
- Kang, K. et al. A modified spectrophotometric method for the determination of trace amounts of phenol in water. **Microchemical J.**, 64:161-71, 2000.
- Ken K.C. et al. Pilot study of in-situ thermal treatment for the remediation of pentachlorophenol- contaminated aquifers. **Environ. Sci. Technol.**, 35 (24): 4910-15, 2001.
- Kim, K.R.; Kim, H. Gas chromatographic profiling and screening for phenols as isobutoxycarbonyl derivatives in aqueous sample. **J. Chromatogr. A**, 866: 87-96, 2000.
- [NTP] National Toxicology Program. Technical Report on the Toxicology and Carcinogenesis Studies of Pentachlorophenol. NTP Tech. Report nº 349. **NIH Publ.** nº 89:2804, 1989.
- Pierce, R.H. et al. The fate of pentachlorophenol in an aquatic ecosystem. In: Rao, K. R.,ed. Pentachlorophenol: **Chem., Pharm. Environ. Toxicol.**, N.Y., London, Plenum Press, pp.41-52, 1978.
- Polese, L.; Ribeiro, M. Methods for determination of hexachlorobenzene and pentachlorophenol in soil samples. **Talanta**, 46: 915-20, 1998.
- Rahde , A.F.; Della Rosa, H.V., 1984. Evaluation of ecotoxicological impact of the hydroelectric dam of Tucuruí, Brazil, 45pp.In: WHO, **Environmental Health Criteria 71, Pentachlorophenol**, WHO, Geneva, 1987, 236p.
- Rudling , L. Determination of pentachlorophenol in organic tissues and water. **Water Res.** 4: 533-37, 1993.
- Schwetz, B. A.; Quast J.F.; Keeler P.A.; Humiston C.G.; Kociba R.J. Results of two-year toxicity and reproduction studies on pentachlorophenol in rats. in: Pentachlorophenol : **Chem. Pharm. Environ. Toxicol.**, K.R.Rao, Ed. Plenum Press, N.Y. p.301-309, 1978.
- Siqueira, M.E.P. **Determinação de pentaclorofenol em urina de trabalhadores expostos ocupacionalmente**. São Paulo, 1987.[Dissertação de mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, em Farmácia e Bioquímica].
- Toledo, E.G. et al. Solid – phase microextraction coupled to liquid chromatography for the analysis of phenolic compounds in water. , 1998. **J. Chromatogr. A**, 923: 45-52, 2001.
- Wegman, R.C.C. , Van Den Broek, H.H., 1983. Chlorophenols in surface waters of the Netherlands. **Water Res.**, 17: 227-230. In: WHO, **Environmental Health Criteria 71, Pentachlorophenol**, WHO, Geneva, 1987, 236p.
- [WHO] World Health Organization. **The guidelines pesticides in drinking-water**, [http://www.water_sanitation_health/dwg/en/507.pdf.] . 05 março 2004].
- [WHO] World Health Organization. **Environmental Health Criteria 71, Pentachlorophenol**, Geneva, 1987, 236p.
- Wong,A.S.; Crosby,D.G. Photolysis of pentaclorophenol : **Chem. Pharm. Environ. Toxicol.**, N.Y., London, Plenum Press, pp 19-25, 1978.
- Zheng, M.H. et al. Analysis of pentachlorophenol from water, sediments, and fish bile of dongting lake in China. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.** 64: 16-19. 2000.
- Zuin, V.G. et al. Determination of pentachlorophenol and hexachlorobenzene in natural waters affected by industrial chemical residues. **J. Braz. Chem. Soc.**, 10:25-30, 1999.

Validação do método espectrofotométrico para quantificação do aminoácido hidroxiprolina em conservas de carne

Spectrophotometric method validation for hydroxyproline amino acid determination in canned meat

RIALA6/972

Jussara C. de M. DELLA TORRE^{1*}, Jaim LICHTIG¹, Nelson J. BERAQUET²

* Endereço para correspondência: Instituto Adolfo Lutz - Seção de Óleos, Gorduras e Condimentos - Av. Dr. Arnaldo, 355, São Paulo, SP. CEP: 01246-902.

¹ Serviço de Alimentos da Divisão de Bromatologia e Química do Instituto Adolfo Lutz

² Centro de Tecnologia de Carnes do Instituto de Tecnologia de Alimentos. Av. Brasil, 2880, Campinas, SP. CEP: 13073-001.
Recebido: 01/12/2003 – Aceito para publicação: 14/05/2004

RESUMO

A validação tem por objetivo assegurar que o método analítico é adequado ao que se propõe quantificar e pode ser realizada por estudos interlaboratoriais ou intralaboratoriais. A exatidão é um dos principais fatores a serem estabelecidos na validação, podendo ser avaliada com o uso de materiais de referência. Os métodos espectrofotométricos são os mais utilizados na quantificação do aminoácido hidroxiprolina na rotina de análise de tecido colágeno devido à precisão, simplicidade, baixo custo e rapidez. Este trabalho teve por objetivo validar intralaboratorialmente a metodologia espectrofotométrica oficial da AOAC (Association of Official Analytical Chemists) para quantificação do aminoácido hidroxiprolina utilizando amostras de conservas de carne de estudo interlaboratorial FAPAS/MAFF/UK (Food Analysis Performance Assessment Scheme / Ministry of Agriculture, Fisheries and Food / United Kingdom) como material de referência. A curva de padronização apresentou linearidade ($r=0,9991$) na faixa utilizada. O método revelou limite de quantificação de hidroxiprolina na alíquota de análise de $0,030 \mu\text{g/mL}$ com desvio padrão relativo de 6,5% e na amostra $0,0075\text{g}/100\text{g}$. As taxas de recuperação variaram de 90 a 95% determinadas em 3 níveis de concentração da amostra FAPAS fortificada. As taxas de repetitividade obtiveram CV (coeficiente de variação) inferiores a 4%. A participação em nove séries do programa interlaboratorial de proficiência FAPAS/MAFF/UK no período de 1997 a 2003 revelou boa exatidão com resultados satisfatórios em 89% das análises. A metodologia apresentou-se eficiente quando aplicada a conservas de carne, podendo ser considerada validada intralaboratorialmente.

Palavras-Chave. validação, hidroxiprolina, método espectrofotométrico, determinação quantitativa, colágeno, conserva de carne.

ABSTRACT

The purpose of validation approach is to assure the adequacy of an analytical method, and it may be performed by either inter - or intralaboratory studies. Accuracy is one of the main factors in the validation process, and it may be evaluated by employing reference samples. For hydroxyproline determination of collagen routine analysis, spectrophotometry methods are used due to the precision, accuracy, simplicity, low cost and rapidity. The present investigation aimed at the intralaboratory validation of the official AOAC (Association of Official Analytical Chemists) spectrophotometric determination of hydroxyproline in canned meat employing the FAPAS/MAFF/UK (Food Analysis Performance Assessment Scheme / Ministry of Agriculture, Fisheries and Food / United Kingdom) as reference material. The calibration curve showed linearity ($r=0.9991$) in the applied concentration

interval. The method revealed quantification limit of 0.030 μ g/mL with relative standard deviation of 6.5%, and 0.0075g/100g for the sample. The recovery rates were of 90-95% for three spiked concentrations FAPAS samples. The repeatability rates displayed the CV (variation coefficient) below 4%. Participation in nine series of interlaboratory FAPAS/MAFF proficiency program, during the period between 1997 and 2003, revealed satisfactory results in 89% of evaluations. The method was considered efficient for canned meat analyses, and it may therefore be considered as intralaboratorially validated.

Key Words. validation, hydroxyproline, spectrophotometric method, quantitative determination, collagen, canned meat

INTRODUÇÃO

Com a implantação dos Programas de Qualidade nos Institutos de Pesquisa, tornou-se necessário a participação em programas interlaboratoriais e a validação de métodos analíticos. Através desses programas é possível auto-avaliar, comparar resultados obtidos usando diferentes técnicas analíticas, testar metodologias, avaliar o desempenho do laboratório e obter materiais de referência certificados. O “Food Analysis Performance Assessment Scheme (FAPAS) - CSL Food Science Laboratory – Ministry of Agriculture, Fisheries and Food (MAFF), UK” tem sido o programa interlaboratorial de análise de alimentos mais utilizado no Reino Unido e em vários países do mundo⁵. Segundo o FAPAS⁸, com a finalização dos resultados, tendo-se estabelecido a concentração do analito, as amostras excedentes podem ser utilizadas como material “quase-referência”, da mesma maneira que os materiais de referência certificados (CRMs). Materiais de teste FAPAS não são CRMs porém, como materiais certificados na área de alimentos são escassos, muitas vezes poderão ser a única fonte de referência disponível⁸.

O laboratório, ao empregar métodos de ensaios químicos emitidos por organismos de normalização, organizações reconhecidas na sua área de atuação ou publicados em livros e/ou periódicos de grande credibilidade na comunidade científica, necessita demonstrar que tem condições de operar de maneira adequada estes métodos, dentro das condições específicas existentes nas suas instalações antes de implantá-los¹⁴.

O primeiro passo para a obtenção de resultados analíticos confiáveis está na validação do método analítico, podendo ser validado intralaboratorialmente ou interlaboratorialmente. No próprio laboratório, através de testes de recuperação e um ou dois dos enfoques seguintes, o analista pode validar um método analítico: a) comparação com um método independente; b) emprego de material de referência certificado. Interlaboratorialmente, a validação pode ser obtida através de um estudo colaborativo envolvendo vários laboratórios. Nota-se que o método escolhido que já foi objeto de um estudo colaborativo; ainda assim está obrigado a ser validado intralaboratorialmente para provar que pode ser usado no laboratório²⁷.

Validação é um conjunto de operações necessárias para demonstrar que um procedimento é adequado para a aplicação pretendida. A validação de um método analítico tem por objetivo o conhecimento de seu potencial aplicativo e de suas limitações, sendo essencial para a correta interpretação dos resultados obtidos na aplicação do método. O processo de validação tem o objetivo de explicar a repetitividade e a reprodutibilidade de um método, pela interpretação dos parâmetros que definem a exatidão e a precisão do mesmo. A repetitividade é o grau de concordância entre os resultados das análises individuais quando o procedimento é aplicado repetidamente a múltiplas análises da mesma amostra homogênea em idênticas condições em curto intervalo de tempo. A reprodutibilidade difere da repetitividade por utilizar laboratórios, operadores e equipamentos diferentes, entre outros¹.

O processo de validação de um teste quantitativo exige além do conhecimento já mencionado da exatidão e da precisão, o conhecimento da especificidade, do limite de quantificação e da linearidade. O limite de detecção deverá ser estabelecido somente nas análises de impurezas e ensaios limite¹.

Os métodos de análise devem apresentar especificidade, pois os alimentos são de constituição química complexa, podendo seus componentes interferir nos resultados. Um método que produz resposta para apenas um analito é chamado específico¹⁴.

Quando são realizadas medidas em amostras com baixos níveis do analito ou de uma propriedade, como, por exemplo, análise de traços, é importante saber qual o menor valor de concentração do analito ou da propriedade que pode ser detectado pelo método. O termo “*limite de detecção*” não é aceito por todos, apesar de ser usado em alguns documentos setoriais. O limite de detecção do equipamento (LDE) é definido como a concentração do analito que produz um sinal de três a cinco vezes a razão sinal/ruído do equipamento. O limite de detecção do método (LDM) é definido como a concentração mínima de uma substância medida e declarada com 95% ou 99% de confiança de que a concentração do analito é maior que zero. O LDM é determinado através de análise completa de uma dada matriz contendo o analito¹⁴.

Para qualquer método quantitativo, existe uma faixa de concentrações do analito ou valores da propriedade na qual o método pode ser aplicado. No limite inferior da faixa de concentração, os fatores limitantes são os valores dos limites de detecção e de quantificação. No limite superior, os fatores limitantes dependem do sistema de resposta do equipamento de medição. A faixa linear de trabalho de um método de ensaio é o intervalo entre os níveis inferior e superior de concentração do analito no qual foi demonstrado ser possível a determinação com precisão, exatidão e linearidade exigidas, sob as condições especificadas para o ensaio¹⁴.

Linearidade é a habilidade das respostas analíticas serem diretamente proporcionais às concentrações das substâncias em estudo^{1,19}. A faixa linear é definida como a faixa de concentrações na qual a sensibilidade pode ser considerada constante. O limite inferior deve ser igual ou maior do que o limite de detecção do método. As etapas de diluição e concentração devem ser praticadas sem o risco de introduzir erros sistemáticos (*bias*). A linearidade da curva de calibração pode ser calculada a partir da equação da regressão linear, determinada pelo método dos mínimos quadrados. O coeficiente de correlação linear (*r*) é freqüentemente usado para indicar o quanto pode ser considerada adequada a reta como modelo matemático. Um valor maior que 0,90 é, usualmente, requerido. O método pode ser considerado livre de tendências (*unbiased*) se o corredor de confiança da reta de regressão linear contiver a origem¹⁴.

Os valores da curva analítica não devem apresentar valores aberrantes e devem apresentar homoscedasticidade. Homoscedasticidade ou heteroscedasticidade é a independência ou dependência da variância das respostas com as concentrações do analito. Se o valor da maior variância dividido pelo somatório das variâncias for menor que o tabelado de Cochran, o método é homoscedástico, e, portanto, a curva analítica pode ser construída pelo método dos mínimos quadrados normais¹.

O limite de quantificação é a mais baixa concentração do analito em exame que pode ser quantificada com limite de confiabilidade aceitável utilizando um determinado procedimento experimental¹. Pode ser considerado como sendo a concentração do analito correspondente ao valor da média do branco mais 5, 6 ou 10 desvios-padrão. Algumas vezes é também denominado "limite de determinação". Na prática, corresponde normalmente ao padrão de calibração de menor concentração (excluindo o branco). Este limite, após ter sido determinado, deve ser testado para averiguar se as exatidão e precisão conseguidas são satisfatórias.

Exatidão do método é definida como sendo a concordância dos valores experimentais com o valor de referência aceito como convencionalmente verdadeiro¹. Os processos normalmente utilizados para avaliar a exatidão de um método são, entre outros: uso de materiais de referência, participação em comparações interlaboratoriais e realização de ensaios de recuperação¹⁴. A taxa de recuperação é definida como a relação

entre o resultado experimental obtido depois da análise de uma amostra fortificada com uma quantidade conhecida do analito (*spike*), e o valor teórico desta quantidade fortificada¹. O analito deve ser adicionado à amostra em pelo menos três diferentes concentrações¹⁴. A faixa de variação de recuperação aceitável é de 70 a 110% e deve ser expressa para cada nível de concentração estudado¹.

A presença da hidroxiprolina no colágeno, representando aproximadamente 14% do mesmo, é uma característica particular da proteína porque este aminoácido ocorre somente em poucas proteínas, a saber, elastina (1,6%), e em menor extensão na proteína do complemento do soro (C1q), e em algumas proteínas vegetais²³. Por causa desta composição incomum, é grande o interesse no desenvolvimento de métodos acurados na quantificação deste aminoácido, que permite quantificar indiretamente o teor de colágeno.

Segundo a AOAC², a hidroxiprolina é quantitativamente determinada como medida do material colagenoso em carne e produtos cárneos. O tecido conjuntivo colagenoso contém 12,5% de hidroxiprolina quando o fator de conversão de nitrogênio a proteína 6,25 é utilizado, ou 14% quando o fator é 5,55.

A detecção e a determinação acurada de hidroxiprolina é um requerimento essencial para a ciência e tecnologia de carnes que busca explicar a verdadeira contribuição do colágeno para a estrutura e qualidade da carne. Em geral, a carne com elevada proporção de tecido conjuntivo é considerada de baixa qualidade, devido à redução da sua maciez e valor nutricional²⁵, estando grande parte dos aminoácidos essenciais em proporção acentuadamente reduzida, e o triptofano comumente ausente³. O tecnólogo de alimentos também requer técnicas analíticas confiáveis para auxiliar no controle de qualidade de um produto uniforme, que também esteja de acordo com a legislação vigente quanto à sua composição. Dependendo da natureza da investigação e da amostra, há vários métodos para a detecção de proteínas colagenosas do tecido conjuntivo e quantificação do aminoácido hidroxiprolina, a saber: **a)** espectrometria de ressonância magnética nuclear¹⁷, **b)** técnica ELISA para a determinação dos vários componentes do tecido conjuntivo⁷; **c)** métodos histoquímicos^{9,10,13,26}, **d)** cromatografia em fase gasosa com detector de massa¹⁵, **e)** cromatografia líquida de alta eficiência²⁴; **f)** espectroscopia de transmissão no infravermelho próximo⁴; **g)** análise de aminoácidos^{12,21,28,29} e **h)** espectrofotometria ou colorimetria^{11,16,18,20,22}. Alguns dos métodos citados podem ser tão bons quanto os colorimétricos, contudo muitos deles necessitam operadores e equipamentos especializados resultando custo elevado, não sendo apropriados para um grande número de amostras⁷.

Na determinação espectrofotométrica da concentração de hidroxiprolina, a amostra é inicialmente hidrolisada com ácido para liberar a hidroxiprolina da ligação peptídica. Isto é geralmente alcançado com H₂SO₄ 3,5M a 105°C por 16h em tubos fechados ou com HCl 6M a 110°C por 8-24h sob refluxo. O aminoácido livre é determinado colorimetricamente após oxidação a pirrol (Figura 1) e reação com 4-

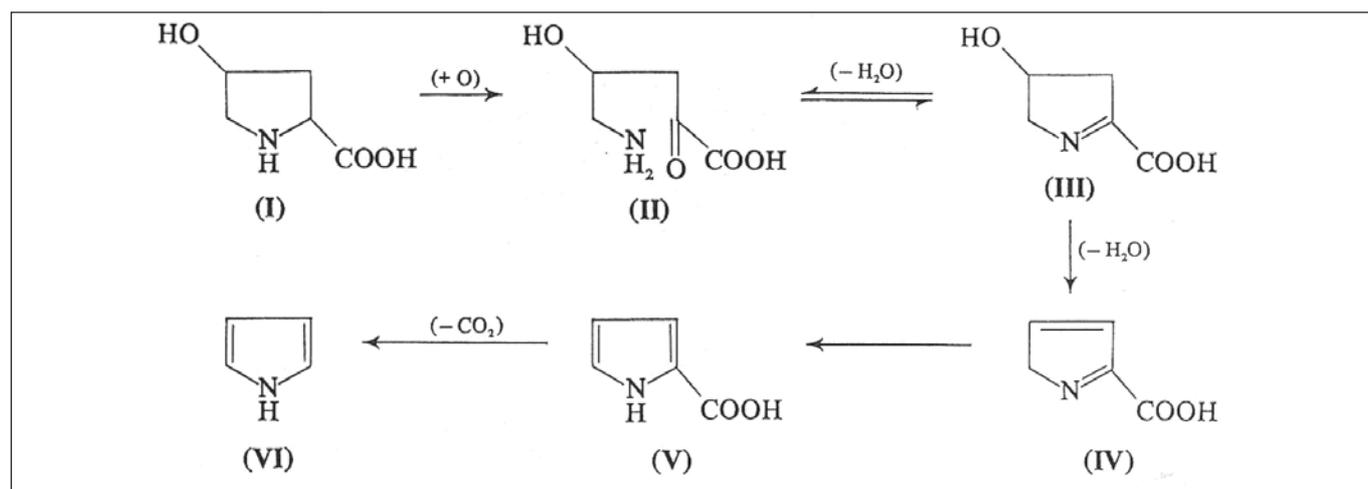


Figura 1. Mecanismo proposto para a oxidação da hidroxiprolina a pirrol. Hidroxiprolina (I) é oxidada inicialmente a ácido α-ceto-γ-hidroxi-δ-aminovalérico linear (II), o qual está em equilíbrio com a estrutura cíclica de ácido Δ'-pirrolina-4-hidroxi-2-carboxílico (III). A perda da molécula de água resulta uma estrutura instável (IV) a qual, espontaneamente, através de rearranjo, resulta em ácido pirrol-2-carboxílico (V). A etapa final de descarboxilação a pirrol (VI) ocorre durante o aquecimento após a adição do reagente cromogênico, 4-dimetilaminobenzaldeído⁷.

dimetilaminobenzaldeído (reagente de Ehrlich) resultando um composto de coloração vermelho-púrpura. A cloramina T é atualmente o agente oxidante preferido na formação do pirrol.

Na existência de uma legislação que estabeleça teores máximos de proteína do tecido conjuntivo colagenoso em carnes e produtos cárneos, o teor de colágeno deve ser determinado com segurança, havendo a necessidade de métodos de análise de rotina que sejam simples, confiáveis e suficientemente rápidos.

No Brasil, a validação dos métodos analíticos tem sido uma preocupação dos pesquisadores, mas desconhecem-se relatos sobre a validação de métodos para a quantificação do aminoácido hidroxiprolina.

O objetivo do presente trabalho foi validar intralaboratorialmente o procedimento de análise quantitativa na determinação do aminoácido hidroxiprolina segundo método espectrofotométrico oficial preconizado pela AOAC², utilizando amostras de conservas de carne de estudo interlaboratorial FAPAS/MAFF/UK.

MATERIAL E MÉTODOS

Material

Amostras

Para a validação do método utilizaram-se amostras de conservas de carne esterilizadas (Figura 2) de estudo interlaboratorial FAPAS/MAFF/UK. As amostras denominadas "canned meat test material" foram analisadas quanto aos teores de hidroxiprolina, no período de 1997 a 2003, correspondendo essas análises à participação do Laboratório em 9 séries ("Rounds") do programa interlaboratorial. De acordo com os procedimentos do FAPAS, o material teste constituiu-se de

porcentagens variáveis de carne suína, toucinho, farinha de rosca, água e sal que foram homogeneizados em "cutter", envasados a vácuo em latas cilíndricas de aproximadamente 150g e autoclavados a um tempo de esterilização (F_0) pré-estabelecido.

Padrão

Foi preparada uma solução padrão de hidroxiprolina em água (Merck, para fins bioquímicos) na concentração de 839 μ g/mL, por pesagem direta de 0,1678g em 200mL de água destilada.

Reagentes

Os solventes orgânicos n-propanol e 2-propanol utilizados foram de grau espectrofotométrico; os demais reagentes utilizados foram de grau pureza analítica.

Equipamentos

Trabalhou-se com espectrofotômetro ultravioleta e visível (HP-8453 gerenciado pelo software UV-VIS Chemstation), balança analítica (Bosch SAE200), pHmetro digital (Hanna HI 93321), banho-maria termostatizado a 60°C (Fanem - Unitemp).

Métodos

Procedimento de análise quantitativa

A determinação da hidroxiprolina seguiu metodologia preconizada pela AOAC² e estabelecida por Della Torre et al.⁶, onde a amostra (4,00g) foi hidrolisada sob refluxo com 30 mL de ácido clorídrico 6M por 8h a 110°C, filtrada e diluída. A hidroxiprolina foi oxidada a pirrol pela cloramina T em tampão citrato-acetato pH 6,0 (temperatura ambiente, 20 minutos). O pirrol com o reagente de Ehrlich (4-dimetilaminobenzaldeído em ácido perclórico/2-propanol) a 60°C por 15 minutos forma um

complexo vermelho-púrpura, que, segundo a metodologia oficial, deve ser medido a 560nm. Neste estudo, o estabelecimento do comprimento de onda de máxima absorção foi obtido através da varredura espectrofotométrica de uma solução padrão de hidroxiprolina, diluída a 0,030µg/mL, submetida ao procedimento acima. A quantificação das amostras realizou-se pelas interpolações dos resultados de absorbância colocadas na equação de regressão linear da reta padrão.

Linearidade

A linearidade foi observada pelo gráfico dos resultados dos ensaios em função da concentração do analito e calculada a partir da equação da regressão linear, determinada pelo método dos mínimos quadrados. A linearidade foi determinada pelo coeficiente de correlação (r) da curva analítica, das soluções padrão de hidroxiprolina, tratadas pelo procedimento, distribuídas uniformemente no intervalo de trabalho¹⁴.

Limite de Quantificação

O limite de quantificação foi estabelecido como o padrão de calibração da curva analítica de menor concentração (excluindo o branco) medido de forma quantitativa com nível aceitável de precisão e exatidão¹⁴.

Sensibilidade

A sensibilidade foi determinada simultaneamente ao teste de linearidade e expressa pelo coeficiente angular da curva de calibração, sendo dependente da natureza do analito e da técnica de detecção¹⁴.

Recuperação

A amostra de conserva de carne obtida em estudo interlaboratorial FAPAS/MAFF ("Round 25") foi previamente avaliada para o teor do aminoácido hidroxiprolina. Os testes de recuperação foram realizados com a adição de 5, 10 e 20

mL de solução padrão de hidroxiprolina na concentração de 839 µg/mL à amostra FAPAS, em triplicata, a fim de se obter os níveis de concentração de hidroxiprolina na alíquota de análise de 0,280 (metade da concentração determinada da amostra de conserva FAPAS); 0,559 (igual) e 1,119 µg/mL (dobro). A recuperação foi calculada pela relação entre a concentração determinada e a teórica (adicionada no início do procedimento) após seguir o procedimento analítico completo¹.

Precisão

Repetitividade

O estudo da repetitividade abrangeu a determinação de hidroxiprolina de amostras de conserva carne (FAPAS, "Round" 25), adicionadas de padrão hidroxiprolina (839µg/mL) nos três níveis de concentração (dobro, igual e metade da concentração esperada), em triplicata. A repetitividade foi expressa pela dispersão dos resultados entre as replicatas nos níveis de concentração de adição do padrão, através do coeficiente de variação (%CV). As determinações foram realizadas no mesmo dia e com o mesmo analista¹.

Exatidão

A exatidão do procedimento analítico de quantificação de hidroxiprolina foi expresso pelo valor-z, representando grau de concordância entre os resultados laboratoriais individuais encontrados e os valores aceitos como referência nos estudos de análise de controle interlaboratorial FAPAS/MAFF/UK (resultados FAPAS), no período de 1997 a 2003.

Tratamento estatístico dos dados

Determinação de valores aberrantes

Na verificação se o menor e/ou maior valor era aberrante ou se não fazia parte da população de valores gerados durante as etapas de validação do método, utilizou-

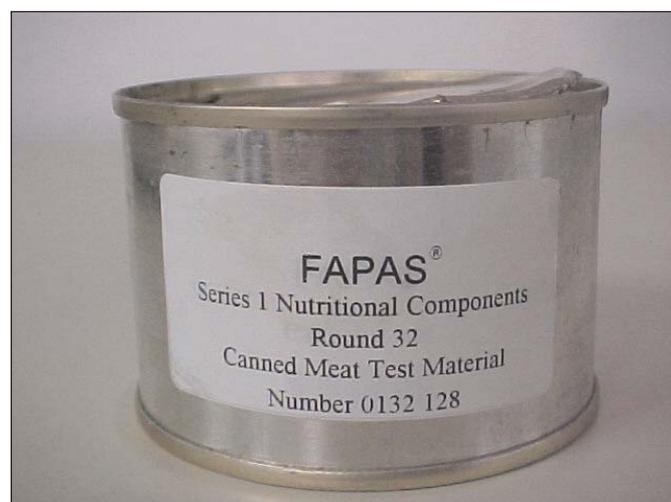


Figura 2. Amostra de conserva de carne para estudo de controle interlaboratorial FAPAS na quantificação de hidroxiprolina

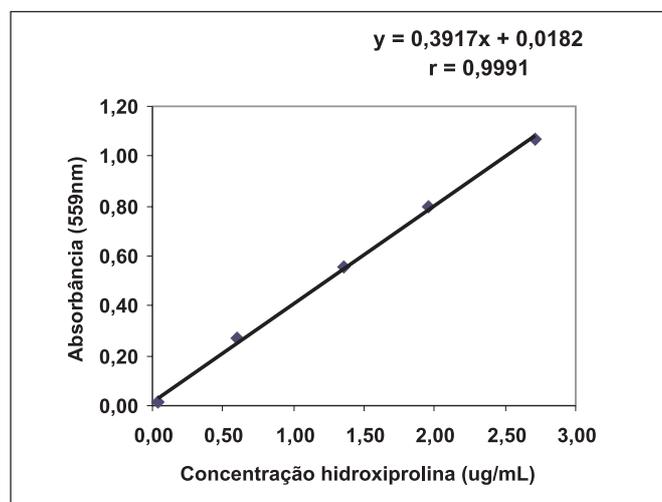


Figura 3. Curva analítica de determinação do aminoácido hidroxiprolina

Tabela 1. Resultados da análise das soluções padrão de hidroxiprolina segundo método espectrofotométrico AOAC².

Solução padrão Hidroxiprolina* (µg/mL)	Absorbância (559nm)	DP	CV(%)	Variância
0,030	0,014	0,001	6,5	0,0000009
0,604	0,268	0,003	1,2	0,0000096
1,359	0,558	0,015	2,7	0,0002260
1,963	0,794	0,010	1,2	0,0000940
2,718	1,071	0,014	1,3	0,0001930

* Análises realizadas em quadruplicata DP = desvio padrão CV=coeficiente de variação

Tabela 2. Taxas de recuperação dos padrões de hidroxiprolina adicionados em amostras de conserva de carne FAPAS.

Níveis	Concentração (alíquota) adicionada* (µg/mL)	Concentração (alíquota) determinada (µg/mL)	Concentração média determinada (µg/mL)	DP	Recuperação (%)	Recuperação média (%)	DP	CV(%)
I	0,28	0,27 0,25 0,26	0,26	0,01	96,4 89,3 92,9	92,9	3,6	3,9
II	0,56	0,53 0,52 0,54	0,53	0,01	94,6 92,8 96,4	94,6	1,8	1,9
III	1,12	1,01 1,02 1,01	1,01	0,01	90,2 91,1 90,2	90,5	0,5	0,6

* Análises realizadas em triplicata DP = desvio padrão CV = coeficiente de variação

Tabela 3. Resultados das participações no controle interlaboratorial FAPAS

N	Ano	“Round”	Resultado laboratório*(%)	Resultado FAPAS(%)	Valor z
1	1997	18	0,073	0,067	0,3
2	1998	20	0,165	0,168	-0,1
3	1998	22	0,176	0,166	0,2
4	1999	25	0,209	0,198	0,2
5	2000	27	0,216	0,203	0,2
6	2001	30	0,112	0,135	-0,7
7	2002	32	0,177	0,202	-0,5
8	2002	34	0,181	0,187	-0,5
9	2003	35	0,114	0,133	-2,2

*Análises realizadas em triplicata

se o teste de Grubbs para o nível de significância de 0,05. O valor y_{ij} foi considerado aberrante quando G calculado era maior ao tabelado em função do número de replicatas (n), conforme a equação¹:

$$G = (y_{ij} - \bar{y})/s$$

Onde:

y_{ij} = valor suspeito de ser aberrante

y = média dos valores obtidos

s = desvio padrão dos valores obtidos

Valores tabelados: n=3, $G_{tab} = 1,15$; n=4, $G_{tab} = 1,48$; n=5, $G_{tab} = 1,72$

Homoscedasticidade/heteroscedasticidade

A homoscedasticidade foi avaliada através do método de Cochran¹, em quadruplicata para os 5 pontos da curva analítica (0,030 – 2,718 µg/mL), calculando-se as variâncias das respostas de absorbância de cada ponto de concentração, dividindo-se a

maior variância (S^2) pela somatória das variâncias ($\sum S^2$) e comparação do valor obtido com o valor tabelado, segundo a fórmula: $c_{cal} = S^2_{maior} / \sum S^2$

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A quantificação de hidroxiprolina segundo método AOAC², aplicando-se o procedimento a um padrão diluído, revelou um pico máximo de absorvância no comprimento de onda de 559nm. Na Tabela 1 estão apresentados os resultados de absorvância, desvio-padrão (DP), coeficiente de variação (CV) e variância obtidos na análise das soluções padrão de hidroxiprolina para as cinco diferentes concentrações, utilizadas na elaboração da curva analítica.

A determinação da homoscedasticidade / heteroscedasticidade verificada através do método de Cochran ($c_{cal} = S^2_{maior} / \sum S^2$) revelou c_{cal} igual a 0,525 para os resultados de variância estabelecida na Tabela 1. Como c_{cal} é menor que c_{tab} (0,684 para 5 pontos) concluiu-se que o método é homoscedástico. Como o critério de homoscedasticidade foi cumprido, a curva de calibração foi calculada pelo método dos quadrados mínimos, revelando a equação da reta $y=0,3917x+0,0182$ e coeficiente de correlação (r) igual a 0,9991 (Figura 3). Desta forma fica estabelecido a linearidade da curva analítica pela proximidade de r ao valor 1 e a sensibilidade de 0,3917 mL μg^{-1} expressa pela inclinação da curva de regressão linear (coeficiente angular da reta).

O limite de quantificação de hidroxiprolina na alíquota de análise ficou definido como 0,030 $\mu\text{g}/\text{mL}$ com desvio padrão relativo de 6,5% (Tabela 1) e de 0,0075g/100g de hidroxiprolina na amostra. A curva analítica abrangeu de 0,030 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a 2,718 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de hidroxiprolina, limite superior com desvio padrão relativo de 1,3%.

As taxas de recuperação de hidroxiprolina das amostras de conservas de carne FAPAS adicionadas de padrão em 3 níveis de concentração, foram calculadas pela relação entre a concentração média determinada e a concentração média teórica (adicionada) para cada nível de concentração estudado (Tabela 2). Os resultados revelaram as taxas de recuperação de 92,9, 94,6 e 90,5%, respectivamente, para as concentrações finais teóricas metade, igual e dobro. A recuperação média de 92,7%, embora ligeiramente inferior a 96,1%, obtida no estudo colaborativo de Kolar¹⁸, mostra-se dentro do intervalo aceito 70 – 110%¹. A repetitividade expressa pela dispersão dos resultados entre replicatas através do coeficiente de variação, revelou valores de CV inferiores a 3,9%. Não houve suspeitas de valores aberrantes.

Na Tabela 3 estão apresentados os resultados dos ensaios de exatidão realizados com nove amostras de conservas de carnes de estudos interlaboratoriais de proficiência FAPAS/MAFF/UK, no período de 1997 a 2003. No relatório final que retornou aos laboratórios participantes, ficou estabelecido o valor-z (“z-score”) da análise para cada laboratório, onde $z=(x-X)/\sigma$; x=concentração do analito determinada, X=concentração

verdadeira do analito, σ =desvio-padrão para o valor x, podendo-se considerar o resultado satisfatório se $|z|<2$, questionável quando $2<|z|<3$ e insatisfatório se $|z|>3$. Os valores-z variaram de -2,2 a 0,3 no período avaliado. Pode-se considerar que 89% (8 em 9) dos resultados foram satisfatórios, por apresentarem valores de |z| menor que 2. Somente 11% (1 em 9) dos resultados revelaram |z| entre 2 e 3, podendo ser considerados questionáveis. Não houve resultado insatisfatório ($|z|>3$). O controle de qualidade do método no laboratório está sendo verificado anualmente pela introdução de amostra de referência FAPAS para análise.

CONCLUSÃO

O método espectrofotométrico preconizado pela AOAC para quantificação de aminoácido hidroxiprolina, através da hidrólise ácida das proteínas, oxidação com cloramina T e reação colorimétrica com reagente de Ehrlich (4-dimetilaminobenzaldeído), foi confirmado ser simples na operação, rápido, adequado para um grande número de amostras, revelando elevada exatidão e precisão em matriz complexa como conservas de carne.

REFERÊNCIAS

1. Abrantes, S.M.P. **Curso de validação de metodologia na área química**. In: V Encontro do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, Instituto Adolfo Lutz, 2003.
2. AOAC International. **Official Methods of Analysis of the AOAC International**. 16. ed., Arlington: AOAC International, 1996. Chapter 39 (Meat and Meat Products), p. 13-9.
3. Bayley, A.J.; Light, N.D. **Connective tissue in meat and meat products**. England: Elsevier Science Publishers; 1989. 355p.
4. Berg, H.; Kolar, K. Evaluation of rapid moisture, fat, protein and hydroxyproline determination in beef and pork using the infratec food and feed analyzer. **Fleischw.**, 71:787-9, 1991.
5. Della Torre, J.C.M. et al. Avaliação das metodologias de análise de produto cárneo através de programa interlaboratorial. In: 1º Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Carnes, 2001. **Anais...**São Pedro: CTC-ITAL, 2001. p.466-7.
6. Della Torre, J.C.M. et al. **Capítulo XIII - Carnes e produtos cárneos – 0283/IV Determinação espectrofotométrica de hidroxiprolina**. In: Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos - Instituto Adolfo Lutz. **4.ed., 2004 (no prelo)**.
7. Etherington, D.J.; Sims, T.J. Detection and estimation of collagen. **J. Sci. Food Agric.**, 32:539-46, 1981.
8. Fapas Secretariat. Protocol for the Food Analysis Performance Assessment Scheme (FAPAS). Organisation and Analysis of data. **Ministry of Agriculture, Fisheries and Food. Food Science Laboratory, United Kingdom**. 3ª ed, may 1993.
9. Flint, F.O.; Firth, B.M. Histochemical demonstration of collagen in comminuted meat products. **Analyst**, 108:757-9, 1983.
10. Flint, F.O.; Pickering, K. Demonstration of collagen in meat products by an improved micro-sirius red polarization method. **Analyst**, 109:1505-6, 1984.
11. França, J.M.; Waszczyński, N. Teor de hidroxiprolina em peles de frango submetidas à tratamento térmico. **B. CEPPA**, 20:19-28, 2002.
12. Gruber, H.A. et al. Determination of connective-tissue components in beef using simultaneous equations based on amino-acid analyses. **J. Food Science**, 55:1506-9, 1990.

13. Hildebrandt, G.; Hirst, L. Determination of the collagen, elastin and bone content in meat products using television image analysis. **J. Food Science**, 50:568-72, 1985.
14. INMETRO. **Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos**. DOQ-CGCRE-008. Revisão: 01 - março 2003. 35p.
15. Johnson, S.K. The determination of hydroxyproline in meat using gas chromatography-mass spectrometry. **Meat Science**, 22:221-7, 1988.
16. Jonas, D.A.; Wood, R. Determination of hydroxyproline in meat products: collaborative study. **J. Assoc. Publ. Analysts**, 21:113-21, 1983.
17. Josefowicz, M.L.; O'Neill, I.K.; Prosser, H.J. Determination of L-hydroxyproline in meat protein by quantitative Carbon-13 Fourier Transform Nuclear Magnetic Resonance Spectrometry. **Anal. Chem.**, 49:1140-3, 1977.
18. Kolar, K. Colorimetric determination of hydroxyproline as measure of collagen content in meat and meat products: NMKL collaborative study. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, 73:54-7, 1990.
19. Leite, F. **Validação em análise química**. 1. ed. Campinas: Editora Átomo, 1996. 120p.
20. Murray, A.C.; Jeremiah, L.E. Toluene as an alternative to benzene in the Woessner determination of hydroxyproline. **J. Agric. Food Chem.**, 31:1368-9, 1983.
21. Nguyen, Q.; Zarkadas, C.G. Comparison of the amino acid composition and connective tissue protein contents of selected bovine skeletal muscles. **J. Agric. Food Chem.**, 37:1279-86, 1989.
22. Reis, R.A.A et al. Quantificação da hidroxiprolina como índice de qualidade de salsicha comercializada em Belo Horizonte – MG. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, 51:589-94, 1999.
23. Sims, T.J.; Bailey, A.J. Connective tissue. In: LAWRIE, R. **Developments in Meat Science – 2**. London: Applied Science Publishers Ltd, 1981. p.29-59.
24. Smith, S.H.; Judge, M.D. An HPLC method using FMOC-ADAM for determination of hydroxyproline in muscle. **Meat Science**, 30:351-7, 1991.
25. Steinhart, H.; Bosselmann, A.; Möller, C. Determination of pyridinolines in bovine collagenous tissues. **J. Agric. Food Chem.** 42:1943-7, 1994.
26. Swasdee, R.L. et al. Ultrastructural changes during chopping and cooking of a frankfurter batter. **J. Food Science**, 47:1011-3, 1982.
27. Valente Soares, L.M. Como obter resultados confiáveis em cromatografia. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 60:79-84, 2001.
28. Zarkadas, C.G. et al. Amino acid composition and protein contents of selected very low energy reducing diets. **J. Agric. Food Chem.**, 40:2198-207, 1992.
29. Zarkadas, C.G. et al. Assessment of the protein quality of beefstock bone isolates for use as an ingredient in meat and poultry products. **Agric. Food Chem.**, 43:77-83, 1995.

Otimização da determinação da aflatoxina M₁ em leite, utilizando coluna de imunoafinidade e cromatografia em camada delgada

Performance of determination for Aflatoxin M₁ in milk by immunoaffinity column and thin layer chromatography

RIALA6/973

Luzia SHUNDO^{1*}, Valter RUVIERI¹, Sandra A. NAVAS¹, Myrna SABINO¹* Endereço para correspondência: ¹ Instituto Adolfo Lutz – Av. Dr. Arnaldo, 355 – 01246-902 – São Paulo/SP, Brazil. - Divisão de Bromatologia e Química, Seção de Química Biológica.

Recebido: 22/03/2004 – Aceito para publicação: 14/05/2004

RESUMO

Um método utilizando coluna de imunoafinidade para limpeza e cromatografia em camada delgada, foi otimizado em nosso laboratório para determinar Aflatoxina M₁ em baixas concentrações no leite. Para a otimização do método, os parâmetros avaliados foram: recuperação, repetitividade, limite de detecção e limite de quantificação. Baseado em adição de padrão nas amostras, os valores das recuperações variaram de 85,83 e 73,86% em níveis de 0,01–0,5 µg/L, respectivamente, e o desvio padrão relativo para repetitividade variou de 7,73-2,08%. O limite de quantificação estabelecido neste método foi de 0,02 µg/L. Os resultados das amostras analisadas por este método tiveram boa correlação quando comparadas com a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. Adicionalmente, o método AOAC também foi otimizado, resultando em um limite de detecção e quantificação de 0,2 e 0,3 µg/L, respectivamente, indicando baixa sensibilidade desse método. A utilização de coluna de imunoafinidade forneceu excelentes resultados na recuperação, sensibilidade e fácil operacionalidade.

Palavras-Chave. leite, aflatoxina M₁, determinação, cromatografia em camada delgada, coluna de imunoafinidade.

ABSTRACT

An immunoaffinity column for cleanup and a thin layer chromatographic method for determining low aflatoxin M₁ concentration in milk were performed in our laboratory. The parameters, such as recovery, repeatability, detection and quantification limit were evaluated to carry out this method. Based on spiked samples, the values of recoveries ranged from 85.83 to 73.86 % at levels of 0.01-0.5 µg/L, respectively, and the relative standard deviation for repeatability (RSDr) ranged from 7.73 to 2.08%. The quantification limit established in this method was 0,02 µg/L. The results of analysed samples by this method demonstrated satisfactory correlation when compared with HPLC. In addition, the AOAC method (1975) was also performed, resulting in detection and quantification limits of 0.2 and 0.3 µg/L, respectively, indicating low sensibility of this method. Immunoaffinity column cleanup gave excellent results for recovery, sensibility and sample throughput.

Key Words. milk, aflatoxin M₁, determination, thin layer chromatography, immunoaffinity column.

INTRODUÇÃO

A Aflatoxina M₁ (AFM₁) é um produto hidroxilado da biotransformação da Aflatoxina B₁ (AFB₁), presente no leite de mamíferos que ingerem ração contaminada com esta micotoxina^{1,7}.

Estudos sobre a toxicidade em animais de experimentação indicam que a AFM₁ é um carcinógeno hepático, com 2 - 10% da potência da AFB₁^{5,6,13,23}. Os organismos mais jovens são mais

susceptíveis a esta toxina, e o leite e seus derivados são produtos muito consumidos pela população infantil. Sabe-se que a maior preocupação com a carcinogenicidade é a exposição crônica, pois é através da alta frequência de ingestão de alimentos contaminados com baixos teores de aflatoxina onde a população exposta é maior.

Os limites estabelecidos para AFM₁ em alimentos são da ordem de ng/L ou ng/g, níveis muito baixos que exigem métodos sensíveis e específicos¹⁴.

A disponibilidade de colunas de imunoafinidade permitiu melhorar a sensibilidade de métodos analíticos, resultando em um extrato límpido, sem interferentes^{4,11,20}.

Este trabalho teve como objetivo avaliar e otimizar duas técnicas para determinar AFM₁ em amostras de leite, ambas por Cromatografia em Camada Delgada (CCD), uma utilizando Coluna de Imunoafinidade (CI)¹⁰ e outra o método da AOAC (Association of Official Analytical Chemists)², com pequenas modificações. Adicionalmente, algumas amostras foram submetidas a análise por CI/CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência), para verificar a eficiência da técnica. Para otimização dos métodos descritos neste trabalho, foram avaliados e otimizados os parâmetros: Recuperação, Repetibilidade, Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ).

Os critérios adotados como referência para a avaliação da recuperação e precisão foram os estabelecidos pelo CE (European Committee)³ onde são considerados aceitáveis os seguintes valores: para a AFM₁ com concentração entre 0,01-0,5 µg/L, valores de porcentagem de recuperação entre 60-120%. Nas concentrações maiores que 0,05 µg/L, foram aceitos valores de porcentagem de recuperação entre 70-120%.

MATERIAL E MÉTODO

Preparo da solução padrão

O padrão de Aflatoxina M₁ (Sigma Chemical Co; St. Louis, MO, EUA) foi preparado segundo o descrito por Scott¹⁵, procedimento 970.44, 971.22, 973.37.

Contaminação artificial das amostras de leite

Para o método CI/CCD, foram adicionadas quantidades de padrões em amostras de leite cru na qual não foi detectada AFM₁, que corresponderam a concentrações finais de 0,01; 0,02; 0,03; 0,3 e 0,5 µg/L. Para o método AOAC/CCD, foram adicionadas quantidades de padrões que corresponderam a 0,2; 0,3; 0,5 µg/L. Para cada nível de concentração, foram realizadas no mínimo 5 repetições.

Determinação de Aflatoxina M₁

Método utilizando coluna de imunoafinidade

Extração

O método utilizado para AFM₁ foi baseado no procedimento descrito por IDF/IUPAC/IAEA¹⁰ e Dragacci et al.⁸. Uma alíquota de 100 mL de leite foi centrifugada a 2000 x g por 15 minutos. Retirou-se a camada de gordura e o volume total foi passado pela coluna de imunoafinidade com fluxo de 2-3 mL por minuto. Após a passagem de todo o volume, a coluna foi lavada com 40 mL de água para retirada dos interferentes da coluna, seca para eliminação da água residual e eluída inicialmente com 2,5 mL de uma solução de acetonitrila/metanol (3:2, v/v) e em seguida com 2,5 mL de metanol, evaporando-se

até resíduo em corrente de N₂.

Cromatografia em Camada Delgada

O resíduo foi redissolvido em 150 µL de uma solução de tolueno/acetonitrila (9:1, v/v). Uma alíquota de 50 µL do extrato da amostra foi aplicada em cromatofolha (silica gel 60), paralelamente com padrões em diferentes níveis de concentração. Desenvolveu-se o cromatograma até 10 cm a partir do ponto de aplicação, ao abrigo da luz. A fase móvel utilizada foi uma solução de clorofórmio, acetona e álcool isopropílico (87:10:3, v/v). A quantificação foi feita através de comparação visual da amostra com padrões de concentrações conhecidas e a confirmação por pulverização com ácido sulfúrico e derivação com TFA (Ácido Trifluoroacético) segundo o descrito por Scott¹⁵, procedimento 980.21E.

Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

O resíduo foi redissolvido em 500 µL da fase móvel que consistiu numa solução aquosa de ácido acético 2%:acetonitrila:metanol (40:35:25, v/v). Uma alíquota de 20 µL da amostra foi injetada no cromatógrafo líquido de alta eficiência para a separação da toxina e a quantificação foi efetuada utilizando detector de fluorescência¹².

A fase móvel foi previamente filtrada em sistema Millipore à vácuo (membrana de 0,45 µm) e degaseificada. As condições cromatográficas utilizadas foram:

Excitação/emissão (λ): 360/430 nm

Tempo de corrida: 6 minutos.

Fluxo: 1 mL/min.

A confirmação da AFM₁ nas amostras de leite foi realizada através de derivação com TFA, segundo procedimento descrito por Scott¹⁵, procedimento 986.16E.

Neste trabalho, foi construída uma curva de calibração onde o volume de cada injeção de 20 µL correspondeu a 0,01; 0,02; 0,04; 0,06; 0,08; 0,1; 0,2 ng. Foram realizados testes de recuperação com adição de padrão de AFM₁ no leite na qual não foi detectada AFM₁, nas concentrações de 0,01; 0,02; 0,05 µg/L, por ocasião da análise das amostras.

Método da AOAC/CCD (1975)

O método utilizado para AFM₁ foi baseado no método da AOAC². Em uma alíquota de 75 mL de leite foi adicionado 300 mL de metanol e agitou-se por 3 minutos. Adicionou-se 25g de celite e agitou-se por 30 minutos em agitador mecânico. Filtrou-se sob vácuo, lavando com 75 mL de metanol. Todo o volume recolhido foi transferido para um funil de separação, adicionando 225 mL de solução aquosa de cloreto de sódio 4%. A gordura e interferentes foram retirados empregando-se 3 porções de 100mL hexano. A fase metanólica foi extraída com 3 porções de 100 mL de clorofórmio. O extrato clorofórmico foi lavado com 300 mL de solução de cloreto de sódio 4%, recolheu-se novamente a fase clorofórmica e, em seguida foi filtrado em

papel de filtro contendo sulfato de sódio anidro. Evaporou-se o clorofórmio até resíduo e este foi redissolvido em 200 µL de uma solução de tolueno/acetoneitrila (9:1, v/v). Uma alíquota de 10 µl foi aplicada em cromatofolha para separação das amostras, paralelamente com padrões em diferentes níveis de concentração. A quantificação foi feita por comparação visual da amostra com padrões de concentrações conhecidas e a confirmação por pulverização com ácido sulfúrico e derivação com TFA, segundo o método descrito por Scott¹⁵, procedimento 980.21E.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Avaliação da recuperação

A recuperação e a repetitividade foram realizadas em amostras artificialmente contaminadas com AFM₁, em diferentes níveis para cada método empregado, com no mínimo cinco repetições para cada nível de concentração. A Tabela 1 apresenta os níveis de concentração e os resultados da avaliação da recuperação (exatidão) da AFM₁ para o método CI/CCD e AOAC/CCD. A Tabela 2 apresenta a avaliação da repetitividade (precisão) e a Tabela 3 a avaliação dos limites de detecção e quantificação da AFM₁.

Pelo método CI/CCD, os dados obtidos indicaram que a recuperação média variou de 85,83% a 73,86% para os níveis de 0,01 e 0,5 µg/L, respectivamente. O DPR foi maior no menor nível de concentração (7,73%) e menor no maior nível de concentração (2,08%). Estes resultados indicaram que, quanto mais próximo do limite de detecção, a diferença entre as determinações são maiores (Tabelas 1 e 2).

O LD e LQ foram estabelecidos baseando-se no CE³. Inicialmente, foi estabelecido o limite de detecção do método em 0,01 µg/L. Entretanto, por se tratar de uma quantificação visual, fatores como acuidade visual e experiência do analista podem interferir no resultado da análise. Assim, foi utilizado LQ de 0,02 µg/L, que coincide com o método original descrito pelo IDF/IUPAC/IAEA¹⁰. Com o LQ de 0,02 µg/L, a recuperação média foi de 85,16% e o DPR foi de 6,93%, valores dentro do limite de aceitabilidade do CE³.

Para CCD visual, este valor de 0,02 µg/L pode ser considerado baixo, quando comparado com dados da literatura. Entretanto, Tuinstra e Brongest²², utilizando CCD bidimensional modificado, obtiveram LD de, em média 0,02 µg/L, atingindo até 0,004 µg/L, dependendo da quantidade de toxina aplicada na placa. Na otimização do método CI/CCD conduzido neste trabalho, foi realizada uma modificação na quantidade da amostra aplicada na placa de CCD, aumentando o volume do mesmo. Observou-se também que neste método, quando comparado com outros que utilizam CI^{11,21}, passa-se um volume maior de leite pela coluna. A maioria dos métodos preconiza volumes, em média, de 50 mL.

Segundo Shepherd et al.¹⁷, o LD depende principalmente do volume de leite passado pela coluna de imunoafinidade. Um

volume maior do que 1000 mL de leite pode ser utilizado, resultando em LD extremamente baixo, podendo atingir níveis abaixo de 50 pg/L (50 ppq) por CLAE¹¹. Segundo estes autores, a utilização de coluna de imunoafinidade resulta em excelentes resultados de recuperação, sensibilidade e fácil operacionalidade. Sua efetividade foi demonstrada em análises com material de referência certificado BCR (Community Bureau of Reference) contaminados naturalmente com AFM₁.

Pelo método da AOAC/CCD, a recuperação média variou

Tabela 1. Avaliação da recuperação (exatidão) da AFM₁

Método	Concentração (µg/L)	Média Recuperação (µg/L)	Recuperação média (%)	Aceitabilidade
CI/CCD	0,01	0,0086	85,83	satisfatório*
	0,02	0,0170	85,16	satisfatório
	0,03	0,0257	85,80	satisfatório
	0,05	0,0404	80,83	satisfatório
	0,30	0,2800	80,00	satisfatório
	0,50	0,3693	73,86	satisfatório
AOAC/CCD	0,20	0,1350	67,40	satisfatório*
	0,30	0,2690	79,70	satisfatório
	0,50	0,4260	85,16	satisfatório

* Não aplicado

CI - Coluna de Imunoafinidade

CCD - Cromatografia em Camada Delgada

Tabela 2. Avaliação da Repetitividade (precisão) da AFM₁

Método	Concentração (µg/L)	DPR ** (%)	Aceitabilidade
CI/CCD	0,01	7,73	satisfatório*
	0,02	6,93	satisfatório
	0,03	6,00	satisfatório
	0,05	6,03	satisfatório
	0,30	4,44	satisfatório
	0,50	2,08	satisfatório
AOAC/CCD	0,20	6,15	satisfatório*
	0,30	7,30	satisfatório
	0,50	8,09	satisfatório

* Não aplicado

** DPR – Desvio Padrão Relativo

Tabela 3. Avaliação dos Limites de detecção e quantificação da AFM₁

Parâmetro	Método	µg/L	Aceitabilidade
LD	CI/CCD	0,01	satisfatório*
	AOAC/CCD	0,20	satisfatório
LQ	CI/CCD	0,02	satisfatório
	AOAC/CCD	0,30	satisfatório

* Não aplicado

de 67,40% a 85,16% para os níveis de 0,2 a 0,5 µg/L, respectivamente. O limite de detecção estabelecido foi de 0,2 µg/L, com recuperação de 67,40% e DPR de 6,15%. O limite de quantificação foi estabelecido em 0,3 µg/L, com recuperação 79,70% e DPR de 7,30%. Apesar de atender ao CE, foi utilizado 0,2 µg/L como LD, pois a placa apresentou interferentes dificultando a visualização. Stubblefield et al.¹⁸, estabeleceram um LD de 0,1 µg/L, valor este não obtido neste estudo, possivelmente devido ao menor volume de amostra aplicada na placa de CCD, que resultou numa melhor separação dos componentes da amostra, tendo em contrapartida, a perda de sensibilidade (Tabelas 1, 2 e 3)

A Figura 1 mostra os dados e a curva de calibração de AFM₁ obtidos por CLAE. O coeficiente de correlação foi de 0,99987, valor satisfatório para análise de micotoxinas. Testes

de recuperação apresentaram resultados de 86,1%, 83,7% e 84,5% nas concentrações de 0,01; 0,02 e 0,05 µg/L, respectivamente, por ocasião da análise das amostras. Este método é utilizado como rotina no Instituto Adolfo Lutz, tendo como LQ=0,01µg/L, pré-determinado por Navas¹².

Um cromatograma de padrão de AFM₁ de 0,06ng/20µL está apresentado na Figura 2. A Figura 3 apresenta um cromatograma de amostra de leite naturalmente contaminado com AFM₁ a 0,03µg/L.

Algumas amostras analisadas por CI/CCD foram submetidas a análise por CLAE, com o objetivo de comparar a duas técnicas e avaliar a eficiência da CCD para determinação de AFM₁ em baixas concentrações, conforme mostra a Tabela 4.

O tratamento estatístico utilizado para comparar as duas técnicas (CCD e CLAE) foi o teste “t” de Student, pareado,

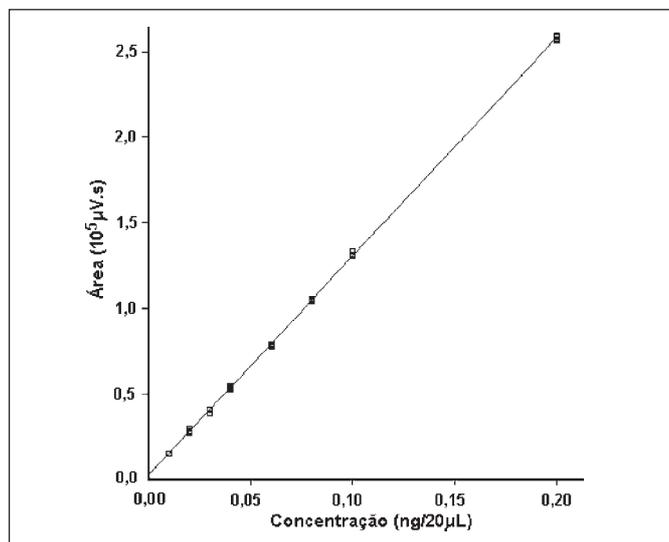


Figura 1. Curva de calibração de AFM₁.

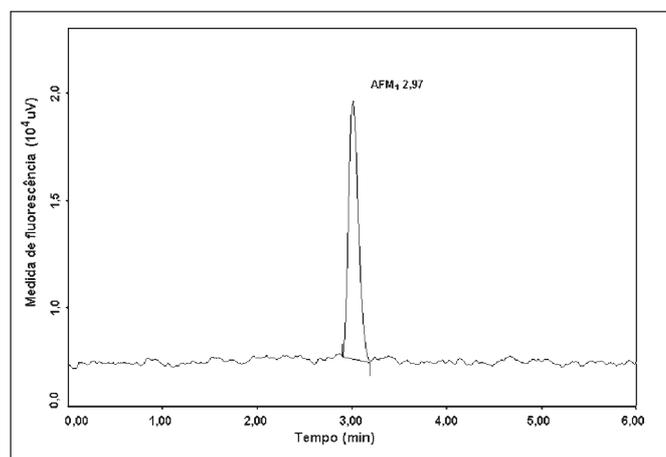


Figura 2. Cromatograma de padrão de AFM₁ de 0,06ng/20µL.

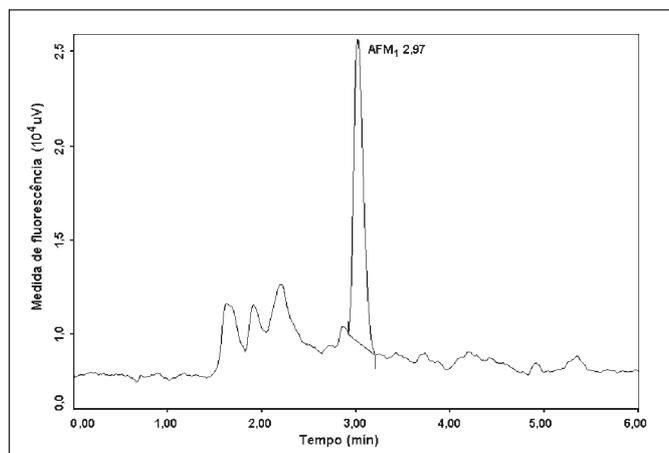


Figura 3. Cromatograma de amostra de leite naturalmente contaminado com 0,03 µg/L de AFM₁.

Tabela 4. Resultados de análises de leite por CI/CCD e CI/CLAE*.

Amostra	CCD (µg/L)	CLAE (µg/L)
1	0,012	0,014
2	0,035	0,034
3	0,014	0,013
4	0,030	0,031
5	0,146	0,136
6	0,051	0,056
7	0,234	0,231
8	0,263	0,278
9	0,077	0,073
10	0,085	0,092

* p=0,6059

utilizando software Bioestat 3.0, obtendo-se um valor de $p=0,6059$ ($t_{\text{calculado}}=-0,5345$; $t_{\text{tabelado}}=2,2622$; $\alpha=0,05$) considerado como não significativo, ou seja, não houve diferença significativa entre os dois métodos.

O método empregado para determinação da AFM₁ por coluna de imunoafinidade mostrou-se específico, conforme descrito por vários autores^{4,9,16,20}. O extrato da amostra apresentou-se límpido e quando aplicado em cromatografia em camada delgada, foi visualizada somente uma mancha correspondente à AFM₁, sem nenhum outro interferente (Figura 5).

Pelo método da AOAC², o extrato apresentou-se sujo na maioria das vezes e, quando aplicado em camada delgada, observou-se manchas com caudas e interferentes, destacando uma substância fluorescente verde azulada próxima ao R_f da AFM₁ (Figura 4). Algumas vezes foi necessário utilizar uma segunda fase móvel (éter etílico:metanol:água, 95:4:1, v/v) para melhorar a separação e, em alguns casos, recorrer a cromatografia bidimensional. Sylos et al.¹⁹, em um estudo comparativo para determinação de aflatoxina M₁ apresentaram resultados semelhantes.

Apesar do avanço tecnológico e o advento de equipamentos sofisticados, este trabalho mostrou que a CCD é uma importante ferramenta que pode ser utilizada pelos laboratórios em análises rotineiras e de ocorrência de AFM₁. O método CI/CCD mostrou-se específico, sensível e preciso, mesmo em baixas concentrações. Apresentou boas recuperações e fácil operacionalidade, não necessitando de equipamentos de alto custo, atendendo às legislações de diferentes países e, em

alguns casos, identificando resultados falso positivo de métodos instrumentais. A AOAC/IUPAC incentiva a validação de métodos analíticos para micotoxinas por CCD, principalmente nos países em desenvolvimento.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a José Guilherme P. Andrade (AM Brasil Científica) pela doação das colunas de imunoafinidade para análise de AFM₁ da marca R-Biopharm Rhône Ltd.

REFERÊNCIAS

1. Allcroft, L. et al. Metabolism of aflatoxin in sheep: Excretion of the 'milk toxin'. **Nature**, 209: 154-5, 1966.
2. AOAC - Association of Official Analytical Chemists. **Official Methods of Analysis of AOAC**. 12th edition, Washington DC, 1975, chapter 26.
3. CE - European Committee - **Comission Directive 98/53/EC**. Laying down the sampling methods and the methods of analysis for the official control of the levels for certain contaminants in foodstuffs, annex II, JOL 201, 17, july, 1998, p.93-101.
4. Chu, F.S. Immunoassay for analysis of mycotoxins. **J. Food Prot.**,47:562-9, 1984.
5. Cullen, J.M.; Ruebner, B.H.; Hsieh, D.S.P. Comparative hepatocarcinogenicity of aflatoxins B₁ and M₁ in the rat. **Food Chem. Toxicol.**, 22:1027-8, 1985.
6. Cullen, J.M. et al. Carcinogenicity of dietary aflatoxin M₁ in male Fischer rats compared to aflatoxin B₁. **Cancer Res.**, 47:1913-17, 1987.
7. De Jongh, H.; Vles, R.O.; van Pelt, J.G. Milk of mammals fed an aflatoxin-containing diet. **Nature**, 202:466, 1964.

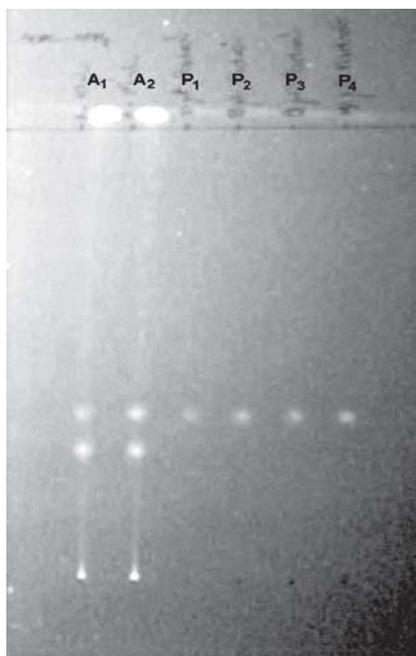


Figura 4. Placa CCD de amostras de leite e padrões de AFM₁, pelo método AOAC/CCD

Legenda: A₁, A₂: Amostras de leite; P₁, P₂, P₃ e P₄: Padrões de AFM₁

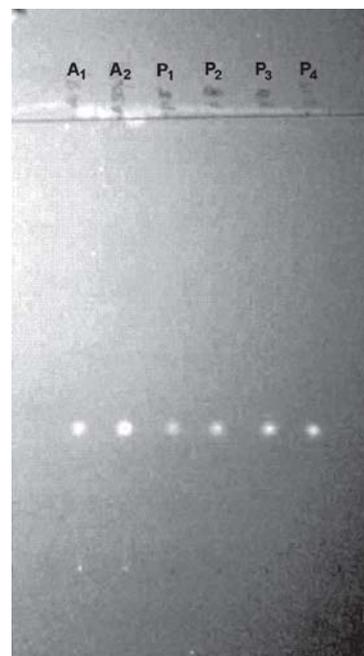


Figura 5. Placa CCD de amostras de leite e padrões de AFM₁, pelo método CI/CCD

8. Dragacci, S.; Grosso, F.; Gilbert, J. Immunoaffinity Column Cleanup with Liquid Chromatography for Determination of Aflatoxin M₁ in Liquid Milk: Collaborative Study. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, 84:2, 2001.
9. Hansen, T.J. Affinity Column Cleanup and Direct Fluorescence Measurement of Aflatoxin M₁ in Raw Milk. **J. Food Protec.**, 53(1):75-7, 1990.
10. IDF/IUPAC/IAEA (International Dairy Federation/International Union of Pure Applied Chemistry/International Atomic Energy Agency). Determination of the content of aflatoxin M₁ in milk by immunoaffinity clean-up followed by thin layer chromatography. Validation of an IAC-TLC method for AFM₁, may, 2001.(não publicado)
11. Mortimer, D.N.; Gilbert, J.; Shepherd, M.J. Rapid and highly sensitive analysis of aflatoxin M₁ in liquid and powdered milks using an affinity column cleanup. **J. Chromatogr.**, 407:393-7, 1987.
12. Navas, S.A. **Possível exposição de crianças as aflatoxinas M₁ e ocratoxina A através do leite materno, na cidade de São Paulo**, 2003. 79p. [Dissertação de Mestrado – Faculdade de Engenharia de Alimentos – Universidade de Campinas.]
13. Pong, R.S.; Wogan, G.N. Toxicity and biochemical and fine structural effects of synthetic aflatoxin M₁ and B₁ in rat liver. **J. Natl. Cancer Inst.**, 47:585-90, 1971.
14. Scott, P.M. Methods for determination of AFM₁ in milk and milk products and milk products – a review of performance characteristics. **Food Addit. Contam.**, 6:283-305, 1989.
15. Scott, P.M. Natural Toxins. **In Official Methods of Analysis of Association of Official Analytical Chemists**. 16th edition, Maryland, 1997, v. II.
16. Scott, P.M.; Trucksess, M.W. Application of Immunoaffinity Columns to Mycotoxin Analysis. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, 80(5):941-9, 1997.
17. Shepherd, M.J.; Holmes, M.; Gilbert, J. Comparison and critical evaluation of six published extraction and clean-up procedures for Aflatoxin M₁. **J. Chromatogr.**, 354:305-15, 1986.
18. Stubblefield, R.D.; Shotwell, O.D.; - Reverse phase analytical and preparative high liquid chromatography aflatoxins. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, 60:784-90, 1977.
19. Sylos, C.M.; Rodriguez-Amaya, D.B.; Carvalho, P.R.N. Occurrence of aflatoxin M₁ in milk and dairy products commercialized in Campinas, Brazil. **Food Addit. Contam.**, 13(2):169-72, 1996.
20. Trucksess, M.W.; Rapid analysis (Thin Layer Chromatographic and Immunochemical Methods) for Mycotoxins in Foods and Feeds. In: De Koe, W.J.; Samson, R.A.; van Egmond, H.P.; Gilbert, J.; Sabino, M. ed. **Mycotoxins and Phycotoxins in Perspective at the Turn of the Millenium**, Wageningen, The Netherlands, 2001, p.29-40.
21. Tuinstra, L.G.M.; Roos, A.H.; van Trijp, J.M.P. Liquid Chromatographic Determination of Aflatoxin M₁ in Milk Powder Using Immunoaffinity Columns for Cleanup: Interlaboratory Study. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, 76(6):1248-54, 1993.
22. Tuinstra, L.M.G.; Brongeeest, J.M. Determination of aflatoxin M₁ in the milk at the parts per trillion level. **J. Chromatogr.**, 111:448-51, 1975.
23. Wogan, G.N.; Paglialunga, S. Carcinogenicity of synthetic aflatoxin M₁ in rats. **Food. Cosmet. Toxicol.**, Oxford, 12:38-4, 1974.

Aceitabilidade sensorial de suco de manga adicionado de polpa de banana (*Musa sp*) verde

Sensory Acceptance of mango juice added with green banana (*Musa sp*) pulp

RIALA6/974

Magda Sinigallia TAIPINA¹, Victor Haim COHEN¹, Nélida Lucia DEL MASTRO¹, Maria Auxiliadora de Brito RODAS², Jussara Carvalho de Moura DELLA TORRE²

¹ Divisão de Benefícios do Instituto de Pesquisa Energética Nuclear. Cidade Universitária / USP. Travessa R, nº 400, Butantã, São Paulo, SP. CEP: 05508-900.

² Laboratório de Análise Sensorial, Divisão de Bromatologia e Química do Instituto Adolfo Lutz. Av. Dr. Arnaldo, 355, São Paulo, SP. CEP: 01246-902.

RESUMO

A aceitabilidade de suco de manga (*Mangifera indica*), adicionado ou não com polpa de banana (*Musa sp*) verde, foi avaliada utilizando escala hedônica em relação aos atributos de cor amarela, aroma, sensação na boca, sabor e doçura. Participaram dos testes sensoriais 59 consumidores de sucos de frutas, previamente avaliados quanto ao perfil de características específicas. Os dados sensoriais foram analisados estatisticamente pelo Teste t de Student, ao nível de significância de 5%. Através do perfil de características dos julgadores, observou-se, principalmente, que o hábito de consumo de sucos de frutas foi com frequência diária para 54% das mulheres, e semanal para 61% dos homens. A faixa etária dos julgadores variou de 20 a 60 anos, sendo que 49% dos homens e 36% das mulheres tinham concluído o nível universitário. Para a cor amarela, aroma e doçura não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os sucos de frutas avaliados. Os sucos de manga variaram entre si ($p < 0,05$) para os atributos de sensação bucal e sabor, sendo o suco adicionado de polpa mais aceito, revelando intenção de compra satisfatória. O suco de manga adicionado de polpa de banana verde foi caracterizado como viscoso, doce e levemente adstringente.

Palavras-Chave. aceitabilidade sensorial, sucos de manga (*Mangifera indica*), polpa de banana (*Musa sp*) verde.

ABSTRACT

The acceptability for mango (*Mangifera indica*) juices, whether added with green banana (*Musa sp*) pulp or not, was tested by means of hedonic scale for yellow color, odor, oral sensation, flavor and sweetness. Took part of the sensory tests 59 fruit juice consumers, whose individual idiosyncratic profiles had been previously analysed. The sensorial data obtained were statistically analysed by Student's t-test, with 5% significance. By means of the consumers' profile, a daily juice fruit intake habit was observed for 54% of the women, while 61% of the men took it every week. The judges' ages varied from 20 to 60 years, while 49% of the men and 36% of the women graduated. For yellow color, odor and sweetness, there was no considerable difference ($p > 0.05$) among the evaluated juices. The mango juices differed from one another ($p < 0.05$) for oral sensation and flavor, while the enriched juice was the best accepted one, presenting the best purchase intention rate. Mango juice added with green banana pulp was characterized as being thicker, sweet and slightly adstringent.

Key Words. sensory acceptance, mango (*Mangifera indica*) juices, pulp with green banana (*Musa sp*)

INTRODUÇÃO

Os alimentos, normalmente, são utilizados pelos indivíduos na satisfação das necessidades fisiológicas e nutricionais. Entretanto, os aspectos psicológicos influem muito, determinando preferências alimentares e o grau de “gostar ou desgostar”. Um alimento pode ser rejeitado porque seu consumo não é usual no ambiente familiar ou por nunca ter sido antes experimentado.

Os hábitos alimentares de um povo costumam ser culturais e estáticos, difíceis de serem trocados, podendo, entretanto, ser alterados pela ocorrência de adaptações sócio-econômicas e ambientais².

Atualmente, têm sido proposto à população brasileira vários tipos de alimentos preparados como fonte alternativa da introdução de nutrientes saudáveis. Como por exemplo, são conhecidos os alimentos à base de banana, farinha de banana e cascas de banana, introduzidos como forma de aproveitamento de frutas rejeitadas para venda “in natura”^{13, 14}.

A banana (*Musa* sp) é uma fruta muito consumida no mundo, sendo cultivada na maioria dos países tropicais. A grande produção de bananas vem acompanhada de elevado índice de perdas pós-colheita. Assim, algumas formas de minimizar as perdas são estudadas para aproveitamento dos frutos excedentes ou impróprios para consumo “in natura”, sendo citados, a bananada, banana passa, banana chips e balas de banana⁴.

Os sucos de frutas, adicionados da polpa de banana verde, estão sendo introduzidos como fonte importante de macro e micronutrientes além de conter o amido resistente, que vem sendo considerado um alimento funcional¹⁵. Como as fibras insolúveis, o amido resistente possui efeitos fisiológicos ligados à capacidade de aumentar o volume fecal e diluir compostos potencialmente tóxicos e cancerígenos¹. Este amido pode reduzir os níveis plasmáticos pós-prandial de glicose, insulina, triglicerídeos e lipoproteína de baixa densidade^{1, 12}.

A banana (*Musa* sp) verde, no decorrer do amadurecimento, sofre algumas modificações na composição química, sendo 12 a 20 % do amido degradado com acúmulo de açúcares solúveis e predominância da sacarose sobre as hexoses frutose e glicose⁴. O Quadro 1 apresenta a composição química média da banana verde e madura como fonte de macro e micronutrientes, segundo Franco⁷.

No Quadro 2 estão o teor de umidade e amido resistente nas frutas nacionais, banana (*Musa* sp) Nanicão, verde e madura, e maçã (*Malus sylvestris*) Gala, segundo Lajolo et al.¹⁰. A farinha de banana verde apresenta os maiores teores de amido resistente, quando comparado à banana madura e à maçã madura, chegando a ter 29% do conteúdo.

Com relação às decisões individuais na ingestão de novos alimentos saudáveis que são lançados no mercado, o sucesso se dá, principalmente, em função das pesquisas de consumidor. O teste de consumidor tem sido muito empregado para verificar a posição de um novo produto em desenvolvimento, o potencial do mercado e para otimizar as formulações de interesse¹¹.

No teste de consumidor, geralmente é utilizada a escala hedônica para avaliar o “status afetivo” dos consumidores em relação ao produto. Esta escala, além de avaliar a preferência do consumidor por inferência, através de valores, avalia também se os produtos são ou não aceitos⁶.

No recrutamento de julgadores para participar do teste de consumidor alguns fatores de escolha podem ser incluídos como: a faixa etária, sexo, aspectos culturais, psicológicos, de estilo de vida e de tendências alimentares. Este critério de escolha relaciona-se à necessidade e importância dos consumidores fazerem parte do grupo da população que consome a categoria de alimento de interesse⁵.

O objetivo do trabalho foi caracterizar sensorialmente e avaliar a aceitabilidade do suco de manga adicionado da polpa de banana Nanicão verde em comparação a uma amostra controle

Quadro 1. Composição química média da banana (*Musa* sp) verde e madura.

Banana	Glicídios (g/100g)	Proteínas (g/100g)	Lipídios (g/100g)	Cálcio (mg/100g)	Fósforo (mg/100g)	VitaminaC (mg/100g)
Verde	28,7	1,4	0,2	8,0	35,0	16,9
Madura	22,0	1,3	0,2	21,0	26,0	6,4

Fonte: Franco (2002)⁷.

Quadro 2. Conteúdo de umidade e amido resistente em frutas brasileiras.

Frutas brasileiras	Nº de amostras	Umidade(g/100g)	Amido resistente (g/100g)
Banana Nanicão, madura	2	74,34	3,75 + 0,02
Banana Nanicão, verde, farinha	3	8,94	29,23 + 2,86
Maçã Gala, madura	2	83,43	0,12 + 0,00

Fonte: Lajolo et al. (2001)¹⁰.

do suco sem a adição da polpa, quanto aos atributos de cor amarela, aroma, sensação na boca, sabor e doçura.

MATERIAL E MÉTODOS

Material:

Preparo da polpa de banana verde - A polpa de banana (*Musa* sp) Nanicao verde foi obtida segundo modo de preparo sugerido por Valle e Camargos¹⁶. Em processador para alimentos colocou-se certa quantidade da polpa de banana verde cozida e quente, para obtenção de uma pasta espessa. A pasta obtida foi armazenada em saco de plástico, fechada e mantida sob refrigeração. Em uma panela, misturou-se uma porção desta pasta para três de água, levando-se ao fogo até a fervura. Foi homogeneizada, depois, em liquidificador até obter uma massa fina e novamente aquecida. Acondicionou-se a polpa de banana aquecida em frasco de vidro tampado e armazenou-se sob refrigeração.

Preparo do suco de fruta - Os sucos de mangas, adicionados da polpa de banana Nanicao verde, foram produzidos de acordo

com procedimentos da Fábrica da CITROSUL Indústria Ltda, São Paulo. Os sucos de manga, para 100 copos de 300 mL, foram preparados na seguinte proporção: 18,8 litros de água; 9,2 litros de suco concentrado de manga e 2,4 kg de polpa de banana verde. Foram acondicionados em copos plásticos lacrados e mantidos sob refrigeração a 10°C, com validade prevista para 3 meses. O suco de manga controle também foi produzido, nas mesmas condições, porém sem a adição da polpa de banana verde.

Métodos:

Recrutamento de julgadores - Nos setores do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN), São Paulo, recrutou-se 59 indivíduos, de ambos os sexos (31 masculino e 28 feminino) para participar do teste de consumidor. Como forma de identificar e qualificar características destes indivíduos considerou-se o sexo, a faixa etária, nível de escolaridade, o hábito e a frequência no consumo de sucos de frutas. Enviou-se um convite-formulário para preenchimento, que deveria retornar assinado pelo candidato que manifestasse interesse, disponibilidade e tempo para participar dos testes (Quadro 3).

Quadro 3. Modelo de formulário utilizado no recrutamento de julgadores de sucos de fruta.

Você está convidado a participar dos testes sensoriais de sucos de fruta a serem realizados no restaurante do IPEN, dias 30 e 31 deste mês, às 14 horas. Sua participação é importante. Se for de seu interesse, tempo e disponibilidade, preencha o formulário, assine e devolva.		
Nome:	Telefone:	Data:
Sexo:	É consumidor (a) de sucos de frutas?	
<input type="checkbox"/> Feminino <input type="checkbox"/> Masculino	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não
Faixa Etária (anos):	Com que frequência consome?	
<input type="checkbox"/> 20 a 30	<input type="checkbox"/> Muito (diariamente)	
<input type="checkbox"/> 41 a 50	<input type="checkbox"/> Moderadamente (semanalmente)	
<input type="checkbox"/> 31 a 40	<input type="checkbox"/> Regularmente (mensalmente)	
<input type="checkbox"/> 51 a 60	<input type="checkbox"/> Muito pouco (anualmente)	
Nível de escolaridade:		
<input type="checkbox"/> Ensino Fundamental		
<input type="checkbox"/> Ensino médio		
<input type="checkbox"/> Graduado		
<input type="checkbox"/> Pós-Graduado		
Comentários:		
Assinatura:		

Quadro 4. Modelo da ficha do teste de consumidor para os sucos de manga.

Nome:	Data:		
Avalie as amostras codificadas de suco de manga, indicando o quanto gostou ou desgostou de cada uma delas, segundo a escala abaixo:			
(7) gostei muitíssimo		345	789
(6) gostei muito	Cor amarela	[]	[]
(5) gostei	Aroma	[]	[]
(4) nem gostei / nem desgostei	Sensação bucal	[]	[]
(3) desgostei	Sabor	[]	[]
(2) desgostei muito	Doçura	[]	[]
(1) desgostei muitíssimo			
Se estas amostras estivessem à venda, você:			
(5) certamente compraria			
(4) provavelmente compraria	345	[]	
(3) talvez compraria ou talvez não compraria			
(2) provavelmente não compraria	789	[]	
(1) certamente não compraria			

Caracterização sensorial - No Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, 5 julgadores do sexo feminino, revelando poder discriminativo normal para os gostos primários ácido, amargo, doce e salgado⁹ caracterizaram sensorialmente amostras de sucos de frutas, com e sem a adição da polpa de banana verde. Por consenso, em mesa redonda, foram descritos os atributos de aparência (forma; cor, etc.), odor e aroma (sensações olfativas e via retro-nasal), sensação bucal (consistência na boca e corpo) e sabor (sensações olfativas, gustativas e táteis), tomando como orientação a ABNT, NBR 12806 (1993)³.

Aceitabilidade sensorial - Para avaliar a aceitação dos sucos de manga, com e sem adição de polpa de banana verde, optou-se pela escala hedônica de 7 pontos, conforme Meilgaard et al. (1991)¹¹ dimensionada de (1) desgostei muitíssimo a (7) gostei muitíssimo, em relação aos atributos de cor amarela, aroma, sensação na boca, sabor e doçura. Também foi utilizada uma escala de intenção de compra de 5 pontos, variando de (1) certamente não compraria a (5) certamente compraria (Quadro 4). A cor amarela foi avaliada em copo de vidro incolor de 250 mL, contendo cerca de 100 mL do suco, tampado com filme plástico e codificado com algarismos de três dígitos. Para o aroma, sensação bucal, sabor e doçura, utilizou-se a própria embalagem de acondicionamento do suco de manga, ou seja, o copo plástico lacrado enviado pela fábrica, devidamente codificado com algarismos de três dígitos (Figura 1).

Análise estatística - No teste de consumidor utilizou-se o delineamento experimental de blocos completos casualizados, com apresentação simultânea dos sucos de manga com e sem a adição da polpa de banana verde. Os dados obtidos foram avaliados pelo Teste t de Student, ao nível de significância de

5%, utilizando programa computadorizado INSTAT, v.2.01 (1993)⁸.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

O Quadro 5 apresenta a caracterização sensorial das amostras dos sucos de manga, com e sem a adição da polpa de banana verde. O suco adicionado da polpa de banana verde foi caracterizado como viscoso e levemente adstringente, identificando-se uma variação na tonalidade da cor, na turbidez e na ligeira intensificação da doçura, quando comparado ao

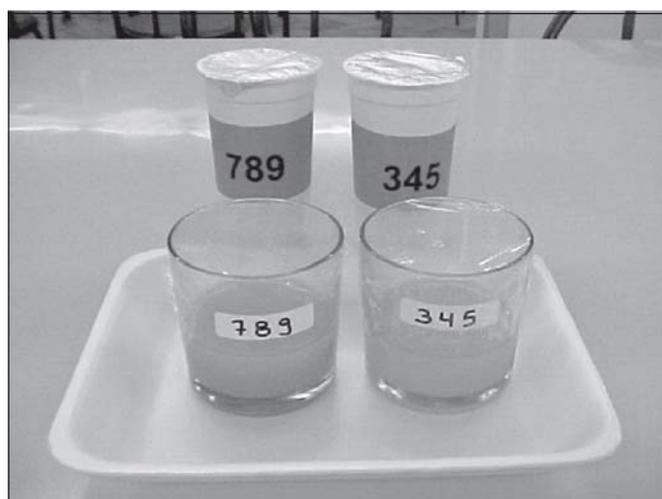


Figura 1. Apresentação dos sucos de manga no teste de consumidor.

suco sem adição da polpa. No suco de manga com polpa de banana verde não foi detectada a presença de odor ou sabor que lembrasse banana.

Nas Figuras 2, 3, 4 e 5, respectivamente, podem ser observados os resultados da avaliação do perfil de características individuais obtidos através do formulário de recrutamento dos candidatos, para a faixa etária, grau de escolaridade, hábito e freqüência no consumo de sucos de

frutas. Para os 59 consumidores de sucos de frutas, a faixa etária para homens e mulheres variou de 20 a 60 anos, com predominância entre 41 e 50 anos para ambos. O grau de escolaridade aponta que 49% dos homens e 36% das mulheres possuem graduação superior e 13% dos homens e 36% das mulheres pós-graduação. Todas as mulheres costumam consumir sucos de frutas, tendo 54% delas o hábito diário e, 36%, semanal. O consumo diário de sucos

Quadro 5. Caracterização sensorial dos sucos de manga.

Atributos sensoriais	Sucos de manga	
	Sem polpa de banana	Com polpa de banana
Aparência	Líquido ligeiramente turvo, viscoso, com pequena proporção de partículas em suspensão. Cor: amarelo-alaranjada.	Líquido turvo, viscoso, com moderada proporção de partículas em suspensão. Cor: amarelo-pardacenta com poucos pontos escuros.
Odor e Aroma	Característico de suco de manga, suave.	Característico de suco de manga, aroma adocicado.
Sensação Bucal	Fluído leve.	Fluído viscoso, levemente adstringente.
Sabor e Gosto	Característico de suco de manga, suave, levemente doce.	Característico de suco de manga, moderadamente doce.

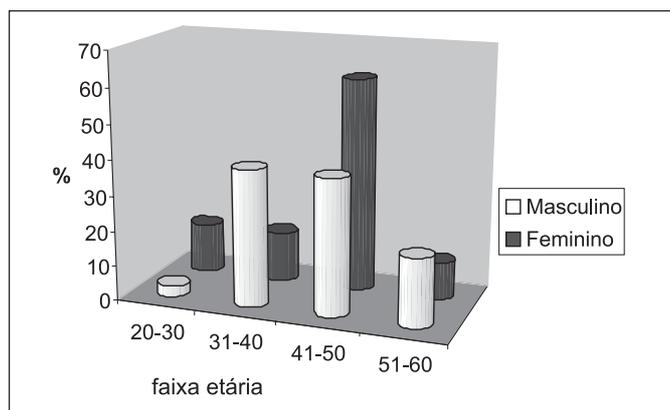


Figura 2. Distribuição percentual de consumidores segundo a faixa etária

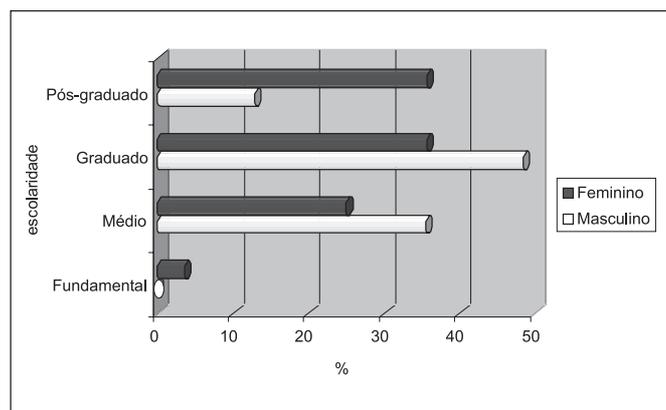


Figura 3. Distribuição percentual de consumidores segundo o grau de escolaridade

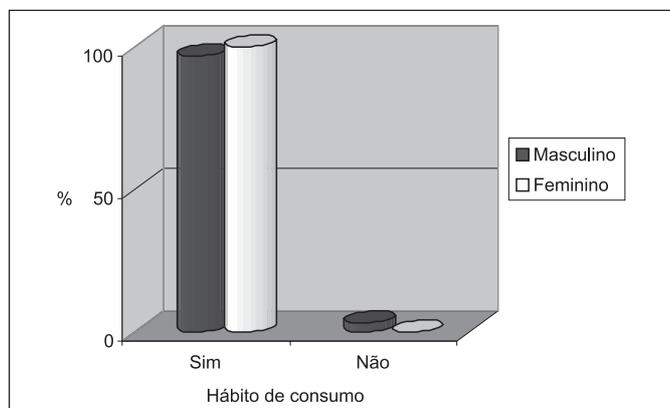


Figura 4. Distribuição percentual de consumidores segundo hábito de consumo de sucos de frutas

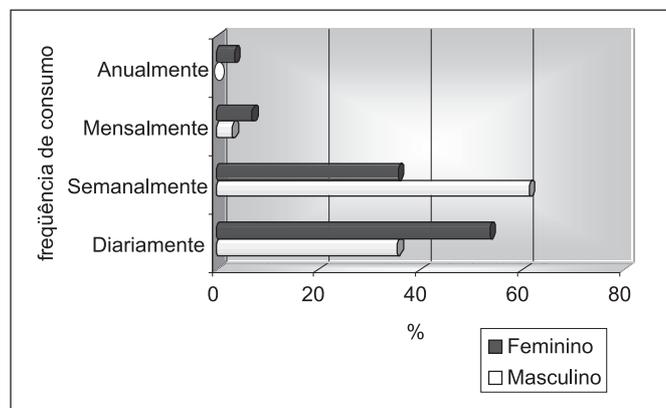


Figura 5. Distribuição percentual de consumidores segundo a freqüência no consumo de sucos de frutas

Tabela 1. Valores médios da aceitação de consumidor e intenção de compra dos sucos de manga, com e sem polpa de banana verde

Parâmetros	Sucos de Manga		p
	Sem polpa de banana	Com polpa de banana	
Aceitabilidade*			
Cor amarela	5,5 ^a (0,2)	5,1 ^a (0,2)	0,09
Aroma	5,4 ^a (0,1)	5,5 ^a (0,2)	0,68
Sensação bucal	5,1 ^b (0,1)	5,7 ^a (0,2)	0,01
Sabor	5,1 ^b (0,2)	5,7 ^a (0,2)	0,03
Doçura	5,2 ^a (0,2)	5,1 ^a (0,2)	0,69
Intenção de Compra **			
	3,7 ^a (0,1)	4,1 ^a (0,1)	0,06

Resultado de 59 julgamentos.

* Escala hedônica (7 pontos): 1 = desgostei muitíssimo a 7 = gostei muitíssimo.

** Escala de intenção de compra (5 pontos): 1 = certamente não compraria a 5 = certamente compraria.

^{a,b} Médias seguidas de letras diferentes, na mesma linha, diferem estatisticamente entre si ao nível de significância de 5%.

() Erro padrão da média

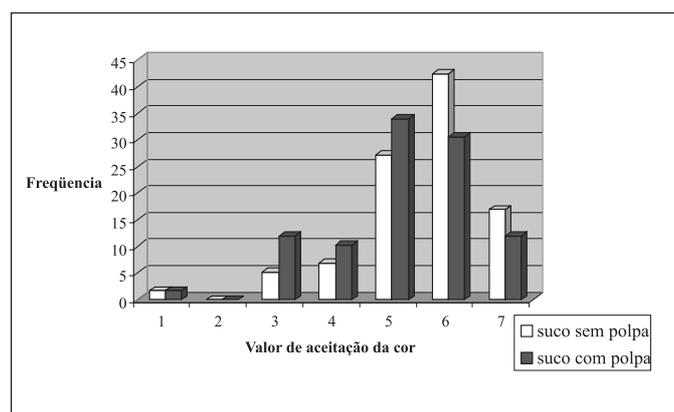


Figura 6. Frequência dos valores de aceitação da cor amarela dos sucos de manga com e sem adição da polpa de banana verde

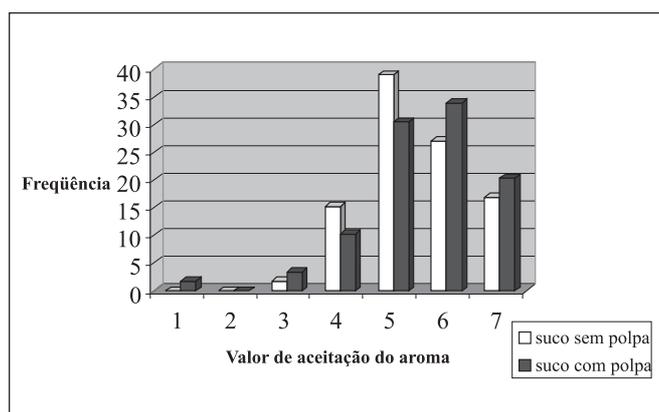


Figura 7. Frequência dos valores de aceitação do aroma dos sucos de manga com e sem adição da polpa de banana verde

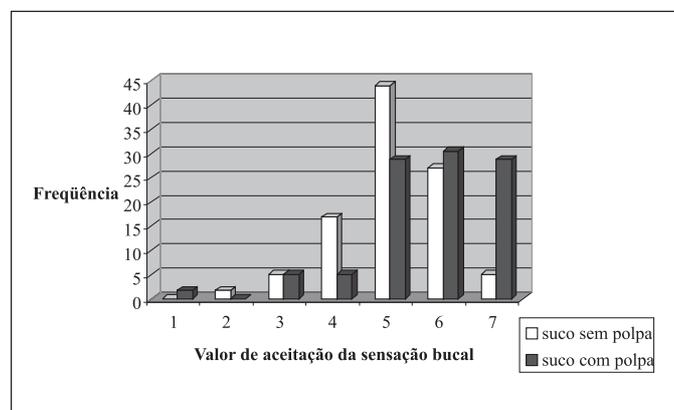


Figura 8. Frequência dos valores de aceitação da sensação bucal dos sucos de manga com e sem adição da polpa de banana verde

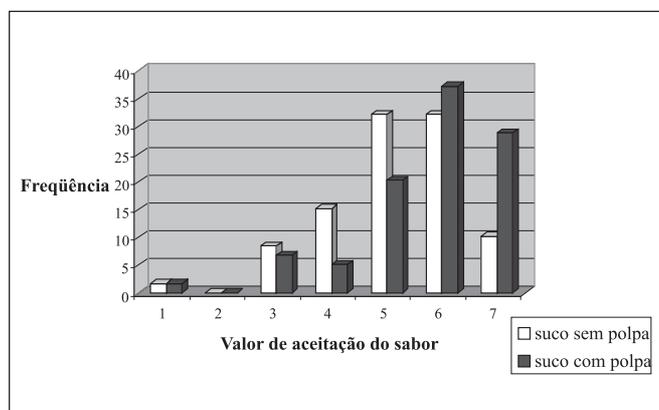


Figura 9. Frequência dos valores de aceitação do sabor dos sucos de manga com e sem adição da polpa de banana verde

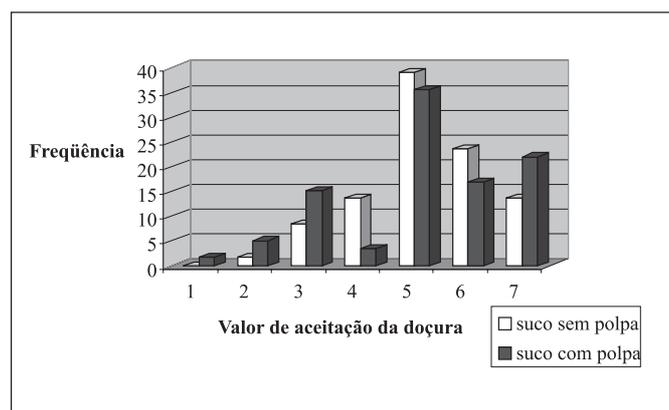


Figura 10. Frequência dos valores de aceitação da doçura dos sucos de manga com e sem adição da polpa de banana verde

de frutas entre os homens foi menor, com maior frequência para semanal (61%).

Na Tabela 1 estão os resultados da aceitabilidade de consumidores e da intenção de compra das amostras de sucos de manga, com e sem a adição da polpa de banana verde. Observa-se que para todos os atributos avaliados, os valores médios de aceitação situaram-se entre 5,1 a 5,7, representando na escala hedônica a faixa de “gostei” e “gostei muito”. Houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre o suco de manga com e sem polpa, quanto à sensação bucal e sabor. Nestes atributos, o suco adicionado da polpa de banana apresentou as maiores médias, sendo considerado mais aceito. A cor amarela, o aroma e a doçura não revelaram diferença significativa ($p > 0,05$) na aceitabilidade das amostras dos sucos de manga. Não houve diferença significativa em relação à intenção de compra, quando comparados os sucos com e sem a polpa de banana verde, situando os valores médios entre 3,7 e 4,1, ou seja, próximos a “provavelmente compraria”.

As Figuras 6, 7, 8, 9 e 10 representam as distribuições das frequências do teste de aceitação de consumidor, segundo a escala hedônica, quanto aos atributos de cor amarela, aroma, sensação bucal, sabor e doçura dos sucos de mangas com e sem a adição da polpa de banana verde. Para o suco de manga adicionado da polpa houve um deslocamento da curva imaginária de Gauss para a direita, nos valores obtidos de sensação bucal e sabor, resultando em uma melhor aceitação nestes atributos.

CONCLUSÕES

O suco de manga com adição da polpa de banana verde teve uma boa aceitação em relação aos atributos sensoriais de

cor amarela, aroma, sensação bucal, sabor e doçura, também revelando intenção de compra satisfatória, para todos os consumidores avaliados segundo o perfil de características individuais pré-definidos pela pesquisa.

No teste de aceitabilidade de consumidor, o suco de manga adicionado da polpa de banana verde apresentou melhor aceitação nos atributos de sensação bucal e sabor, sendo este suco caracterizado sensorialmente como viscoso, doce e levemente adstringente.

REFERÊNCIAS

1. Asp, N.G.; Amelvoort, J.M.M.; Hautvast, J.G.A.A.J. Eureka physiological implication of the consumption of resistant starch in man. In: European Flair-Concerted Action, 11, Cost 911, 1994, Wageningen. **Proceedings...** Wageningen, 1994.
2. Asp, H.E. Factors affecting food decisions made by individual consumers. **Food Policy**, 24:287-294, 1999.
3. Associação Brasileira de Normas Técnicas. Análise sensorial de alimentos e bebidas: Terminologia. **NBR 12.806**, Rio de Janeiro, 1993, 8 p.
4. Cordenunsi, B.R. et al. Composição em carboidratos em banana verde e madura em diferentes cultivares. In: Conferencia Internacional de Almidón, Set. 1998. Equador. **Anais...**
5. Faria, E.V.; Mori, E.E.M.; Yotsuyanagi, K. **Técnicas de análise sensorial**. LAFISE/ ITAL, Campinas, 2000, 103p.
6. Ferreira, V.L.P. et al. **Análise sensorial: testes discriminativos e afetivos**. 1ª Ed., PROFÍQUA/ SBCTA, Campinas, 2000, 127 p.
7. Franco, G. **Tabela de composição química dos alimentos**. S.P: Atheneu, 2002. p.71-72.
8. INSTAT. **GraphPad InStat tm**, Dr. Cipolla-Neto. Univ. Of. São Paulo. v. 2.01, 1990-1993.
9. International Organization For Standardization (ISO). **Method of investigating sensitivity of taste. International Standard - ISO / DIS n° 3972**, Geneva, 1990, 5p.
10. Lajolo, F.M. et al. **Fibra dietética en iberoamérica: tecnología y salud - Obtención, caracterización, efecto fisiológico y aplicación en alimentos**. São Paulo: Varela, 2001. 469p.
11. Meilgaard, M.M.; Cciville, G.V.; Carr, T. **Sensory Evaluation Techniques**, 1ª Ed., v.1, CRC-Press, Flórida, USA, 1991, 125p.
12. Muir, J.G.; et al.. Resistant starch-the neglected dietary fiber? Implications for health. **Dietary Fiber Bibliography and Reviews**. 1: 33-47, 1993.
13. Ranzani, M.R.T.C.; Sturion, G.L; Bicudo, M.H. Avaliação química e biológica da casca de banana maduro. **Arch. Latinoamer. Nutrit.**, 46: 320-324, 1996.
14. Suntharalingam, S.; Ravindran, G. Physical and biochemical properties of green banana flour. **Plant Foods Human Nutrit**, 43:19-27, 1993.
15. Torres, E.A.F.S. **Alimentos do Milênio: Importância dos transgênicos funcionais e fitoterápicos para a saúde**. São Paulo: Signus, 2002. p.1-14.
16. Valle, H.F.; Camargos, M. **Yes, nós temos bananas**. São Paulo, SP: SENAC, 2002.p. 86-9.

Determinação de metais presentes em corantes e pigmentos utilizados em embalagens para alimentos

Determination of metals present in dyes and pigments used in food packaging.

RIALA6/975

Odair ZENEBON¹, Lúcia Tieco Fukushima MURATA^{1*}, Neus Pascuet¹, Maria Rosa da Silva de ALCÂNTARA¹, Maria Cecília Depieri NUNES¹, Eliani Rosa RIBEIRO¹, Paulo TIGLEA¹

* Endereço para correspondência: Laboratório de Embalagens e Correlatos - Divisão de Bromatologia e Química - Instituto Adolfo Lutz - Av. Dr. Arnaldo 355 CEP: 01246-902 - Fone: 3068 - 2920
e-mail: lumurata@ial.sp.gov.br

RESUMO

Entre os aditivos presentes na formulação de embalagens para alimentos, principalmente embalagens plásticas, incluem-se as substâncias que conferem coloração, classificadas como corantes ou pigmentos, dependendo de sua solubilidade ou não no polímero. Sua adição em materiais para embalagens satisfaz uma exigência estética e tecnológica. Os metais que podem estar presentes como contaminantes das substâncias corantes e portanto nas embalagens, podem migrar para o alimento, apresentando riscos à saúde. O objetivo deste trabalho foi verificar e monitorar os teores de chumbo, cádmio e zinco nestes produtos, e validar a metodologia analítica segundo os Regulamentos Técnicos do Mercosul (Resolução N° 105/99 da ANVISA/MS). A quantificação destes metais foi feita por espectrofotometria de absorção atômica com chama. Das 407 amostras analisadas 5% estavam em desacordo com os limites estipulados pela legislação vigente. Os altos teores de metais nelas encontrados justificam o controle contínuo que deve ser feito sobre estes produtos.

Palavras-Chave. corantes, pigmentos, teores de: chumbo, cádmio, zinco, embalagens para alimentos.

ABSTRACT

Among the additives used in the formulation of food packaging, specially in plastics packaging, are included substances which provide coloration, classified as coloring or pigments according to their solubility or insolubility in the polymer. The addition of these substances into packaging materials satisfies an esthetic and technological requirements. The metals eventually present as contaminants in colorings and pigments for packaging can migrate to food causing health damages. The purpose of the present study was to verify and to control the levels of lead, cadmium and zinc, in these products and to validate the analytical methodology in accordance to Mercosul Regulations (Resolução N°105/99 ANVISA/MS). The quantification of these metals was performed by flame atomic absorption spectrometry technique. Of 407 samples, 5% were in disagreement with the legislation limits. The high levels of those metals found in analyzed samples justify the continuous control that should be done in this kind of products.

Key Words. coloring, pigments, lead, cadmium, zinc levels, food packaging.

INTRODUÇÃO

Entre os aditivos presentes na formulação de embalagens, principalmente embalagens plásticas, para alimentos, incluem-se as substâncias que conferem coloração e que podem ser classificadas como corantes ou pigmentos, dependendo de sua solubilidade ou não no polímero.

Os pigmentos são geralmente definidos como partículas praticamente insolúveis em solventes ou veículos de origem

orgânica ou inorgânica, em oposição aos corantes que são solúveis⁴³. Entretanto, por se tratar de produtos diferentes em relação à composição química, matéria-prima, mercado, peritos e problemas envolvidos, as indústrias fabricantes elaboraram definições de pigmentos e corantes, separadamente, e submetem-nas às agências governamentais, a fim de minimizar as confusões existentes entre as duas indústrias.

Assim, a CPMA (Color Pigments Manufactures Association) definiu pigmentos como “partículas sólidas,

orgânicas ou inorgânicas, coloridas, pretas, brancas ou fluorescentes, normalmente insolúveis e que não são física e quimicamente afetadas pelo veículo ou substrato no qual estão incorporados. Eles alteram a aparência do substrato por absorção seletiva e por dispersão da luz, ou ambos. Na sua aplicação, os pigmentos são usualmente dispersos em veículos ou substratos, para produção, por exemplo, de tintas de impressão, plásticos, tintas industriais ou outros materiais poliméricos. Os pigmentos mantêm sua estrutura cristalina ou partículas durante todo o processo de coloração⁵⁹.

A ETAD (Ecological and Toxicological Association of Dyestuff Manufacturing Industry) que representa os fabricantes de corantes, definiu corantes como: “substâncias orgânicas intensamente coloridas ou fluorescentes, as quais colore um substrato por absorção seletiva da luz. Corantes são solúveis ou penetram no substrato no processo de aplicação que, no mínimo temporariamente, destroem qualquer estrutura cristalina da substância colorida. Corantes são retidos no substrato por absorção, solução e retenção mecânica ou pela ligação química iônica ou covalente⁵⁹”.

Os corantes e pigmentos são largamente usados em composições de revestimento de todos os tipos, incluindo tintas e vernizes, tintas de impressão, plásticos, borrachas, fibras têxteis sintéticas, papel colorido, cosméticos, lentes de contato, detergentes e sabões, composições de cera, modelagem de barro, giz, crayon, aquarelas, concreto e produtos de alvenaria e cerâmica, entre outras aplicações⁵.

O seu emprego nos mais diferentes materiais satisfaz uma exigência de ordem estética e mercadológica. Pesquisas relacionadas aos aspectos emocionais e psicológicos da aparência afirmam que certas cores e texturas transmitem uma sensação de rigidez ou maciez, de boa qualidade ou austeridade, e, que estes fatores influenciam na decisão final de uma compra²⁹.

Além disso, a sua adição satisfaz também uma exigência de ordem tecnológica, uma vez que os pigmentos podem exercer várias funções simultaneamente, como de proteção anti-corrosão, enchimento, fungicidas e bactericidas, estabilizantes ultravioleta, reforço, etc.¹.

Devido ao seu extensivo uso como agente colorante, nos mais diversos tipos de produtos, os corantes e pigmentos têm sido objeto de vários estudos no que tange a efeitos genotóxicos, mutagênicos e carcinogênicos relacionados às substâncias utilizadas em sua síntese. Estes estudos apontam não só para os riscos ocupacionais e ambientais provenientes do uso destas substâncias, como também, desenvolvem novos pigmentos com compostos que têm o mínimo risco ocupacional e ambiental associados com sua síntese e uso^{14,15,20,21,28,30,42}.

Com relação aos metais, sabe-se que estes são componentes integrantes do meio ambiente e das matérias vivas. Encontrados em praticamente todos os organismos vivos, eles apresentam uma extensa gama de funções biológicas, tais como: componentes dos sistemas enzimático e redox, ativadores de enzima, etc. Além disto, podem estar presentes nos alimentos,

como resultado do contato do alimento com o meio ambiente, durante sua produção, processamento, manipulação, embalagem, armazenamento, distribuição ou cozimento^{17,24}.

Embora alguns metais presentes nos alimentos sejam essenciais para o bom funcionamento do organismo humano, outros podem ser bastante nocivos à saúde, causando efeitos tóxicos, agudos ou crônicos^{23,46}.

O Decreto-Lei Federal Nº 986/69 de 21 de outubro de 1969 considera os metais arsênio, cádmio, chumbo, cobre, estanho, ferro, mercúrio e zinco, como aditivos incidentais, quando presentes em alimentos. Estes aditivos são definidos como toda substância não adicionada intencionalmente, ou seja, proveniente de substância residual ou migrada, presente no alimento em decorrência dos tratamentos prévios a que tenham sido submetidos a matéria-prima e o alimento “*in natura*” e do contato do alimento com artigos e utensílios empregados nas suas diversas fases de fabricação, manipulação, embalagem, estocagem, transporte ou venda².

O Comitê Misto de Peritos da FAO/WHO sobre aditivos para alimentos da Comissão do Codex Alimentarius considera tais elementos como contaminantes¹⁶.

Dentre os metais que podem estar presentes como contaminantes das substâncias corantes destacam-se o chumbo e o cádmio. O chumbo e o cádmio são metais tóxicos que constituem um sério risco à saúde humana, mesmo em pequenas quantidades, devido ao seu acúmulo progressivo no organismo^{4,7,9,11,19,45}.

Segundo vários estudos, a contaminação por metais tóxicos é ainda hoje, uma das doenças de origem tóxico-ambiental mais comuns que afeta tanto adultos quanto crianças^{6,10,12,18,22,24,25,41}.

Os compostos à base de sais de chumbo e cádmio têm sido largamente empregados como substâncias corantes para diversos tipos de aplicação, devido ao seu alto poder de cobertura, baixo custo e excepcional estabilidade à luz e às altas temperaturas, principalmente quando usados em plásticos e cerâmica, onde a substância corante deve resistir à temperatura de elaboração do material. Quando presentes em embalagens para alimentos, entretanto, esses compostos podem migrar para o conteúdo, no caso o alimento, apresentando riscos para a saúde^{13,26,27}.

O objetivo deste trabalho foi verificar e monitorar os teores de chumbo, cádmio e zinco presentes nos corantes e pigmentos utilizados na elaboração de embalagens para alimentos e validar a metodologia analítica segundo os Regulamentos Técnicos do Mercosul (Res. 105/99 da ANVISA/MS)³.

MATERIAIS E MÉTODOS

As amostras estudadas foram corantes e pigmentos, na concentração máxima de uso, utilizados na coloração de embalagens para alimentos.

Foram analisadas 407 amostras de corantes e pigmentos, sendo 52% inorgânicos e 48% orgânicos. A nomenclatura oficial e o número de identificação e a classificação química segundo o Colour Index^{33,34,35,36,37,38,39}, desses corantes e pigmentos, bem como a porcentagem de amostras analisadas de cada um e alguns de seus principais usos estão especificados nas Tabelas 1 e 2 respectivamente.

A preparação das amostras para a quantificação de chumbo, cádmio e zinco foi realizada por extração direta desses elementos com diferentes ácidos inorgânicos diluídos, conforme descrito na Resolução 105/99³, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, do Ministério da Saúde, ou seja: para cádmio e zinco, solução aquosa de ácido clorídrico 0,1 mol/L; e para o chumbo, solução aquosa de ácido nítrico 1,0 mol/L. Segundo esta metodologia, esta extração é realizada por meio de agitador magnético durante duas horas. Em lugar deste equipamento foi utilizado um Shaker marca New Brunswick Scientific modelo Innova 4230 a fim de evitar uma possível contaminação das amostras, quando da reutilização da barra magnética utilizada no agitador, devido à dificuldade de sua descontaminação. Nesta metodologia não está especificado o tempo de decantação das amostras após a extração por duas horas. Empiricamente, verificou-se que, após um período de uma hora, o processo de decantação era em geral satisfatório para a separação

das fases. Este período é também o recomendado pela Norma Européia EN 71-3- 1988³². Verificou-se também, no processo de validação da metodologia, que o umedecimento prévio do papel de filtro com os respectivos ácidos utilizados na extração otimizava a recuperação dos padrões e conseqüentemente a detecção dos teores dos metais estudados. A determinação desses metais foi efetuada por espectrofotometria de absorção atômica com chama, utilizando-se um espectrofotômetro Perkin Elmer, modelo A Analyst 100, nas seguintes condições: chama oxidante ar/acetileno, corretor de deutério e lâmpadas de cátodo oco de chumbo, cádmio e zinco. A leitura dos elementos foi feita nos seguintes comprimentos de onda (λ) em nm: $\lambda_{Cd} = 228,8$; $\lambda_{Pb} = 283,3$; $\lambda_{Zn} = 213,9$.

Validação Intralaboratorial do método

Para avaliar a exatidão foi usado o método da adição de padrão, devido à falta de materiais de referência certificado mesmo no mercado internacional.

A partir de padrões certificados de chumbo, cádmio e zinco, foram feitas soluções nas concentrações apresentadas na Tabela 3, as quais foram adicionadas em várias amostras de corantes e pigmentos, amostras estas, representativas dos corantes e pigmentos mais comumente empregados em embalagens destinadas a acondicionar produtos alimentícios.

Tabela 1. Corantes e pigmentos inorgânicos analisados neste estudo.

Nome	Nº Colour Index	Classificação Química	% Amostras Analisadas	Alguns Usos
Pigment Blue 29 (Azul Ultramar)	C.I. 77007	Inorgânico	03	Papel, borracha, plásticos e produtos vinílicos
Pigment White 6 (Dióxido de titânio)	C.I. 77891	Inorgânico	27	Papel, plásticos, produtos vinílicos, borrachas, cerâmicas
Pigment Black 7 (Negro de fumo)	C.I. 77266	Inorgânico	11	Tintas, tintas de impressão, plásticos
Óxido de Ferro:				
Pigment Yellow 43	C.I. 77492	Inorgânico	06	Papel, borracha, plásticos e produtos vinílicos
Pigment Red 101	C.I. 77491			
Pigment Brown 6	C.I. 77499			
Pigmentos de Cádmio:				
Pigment Yellow 35	C.I. 77205	Inorgânico	02	Borracha, Tintas de impressão, papel, plásticos, produtos vinílicos, cerâmica, vidro
Pigment Red 108	C.I. 77202			
Pigmentos Complexos Inorgânicos Coloridos:				
'Pigment Brown 24	C.I. 77310	Inorgânico	01	Tintas, tintas de impressão, policloreto de vinila e poliésteres
Pigment Yellow 53	C.I. 77788			
Pigmentos Metálicos:				
Pigment Metal 1 (Alumínio)	C.I. 77000	Inorgânico	01	Tintas
Outros:				
Pigment Violet 15	C.I. 77077	Inorgânico	01	Tintas à base de água e têmpera, como carga em borrachas e plásticos e em adição a outros pigmentos
Pigment White 18	C.I. 77220			
Pigment White 20	C.I. 77019			

Em cada uma destas amostras, foram feitas 10 repetições para cada uma das concentrações, obtendo-se uma recuperação média de: 93% para o zinco; 92% para o cádmio e 80% para o chumbo.

A repetitividade do método apresentou-se adequada com os valores dos coeficientes de variação de 8,1% para chumbo, 2,5% para cádmio e 3,5 % para zinco.

A faixa linear de trabalho utilizada foi de 0,4 a 2,0 mg/L

para o chumbo e de 0,2 a 1,0 mg/L para o cádmio e o zinco. Foram escolhidas estas concentrações, devido aos baixos níveis de metais geralmente encontrados nas amostras de corantes e pigmentos.

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ), foram determinados usando a recomendação da IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry)^{8,40} onde LD = 3s e LQ =

Tabela 2. Corantes e pigmentos orgânicos analisados neste estudo.

Nome	Nº Colour Index	Classificação Química	% Amostras Analisadas	Alguns Usos
Pigment Blue 15:3 Pigment Green 7	C.I. 74160 C.I. 74260	Ftalocianina	16	Tintas, tintas de impressão, borracha, papel, policloreto de vinila e outros plásticos
Pigment Red 57:1 Pigment Yellow 181 Pigment Red 247 Pigment Blue Pigment Red 48:3 Pigment Red 48:2 Pigment Red 176 Pigment Red 170	C.I. 15850:1 C.I. 11777 C.I. 15915 C.I. 16088-20 C.I. 15865:3 C.I. 15865:2 _____ _____	Monoazo	10	Tintas, tintas de impressão, papel, policloreto de vinila, e outros plásticos
Solvent Red 27 Pigment Yellow 12 Pigment Yellow 14 Pigment Yellow 17 Pigment Yellow 83 Pigment Yellow 93 Pigment Yellow 95 Pigment Yellow 180 Pigment Red 166 Pigment Red 214 Pigment Orange 13 Pigment Red 122 Pigment Violet 19	C.I. 26125 C.I. 21090 C.I. 21095 C.I. 21105 C.I. 21108 C.I. 20034 C.I. 20034 C.I. 20730 _____ _____ C.I. 21110 _____ C.I. 46500	Diazo	13	Tintas, tintas de impressão, papel, policloreto de vinila, plásticos de poliestireno e poliolefinas
Solvent Violet 13 Solvent Violet 36 Solvent Blue 97	C.I. 60725 _____ _____	Antraquinona	03	Resinas termoplásticas, poliestireno, policarbonato e policloreto de vinila
Outros policíclicos que não apresentam grupos azo: Pigment Red 149 Pigment Red 178 Solvent Red 135 Solvent Orange 60	C.I. 71137 C.I. 71155 _____ _____	Perilene Perilene Perinona Perinona	02	Termoplásticos, poliestireno, policloreto de vinila e poliamida
Outros: Pigment Violet 13 Pigment Violet Pigment Orange 64 Solvent Yellow 93	_____ C.I. 51345 C.I. 12760 _____	Orgânico Oxazine Benzimidazona <i>Monomethine</i>	03	Tintas, tintas de impressão, poliestireno, polimetacrilato e policloreto de vinila

10s. (s = desvio padrão), calculados através do menor nível de concentração, ou seja 0,4 mg/L para o chumbo e 0,2 mg/L para o cádmio e zinco. Foram usados os desvios obtidos nos testes de repetitividade.

Os limites de detecção do método foram 0,09mg/kg, 0,02mg/kg e 0,02mg/kg e os de quantificação foram 0,31mg/kg, 0,05mg/kg e 0,07mg/kg para chumbo, cádmio e zinco respectivamente. Na amostra o limite de quantificação deve ser multiplicado pelo fator de diluição que é de 25 vezes.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 407 amostras analisadas observou-se que 5% estavam em desacordo com os limites estabelecidos pela legislação em vigor (Resolução 105/99). Segundo esta legislação, os corantes e pigmentos não devem conter os elementos analisados em quantidades superiores às concentrações especificadas na Tabela 4.

A limitação restrita, presente na legislação, destes metais em corantes e pigmentos utilizados na elaboração de embalagens e equipamentos destinados a entrar em contato com alimentos, visa não só os aspectos toxicológicos, quando da ingestão em excesso destes metais prejudiciais à saúde humana, como também o seu impacto ambiental.

Além disso, a presença destes metais em emissões ou cinzas, quando da incineração de embalagens, ou na lixívia quando a embalagem é exposta em aterros, deve ser limitada a fim de assegurar que tais substâncias não sejam liberadas no

meio ambiente^{31,44}.

Dentre as amostras em desacordo, duas apresentaram-se insatisfatórias para cádmio com teores de 130 mg/kg e 150 mg/kg, compreendidos no intervalo de 100 a 150 mg/kg, conforme Figura 1; quatro para chumbo, com teores variando de 380 mg/kg a 27000 mg/kg compreendidos nos intervalos de 100 a 1000 mg/kg, 1000 a 10000 mg/kg e 10000 a 30000 mg/kg, conforme Figura 2; e dezesseis para zinco com teores variando de 2400 mg/kg a 34000 mg/kg compreendidos nos intervalos de 2000 a 5000 mg/kg, 5000 a 10000 mg/kg e 10000 a 35000 mg/kg, conforme Figura 3; totalizando 20 amostras, uma vez que duas delas apresentaram-se insatisfatórias tanto para zinco quanto para cádmio. Os teores detectados dos metais analisados, bem como a porcentagem de aprovação/rejeição de cada um, para o restante das amostras também encontram-se apresentados nas Figuras 1, 2 e 3.

Foi observado que pigmentos constituídos por polissulfetos não respondem às condições de ensaio estabelecidas pela legislação e nem aos testes de recuperação de padrão, uma vez que os sulfetos de chumbo formados só são solúveis em ácido diluído à quente, o que não está previsto nesta metodologia. Pigmentos com estas características serão objetos de estudos posteriores.

Uma vez que a Res. 105/99 está sendo revista, gostaríamos de sugerir que as observações feitas no item material e método, relacionadas à parte analítica constassem desta revisão a fim de proporcionar confiabilidade a esta metodologia.

CONCLUSÃO

A validação da metodologia pelo método de adição de padrão mostrou-se ser adequada para este tipo de produto, pois

Tabela 3. Concentrações das soluções padrões adicionadas e respectivas faixas de recuperação.

Elemento	Concentração (mg/L)	Faixa de Recuperação %
Pb	0,4	79,58
	0,8	84,08
	1,6	77,22
Cd	0,2	90,07
	0,4	90,01
	0,8	94,62
Zn	0,2	95,23
	0,4	92,31
	0,8	91,65

Tabela 4. Concentrações de chumbo, cádmio e zinco em corantes e pigmentos estabelecidos pela legislação.

Elemento	Concentração(mg/kg)
Chumbo (solúvel em HNO ₃ 1 mol/L)	100
Cádmio (solúvel em HCl 0,1 mol/L)	100
Zinco (solúvel em HCl 0,1 mol/L)	2000

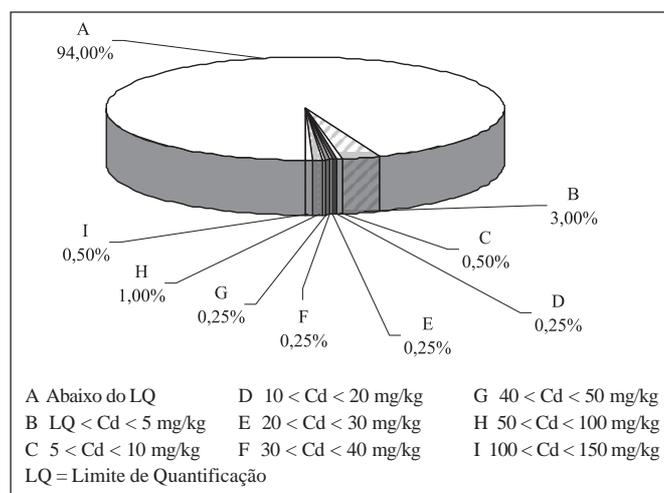


Figura 1. Teores detectados de Cádmio com as respectivas porcentagens de aprovação/rejeição.

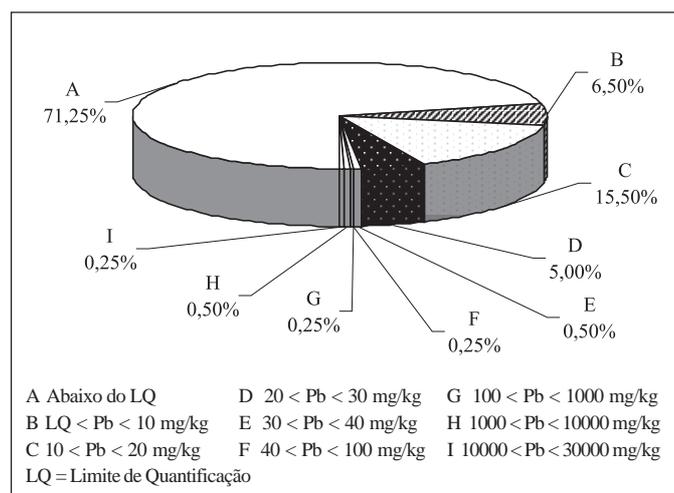


Figura 2. Teores detectados de chumbo com as respectivas porcentagens de aprovação/rejeição.

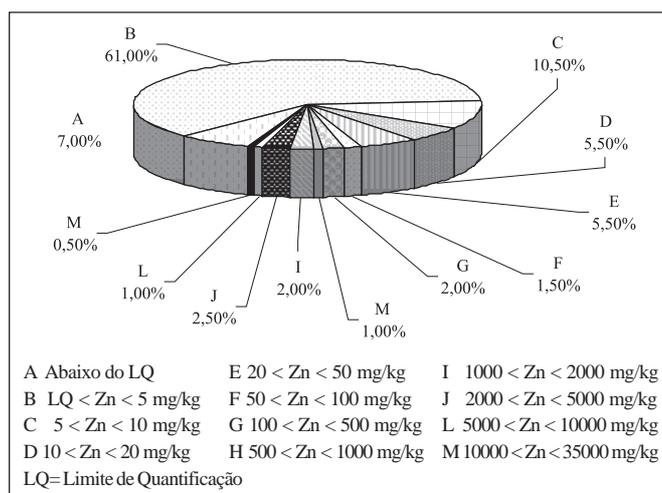


Figura 3. Teores detectados de Zinco com as respectivas porcentagens de aprovação/rejeição.

os resultados obtidos estavam dentro da faixa percentual esperada.

Mesmo com a alta porcentagem de amostras satisfatórias para os três metais analisados, verificou-se que entre os 5% de amostras em desacordo foram detectados teores extremamente acima daqueles estipulados pela legislação, o que justifica o controle contínuo que deve ser feito em corantes e pigmentos utilizados na elaboração de embalagens e equipamentos destinados a entrar em contato com alimentos. Salienta-se ainda, que este controle deve ser ampliado para quantificação de outros metais além dos que foram objetos deste estudo.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos as estagiárias Sarah Fernandes e Andreia Iervolino pela colaboração técnica prestada.

REFERÊNCIAS

- Athey, R.D. An overview of coatings technology. *Coating Materials. Athey Technologies*, 102-5, 1993.
- Brasil. Leis, decretos etc. Decreto-Lei Nº 986/69 de 21 de outubro de 1969. Institui normas básicas sobre alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 21 de outubro de 1969.
- Brasil. Leis, decretos etc. Resolução 105 de 19 de maio de 1999. Disposições gerais para embalagens e equipamentos plásticos em contato com alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 20 de maio de 1999. Seção I, pt I, p.21-34.
- Brzóška, M.M. & Moniuzko-Jakoniuk, J. Interactions between cadmium and zinc in the organism. Review. **Food and Chem. Toxicol.**, 39: 967-80, 2001.
- Color Pigments Manufacturers Association. **Manuseio seguro de pigmentos coloridos**. 1º Ed. CPMA, Inc., Alexandria, Virginia 22314, 1993. 65 p.
- Cordeiro, R. et al. Distúrbios neurológicos em trabalhadores com baixos níveis de chumbo no sangue. I: Neuropatia periférica. **Rev. Saúde Pública**, 30(3): 248-55, 1996.
- Criteria (dose/effect relationships) for cadmium. **Commission Of The European Communities**. Oxford, Pergamon Press, 1978. 202 p.
- Currie, L.A. Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities. **Pure Appl. Chem.**, 67 (10): 1669-723, 1995.
- Damstra, T. Toxicological Properties Of Lead. **Environ. Health Perspect.**, 19: 297-307, 1971.
- Elpo, E.R.S. & Freitas, R.J.S. Avaliação dos Teores de Cádmiio, Chumbo, Cromo e Níquel nos Alimentos da Cesta Básica. **B.CEPPA**, 13(2):71-84, 1995.
- Friberg, L. et al. **Handbook on the toxicology of metals**. Amsterdam, Elsevier, 1979.
- Galal-Gorchev, H. Dietary intake, levels in food and estimated intake of lead, cadmium and mercury. **Food Addit. Contam.**, 10 (1): 115-28, 1993.
- Garrido, N.S. et al. Avaliação dos níveis de arsênio, chumbo e cádmio em corantes e pigmentos utilizados em embalagens para alimentos no período de 1982 a 1989. **Rev. Inst. Adolfo lutz**, 51(1/2): 63-8, 1991.
- Hinks, D. et al. Synthesis and evaluation of organic pigments and intermediates. 1. Nonmutagenic benzidine analogs. **Dyes and Pigments**, 44 : 199-207, 2000.
- Hinks, D. et al. Synthesis and evaluation of organic pigments. 2. Studies of bisazomethine pigments based on planar nonmutagenic benzidine analogs. **Dyes and Pigments**, 48: 7-13 , 2001.
- Joint Fao/Who Expert Committe On Food Additives, 41ª, Geneva, 1993. **Toxicological evaluation of certain food additives and contaminants** Geneva, OMS/ IPCS, 1993. (WHO Food Additives Series, 32)
- Kakuda, Y. Environmental Contaminants in Food – Book Reviews – **Food Res. Int.**, 35: 496 – 7, 2002.
- Landrigan, P.J. & Todd, A.C. Lead Poisoning – **WJM**, 161(2): 153-9, 1994.
- Martell, A.E. Chemistry of carcinogenic metals. **Environ. Health Perspect.**, 40: 207-26, 1981.
- Møller, P. & Wallin, H. Genotoxic hazards of azo pigments and other colorants related to 1-phenylazo-2-hydroxynaphthalene. **Mutat. Res.**, 462: 13-23, 2000.
- Nakpathon, M. et al. Synthesis and evaluation of organic pigments. 4. New monoarylide and diarylide pigments. **Dyes and Pigments**, 48: 93-106, 2001.
- Peterson, N.J. et al. Lead – Contaminated drinking water in Bulk-Water Storage Tanks – Arizona and California, 1993. **Epidemiologic Notes and Reports. MMWR**, 43(41): 751-8, 1994

23. Piotrowski, I.K. & Coleman, J.K. Environmental hazards of heavy metals: summary evaluation of lead, cadmium and mercury. London, MARC/GEMS, **MARC Report** , n.º.20: 1-18, 1980.
24. Rojas, E.et.al. Are metals dietary carcinogens? **Mutat. Res.**, 443: 157-81, 1999.
25. Schilter, B.& Huggett. A.C. Viewpoint Are current regulatory limits for food contaminants suitable for infants and children? **Trends Food Sci. Technol.**, 8: 48 – 53, 1997.
26. Sheets R.W. Extraction of lead, cadmium and zinc from overglaze decorations on ceramic dinnerware by acidic and basic food substances. **Sci. Total Environ.**, 197: 167-75, 1997 .
27. Sheets R.W. Release of heavy metals from European and Asian porcelain dinnerware. **Sci. Total Environ.**, 212: 107-113, 1998 .
28. Sokolowska, J. et. al. Synthesis and evaluation of organic pigments. 3. Studies based on nonmutagenic twisted benzidines. **Dyes and Pigments**, 48: 15- 27, 2001.
29. Speelman, D. Licensing agreement enhances global colorant capabilities. **Reinforced Plastics**, September, 62-65, 2000.
30. Šulcová, P. & Trojan, M. The synthesis of the $Ce_{0,95-y}Pr_{0,05}La_yO_{2-y/2}$ pigments. **Dyes and Pigments**, 44: 165-8, 2000.
31. The European Parliament. **Directive 94/EC** of the European Parliament and the Council on Packaging and Packaging Waste. December, 1994. 12p.
32. The European Standard. **EN 71-3 British Standard** , Safety of toys. Part 3. Specification for migration of certain elements. 1995.
33. The Society of Dyers And Colourists & American Association of Textile Chemists and Colourists – **COLOUR INDEX** . 3rd ed., Great Britain: Lund Humphries, Bradford and London, v. 1, 1971.
34. The Society of Dyers And Colourists & American Association of Textile Chemists and Colourists – **COLOUR INDEX** . 3rd ed., Great Britain: Lund Humphries, Bradford and London, v. 2, 1971.
35. The Society of Dyers And Colourists & American Association of Textile Chemists and Colourists – **COLOUR INDEX** . 3rd ed., Great Britain: Lund Humphries, Bradford and London, v. 3, 1971.
36. The Society of Dyers And Colourists & American Association of Textile Chemists and Colourists – **COLOUR INDEX** . 3rd ed., Great Britain: Lund Humphries, Bradford and London, v. 4, 1971.
37. The Society of Dyers And Colourists & American Association of Textile Chemists and Colourists – **COLOUR INDEX** . 3rd ed. (Second Revision), Huddersfield: H Charlesworth & Co Ltd, v. 5, 1982.
38. The Society of Dyers And Colourists & American Association of Textile Chemists and Colourists – **COLOUR INDEX** . Revised 3rd ed., Great Britain: Chorley & Pickersgill Ltd, v.6 (First Supplement to Volumes 1-4) , 1975.
39. The Society of Dyers And Colourists & American Association of Textile Chemists and Colourists – **COLOUR INDEX** . 3rd ed. (Second Revision), Huddersfield : H Charlesworth & Co Ltd, v. 7 (Supplement to volumes 1-4 and 6 of the third edition) , 1982.
40. Thompson, M. et. al. Harmonized Guidelines for Single-Laboratory Validation of Methods of Analysis. **Pure Appl. Chem.**, v. 74, n.º 5, 835-55, 2002.
41. Todd, A.C et. al. Unraveling the Chronic Toxicity of Lead: An Essential Priority for Environmental Health . **Environ. Health Perspect.**, 104 (1): 141-6, 1996.
42. Trojan, M. et. al. The synthesis of binary zinc (II)-nickel(II) ciclo-tetraphosphates as new special pigments. **Dyes and Pigments**, 44: 161-4, 2000.
43. Trouchin M. Book Review: Color for Science, Art and Technology. Edited by K. Nassau. **J. Photochem. Photobiol.B: Biol.**, 50: 76-8, 1999.
44. Vassilev, S.V. & Danheux, C.B. Characterization of refuse-derived char from municipal solid waste. 2. Occurrence, abundance and source of trace elements. **Fuel Process. Technol.**, 59: 135-61, 1999.
45. Waalkes, M.P. Cadmium carcinogenesis in review **J. Inorganic Biochem.**, 79: 241– 4, 2000.
46. Zenebon, O. **Migração de chumbo e cádmio de recipientes cerâmicos. Estudo visando a sua regulamentação bromatológica.** São Paulo, 1986. [Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo].

Comportamento do óleo de milho em frituras

Functioning of corn oil in frying processes

RIALA6/976

Neuza JORGE¹*, Bruno Bellei Prazeres SOARES²

¹ Prof^a Dr^a do Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista. Rua Cristóvão Colombo, 2265 – Jardim Nazareth. CEP 15054-000 – São José do Rio Preto – SP. E-mail: njorge@eta.ibilce.unesp.br

² Aluno de Iniciação Científica – Bolsista CNPq/PIBIC.

RESUMO

Este trabalho teve por objetivo estudar o comportamento de óleo de milho em frituras descontínuas, a fim de se determinar alterações físico-químicas do óleo durante o processo. Os experimentos foram conduzidos com frituras de batatas fatiadas em recipientes com relações superfície/volume de óleo (S/V) 0,5 e 1,0 cm⁻¹, submetido em diferentes tempos, à temperatura de 180°C. Para cada relação superfície/volume, foram efetuadas 15 frituras em intervalo de 30 minutos, por período total de 7,5 horas, com retirada de amostras de óleo após cada fritura. Para a avaliação da degradação foram utilizadas as seguintes determinações analíticas: ácidos graxos livres (% , expressos em ácido oléico), índice de peróxidos (meq/kg), índice de refração (a 40°C), índice de iodo (g I₂/100 g) e compostos polares totais (%). Os resultados obtidos das determinações analíticas foram submetidos à análise de variância, empregando um esquema fatorial, no delineamento inteiramente casual, e teste Tukey de médias. O teor de ácidos graxos livres aumentou com o tempo de fritura, evidenciando o desenvolvimento de reações hidrolíticas para ambas as relações superfície/volume. No entanto, os valores máximos de 0,28% e 0,39%, respectivamente para relações S/V 0,5 e 1,0 cm⁻¹, não ultrapassaram os limites estabelecidos por regulamentos internacionais. Os resultados obtidos para o índice de peróxidos apresentaram oscilações entre os diversos tratamentos submetidos. Os valores máximos para este parâmetro foram 19,04 e 12,19 meq/kg para S/V 0,5 e 1,0 cm⁻¹, respectivamente. Para o índice de refração, os resultados mostraram aumento gradativo com o tempo de fritura, para as duas condições da relação S/V. Os valores máximos obtidos foram respectivamente de 1,4670 e 1,4675 para S/V 0,5 e 1,0 cm⁻¹. Os maiores valores encontrados para o teor de compostos polares totais foram de 26,00 e 42,45%, respectivamente, para S/V 0,5 e 1,0 cm⁻¹. Os valores obtidos para os compostos polares totais para S/V 1,0 cm⁻¹ apresentaram condições insatisfatórias após 5,5 horas de uso, de acordo com padrões estabelecidos em regulamentos internacionais; por outro lado, para S/V 0,5 cm⁻¹, o óleo de milho apresentou 20,64% de compostos polares. Com base nos resultados obtidos, concluiu-se que a relação S/V e o tempo de fritura influenciaram na qualidade final do óleo de milho submetido às frituras de batatas.

Palavras-Chave. óleo de milho, frituras, batatas fritas.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the functioning of corn oil during discontinuous frying processes in order to determine physical-chemical alterations. Sliced potatoes were fried establishing a device surface/ oil volume ratio (S/V) of 0.5 and 1.0 cm⁻¹; at 180°C, and at diverse lengths of frying time. Fifteen frying processes were conducted for each surface/volume ratio, with intervals of 30 min among them, for total period of time of 7.5 hours, and collecting oil samples after every process. In order to evaluate the oil degradation the following analytical determinations were used in duplicate: free fatty acids (% , expressed in oleic acid), peroxide value (meq/kg), refraction value (under 40°C), iodine index (g I₂/100g), and total polar compounds (%). The results obtained from these analytical determinations were submitted to analysis of variance using a factorial scheme, in completely randomized statistical design, and the Tukey test. The free fatty acids increased proportionally with the length of frying time, evidencing the development of hydrolytic reactions for both surface/volume ratios. Nevertheless, the maximum values of 0.28% and 0.39%, for 0.5 and 1.0 cm⁻¹, respectively have not exceeded the limits established by international rules. The results obtained for the peroxide index have shown values oscillations among the varied treatments. Maximum values for this parameter were 19.04 and 12.12 meq/kg for S/V 0.5 and 1.0 cm⁻¹,

respectively. As for the refraction index, results have shown a gradual increase with the time of frying, for both conditions of S/V ratio. The maximum values obtained were 1.4670 and 1.4675 for S/V 0.5 and 1.0 cm⁻¹, respectively. The greatest values found for the amount of total polar compounds were 26.00 and 42.45% for S/V 0.5 and 1.0 cm⁻¹, respectively. The values of total polar compounds obtained for S/V 1.0 cm⁻¹ have shown unsatisfactory conditions after processing time of 5.5 hours, according to international standards; with regards to S/V 0.5 cm⁻¹, the total polar compounds were 20.64% for the corn oil. According to the data obtained in the present study, it has been concluded that the S/V ratio and the length of frying time have influenced the final quality of corn oil used for frying potatoes.

Key Words. corn oil, frying, fried potatoes.

INTRODUÇÃO

O processo de fritura para a produção de alimentos vem ganhando grande popularidade nas mais diversas faixas sociais de nosso país. Por ser um produto relativamente barato e de fácil obtenção, os óleos de origem vegetal proporcionam um meio rápido de preparo de alimentos, o que vem se tornando fator primordial para a vida moderna, principalmente em grandes centros urbanos. Este processo de preparo de alimentos é muito comum sob o ponto de vista comercial, principalmente em restaurantes tipo *fast food*⁹. Os produtos fritos possuem grande aceitação por pessoas de todas as idades, o que contribuiu para um importante aumento no consumo destes, em escala mundial¹⁷.

Apesar dos avanços tecnológicos, existem muitos estabelecimentos que utilizam óleos em frituras de forma inadequada, ou seja, sem a preocupação com as características que estes podem adquirir ao longo do processo. Muitas vezes, tal prática é realizada com o objetivo de reduzir custos com o consumo de óleo, ou então, por falta de informações mais específicas.

O exposto anteriormente não é somente observado em nível comercial. A utilização doméstica do óleo é, muitas vezes, conduzida de forma errônea. A principal dificuldade nestes casos é determinar qual o momento mais adequado em que é necessário realizar o descarte do mesmo. Frequentemente, esta avaliação é feita de forma muito subjetiva, através de observações de formação de espumas, fumaça, cor e odor. Não existe, ainda, um método prático para identificar com segurança o momento adequado para o descarte de óleos utilizados para frituras^{5,12,15}. Por isso, muitos estudos têm se concentrado na análise dos constituintes dos mais diversos óleos e de suas alterações, bem como a determinação do tempo em que estes devem ser descartados, buscando sempre fornecer ao consumidor um produto mais seguro à saúde^{4,23}.

Muitas vezes, o óleo é submetido a condições de manipulação muito intensas, o que acaba induzindo o mesmo a mudanças em sua composição, alterando drasticamente a sua qualidade²⁰. Estas alterações, provenientes de reações de degradação, afetam as propriedades sensoriais, nutritivas e funcionais do alimento frito e, em último grau, pode resultar na formação de compostos prejudiciais à saúde^{9,12}. Entre estas

condições, pode-se citar as altas temperaturas que são geralmente empregadas nos processos de fritura, e que provocam alterações térmicas nos constituintes do óleo; a umidade, proveniente da água existente nos alimentos submetidos a fritura e que produzem as alterações hidrolíticas; e por fim, o oxigênio, que se dispersa no interior do óleo através de sua superfície, que permanece em contato direto com o ar atmosférico, provocando alterações oxidativas^{7,14}. Segundo Tyagi e Vasishtha²⁵, existem evidências de que óleos altamente oxidados e aquecidos podem possuir algumas propriedades carcinogênicas devido à formação de substâncias potencialmente tóxicas.

O tempo de fritura é de fundamental importância, uma vez que este determinará o período que o óleo estará em contato com estes agentes de degradação. Quanto maior for este tempo de contato, certamente maiores serão os níveis de degradação. Além disso, a relação existente entre o volume e a área de contato do óleo com a atmosfera, geralmente estabelecida pelo recipiente de fritura utilizado, permite a obtenção de diferentes níveis de oxidação. Pequeno volume e grande área superficial proporcionam maiores alterações em virtude da maior velocidade das reações e do contato intenso do óleo com o oxigênio atmosférico. Esta é a situação típica caseira, onde em recipientes como frigideiras são adicionadas pequenas quantidades de óleo. No entanto, em estabelecimentos comerciais são utilizados recipientes que comportam maiores volumes de óleo, como fritadeiras elétricas e tachos de fritura. Outros fatores que certamente interferem na intensidade destas alterações são as próprias características químicas de cada óleo, como por exemplo, o grau de insaturação que seus ácidos graxos majoritários apresentam^{11,16}.

Considerando a importância das frituras com óleos vegetais nos hábitos alimentares atuais, a finalidade deste estudo foi conhecer o comportamento do óleo de milho em frituras domésticas, utilizando sucessivas frituras de batatas.

MATERIAL E MÉTODOS

Processo de fritura

Foram utilizados, para os ensaios de fritura descontínua de batatas, óleo de milho adquirido junto ao comércio local.

Para o óleo em questão foram realizados dois

procedimentos de fritura em recipiente de alumínio contendo 0,5 e 1,0 litro de óleo, com relações superfície/volume (S/V) 1,0 e 0,5 cm⁻¹, respectivamente. A temperatura empregada foi, em média, 180°C.

As batatas foram descascadas, cortadas em fatias (cerca de 0,3 cm de espessura), submersas em água até o momento da fritura, escorridas e pesadas antes e após cada processo de fritura.

Quinze lotes de batatas com aproximadamente 100 gramas foram fritos, para cada procedimento de fritura, por período de 5 minutos. Para cada lote foram empregados intervalos de 25 minutos entre cada operação de fritura. Para cada procedimento, o óleo foi aquecido por período total de 7,5 horas, sem nenhuma reposição.

Antes de dar início aos ensaios de fritura, o óleo foi submetido a aquecimento por 10 minutos, para o estabelecimento do controle de temperatura. Após a fritura de cada lote de batatas, amostras de óleo foram retiradas em diferentes intervalos de tempo (0,5; 1,5; 2,5; 3,5; 4,5; 5,5; 6,5 e 7,5 horas) e, em seguida, foram estocadas em congelador à temperatura de -18°C.

Métodos analíticos

- **Ácidos graxos livres**, expressos em ácido oléico (%), conforme método proposto pela AOCS².
- **Índice de peróxidos**, expressos em miliequivalentes de oxigênio ativo por kg de óleo, conforme método anterior².
- **Índice de refração**, determinado a 40°C de acordo com o mesmo método², mediante uso de Refratômetro de Abbé.
- **Índice de iodo**, expresso em gramas de iodo absorvido por 100 gramas de amostra, conforme o método recomendado pela AOCS².
- **Compostos polares totais**, expressos em porcentagem de área, obtidos mediante cromatografia em coluna, conforme o método proposto por Waltking e Wessels²⁶ com uma pequena modificação: o uso de hexano:éter etílico na proporção 90:10, ao invés de 87:13, para produzir uma melhor separação da fração não polar¹⁰.

- **Composição em ácidos graxos**, expressa em porcentagem de área, determinada através de cromatografia em fase gasosa utilizando-se cromatógrafo HP 5890 com detector de ionização de chama, coluna de sílica fundida BPX70, 50 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno, temperatura programada entre 160-230°C, taxa de 2°C/min, hidrogênio como gás de arraste, usando como referência ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME) da Sigma e Merck para identificação. Os ésteres metílicos foram preparados com metilato de sódio¹.

Análise estatística

O experimento foi realizado em esquema fatorial 2x8 com duas relações S/V (0,5 e 1,0 cm⁻¹) e oito tempos de fritura (0,5; 1,5; 2,5; 3,5; 4,5; 5,5; 6,5 e 7,5 horas), no delineamento inteiramente casualizado. Os resultados obtidos das determinações analíticas, em duplicatas, foram submetidos à análise de variância e as diferenças entre as médias foram testadas a 1 e 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey²¹, através do programa ESTAT - Sistema para Análises Estatísticas (v. 2.0).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 apresenta as características físico-químicas do óleo de milho inicial, onde pode-se verificar que os valores para ácidos graxos livres, índice de peróxidos, índice de refração, índice de iodo e viscosidade encontram-se dentro dos limites estabelecidos pela Legislação Brasileira para o óleo de milho refinado³. Observa-se também que a fração polar encontrada foi de 3,2%. De acordo com Masson et al.¹⁸, óleos que apresentam valores abaixo de 5% de compostos polares totais possuem boas características iniciais devido às poucas alterações que são obtidas durante o processo de refinação do óleo.

Com relação à composição de ácidos graxos, a porcentagem total de ácidos poliinsaturados (C18:2n6 + C18:3n3) foi de 52,9%, enquanto que as porcentagens de ácido graxo

Tabela 1. de variância para as determinações de ácidos graxos livres (AGL), índice de peróxidos (IP), índice de refração (IR), índice de iodo (II) e compostos polares totais (CPT).

Características*	
Ácidos graxos livres (ácido oléico %)	0,13
Índice de peróxidos (meq/kg)	0,9
Índice de refração	1,4655
Índice de iodo (g I ₂ /100 g)	120,07
Compostos polares totais (%)	3,2
Composição em ácidos graxos (% de área)	
Ácido palmítico (C16:0)	12,0
Ácido esteárico (C18:0)	2,9
Ácido oléico (C18:1n9)	32,2
Ácido linoléico (C18:2n6)	52,2
Ácido linolênico (C18:3n3)	0,7

* Valores obtidos da média de duas determinações.

monoinsaturado (C18:1n9) e ácidos graxos saturados (C16:0 + C18:0) foram de 32,2 e 14,9%, respectivamente.

Apesar da quantidade de ácido linolênico (C18:3n3) mostrar-se inferior a 2%, valor este considerado limite por alguns países como Bélgica, Chile e França, para óleos vegetais utilizados em frituras, a quantidade em ácido linoléico (C18:2n6) superou mais da metade da quantidade de ácidos graxos totais. Tais dados demonstram a instabilidade térmica e oxidativa que o óleo de milho possui em virtude da alta quantidade de ácidos graxos insaturados. Também explicam os resultados encontrados por Takeoka et al.²⁴ e Shen et al.²², que relacionam o óleo de milho como instável a processos de fritura devido a sua alta insaturação. O interessante, no entanto, é observar que a maior parte desta insaturação é proveniente do ácido linoléico, que apresenta duas duplas ligações, ao contrário do ácido linolênico, que mesmo com um grau maior de insaturação que o anterior, com três duplas ligações em sua cadeia carbônica, possui uma

participação muito pequena na composição do óleo.

A Tabela 2 apresenta a análise de variância para as determinações de ácidos graxos livres, índice de peróxidos, índice de refração, índice de iodo e compostos polares totais, utilizando-se os valores obtidos ao longo do período de aquecimento de 7,5 horas, para as relações S/V 0,5 e 1,0 cm⁻¹.

Como observado na Tabela 2, o teste F foi significativo para os efeitos principais ($p < 0,01$ e $p < 0,05$) em todas as determinações. As interações entre os fatores S/V x Tempos de fritura foram significativas para ácidos graxos livres, índice de peróxidos e compostos polares totais ($p < 0,01$) e índice de refração ($p < 0,05$) e foram não significativas para índice de iodo ($p > 0,05$). Sendo assim, foi necessário proceder o desdobramento da interação S/V x Tempos de fritura para os dados de ácidos graxos livres, índice de peróxidos, índice de refração e compostos polares totais, cujos resultados dos testes de médias encontram-se na Tabela 3.

Tabela 2. Análise de variância para as determinações de ácidos graxos livres (AGL), índice de peróxidos (IP), índice de refração (IR), índice de iodo (II) e compostos polares totais (CPT).

Causas de Variação	GL	Quadrados Médios				
		AGL	IP	IR ¹	II	CPT
S/V	1	0,0012*	331,4669**	0,1653**	1363,3337**	65,7518**
Tempos de fritura	7	0,0175**	7,1868**	1,0332**	54,9817**	319,1625**
S/V x Tempos de fritura	7	0,0021**	10,3366**	0,0367*	12,3577 ^{ns}	38,0848**
Resíduo	16	0,0002	0,2732	0,0116	4,6770	1,4322
Desvio-Padrão		0,0158	0,5227	0,1075	2,1626	1,1968
Coef. de Variação (%)		7,51	4,24	0,01	1,92	6,37

¹ Dados originais multiplicados por 10³;

^{ns} Não significativo ($p > 0,05$);

* Significativo ($p < 0,05$);

** Significativo ($p < 0,01$).

Tabela 3. Desdobramento da interação S/V x Tempos de fritura para os dados de ácidos graxos livres, índice de peróxidos, índice de refração e compostos polares totais.

S/V (cm ⁻¹)	Tempos de fritura (horas)							
	0,5	1,5	2,5	3,5	4,5	5,5	6,5	7,5
Ácidos graxos livres (ácido oléico %)								
0,5	0,16 ^{cA}	0,17 ^{bcA}	0,17 ^{bcA}	0,21 ^{bcA}	0,17 ^{bcA}	0,22 ^{ba}	0,28 ^{aA}	0,28 ^{aB}
1,0	0,12 ^{eB}	0,17 ^{deA}	0,18 ^{dA}	0,18 ^{dA}	0,19 ^{cdA}	0,24 ^{bcA}	0,28 ^{ba}	0,39 ^{aA}
Índice de peróxidos (meq/kg)								
0,5	9,08 ^{bb}	12,19 ^{ab}	11,24 ^{ab}	8,29 ^{bcB}	8,18 ^{bcB}	9,33 ^{bb}	6,99 ^{cb}	7,59 ^{bcB}
1,0	15,59 ^{bcA}	16,30 ^{ba}	15,20 ^{bcA}	11,60 ^{dA}	14,10 ^{cA}	14,37 ^{cA}	19,04 ^{aA}	18,18 ^{aA}
Índice de refração								
0,5	1,4657 ^{eA}	1,4659 ^{deB}	1,4662 ^{cdA}	1,4663 ^{cA}	1,4665 ^{bcA}	1,4667 ^{abA}	1,4669 ^{aA}	1,4670 ^{aB}
1,0	1,4657 ^{fA}	1,4662 ^{eA}	1,4661 ^{eA}	1,4664 ^{deA}	1,4666 ^{cdA}	1,4669 ^{bcA}	1,4670 ^{ba}	1,4675 ^{aA}
Compostos polares totais (%)								
0,5	7,80 ^{dA}	11,16 ^{dA}	10,94 ^{dA}	18,54 ^{cA}	20,52 ^{bcA}	20,64 ^{bcB}	23,32 ^{abB}	26,00 ^{aB}
1,0	6,65 ^{fA}	9,75 ^{efA}	13,30 ^{deA}	15,60 ^{dB}	20,80 ^{cA}	24,80 ^{bcA}	28,50 ^{ba}	42,45 ^{aA}

a, b, c... (linha) - em cada S/V, médias de tempo de fritura seguidas de mesma letra minúscula, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$)
A, B (coluna) - em cada tempo de fritura, médias de S/V seguidas de mesma letra maiúscula, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Tabela 4. Média dos fatores para os dados de índice de iodo.

Fatores	Índice de Iodo (g iodo/100 g)
S/V (cm ⁻¹)	
0,5	119,22 ^a
1,0	106,17 ^b
Tempos de fritura (horas)	
0,5	115,23 ^a
1,5	116,40 ^a
2,5	112,63 ^{ab}
3,5	116,08 ^a
4,5	115,45 ^a
5,5	109,51 ^{bc}
6,5	109,75 ^{bc}
7,5	106,52 ^c

a, b, c - para cada fator, médias seguidas de mesma letra, não diferem entre si pelo teste Tukey (p > 0,05).

De acordo com a Tabela 3, os ácidos graxos livres aumentaram com o tempo de fritura, indicando o desenvolvimento de reações hidrolíticas para ambas as relações superfície/volume. A formação de ácidos graxos livres é proveniente da degradação dos triglicerídios e estes componentes também fazem parte dos compostos polares totais. De acordo com Melton et al.¹⁹, os ácidos graxos livres podem se degradar formando componentes voláteis, bem como outros não voláteis. Portanto, estes compostos podem ser perdidos via vaporização. Além disso, esta análise é muito dependente do tipo de óleo utilizado e da forma de fritura conduzida. No entanto, a avaliação dos ácidos graxos livres é muito importante para a compreensão da degradação de um óleo de fritura.

A porcentagem de ácidos graxos livres no final do processo, para S/V 0,5 cm⁻¹, foi equivalente a 0,28%. Este resultado está abaixo dos limites recomendados por alguns pesquisadores¹². A mesma tendência pôde ser observada para as frituras realizadas com S/V 1,0 cm⁻¹, onde o valor encontrado referente ao último tempo de fritura foi de 0,39 % (Tabela 3). Ainda, em relação às S/V estudadas, verifica-se que apenas os tempos de fritura 0,5 e 7,5 horas diferiram entre si, tendo a relação S/V 1,0 cm⁻¹ apresentado maior valor ao final do processo de fritura.

De acordo com as legislações existentes, estes valores finais encontram-se dentro dos limites estabelecidos por diversos países. Geralmente, estes limites variam entre 2 e 2,5%¹³. Mesmo assim, o óleo de milho apresentou valores abaixo destes limites ao final dos experimentos.

Em relação aos resultados apresentados na Tabela 3, verifica-se que os índices de peróxidos para os diferentes tempos de frituras apresentaram comportamento instável, os quais decresceram devido, provavelmente, à formação de compostos voláteis como aldeídos e cetonas. Este comportamento foi semelhante ao encontrado por alguns autores, justificado pela formação destes compostos a partir dos hidroperóxidos^{7,8,9,16}. Nas temperaturas utilizadas no processo de fritura, os hidroperóxidos se decompõem rapidamente dando origem a produtos secundários de oxidação (trienos, aldeídos, cetonas)^{5,6}. Quanto às relações S/V dentro de cada tempo de fritura, verifica-se que diferiram entre si, tendo a relação S/V 1,0 cm⁻¹ apresentado maiores valores durante todo o processo de fritura. De acordo com a Tabela 3, após 7,5 horas de fritura, o óleo de milho atingiu valor de 18,18 meq/kg, sendo que o valor máximo encontrado durante o processo foi de 19,04 meq/kg, ocorrido após 6,5 horas de fritura.

A determinação do índice de refração é um método utilizado para observar a formação de compostos de maior peso molecular formados durante o processo de fritura. Estes compostos são denominados polímeros e são oriundos de reações entre triglicerídios degradados por reações térmicas ou oxidativas²⁰. Os resultados destas análises mostram aumento com o tempo de fritura, para ambas as relações S/V utilizadas. Observa-se ainda pela Tabela 3 que, em relação às S/V dentro de cada tempo de fritura, nos tempos de fritura 0,5, 2,5, 3,5, 4,5, 5,5 e 6,5 horas as S/V não diferiram estatisticamente entre si.

De acordo com a Tabela 2, observa-se que não houve interação significativa para o índice de iodo, o que indica que os fatores S/V e Tempos de fritura agem de modo independente sobre ele.

A Tabela 4 apresenta as médias obtidas para índice de iodo e, em relação às S/V, verifica-se pela Tabela 2 que o teste F foi significativo (p < 0,01). Logo, as duas relações S/V apresentam diferenças quanto ao índice de iodo, sendo a S/V 1,0 cm⁻¹ a de menor valor. Para os tempos de fritura, observa-se pela Tabela 2, que o teste F também foi significativo (p < 0,01).

Tabela 5. Coeficientes de correlação linear (r) entre tempos de fritura (x) e determinações físico-químicas (y) para as relações S/V 0,5 e 1,0 cm⁻¹ e as correspondentes equações lineares.

Determinações	S/V = 0,5 cm ⁻¹		S/V = 1,0 cm ⁻¹	
	R	Equação	r	Equação
AGL	0,88**	y=0,14+0,02x	0,91**	y=0,09+0,03x
IP	-0,69 ^{ns}		0,39 ^{ns}	
IR	0,99**	y=1,47+0,19x	0,98**	y=1,47+0,29x
II	-0,91**	y=123,88-1,16x	-0,66 ^{ns}	
CPT	0,97**	y=6,92+2,61x	0,96**	y=1,94+4,57x

AGL: ácidos graxos livres; IP: índice de peróxidos; IR: índice de refração; II: índice de iodo; CPT: compostos polares totais; ^{ns} não significativo (p > 0,05); ** teste significativo (p < 0,01).

Então, os tempos de fritura apresentam diferenças no índice de iodo. Pela Tabela 4, verifica-se que houve redução no índice de iodo com o tempo de fritura. De acordo com o teste de Tukey para as médias de tempos de fritura, verificou-se que os tempos de fritura 0,5, 1,5, 3,5 e 4,5 horas não diferiram entre si, o mesmo acontecendo com os tempos de fritura 5,5 e 6,5 horas.

O índice de iodo, diferentemente das demais análises realizadas neste estudo, apresentou comportamento decrescente ao transcorrer as operações de fritura para ambas as relações S/V. A sua diminuição ocorre devido às diversas reações degradativas como polimerização, ciclização e oxidação, que quebram as duplas ligações disponíveis nos ácidos graxos. Portanto, o índice de iodo é um método que permite avaliar como o caráter poliinsaturado de um óleo pode contribuir para as alterações no mesmo.

Os resultados obtidos por meio da análise de compostos polares totais fornecem dados suficientemente reais sobre a degradação sofrida por um óleo vegetal durante um processo de fritura. No caso do óleo de milho, a formação destes compostos foi crescente com o tempo de fritura (Tabela 3). Este aumento gradativo foi semelhante ao encontrado por Melton et al.¹⁹, onde a justificativa se baseia na formação de compostos oriundos da degradação dos triglicerídios.

Pela Tabela 3 observa-se para ambas as relações S/V, que os valores de compostos polares totais aumentaram ao longo do tempo de fritura. Em se tratando da S/V 0,5 cm⁻¹, os tempos de fritura 0,5, 1,5 e 2,5 horas não diferiram significativamente, o mesmo acontecendo com os tempos de fritura 4,5 e 5,5 horas. Já, para a relação S/V 1,0 cm⁻¹, durante o processo de fritura, todos os valores para compostos polares totais diferiram entre si.

Ainda, com respeito às relações S/V usadas neste estudo, verifica-se a partir do tempo de fritura 5,5 horas que S/V 1,0 cm⁻¹ apresenta maiores alterações em comparação à S/V 0,5 cm⁻¹. Conforme a Tabela 3, nos tempos de fritura 3,5, 5,5, 6,5 e 7,5 horas as relações S/V diferiram estatisticamente entre si e que no tempo de fritura 7,5 horas, a S/V 1,0 cm⁻¹ apresentou alteração, cujo valor foi de 1,6 vezes maior do obtido com a S/V 0,5 cm⁻¹.

O óleo de milho com relação S/V 0,5 cm⁻¹ apresentou valores de compostos polares totais acima do limite estabelecido para descarte de óleos de fritura no tempo 7,5 horas, enquanto que para S/V 1,0 cm⁻¹, apresentou valores acima de 25% a partir de 5,5 horas.

A Tabela 5 apresenta os coeficientes de correlação linear entre o tempo de fritura e as determinações físico-químicas realizadas no óleo de milho refinado utilizado à temperatura de 180°C. Observa-se que o óleo de milho refinado apresentou melhores coeficientes de correlação entre o tempo de fritura com compostos polares totais (0,97 e 0,96) e índice de refração (0,99 e 0,98), para as relações S/V 0,5 e 1,0 cm⁻¹, respectivamente. Para o índice de peróxidos com o tempo de fritura, observou-se que as correlações não foram significativas para ambas as relações S/V.

CONCLUSÕES

O óleo de milho com relação S/V 1,0 cm⁻¹ apresentou maiores alterações quando comparado com S/V 0,5 cm⁻¹.

De acordo com os resultados obtidos pelas análises efetuadas no óleo de milho submetido a frituras de batatas, observou-se que este óleo sofreu alterações ao longo do tempo de fritura.

Considerando o limite de descarte para óleos de fritura de 25% de compostos polares totais, o óleo de milho apresentou valores acima deste limite ao final do processo de fritura, para ambas as relações S/V, devendo ser descartado no tempo de fritura 7,5 horas para S/V 0,5 cm⁻¹ e a partir de 5,5 horas para S/V 1,0 cm⁻¹.

AGRADECIMENTOS

Ao PIBIC/CNPq pela concessão de bolsa de Iniciação Científica e aos Laboratórios da Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile pela realização das análises de cromatografia gasosa.

REFERÊNCIAS

1. AENOR. Asociación Española de Normalización, Norma UNE 55037-73. **Catálogo de Normas UNE**, Madri, 1991.
2. American Oil Chemists' Society. **Official methods and recommended practices of the AOCS**. 3rd. ed. Washington, DC, 1993.
3. Brasil. Resolução nº 482, de 23 de setembro de 1999. Regulamento Técnico para fixação de identidade e qualidade de óleos e gorduras vegetais. **Diário Oficial da União**, Brasília-DF, v. 196. 13 out. 1999. Seção I, p. 82-7.
4. Castang, J. Study of frying oils: analytical characteristics and control project. **J. Ann. Fals. Exp. Chim.**, 74: 701-18, 1981.
5. Cella, R. C. F.; Regitano-D'arce, M. A. B.; Spoto, M. H. F. Comportamento do óleo de soja refinado utilizado em fritura por imersão com alimentos de origem vegetal. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, 22: 111-6, 2002.
6. Cuesta, C. et al. Modificaciones de un aceite de oliva durante las frituras sucesivas de patatas. Correlaciones entre distintos índices analíticos y de evaluación global de la degradación. **Rev. Agroquím. Tecnol. Aliment.**, 31:523-31, 1991.
7. Damy, P. C.; Jorge, N. Determinações físico-químicas do óleo de soja e da gordura vegetal hidrogenada durante o processo de fritura descontínua. **Braz. J. Food Technol.**, 6: 251-7, 2003.
8. Del Ré, P. V. **Comportamento de óleos vegetais em frituras descontínuas de produtos pré-fritos congelados**. São José do Rio Preto, 2003. [Dissertação de Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas - Universidade Estadual Paulista].
9. Del Ré, P. V. et al. Influência da relação superfície/volume em frituras de batata palito. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 62: 213-9, 2003.
10. Dobarganes, M. C.; Pérez-Camino, M. C.; González-Quijano, R. G. Métodos analíticos de aplicación en grasas calentadas. I. Determinación de ésteres metílicos no alterados. **Grasas y Aceites**, 35: 172-7, 1984.
11. Dobarganes, M. C.; Pérez-Camino, M. C.; Márquez-Ruiz, G. Determinación de compuestos polares en aceites y grasas de frituras. **Grasas y Aceites**, 40: 35-8, 1989.
12. Engelsens, S. B. Explorative spectrometric evaluations of frying oil deterioration. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, 74: 1495-508, 1997.

13. Firestone, D.; Stier, R. F.; Blumenthal, M. M. La regulación de los aceites y grasas de fritura. **Alimentaria**, Septiembre: p. 71-76, 1991.
14. Fritsch, C. W. Measurements of frying fat deterioration: a brief review. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, 58: 272-4, 1981.
15. Lopes, M. R. V. **Estudo comparativo entre métodos analíticos tradicionais e testes rápidos utilizados na avaliação da qualidade dos óleos e gorduras de fritura**. São José do Rio Preto, 2002. [Dissertação de Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas – Universidade Estadual Paulista].
16. Malacrida, C. R.; Jorge, N. Alterações do óleo de soja e da mistura azeite de dendê-óleo de soja em frituras descontínuas de batatas *chips*. **Braz. J. Food Technol.**, 6: 245-9, 2003.
17. Masson, L. et al. Fat deterioration in deep fat frying of french fries potatoes at restaurant and food shop sector. **Grasas y Aceites**, 50: 460-8, 1999.
18. Masson, L. et al. Comportamiento de aceites poliinsaturados en la preparación de patatas fritas para consumo inmediato: formación de nuevos compuestos y comparación de métodos analíticos. **Grasas y Aceites**, 48: 273-81, 1997.
19. Melton, S. L. et al. Review of stability measurements for frying oils and fried food flavour. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, 71: 1301-8, 1994.
20. Paul, S.; Mittal, G. S. Regulating the use of degraded oil/fat in deep-fat/oil food frying. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, 37: 635-62, 1997.
21. Gomes, F. P. **Curso de estatística experimental**. 14. ed. Piracicaba: Nobel, 2000. 477 p.
22. Shen, N. et al. Oxidative stability and aromascan analyses of corn oils with altered fatty acid content. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, 76: 1425-9, 1999.
23. Stevenson, S. G.; Vaisey-Genser, M.; Eskin, N. A. M. Quality control in the use of deep frying oils. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, 61: 1102-8, 1984.
24. Takeoka, G. R.; Full, G. H.; Dao, L. T. Effect of heating on the characteristics and chemical composition of selected frying oils and fats. **J. Agric. Food Chem.**, 45: 3244-9, 1997.
25. Tyagi, V. K.; Vasishtha, A. K. Changes in the characteristics and composition of oils during deep-fat frying. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, 73: 499-506, 1996.
26. Walkling, A. E.; Wessels, H. Chromatographic separation of polar and non-polar components of frying fats. **J. Assoc. Offic. Anal. Chem.**, 64: 1329-30, 1981.

Descarte de resíduos de laboratório contendo metais pesados (Hg, Pb, Cd) por adsorção em hidróxido de ferro (III)

Disposal of laboratory waste containing heavy metals (Hg, Pb, Cd) by adsorption on iron (III) hydroxide

RIALA6/977

Jaim LICHTIG^{1*}, Maria de Fátima H. CARVALHO¹, Carmen S. KIRA¹, Franca D. MAIO¹

* Endereço para correspondência: ¹Instituto Adolfo Lutz - Divisão de Bromatologia e Química, Seção de Equipamentos Especializados, Av. Dr. Arnaldo, 355 - Cerqueira César - CEP: 01246-902, São Paulo, SP.

e-mail: jaimlichtig@yahoo.com.br

Recebido 12/04/2004 - aceito para publicação: 28/07/2004

RESUMO.

Para a determinação de metais são frequentemente utilizadas as soluções-padrão de alta concentração (1000 mg/L) de diferentes íons metálicos. A geração de resíduos contendo esses íons acaba sendo inevitável e um correto gerenciamento desses resíduos é necessário a fim de se prevenir e reduzir os riscos à saúde humana e ao meio ambiente. No procedimento proposto os íons Hg(II), Pb(II) e Cd(II), contidos em soluções ácidas, foram co-precipitados com íons Fe(III) 0,10 mol/L em pH 8,5. Após a filtração, o filtrado foi seco ao ar e o sólido foi moído e misturado a uma mistura de cimento/areia (3:1). O procedimento, que consistiu na imobilização dos metais pesados, permitiu que o resíduo pudesse ter um encaminhamento a um aterro de forma segura e eficiente, quanto à preservação da saúde pública e do meio ambiente.

Palavras-Chave. metais tóxicos, imobilização de metais, co-precipitação com Fe(OH)₃, descarte de laboratório.

ABSTRACT

The use of high concentrated standard solutions for the determination of metals has been one of the main reasons for the production of hazardous wastes containing heavy metals in laboratories. To eliminate the environmental problems associated with hazardous waste disposal a correct waste management has been required. In the proposed procedure acid solutions containing metals as Hg(II), Pb(II), Cd(II) were treated with 0.1 mol/L Fe(III) at pH 8.5. The precipitate containing the toxic metals was dried and mixed with cement/sand (3:1). In this procedure, fixation agents react with heavy metals to form a stable and no harmful product that will not leach out in acid solutions, permitting its disposal in a non-hazardous way.

Key Words. heavy metals, immobilization of metals, adsorption on Fe(OH)₃, laboratory wastes.

INTRODUÇÃO

Dentre os diversos ensaios realizados pelo Instituto Adolfo Lutz, a Seção de Equipamentos Especializados da Divisão de Bromatologia e Química é responsável pela determinação de metais em diversas matrizes, como água, alimentos e material biológico. Para a execução dessas análises são utilizadas soluções-padrão de alta concentração de diversos íons metálicos, dentre eles Hg, Pb e Cd. Assim, a geração de resíduos contendo esses metais é inevitável. Em virtude da crescente contaminação ambiental decorrente da disposição inadequada de resíduos perigosos no Brasil, existe uma preocupação em tratar esses resíduos previamente à sua disposição final.

Considerando os riscos que a manipulação de resíduos

pode acarretar à saúde humana e ao meio ambiente, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, ANVISA, publicou em 25/02/2003 a Resolução¹ RDC nº 33, que dispõe sobre o regulamento técnico para o gerenciamento de resíduos de serviços de saúde, que incluem os resíduos gerados em laboratório. Segundo esta resolução, os resíduos que contêm os metais pesados devem ser encaminhados a um aterro sanitário industrial para resíduos perigosos ou submetidos a tratamento de acordo com as orientações do órgão local de meio ambiente. Entretanto, no Brasil não existe até o presente uma regulamentação específica para o tratamento de resíduos de laboratório. A escolha do tipo de tratamento para o resíduo depende de fatores como custo e operação.

Segundo Lindqvist⁴ uma fonte significativa de emissão de metais pesados no ar é a incineração de resíduos. Uma

alternativa para contornar este problema seria a separação prévia desses íons metálicos evitando, portanto o seu lançamento na atmosfera.

Vários são os métodos de disposição de resíduos, podendo-se citar: incineração, imobilização⁷, aterro e armazenamento subterrâneo. Quase todos esses métodos necessitam de um pré-tratamento, cujo objetivo é a redução no volume e da concentração dos resíduos, de tal forma que esses resíduos possam ser estocados ou dispostos sem afetar o meio ambiente⁸. O pré-tratamento envolve a utilização de processos químicos ou biológicos para alterar a forma dos contaminantes metálicos, reduzindo assim sua mobilidade e/ou toxicidade⁶.

A tecnologia de imobilização comumente empregada para tratar os resíduos perigosos consiste na fixação do resíduo tóxico em certos materiais, como o cimento, formando uma massa sólida. O uso do cimento como material ligante foi originalmente empregado na década de 50 a fim de tratar resíduos nucleares. Desde então muitas formulações foram desenvolvidas de acordo com o tipo de resíduo, características dos metais pesados a serem descartados, etc. Como resultado, a utilização de cimento juntamente com outros materiais ligantes, como a cal virgem ou a argila foi enfocada em trabalhos que mostraram a sua aplicação no processo de imobilização⁵.

O método convencional de tratar resíduos que contenham metais consiste na sua precipitação. Normalmente os metais pesados encontram-se dissolvidos em meio ácido e podem precipitar em meio alcalino, como hidróxidos ou sais básicos. Assim, a elevação do pH de uma solução contendo metais deve propiciar a sua precipitação. As partículas geradas na precipitação podem ser pequenas e ficam em suspensão como colóides que geram forças repulsivas e impedem a agregação, exigindo a adição de coagulantes químicos para garantir a eficácia do processo de separação dos íons metálicos por precipitação⁶. Um precipitante químico bastante utilizado é o cloreto de ferro (III) por possuir área de adsorção bastante elevada^{2,3,9}.

O objetivo deste trabalho foi propor um procedimento simples para separar os íons metálicos tóxicos (Hg, Pb, Cd) contidos nos resíduos gerados em laboratório.

MATERIAL E MÉTODOS

Material

Hidróxido de sódio, grau comercial
Cloreto de ferro (III), grau comercial
Sulfato de ferro (III), grau comercial
Papel indicador universal
Papel de filtro qualitativo

Procedimento

O procedimento descrito a seguir deve ser realizado em local com sistema de exaustão, uma vez que se está manuseando soluções ácidas.

Cerca de 8 litros do resíduo de descarte foram colocados

em um recipiente plástico de grande capacidade (15 L). Foi adicionado sulfato (ou cloreto) de ferro (III) sólido, de tal forma que a concentração da solução final ficasse em torno de 0,10 – 0,12 mol/L em ferro (III). O pH desta solução foi ajustado a 8,5, adicionando-se hidróxido de sódio sólido. Esta solução foi agitada por 3 minutos e deixada em repouso por 15 horas, até que o hidróxido de ferro coloidal sedimentasse. Após esse tempo, a solução foi filtrada em papel de filtro qualitativo. O filtrado foi então neutralizado e descartado.

O precipitado recolhido foi seco ao ar, moído e adicionado a uma mistura de cimento e areia (proporção 3:1). A proporção do resíduo sólido moído em relação à mistura de cimento e areia foi de 1:10.

Após a secagem completa da mistura de cimento esta foi disposta em aterro.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A primeira etapa do processo para a imobilização dos íons metálicos consistiu na separação desses íons por adsorção em precipitado de hidróxido de ferro (III). A elevada área de adsorção do hidróxido de ferro (III) permite que os hidróxidos de Hg (II), Cd (II) e Pb (II) sejam adsorvidos sobre ele.

A precipitação de $\text{Fe}(\text{OH})_3$ em pH 8,5 é ideal para a adsorção dos hidróxidos dos metais pesados, pois nesse pH ocorre a neutralização do colóide do $\text{Fe}(\text{OH})_3$ no seu ponto isoelétrico, ocorrendo a aglutinação das partículas de $\text{Fe}(\text{OH})_3$ com conseqüente precipitação. Apesar do $\text{Fe}(\text{OH})_3$ começar a precipitar em pH 3,0, boa parte do mesmo permanece no estado coloidal na precipitação com pH entre 3,0 e 8,0. Assim, em pH abaixo de 8,5 não há certeza da adsorção total dos hidróxidos dos metais tóxicos sobre o $\text{Fe}(\text{OH})_3$, pois grande parte do $\text{Fe}(\text{OH})_3$ permanece no estado coloidal, sem aglutinação. A precipitação do hidróxido de ferro, que durou cerca de 15 horas, pode ser agilizada com uso de aquecimento. Neste caso uma ebulição de 2 horas seriam suficientes para precipitar quantitativamente o $\text{Fe}(\text{OH})_3$.

Estudos previamente realizados mostraram que soluções contendo Fe (III) na concentração de 0,1 mol/L e Hg (II), Cd (II) e Pb (II) com concentração de 20 mg/L cada uma, com a subseqüente precipitação de hidróxido de ferro (III) em pH 8,5, resultaram em concentrações desses íons tóxicos na solução filtrada abaixo de 2 ¼g/L. Estas concentrações foram determinadas utilizando-se a técnica de voltametria de redissolução anódica (stripping).

O tratamento do cimento seco com ácido acético a 3% não provocou a solubilização dos íons metálicos imobilizados, o que garante que a chuva ácida não tem efeito sobre a redissolução destes metais.

Uma outra forma de separação dos íons metálicos seria por precipitação destes com o uso de gás sulfídrico. O gás sulfídrico, à quente, precipita quantitativamente, em meio ácido, os sulfetos de mercúrio, cádmio e chumbo. Em virtude da

insalubridade gerada em laboratório pela manipulação de H_2S , este procedimento foi descartado¹⁰. Uma precipitação dos metais em questão, em meio alcalino, com Na_2S não é recomendável pois ocorre a formação dos sulfetos em suspensão coloidal, misturados aos hidróxidos de Hg, Cd e Pb, o que torna a filtração extremamente dificultada.

Outra vantagem do procedimento proposto é a possibilidade de utilização de reagentes de grau comercial, que minimizam o custo do laboratório na aplicação deste processo.

Este procedimento é aplicável à imobilização de íons mercúrio na forma inorgânica. Assim, se o mercúrio estiver na forma orgânica, como metil-mercúrio ou dimetil-mercúrio, há a necessidade de se adicionar primeiramente permanganato de potássio sólido e, a seguir, aplicar o procedimento descrito. Íons permanganato oxidam o cloreto de metil-mercúrio e o dimetil-mercúrio, em meio ácido.

CONCLUSÃO

O procedimento proposto é de fácil operação e utiliza reagentes de baixo custo. Além disso, é uma boa alternativa à utilização do gás sulfídrico para separação dos íons metálicos.

O processo realizado permitiu que o resíduo de descarte após esse tratamento pudesse ter um encaminhamento seguro, de forma eficiente visando à proteção e preservação da saúde pública, dos recursos naturais e do meio ambiente.

REFERÊNCIAS

1. Brasil. Resolução RDC nº 33, de 25 de fevereiro de 2003 – Diário Oficial da União, Brasília. 05 de março de 2003. Regulamento técnico para o gerenciamento de resíduos de serviços de saúde. Disponível em http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/rdc/33_03rdc.htm. Acessado em 01/04/04.
2. Kolthoff, I.M.; Sandell, E.B. **Tratado de Química Analítica Quantitativa**, Libreria y Editora Nigar, Buenos Aires, Argentina; 1956. 856p.
3. Lehmann, M.; Zouboulis, A. I.; Matis, K. A. Removal of metal ions from dilute aqueous solutions: a comparative study of inorganic sorbent materials. **Chemosphere**, 39(6): 881-92, 1999
4. Lindqvist, O. Environmental impact of mercury and other heavy metals. **Journal of Power Sources**, 57: 3-7, 1995.
5. Park, Choon-Keun. Hydration and solidification of hazardous wastes containing heavy metals using modified cementitious materials. **Cement and concrete research**, 30: 429-35, 2000.
6. Pedroso, M. F. M. Gerenciamento dos resíduos. In: Azevedo, F. A.; Chasin, A. A. M. , editors. **Metais. Gerenciamento da toxicidade**. São Paulo, Rio de Janeiro, Ribeirão Preto, Belo Horizonte: Editora Atheneu; 2003. p. 493-511.
7. Pereira, C. F.; Rodriguez-Pinero, M.; Vale, J. Solidification/stabilization of electric arc furnace dust using coal fly ash. Analysis of the stabilization process. **Journal of Hazardous Material**, B82: 183-95, 2001.
8. Visvanathan, C. Hazardous waste disposal. **Research, conservation and recycling**, 16:201-12, 1996.
9. Vogel, A.I. **Análise Inorgânica Quantitativa**, Quarta Edição, Editora Guanabara Dois; 1981. 638p.
10. Vogel, A.I. **Química Analítica Qualitativa**, Editora Mestre Jou-SP; 1981. 598p.

Testes rápidos utilizados na avaliação da qualidade de óleos e gorduras de fritura

Rapid tests for evaluating the quality of fats and oils used in frying process

RIALA6/978

Maria do Rosário Vigeta LOPES¹, Neuza JORGE^{2*}

¹ Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos – Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista.

^{2*} Endereço para correspondência: Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos, IBILCE – UNESP, Rua Cristóvão Colombo, 2265, Jardim Nazareth, CEP 15054-000, São José do Rio Preto-SP, Fax: 55 17 221 2299, e-mail: njorge@eta.ibilce.unesp.br

Recebido: 13/06/2003 – Aceito para publicação: 01/09/2004

RESUMO

Os objetivos foram determinar os níveis de alteração de 58 amostras de óleos e gorduras utilizadas em processos de fritura de estabelecimentos comerciais, e avaliar a confiabilidade dos seguintes testes rápidos: ensaio de Perevalov, Oil Test, Monitor de Gordura 3M e ensaio de Solubilidade em Acetona-Metanol. Para isto, foram empregados os métodos analíticos de determinação de compostos polares totais e de ácidos graxos livres, e em estudo comparativo com estes métodos, foram aplicados os testes rápidos acima mencionados. O conjunto de reagentes de Oil Test e o Monitor de Gordura 3M foram adquiridos comercialmente e os outros dois foram realizados com reagentes preparados no laboratório. Das 58 amostras analisadas, foram encontrados 20,7% e 15,5% com teores de compostos polares e ácidos graxos livres, respectivamente, superiores aos limites estabelecidos em legislações internacionais para óleos e gorduras de fritura. Já os testes rápidos apresentaram resultados corretos em 67,2% para o ensaio de Perevalov; 87,9% quando utilizado o kit Oil Test; 75,9% para o Monitor de Gordura 3M e 62,1% para o ensaio de Solubilidade, quando comparados com o limite estabelecido para compostos polares totais. O Oil Test foi o que apresentou melhor coeficiente de correlação com o teor de compostos polares totais (0,86) e menor ocorrência de resultados falsos (12,1%), quando comparado com os testes de Perevalov e Monitor de Gordura 3M.

Palavras-Chave. testes rápidos, óleos e gorduras, fritura, controle de qualidade.

ABSTRACT

The objectives were to determine the level of alteration of 58 fats and oils samples used from frying processes in commercial establishments, and to study the reliability of the following rapid tests: Perevalov assay, Oil Test, Fat Monitor 3M, and Solubility assay in Ketone-Methanol. To accomplish this study, some methodologies have been employed, such as: the determination of total polar compounds and the determination of free fatty acids. In a parallel comparative study, the rapid tests were carried out. Oil Test and Fat Monitor 3M assays purchased from the local market, and Perevalov assay and Solubility test in Ketone-Methanol were prepared in our laboratory. Among the 58 analyzed samples, 20.7% and 15.5% resulted in concentrations of total polar compounds and of free fatty-acids, respectively, above the limits established for fats and oils for frying purposes. The rapid tests have shown the following rate of accurate results: 67.2% on Perevalov assay; 87.9% on Oil Test kit; 75.9% on Fat Monitor 3M assay; and 62.1% on Solubility assay, when compared with the limit established for total polar compounds. Oil Test demonstrated the best correlation coefficient regarding the total polar compounds (0.86%), and it has also presented a minor occurrence of false results (12.1%) when compared with Perevalov assay and Fat Monitor 3M.

Key Words. rapid tests, fats and oils, frying process, quality control.

INTRODUÇÃO

Diversos tipos de alimentos são fritos em diferentes tipos de óleo, em variadas condições de operação e vários tipos de fritadeira. A junção de todas essas variáveis determina a taxa em que as reações de degradação ocorrem, impossibilitando encontrar um método analítico que seja eficiente em qualquer processo de fritura⁷.

A eficiência do controle de qualidade dos óleos empregados em frituras reside na existência de métodos analíticos objetivos e compatíveis com as necessidades do analista ou do usuário. Vários são os métodos analíticos oficiais utilizados em laboratório que podem avaliar a qualidade dos óleos de fritura, sendo os dois mais recomendados internacionalmente por legislação: a determinação de compostos polares totais e a determinação de substâncias de polimerização⁴. Todavia, o setor de preparação de produtos fritos de consumo imediato e os restaurantes necessitam de provas rápidas que avaliam, eficazmente, a qualidade do óleo em uso, já que estes locais não dispõem de condições existentes em um laboratório de análise e também pela constante modificação da alteração do óleo em frituras.

Além disso, os critérios normalmente utilizados por tais estabelecimentos para descartar os óleos como cor, formação de espuma, tempo de uso e mau aspecto dos produtos fritos não são suficientes para caracterizar o óleo como inadequado para o uso¹⁰.

Nestes estabelecimentos, podem ocorrer abusos involuntários na reutilização do óleo devido à falta de correlação entre estes critérios e a porcentagem de compostos polares, que são substâncias provenientes da alteração que pode ocorrer em óleos e gorduras submetidos a processos de fritura⁴.

Um fator relevante que deve ser levado em consideração seria a introdução de testes rápidos de controle, que são realizados *in situ* tanto pelo usuário como pelos serviços de inspeção sanitária, que podem ser de grande utilidade para verificar e melhorar a qualidade dos óleos de fritura.

Em busca de soluções para estes problemas, vários testes rápidos foram desenvolvidos e estão sendo comercializados trazendo meios mais ágeis e menos subjetivos de controlar a reutilização do óleo de fritura.

Um último aspecto a ser considerado seria a capacidade destes testes em substituir os métodos oficiais onde não haja a infra-estrutura de um laboratório.

Este trabalho teve como objetivos determinar os níveis de alteração de óleos e gorduras em diversos estabelecimentos comerciais e verificar a confiabilidade de quatro testes rápidos: o kit Oil Test e o Monitor de Gordura 3M, adquiridos comercialmente, o ensaio de Perevalov e o teste de Solubilidade em Acetona-Metanol, realizados com reagentes preparados em laboratório.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras

Foram coletadas 58 amostras de óleos e gorduras de frituras em estabelecimentos comerciais como: barracas e feiras

livres, cadeias de *fast food*, lanchonetes e pastelarias, restaurantes e cozinhas industriais, de diferentes pontos da cidade de São José do Rio Preto-SP, sendo uma amostra de cada estabelecimento.

As amostras foram coletadas durante o processo, ou seja, se encontravam em uso. Depois de coletadas, as amostras foram conservadas em *freezer* em frascos de vidro de cor âmbar à temperatura aproximada de -20°C , sendo descongeladas imediatamente antes de serem analisadas.

Determinações analíticas

Ensaio de Perevalov. É a prova rápida clássica realizada nos laboratórios como método de discriminação entre amostras com alto e baixo nível de alteração³. O procedimento prático consiste em misturar 1,5 mL de óleo e/ou gordura em 3,5 mL de uma mistura a 2% de NaOH em álcool benzílico e n-propanol (1:3), agitando ligeiramente a mistura. A seguir, adiciona-se 0,11 mL de uma solução a 0,1% de azul de bromotimol em dioxano, que contém 1% de quantidades equimolares de trietanolamina e ácido acético glacial. Depois de agitar a mistura, observa-se a coloração que aparece nos primeiros 2 minutos. A evolução da cor está diretamente relacionada com o estado de oxidação do óleo e/ou gordura e permite ter uma impressão rápida do nível de alteração da amostra, ou seja, a base deste ensaio é a modificação da cor de um indicador redox quando a quantidade de compostos de oxidação é aumentada. As cores apresentadas, após a reação, correspondem à classificação dada ao estado em que o óleo se encontra, segundo uma escala de cores, conforme Tabela 1.

Ensaio kit Oil Test. O kit Oil Test trata-se de um teste rápido colorimétrico que está sendo comercializado no mercado brasileiro pela Policontrol em parceria com o Núcleo de Aplicação e Tecnologia em Alimentação (NATA), para monitorar a qualidade de óleos ou gorduras de fritura em restaurantes, lanchonetes, pastelarias, etc. Seu princípio se baseia na avaliação das alterações da acidez e na formação de peróxidos, de modo conjunto¹¹. O *kit* consta de três reativos: os reativos 1 e 2 são misturados em um tubo, a seguir adiciona-se o óleo quente, agita-se e adiciona-se o reativo 3 e repete-se a agitação. Após três minutos de repouso, a cor obtida é comparada com a escala de cores que indica o nível de alteração da amostra de óleo (Tabela 1).

Monitor de Gordura 3M. O Monitor de Gordura 3M, produto distribuído por 3M do Brasil Ltda., é uma fita de papel com quatro faixas azuis numeradas, que mudam da cor azul para o amarelo à medida que a concentração de ácidos graxos livres aumenta no meio de fritura (Tabela 1). É usado mergulhando-se a fita de papel, não tóxico, dentro da gordura à temperatura do processo, até que todas as quatro faixas azuis estejam submersas.

A Tabela 1 indica as mudanças de cores características das três provas colorimétricas utilizadas, com indicação dos valores correspondentes ao descarte da amostra.

Ensaio de Solubilidade em Acetona-Metanol. Trata-se de um ensaio simples baseado na baixa solubilidade dos

Tabela 1. Escala para a avaliação da cor nos ensaios colorimétricos.

Perevalov	Oil Test	Monitor de Gordura 3M	
		Faixas Amarelas	A.GL. (%)
1. Azul	1. Azul	1	2
2. Azul-verde	2. Azul-verde	2	3,5*
3. Verde-azul	3. Verde*	3	5,5
4. Verde*	4. Verde-oliva	4	7
5. Verde-oliva			
6. Oliva			
7. Oliva-marrom			
8. Marrom-avermelhado			

A.GL.: Ácidos Graxos Livres

* Valor a partir do qual deve ser descartada a amostra.

compostos de polimerização na mistura acetona-metanol (90:10) à baixa temperatura¹⁵. O procedimento consiste em pesar 1 grama de amostra e dissolvê-la em 20 mL de solução acetona-metanol, agitar e deixar por 12 horas em baixa temperatura (4 - 6°C). O aparecimento de um precipitado amarelo corresponde a compostos de polimerização e indica a necessidade de descartar o óleo.

Determinação quantitativa dos compostos polares totais. A determinação de compostos polares totais, mediante cromatografia em coluna, foi obtida conforme o método proposto Dobarganes et al.⁵.

Determinação de ácidos graxos livres. A porcentagem de ácidos graxos livres foi expressa em ácido oléico. Foi utilizado o método AOCS Cd 3d-63 (1993)¹.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 2 apresenta os resultados obtidos para os quatro testes rápidos e para as porcentagens de compostos polares e de ácidos graxos livres.

Conforme revisão de leis e regulamentações adotadas por alguns países, realizada por Firestone et al.⁶, a maioria deles adota as seguintes limitações: 1 - 2,5% para ácidos graxos livres e 24 - 27% para compostos polares totais. Neste trabalho foram adotadas como limitações 1% e 25% para ácidos graxos livres e compostos polares totais, respectivamente.

Pela Tabela 2, observa-se que 12 (20,7%) amostras se encontraram acima do limite para compostos polares e 9 (15,5%) apresentaram teores de ácidos graxos livres acima de 1%, totalizando 16 (27,6%) amostras com pelo menos um parâmetro em desacordo com os limites adotados para o presente estudo. Por outro lado, os resultados indicam que 42 (72,4%) das amostras se encontravam em condições de serem reutilizadas.

A Tabela 3 apresenta valores para compostos polares totais, obtidos através do método da IUPAC (1982)⁹, em óleos de fritura de diversos países. Estes valores mostram porcentagens maiores de amostras com valores de compostos

polares acima de 25% comparadas à obtida neste trabalho (20,7%).

Em trabalho similar, Dobarganes e Márquez-Ruiz³ estudaram a validade de métodos rápidos para substituição da determinação de compostos polares por métodos rápidos, também verificaram que estes métodos não estão isentos de erros. Segundo estes mesmos autores, os resultados falsos podem ser de dois tipos:

a - Resultados falsos negativos, representados pela letra *a*. O teste falso negativo indica que não é necessário descartar o óleo ou a gordura, mas a porcentagem de compostos polares é maior que 25%. Neste caso, o usuário estaria consumindo óleo em desacordo por estar acima do limite recomendado.

b - Resultados falsos positivos, representados pela letra *b*. A prova falsa positiva indica que é necessário descartar o óleo, mas a porcentagem de compostos polares se encontra abaixo de 25%. Na prática, o usuário estaria descartando o óleo que ainda poderia ser utilizado.

A Tabela 4 apresenta os valores obtidos de compostos polares em função dos testes rápidos, evidenciando o número e as porcentagens de amostras nas diferentes condições e níveis de alterações reveladas através das provas rápidas.

Os resultados mostraram que, em média, os valores obtidos mediante as provas rápidas aumentaram de forma direta com a quantidade de compostos polares. Das 58 amostras analisadas, deveriam ser descartadas: 53,4% pelo teste de Perevalov; 25,9% pelo kit Oil Test; 62,0% pelo Monitor de Gordura 3M. E das 40 amostras analisadas, 35,0% deveriam ser descartadas pelo teste de Solubilidade.

É importante destacar que o Monitor de Gordura 3M associa a degradação da gordura com a concentração de ácidos graxos livres. E, segundo Paul e Mittal¹², muitas vezes, concentrações baixas de ácidos graxos livres pode significar que o óleo esteja em estado avançado de degradação e que os ácidos graxos que porventura tenham se formado num estágio inicial de quebra da gordura, por hidrólise, já tenham sido oxidados em estágios posteriores, com a reutilização do óleo.

Tabela 2. Resultados obtidos de testes rápidos, de determinações de compostos polares e ácidos graxos livres para as 58 amostras de óleos e gorduras de fritura.

Amostras	Perevalov*	Oil Test*	3M**	Solubilidade	C.P.T. (%)	A.G.L. (%)
1	1	1	0	-	5,40	0,11
2	1	1	0	-	7,51	0,11
3	4	3	1a	+	35,83	0,38
4	5	3	1a	+	37,99	0,39
5	2	2	1	TG	6,40	0,22
6	5	3	1a	+	31,50	0,39
7	6b	3b	4b	+b	21,77	4,49
8	2	2	0	TG	11,55	0,33
9	2	1	1	-	6,00	0,19
10	4b	2	1	-	24,22	0,57
11	1	1	0	-	10,18	0,17
12	4b	2	1	-	22,47	0,49
13	6b	3b	1	-	20,95	0,43
14	6	4	2	+	45,69	1,40
15	4b	2	0	-	15,82	0,30
16	1	1	0	-	11,73	0,20
17	1	1	0	-	11,70	0,19
18	1	1	0	-	11,74	0,26
19	2	1	1	-	12,31	0,37
20	2	1	0	-	10,19	0,25
21	4b	2	0	-	10,68	0,32
22	2	1	0	TG	5,26	0,35
23	1	1	0	-	7,30	0,17
24	1	1	0	-	7,02	0,21
25	5b	3b	1	-	22,40	0,65
26	4b	2	1	-	14,10	0,47
27	5b	2	2b	TG	18,87	2,21
28	4b	2	2b	TG	15,14	1,48
29	4b	3b	3b	TG	20,98	3,39
30	4b	1	0	TG	6,44	0,20
31	1	1	0	TG	5,26	0,17
32	3	2	0	TG	12,34	0,35
33	4b	2	1	+b	13,10	0,59
34	4b	3b	1	TG	20,73	0,59
35	6	4	2	+	34,25	1,50
36	6	4	2	+	31,14	3,33
37	2	1	1	TG	6,90	0,34
38	4b	2	1	-	18,16	0,51
39	4	3	1a	+	25,82	0,55
40	4b	2	1	+b	22,78	0,46
41	1	1	0	-	8,26	0,17
42	2	2	1	TG	3,91	0,44
43	3	1	1	TG	9,40	0,34
44	1	1	1	-	6,56	0,38
45	2	1	2b	TG	11,05	0,22
46	4b	2	1	TG	19,75	0,34
47	4	3	1a	+	25,30	0,45
48	4	2a	1a	-a	31,83	0,42
49	2	1	0	TG	11,20	0,28
50	1	1	0	TG	6,85	0,20
51	1	1	0	-	8,77	0,17
52	4b	2	1	TG	17,26	0,30
53	4b	2	2b	-	20,98	0,59
54	1	1	0	-	5,00	0,17
55	2	1	0	-	12,37	0,37
56	4	2a	1a	+	27,36	0,55
57	5	3	1a	+	35,81	1,38
58	6	4	2	+	38,01	1,59

* Número correspondente à cor observada; ** Número de faixas amarelas; C.P.T.: Compostos Polares Totais; A.G.L.: Ácidos Grassos Livres; TG: Precipitado contendo triglicerídios saturados; +: Resultado positivo; -: Resultado negativo; a: Falso negativo; b: Falso positivo.

A fim de analisar a confiabilidade deste teste foi estabelecido valor máximo de 1% para ácidos graxos livres, por ser o limite mais rigoroso adotado pela legislação de alguns países para óleos de fritura^{4,6}.

A Tabela 5 apresenta uma avaliação da confiabilidade das provas rápidas utilizadas onde se encontram os números de resultados corretos, de falsos positivos e de falsos negativos com suas respectivas porcentagens. Como se pode observar, foram obtidas as seguintes porcentagens de resultados corretos: 67,2% para o ensaio de Perevalov; 87,9% utilizando o kit Oil Test; 75,9% para o Monitor de Gordura 3M e 62,1% para o ensaio de Solubilidade.

Os resultados obtidos indicaram que, com relação aos erros, os falsos positivos foram os mais encontrados. O ensaio de Perevalov apresentou 32,8% de resultados falsos positivos e foi o que apresentou a maior porcentagem de resultados falsos (32,8%). Os ensaios com o kit Oil Test, Monitor de Gordura 3M e Solubilidade apresentaram 8,6%; 10,3% e 5,2% de resultados falsos positivos, respectivamente.

Com relação à aplicação dos testes utilizados, o teste de Solubilidade está limitado aos óleos que contenham triglicerídios insolúveis na mistura de solventes (acetona-metanol) e que se precipitam à temperatura de 4 - 6°C.

Tabela 3. Resultados comparativos de compostos polares totais com estudos similares realizados por vários autores.

Autores	Nº de Amostras	C.P.T. (%) Mín. – Máx.	Amostras C.P.T. > 25%
Croon <i>et al.</i> ³	100	1 – 55	38 (38,0)
Gertz ¹⁰	125	5,8 - 57,7	44 (35,2)
Sebédio <i>et al.</i> ¹⁸	31	8,2 - 54,6	15 (48,4)
Dobarganes e Márquez-Ruiz ⁴	174	3,1 - 61,4	60 (34,5)
Skrötkki ¹⁹	20	7,7 - 55,8	12 (60,0)

C.P.T.: Compostos Polares Totais.

Os valores entre parênteses são porcentagens sobre o total de amostras analisadas.

Tabela 4. Valores, em porcentagem, de compostos polares correlacionados com os testes rápidos utilizados.

Testes Rápidos	Nº. de Amostras**	Valor Médio	Valor Mínimo	Valor Máximo	Desvio Padrão
Perevalov					
1. Azul	14 (24,1)	8,1	5,0	11,7	2,4
2. Azul-verde	11 (19,0)	8,8	3,9	12,4	3,1
3. Verde-azul	2 (3,5)	10,9	9,4	12,3	2,1
4. Verde ^(Trocar)	20 (34,5)	18,1	6,4	35,8	8,0
5. Verde-oliva	5 (8,6)	29,3	18,9	38,0	8,35
6. Oliva	6 (10,3)	32,0	21,8	45,7	9,6
Oil Test					
1. Azul	24 (41,4)	5,5	5,0	12,4	2,5
2. Azul-verde	19 (32,7)	17,2	3,9	31,8	7,0
3. Verde ^(Trocar)	11 (19,0)	27,2	20,7	38,0	6,8
4. Verde-oliva	4 (6,9)	37,3	31,1	45,7	6,3
Monitor 3M⁽¹⁾					
0	22 (37,9)	9,2	5,0	15,8	3,0
1. (2,0)	26 (44,8)	20,0	3,9	38,0	10,0
2. (3,5) ^(Trocar)	8 (13,8)	26,9	11,0	45,7	12,2
3. (5,5)	1 (1,7)	-	-	-	-
4. (7,0)	1 (1,7)	-	-	-	-
Solubilidade*					
- (negativo)	26 (65,0)	12,5	5,0	24,2	5,9
+ (positivo)	14 (35,0)	31,1	13,1	45,7	8,1

** Valores entre parênteses representam a porcentagem em relação ao total de amostras analisadas.

* 18 amostras não puderam ser analisadas por conter triglicerídios que precipitaram à temperatura do teste.

⁽¹⁾ Número de faixas amarelas observadas e entre parênteses o valor obtido, em porcentagem, de ácidos graxos livres.

Tabela 5. Avaliação da confiabilidade dos testes rápidos utilizados.

Total	Perevalov	Oil Test	Monitor 3M	Solubilidade*
	58 (100)	58 (100)	58 (100)	58 (100)
Resultados Corretos	39 (67,2)	51 (87,9)	44 (75,9)	36 (62,1)
C.P. > 25%	12 (20,7)	10 (17,2)	4 (6,9)	11 (19,0)
C.P. < 25%	27 (46,5)	41 (70,7)	40 (69,0)	25 (43,1)
Resultados Falsos	19 (32,8)	7 (12,1)	14 (24,1)	4 (6,9)
C.P. > 25% (falso -)	0 (0,0)	2 (3,5)	8 (13,8)	1 (1,7)
C.P. < 25% (falso +)	19 (32,8)	5 (8,6)	6 (10,3)	3 (5,2)

Os valores entre parênteses são porcentagens sobre o total de amostras analisadas.

* 18 amostras não puderam ser avaliadas por conter triglicerídios que se precipitaram à temperatura do ensaio.

C.P.: Compostos Polares.

Tabela 6. Resultados falsos obtidos para diferentes faixas de valores, em porcentagem, de compostos polares.

Resultados Falsos	Perevalov	Oil Test	Monitor 3M	Solubilidade
Totais	19 (32,8)	7 (12,1)	14 (24,1)	4 (6,9)
C.P. < 20%	10 (17,3)	0	3 (5,2)	1 (1,7)
20% < C.P. < 25%	9 (15,5)	5 (8,7)	3 (5,2)	2 (3,5)
25% < C.P. < 30%	0	1 (1,7)	3 (5,2)	0
C.P. > 30%	0	1 (1,7)	5 (8,6)	1 (1,7)

Os valores entre parênteses são porcentagens sobre o total de amostras analisadas.

C.P.: Compostos Polares.

Do total de 58 amostras analisadas observa-se, na Tabela 2, que 18 (31,0%) amostras continham triglicerídios saturados que precipitaram com os polímeros, não tendo sido possível deduzir nenhuma conclusão. Isto significa que o teste não seria indicado para aplicação em estabelecimentos que utilizem gorduras para fritar ou que introduzam no banho de fritura produtos pré-fritos em gorduras saturadas que, durante o processo de fritura, são diluídas no banho. Em estudos anteriores^{3,10,13} foram encontrados resultados semelhantes.

Os testes colorimétricos apresentam a desvantagem de sofrer interferência da cor, principalmente quando produtos pigmentados são fritos nos óleos e ou gorduras, ocorrendo a solubilização de pigmentos dos alimentos para o óleo durante o processo de fritura. Frequentemente, tais compostos não estão relacionados com a alteração do óleo, podendo interferir nos resultados obtidos com estes testes².

Na Tabela 6, encontra-se a distribuição dos erros em diferentes intervalos de concentração de compostos polares. Os resultados indicam o número total de resultados falsos obtidos para os quatro testes rápidos e, entre parênteses suas porcentagens sobre o total de amostras analisadas.

O ensaio de Perevalov apresentou maior ocorrência de resultados falsos para amostras que continham teor de compostos polares totais abaixo de 20% e nenhuma ocorrência

de resultados falsos para amostras com teores de compostos polares acima de 25%.

O kit Oil Test mostrou maior ocorrência de resultados falsos no intervalo de 20 a 25%.

Já, o Monitor de Gordura 3M, apresentou porcentagem de erros distribuída em todas as faixas, mas a incidência maior foi para a faixa acima de 30% de compostos polares. Isto se deveu, provavelmente, ao fato de que acima de 25% de compostos polares os ácidos graxos livres poderiam ter se oxidado.

Quanto à distribuição dos erros para o teste de Solubilidade, observou-se uma maior concentração de resultados falsos para o intervalo de 20 a 25% de compostos polares.

Os coeficientes de correlação entre os métodos analíticos tradicionais utilizados e os testes rápidos podem ser observados na Tabela 7.

Em geral, foram encontradas boas correlações entre os testes rápidos e a determinação de compostos polares. Os melhores coeficientes de correlação foram obtidos entre os testes de Perevalov e kit Oil Test com compostos polares, cujos valores encontrados foram 0,81 e 0,86, respectivamente.

Com relação ao Monitor de Gordura 3M, observou-se bons coeficientes de correlação com a porcentagem de compostos polares (0,74) e com a porcentagem de ácidos graxos livres (0,72).

Tabela 7. Coeficientes de correlação entre os métodos analíticos e os testes rápidos.

	Compostos Polares	Ácidos Graxos
	Totais	Livres
Perevalov	0,81	0,59
Oil Test	0,86	0,58
Monitor 3M	0,74	0,72
Solubilidade	0,75	0,53

Valor similar de coeficiente de correlação foi encontrado entre o teste de Solubilidade e compostos polares (0,75).

A literatura consultada^{4,10,14} e este trabalho mostram boas correlações entre os ensaios rápidos e o método padrão de compostos polares demonstrando ser os métodos rápidos muito adequados para o controle de qualidade de alimentos fritos no setor de restaurantes e de produção de alimentos para consumo imediato.

Pérez-Camino et al.¹⁴ encontraram um bom coeficiente de correlação entre a porcentagem de compostos polares e prova de Perevalov (0,89) ressaltando sua importância como medida de utilidade para controlar a qualidade do óleo ou gordura durante o uso.

Em resumo, pode-se concluir que ainda é inevitável um número mínimo de erros nestes testes rápidos. Porém, com a utilização conjunta de dois ou mais testes rápidos como ensaio de Perevalov, kit Oil Test, ensaio de Solubilidade e Monitor 3M, se conseguiria uma melhoria na qualidade dos óleos ou gorduras de frituras.

Segundo González-Quijano e Dobarganes⁸, o emprego de provas rápidas na avaliação de óleos e gorduras de fritura é útil, pois permite conclusões mais rápidas com relação ao momento em que é necessário descartar o óleo, além de tornar possível o seu uso por pessoal não especializado (donas de casa, usuários de fritadeiras de restaurantes, lanchonetes, pastelarias, etc).

Visto não existir uma legislação no Brasil, em nível federal, que estabeleça os níveis máximos de alterações em óleos e gorduras de fritura, a aplicação de testes colorimétricos rápidos, como o kit Oil Test ou o Monitor de Gordura 3M, seria um bom começo para que as autoridades competentes se conscientizem da necessidade de estabelecer Normas e Padrões de Qualidade para óleos e gorduras de fritura.

CONCLUSÕES

O kit Oil Test foi o que apresentou melhor coeficiente de correlação com o teor de compostos polares totais (0,86) e menor ocorrência de resultados falsos (12,1%), quando comparado com os testes de Perevalov e Monitor de Gordura 3M, sendo, portanto, o mais recomendado.

A aplicação dos testes rápidos poderia ser recomendada não só por usuários de processos de frituras descontínuos, como também pelos Serviços de Inspeção Sanitária o que contribuiria para decidir o momento mais adequado para se descartar o óleo.

Mesmo que um certo número de resultados falsos não possa ainda ser evitado, o uso das, pelo menos, duas provas rápidas comerciais poderia proporcionar uma melhoria na qualidade dos óleos de fritura de pequenos estabelecimentos como barracas e feiras livres, lanchonetes, pastelarias, restaurantes e cozinhas industriais, que não dispõem de uma estrutura laboratorial.

Do total de amostras analisadas, 20,7% encontraram-se acima do limite para compostos polares totais e 15,5% apresentaram teores de ácidos graxos livres acima de 1%.

REFERÊNCIAS

1. American Oil Chemist's Society. **Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society**. 3 ed. Champaign, 1993.
2. Blumenthal, M. M. Frying research provides new perspectives. **Hornblower**, p. 78-82, Apr/May, 1988.
3. Dobarganes, M. C.; Márquez-Ruiz, G. Control de calidad de las grasas de fritura. Validez de los métodos de ensayos rápidos en substitución de la determinación de compuestos polares. **Grasas y Aceites**, 46 (3): 196-201, 1995.
4. Dobarganes, M. C.; Márquez-Ruiz, G. Regulation of used frying fats and validity of quick tests for discarding the fats. **Grasas y Aceites**, 49 (3-4): 331-5, 1998.
5. Dobarganes, M. C.; Velasco, J.; Dieffenbacher, A. Determination of polar compounds, polymerized and oxidized triacylglycerols, and diacylglycerols in oils and fats. **Pure Appl. Chem.**, 72 (8): 1563-75, 2000.
6. Firestone, D.; Stier, R. F.; Blumenthal, M. M. Regulation of frying fats and oils. **Food Technology**, 45 (2): 90-4, 1991.
7. Fritsch, C. W. Measurement of frying fat deterioration. A brief review. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, 58 (3): 272-4, 1981.
8. González-Quijano, R. G.; Dobarganes, M. C. Analytical procedures for the evaluation of used frying fats. In: Varela, G.; Bender, A. E.; Morton, I. A. editor **Frying foods: principles, changes, new approaches**. Chichester: Ellis Horwood; 1988. p. 141-54.
9. IUPAC-AOAC. Polar compounds in frying fats. In: **International Union of Pure and Applied Chemistry. Standard method of oils, fats and derivatives**. Oxford: Blackwell Scientific Publications; method 2507; 1982.
10. Mattos, E. S.; Ans, V. G.; Jorge, N. Utilização do kit Oil Test para avaliação da alteração dos óleos de fritura. **Higiene Alimentar**, 11 (75): 40-7, 2000.
11. Oil Test: **Avaliação de óleos e gorduras. Policontrol Instrumentos de Controle Ambiental**, 1993. p. 1-38.
12. Paul, S.; Mittal, G. S. Regulating the use of degraded oil/fat in deep-fat/oil food frying. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 37 (7): 635-62, 1997.
13. Pérez-Camino, M. C. et al. Lipid changes during frying of frozen prefried foods. **J. Food Sci.**, 56: 1644-7, 1991.
14. Pérez-Camino, M. C. et al. Alteración de grasas usadas en fritura. III. Correlación entre índices analíticos y métodos de evaluación directa de compuestos de degradación. **Grasas y Aceites**, 39 (2): 72-6, 1988.
15. Tasioula-Margari, M.; Komaitis, M.; Kontominas, M. G. Investigation by fractional crystallization of classes of compounds formed during frying of vegetable oils. **Food Chem.**, 36: 295-304, 1990.

Avaliação da qualidade sensorial de batata frita, óleo de soja e gordura parcialmente hidrogenada de soja em tempos de fritura variáveis¹

Sensory quality evaluation of French fries, soy oil, and partially hydrogenated soy fat at variable length of frying time

RIALA6/979

Elaine Abrão Assef SANIBAL^{2*}, Maria Auxiliadora de Brito RODAS³, Jussara Carvalho de Moura DELLA TORRE³, Jorge MANCINI FILHO²

* Endereço para correspondência: Av. Prof. Lineu Prestes, 580 - Bloco 14. Butantã, São Paulo, SP, Brasil. CEP: 05508-900 – E-mail: sanibal@usp.br

¹ Condensação da dissertação de mestrado “Avaliações físicas, químicas e sensoriais do óleo e gordura de soja no processo de fritura”, apresentada e defendida na Universidade de São Paulo em 01 de agosto de 2001. Estudo financiado pelo CNPq e FAPESP.

² Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

³ Laboratório de Análise Sensorial da Diretoria de Serviço de Alimentos, do Instituto Adolfo Lutz -São Paulo, SP.
Recebido:15/05/2004 – Aceito para publicação: 14/09/2004

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar, segundo os parâmetros indicadores do tempo de descarte, os atributos de qualidade sensorial em função da estabilidade do óleo de soja (OS) e da gordura parcialmente hidrogenada de soja (GPHS) no processo de fritura de batatas. Os testes sensoriais constaram da ordenação da cor do OS, da GPHS e das batatas e de escalas de categoria para avaliar a qualidade global e a intensidade de oxidação do odor do OS e GPHS e do odor e sabor das batatas, em tempos de fritura variáveis. Considerou-se 100 horas como tempo total de processamento de fritura, com temperatura a $180^{\circ}\text{C} \pm 5$. Os resultados sensoriais revelaram escurecimento da cor do OS e da GPHS e odor moderadamente oxidado, com o aumento do tempo de fritura. Verificou-se a mesma tendência para o odor e sabor oxidado das amostras de batatas fritas. Não houve diferença significativa na qualidade sensorial do odor e sabor das batatas fritas em OS e GPHS.

Palavras-Chave. batata frita, óleo de soja, gordura parcialmente hidrogenada de soja; análise sensorial; oxidação.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the sensory quality attributes regarding soy oil (SO), and partially hydrogenated soy fat (PHSF) stability in potato frying process, according to the indicative discarding time parameters. The sensory testing included SO, PHSF, and French fries colour ranking, as well as the category scales to evaluate global quality and oxidation intensity of odor in SO and PHSF, and French fries odor and flavor, exhibited at different length of frying time. The total time of processing was 100 hours at temperature controlled to $180^{\circ}\text{C} +5$. Sensory results revealed colour darkening in both SO and PHSF, and also a moderate oxidation odor in proportion to the increasing of frying time. The same tendency toward both oxidized odor and oxidized flavour in French fries samples was observed. No significant difference was observed in odor and flavour sensory quality in French fries prepared either in SO or PHSF.

Key Words. french fries, soy oil, partially hydrogenated soy fat, sensory analysis, oxidation.

INTRODUÇÃO

O processo de fritura gera alimentos com textura crocante e riqueza de aroma e sabor. A atração pelos produtos fritos tem sido universal e desfrutados por diferentes grupos culturais¹³.

A qualidade do alimento pode ser influenciada pelos aminoácidos, proteínas, carboidratos, promovendo as reações sensoriais humanas em relação aos atributos de cor, textura, odor e sabor. A utilização de óleos e gorduras na fritura de alimentos também influencia a qualidade dos mesmos. De certa forma, pode-se observar que quando a batata é frita em tipos de óleos variáveis, o sabor não se altera se os mesmos são frescos e se as batatas são consumidas logo após a fritura.

As mudanças físicas e químicas que ocorrem nos óleos e gorduras de fritura alteram tanto as suas características sensoriais quanto dos alimentos por eles processados. Entre as mudanças físicas estão: o escurecimento, o aumento da viscosidade, a diminuição do ponto de fumaça e a formação de espuma. As alterações químicas podem ser resumidas em três tipos diferentes de reação: os óleos e gorduras podem hidrolisar e formar ácidos graxos livres, monoacilglicerol e diacilglicerol e/ou podem oxidar e formar peróxidos, hidroperóxidos, dienos conjugados, ácidos graxos *trans*, epóxidos, hidróxidos e cetonas e também compostos cíclicos e triacilgliceróis diméricos e poliméricos^{9,11,12}.

A análise sensorial é muito utilizada para avaliar as transformações que comprometem a qualidade dos alimentos. Ela é de fundamental importância dentro da ciência, da tecnologia e nos estudos de mercado de inúmeros produtos alimentícios³.

Os testes sensoriais, que utilizam os órgãos dos sentidos humanos como “instrumentos” de medida, são incluídos como garantia de qualidade por ser esta medida multidimensional integrada e possuir vantagens como avaliar a aceitabilidade de consumidores. Alguns instrumentos são efetivos em detectar o surgimento de problemas no processamento e armazenamento de alimentos, entretanto, muitas vezes são incapazes de medir alterações perceptíveis que afetam as características sensoriais⁸.

A visão é fundamental na análise sensorial, pois através dela são obtidas as primeiras impressões com relação à aparência do produto, principalmente a coloração. O consumidor espera que determinado alimento tenha sua cor característica e reluta em consumir quando há mudança na tonalidade ou intensidade da coloração do alimento comumente consumido. Na sensação olfativa pode ocorrer mascaramento de um odor pelo outro; percepção de um único odor resultante da mistura de odores; percepção de vários odores separadamente e, ainda, a adaptação ao odor após certo tempo de exposição do indivíduo, neste caso, com dificuldades para percebê-lo e descrevê-lo⁴.

Os testes de discriminação são muito utilizados para comparar diversas amostras e verificar se diferem estatisticamente entre si em relação a determinado atributo. Para participar dos testes os julgadores devem apresentar boa acuidade sensorial e serem orientados quanto ao tipo de produto, familiarizando-se com o mesmo e com o tipo de teste. É

interessante utilizar testes rápidos de comparação, como o de ordenação da cor. No entanto, é importante frisar que o teste de ordenação não oferece a possibilidade de quantificar o grau de diferença entre as amostras^{1,10}.

O teste de escala de categoria revela a variação de um determinado atributo sensorial entre as diversas amostras analisadas, determinando o grau de diferença entre elas². Na escala, os pontos devem ser equidistantes a fim de permitir análise estatística por métodos paramétricos, sendo o número de categorias ajustado com a extensão da variação a ser encontrada nos produtos³.

O objetivo do trabalho foi avaliar atributos de qualidade sensorial de óleo de soja (OS) e gordura parcialmente hidrogenada de soja (GPHS) em função da estabilidade física e química ocorrida durante a fritura de batata palito, segundo parâmetros indicadores do tempo de descarte, através dos testes de ordenação para cor e escalas de categoria para qualidade global e intensidade de oxidação do odor e do sabor.

MATERIAL E MÉTODOS

O processo de fritura das batatas foi conduzido no Laboratório de Lípidos do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. O óleo de soja (OS) da marca Lisa e a gordura parcialmente hidrogenada de soja (GPHS) da marca Frygill foram cedidos pela empresa Cargill Agrícola S.A., São Paulo. As batatas palito pré-fritas congeladas da marca McCain, foram cedidas pela Distribuidora Pratigel Indústria e Comércio de Alimentos Ltda, São Paulo.

Na operação de fritura em laboratório utilizou-se uma fritadeira elétrica da marca Fritanella-Walita com capacidade de 5 L. O tempo total de fritura foi de 100 horas com temperatura controlada à $180^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$, correspondendo 50 horas em OS e 50 horas em GPHS. O processo foi conduzido durante 10 dias, 5 horas por dia. A cada hora foram realizadas duas frituras com duração de 4 minutos cada, totalizando 100 operações de fritura em 50 horas de processamento. A quantidade de batata a cada fritura correspondeu a 10% de óleo ou gordura, totalizando no final de 50 horas de fritura, 2310g de batatas fritas em cada meio de fritura.

A cada 10 horas de fritura efetuou-se a filtragem do OS e da GPHS, com a utilização de papel de filtro e bomba a vácuo. Cerca de 300 mL de OS e GPHS foram coletados, acondicionados em vidro âmbar com nitrogênio e armazenados em freezer à -18°C , para a seqüência das análises. Em seguida, o volume do meio de fritura foi controlado com 10% de reposição em relação ao volume final.

Análises sensoriais das amostras de batata frita, óleo de soja (OS) e gordura parcialmente hidrogenada de soja (GPHS) foram realizadas no Laboratório de Análise Sensorial do Instituto Adolfo Lutz, na cidade de São Paulo.

Uma equipe composta por 13 julgadores, idades variando

entre 25 e 45 anos, foi recrutada em função do interesse, disponibilidade, capacidade em reconhecer e ordenar em escala, a intensidade dos gostos primários⁷: doce, salgado, ácido e amargo e, revelando acuidade visual normal ou superior para cores pelo teste “*Farnsworth - Munsell Hue - Test*”⁵.

A equipe formada obteve treinamento prévio quanto ao uso da escala de categoria, reconhecimento dos padrões de odores de OS, da GPHS, de óleos fortemente oxidados e das batatas fritas em OS e GPHS, para a familiarização com as amostras, metodologia e avaliação dos atributos sensoriais de oxidação e não oxidação.

Na avaliação da cor utilizou-se o teste de ordenação segundo ISO⁶ para as 6 amostras compostas de OS e GPHS, nos tempos de fritura 0 (zero), 30 e 50 horas, ordenado-as da cor mais clara para a mais escura. O mesmo foi realizado para as 4 amostras de batatas fritas em OS e GPHS nos tempos 0 (zero) e 50 horas de fritura (Ficha 1). Para o teste, cerca de 25mL das amostras de OS e GPHS (liquefeita à 45°C) foram colocadas em tubos de ensaio codificado com algarismos de 3 dígitos, arranjadas ao acaso, em suporte de acrílico incolor (Figura 1). As batatas fritas foram colocadas em pratos de porcelana branca codificados com algarismos de três dígitos e aleatorizados (Figura 2). Os testes foram conduzidos em ambiente de laboratório, sob iluminação artificial com lâmpada fluorescente branca.

Na avaliação da oxidação e qualidade global do odor de OS e da GPHS (Ficha 2) e, também, do odor e sabor das batatas palito fritas (Ficha 3) utilizou-se escala estruturada de oito pontos numérica e verbal (unipolar)². As amostras de OS, GPHS e batatas fritas foram avaliadas nos tempos de fritura de 0 (zero) e 50 horas.

Nos testes do odor de OS e da GPHS, as amostras foram apresentadas em frascos de vidro neutros recobertos com papel de alumínio contendo pequenos orifícios na parte superior para mascaramento da aparência e, mantidos em banho-maria (~45°C) para auxiliar na emissão dos voláteis (Figura 3). O teste foi



Figura 1. Apresentação de OS e GPHS para ordenação de cores.



Figura 2. Apresentação de batata frita em OS e GPHS para ordenação de cores.

Ficha 1. Modelo de ficha do teste de ordenação de cores de OS, GPHS e batata frita.

Nome:	Data:
Por favor, avalie cada uma das amostras codificadas de óleo de soja e gordura parcialmente hidrogenada de soja, em ordem crescente de intensidade, da cor mais clara para a mais escura.	
_____	_____
(+) clara	(+) escura
Agora, avalie cada uma das amostras codificadas de batata frita, em ordem crescente de intensidade, da cor mais clara para a mais escura.	
_____	_____
(+) clara	(+) escura
Comentários:	

conduzido fora das cabines, sob iluminação artificial branca. Ficaram à disposição dos julgadores os padrões de odores identificados como OS, GPHS e óleo de soja fortemente oxidado, mantidos igualmente aquecidos.

As batatas após a fritura (temperatura controlada à 180°C ± 5°C, duração de 4 minutos) no OS e na GPH com tempos de uso 0 e 50 horas foram acondicionadas em caixas de isopor até o término da fritura e, em seguida, mantidas envolvidas em papel de alumínio dentro do forno pré-aquecido (~45°C). Cerca de 4 unidades de batatas fritas foram colocadas em recipientes descartáveis de plástico neutros com tampa, com capacidade de 50 mL, codificados com algarismos de três dígitos e servidos aos julgadores simultaneamente e de forma aleatória (Figura 4). Foram utilizadas na condução dos testes cabines individuais, climatizadas e iluminadas com lâmpada fluorescente vermelha.

Os testes sensoriais seguiram delineamento experimental de Blocos Completos Casualizados. Os resultados das intensidades de odor e sabor avaliados em escala de categoria foram submetidos à análise de variância e comparação de médias pelo teste de Tukey, com nível de significância fixado à 5%.

A análise estatística dos resultados da ordenação de cores seguiu o método de Friedman⁶, onde para cada um dos julgamentos das amostras foi dado valor correspondente à posição ordenada. Com o número de tratamentos, o número de julgamentos e a soma das ordenações, obteve-se o valor F de

Friedman através de fórmula, que foi comparado ao valor crítico tabelado ao nível de 5% de significância. A comparação entre duas amostras, diferença mínima significativa, seguiu fórmula apresentada pelo método.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1 estão apresentados os resultados sensoriais do teste de ordenação da cor das amostras de batata frita em OS e GPHS, em função dos diferentes tempos de fritura de 0 (zero) e 50 horas. Para os 4 tratamentos e 13 julgamentos, os resultados revelaram valor F de Friedman (39,00) maior que o valor crítico tabelado (7,81) e, portanto, diferença significativa ao nível de 5%. No tempo 0 (zero), a batata frita em OS não utilizado, apresentou menor total de ordenação, seguido pela batata frita em GPHS, também não utilizada (0h). Após 50 horas de fritura, a batata frita em GPHS apontou maior total de ordenação, com uma coloração mais escura.

Na Tabela 2 podem ser observados os resultados dos testes de ordenação de cores de OS e GPHS em diferentes tempos de fritura. Verifica-se que houve diferença significativa entre as amostras ao nível de 5%, para os 6 tratamentos e 13 julgamentos, com valor F de Friedman (63,42) maior do que o valor crítico tabelado (11,07). A estatística revela que as amostras de OS e

Ficha 2. Modelo de ficha do teste de intensidade do odor de OS e GPHS.

Nome:				Data:				
Por favor, expresse a intensidade do odor oxidado das amostras codificadas de óleo de soja (OS) e gordura parcialmente hidrogenada de soja, segundo a escala abaixo:								
0	1	2	3	4	5	6	7	8
ausente		fraco		moderado		forte		muito forte
			Amostra nº			Valor		
			_____			_____		
			_____			_____		
			_____			_____		
			_____			_____		
Agora, avalie o odor quanto à qualidade global:								
0	1	2	3	4	5	6	7	8
ruim				regular				excelente
			Amostra nº			Valor		
			_____			_____		
			_____			_____		
			_____			_____		
			_____			_____		
Comentários:								

Ficha 3. Modelo de ficha do teste de intensidade do odor e sabor de batata palito frita.

Nome: _____ Data: _____

Por favor, expresse a intensidade do odor e sabor oxidado das amostras codificadas de batata frita, segundo a escala abaixo:

0	1	2	3	4	5	6	7	8
ausente		fraco		moderado		forte		muito forte

Amostra nº	odor oxidado	sabor oxidado
_____	_____	_____
_____	_____	_____
_____	_____	_____

Agora, avalie o odor e sabor quanto à qualidade global:

0	1	2	3	4	5	6	7	8
ruim				regular				excelente

Amostra nº	odor oxidado	sabor oxidado
_____	_____	_____
_____	_____	_____
_____	_____	_____

Comentários: _____



Figura 3. Apresentação de OS e GPHS para avaliação do odor.

Tabela 1. Teste de ordenação da cor da batata frita em óleo de soja (OS) e gordura parcialmente hidrogenada de soja (GPHS) nos diferentes tempos de fritura.

Amostra	Tempo(horas)	Cor Totais de ordenação*
OS	0	13 ^a
GPHS	0	26 ^b
OS	50	39 ^c
GPHS	50	52 ^d

* Somatório das ordens de 13 julgadores. Ordenação da cor mais clara (ordem 1) para a cor mais escura (ordem 4).

^{a,b,c,d} Médias seguidas de letras diferentes, na mesma coluna, diferem entre si ao nível de significância de 5%. Diferença mínima significativa maior ou igual a 12,9 (ISO)⁶.



Figura 4. Apresentação da batata frita para avaliação do odor e sabor.

Tabela 2. Teste de ordenação da cor do óleo de soja (OS) e gordura parcialmente hidrogenada de soja (GPHS) nos diferentes tempos de fritura.

Amostra	Tempo de fritura(horas)	Cor Totais de ordenação*
GPHS	0	13 ^a
OS	0	26 ^{a,b}
GPHS	30	43 ^{b,c}
OS	30	48 ^{c,d}
OS	50	65 ^{d,e}
GPHS	50	78 ^e

* Somatório das ordens de 13 julgadores. Ordenação da cor mais clara (ordem 1) para a cor mais escura (ordem 6).

^{a,b,c,d,e} Médias seguidas de letras diferentes, na mesma coluna, diferem entre si ao nível de significância de 5%. Diferença mínima significativa maior ou igual a 18,7 (ISO)⁶.

GPHS não diferiram duas a duas em relação à cor, nos tempos de fritura de 0 (zero), 30 e 50 horas. Tanto a amostra de OS como a de GPHS revelaram escurecimento gradativo com o aumento do tempo de utilização na fritura das batatas.

Observou-se que para os 13 julgamentos da cor no tempo 0 (zero) hora, a amostra de GPHS sem utilização foi alocada por todos os julgadores na 1ª posição (total de ordenação = 13) e, para OS, na 2ª posição (total de ordenação = 26). O mesmo ocorrendo para 50 horas de fritura, com a 5ª posição para o OS e a 6ª posição para a GPHS. Houve troca de posições nos totais de ordenação da cor somente para 30 horas de fritura. Portanto, do ponto de vista prático, não pôde ser evidenciado diferenças de tonalidades entre o OS e a GPHS, somente para 30h de fritura. Embora a GPHS seja inicialmente (0h) mais clara que o OS, no final da fritura (50h) tornou-se mais escura que este para o mesmo tempo de uso. Como preconizado por Meilgaard et al.¹⁰, o teste de ordenação de Friedman evidencia diferenças globais entre as amostras, mas não revela o grau da diferença existente entre as mesmas.

Na Tabela 3 estão os resultados dos atributos de qualidade sensorial em relação ao odor das amostras de OS e GPHS e do odor e sabor das amostras de batata frita, nos tempos de fritura de 0 (zero) e 50 horas.

Não houve diferença significativa nos atributos de odor oxidado e qualidade global do odor para OS e GPHS para os mesmos tempos de fritura, 0 (zero) e 50 horas. A utilização de 50h resultou um odor moderadamente oxidado das amostras de

OS e GPHS, em uma escala dimensionada de zero (nenhum) a 8 (muito forte). A qualidade global do odor da GPHS ficou significativamente reduzida com 50 horas de fritura, ficando também evidente a redução de qualidade do OS.

Observa-se uma tendência ao aumento da oxidação e diminuição da qualidade global do odor e sabor das batatas fritas em OS e GPHS no tempo de uso de 50 horas (Tabela 3). Nos mesmos tempos de fritura, zero e 50h, as amostras de batatas fritas em OS ou GPHS, não diferiram entre si quanto à qualidade sensorial do odor e sabor.

CONCLUSÕES

A batata palito frita em gordura parcialmente hidrogenada de soja (GPHS) revelou tonalidade mais escura quando comparada à batata frita em óleo de soja (OS) nos tempos de fritura de 0 (zero) e 50 horas.

As amostras de OS e GPHS que no tempo zero de fritura apresentaram cores mais claras, com o decorrer do tempo revelaram escurecimento das mesmas. Estas amostras, nas 30 horas de fritura, não diferiram entre si na intensidade da cor, e nas 50 horas houve evidência da GPHS apresentar-se mais escura que o OS.

Houve surgimento de odor moderadamente oxidado no OS e na GPHS após 50 horas de fritura e, conseqüentemente, tendência à redução da qualidade global do odor destes meios

Tabela 3. Intensidade dos atributos sensoriais de odor e sabor da batata frita e do odor de óleo de soja (OS) e gordura parcialmente hidrogenada de soja (GPHS), nos diferentes tempos de fritura.

Amostras	Atributos sensoriais	Intensidade dos atributos sensoriais*			
		OS		GPHS	
		Tempo de fritura		Tempo de fritura	
		0h	50h	0h	50h
OS e GPHS	Odor oxidado ¹	1,92 ^b (0,40)	3,77 ^a (0,53)	0,69 ^b (0,31)	4,77 ^a (0,57)
	Qualidade global do odor ²	4,46 ^{a,b} (0,64)	3,23 ^b (0,48)	5,54 ^a (0,65)	2,85 ^b (0,52)
Batata frita	Odor oxidado ¹	2,31 ^c (0,43)	4,08 ^{a,b} (0,50)	2,46 ^{b,c} (0,45)	4,85 ^a (0,59)
	Qualidade global do odor ²	5,54 ^a (0,40)	3,38 ^b (0,71)	5,15 ^{a,b} (0,52)	3,38 ^b (0,65)
	Sabor oxidado ¹	1,92 ^b (0,46)	3,62 ^{a,b} (0,67)	2,62 ^b (0,51)	4,85 ^a (0,66)
	Qualidade global do sabor ²	6,31 ^a (0,29)	3,38 ^b (0,70)	4,77 ^{a,b} (0,62)	3,00 ^b (0,62)

* Resultados de 13 julgamentos. OS = óleo de soja GPHS = gordura parcialmente hidrogenada de soja

¹Escala: 0=nenhum, 2=fraco, 4=moderado, 6= forte, 8=muito forte

²Escala: 0= ruim, 4= regular, 8= excelente

^{a,b} Médias seguidas de letras diferentes, na mesma linha, diferem significativamente entre si ao nível de 5% (Tukey).

() Erro padrão da média.

de fritura. As amostras de OS e GPHS não diferiram entre si quanto à oxidação e qualidade global do odor, nos mesmos tempos de uso.

A mesma tendência foi observada para a qualidade sensorial das batatas fritas. O odor e sabor moderadamente oxidados resultaram numa diminuição da qualidade global. As batatas fritas em OS ou GPHS com os mesmos tempos de utilização de 0 (zero) ou 50 horas, não revelaram diferenças na intensidade de oxidação e qualidade global do odor e sabor.

FINANCIAMENTO E AGRADECIMENTO

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP

REFERÊNCIAS

1. ABNT, Associação Brasileira de Normas Técnicas. **NBR 13170**: teste de ordenação em análise sensorial de alimentos. Rio de Janeiro, 1994. 7p.
2. ABNT, Associação Brasileira de Normas Técnicas. **NBR 14141**: teste de escalas utilizadas em análise sensorial de alimentos e bebidas. Rio de Janeiro, 1998. 3p.
3. Faria, E. V.; Mori, E. E. M.; Yotsuyanagi, K. *In: Técnicas de Análise Sensorial*. Instituto de Tecnologia de Alimentos / LAFISE (ed.). Campinas, São Paulo, 2000. 102p.
4. Ferreira, V. L. P. et al. **Análise Sensorial: Testes Discriminativos e Afetivos. Manual: Série Qualidade**. 1ªed., SBCTA:Campinas, 2000. 127p.
5. GretagMacbeth. **Quick Guide to Operation FM Test. Munsell Color**. GretagMacbeth, 1997. 31p.
6. ISO, International Organization for Standardization. **ISO 8587**: sensory analysis: methodology-ranking. Geneva, 1988. 9p.
7. ISO, International Organization for Standardization. **ISO/DIS 3972**: sensory analysis: method of investigating sensitivity of taste. Geneva, 1990. 9 p.
8. Jorge, N. **Estudo do comportamento do óleo de girassol e do efeito do dimetil polisiloxano em termo oxidação e frituras**. Campinas, 1996. [Dissertação de Doutorado - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
9. Martín, J.C. et al. Effect of fatty acid positional distribution and triacylglycerol composition on lipid by-products formation during heat treatment: II *trans* Isomers. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, 75: 1073-78, 1998.
10. Meilgaard, M.; Civille, G.V.; Carr, B.T. **Sensory evaluation techniques**. 3 ed., Boca Raton: CRC Press; 1999. 387 p.
11. Ovesen, L.; Leth, T.; Hansen, K. Fatty acid composition and contents of *trans* monounsaturated fatty acids in frying fats, and in margarines and shortenings marketed in Denmark. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, 75:079-1083, 1998.
12. Romero, A.; Cuesta, C.; Sánchez-Muniz, F.J. *Trans* fatty acid production in deep fat frying of frozen foods with different oils and frying modalities. **Nutr. Res.**, 20:599-608, 2000.
13. Stevenson, S.G.; Vaisey-Genser, M.; Eskin, N.A M. Quality control in the use of deep frying oils. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, 61:1102-8, 1984.

Chumbo em alimentos produzidos no entorno de uma empresa recicladora de baterias no município de Bauru, estado de São Paulo, Brasil

Lead in food grown in the surroundings of a recycling battery company in the county of Bauru, state of São Paulo, Brazil

RIALA6/980

Isaura Akemi OKADA*, Maria Cristina DURAN*, Carmen Silvia KIRA*, Franca Durante de MAIO*¹, Alice Momoyo SAKUMA*, Paulo TIGLEA**, Maria de Lourdes S. PEREIRA***

* Endereço para correspondência: Instituto Adolfo Lutz – Seção de Equipamentos Especializados - Av. Dr. Arnaldo, 355 – Cerqueira César – São Paulo/SP - 01246-902 - fone: (0xx11) 3068-2923 - fax: (0xx11) 3062-5363
e-mail: alice@ial.sp.gov.br

**Instituto Adolfo Lutz – Diretoria de Serviço de Química Aplicada – Divisão de Bromatologia e Química

*** VISA/Bauru/ SP

Recebido: 28/01/2004 – Aceito para publicação: 26/10/2004

RESUMO

Uma empresa recicladora de baterias chumbo-ácido localizada no município de Bauru, Estado de São Paulo, contaminou o solo de chácaras e de conjuntos residenciais no seu entorno. A exposição ao chumbo pode ocorrer diretamente por inalação de material particulado emitido pelo processo industrial ou ingestão de poeira, água e alimentos produzidos em áreas contaminadas. Este estudo visou determinar as concentrações de chumbo em amostras de alimentos (hortaliças, raízes / tubérculos, frutas, ovos e leites) produzidos e consumidos em área situada ao redor da empresa, antes e após a remediação do solo. A primeira coleta foi realizada em 2002, após a interdição da empresa, e a segunda em 2003, após a remediação de algumas áreas. As determinações de Pb foram realizadas por espectrometria de absorção atômica com chama. Na primeira coleta, 39,3% das amostras analisadas apresentaram-se contaminadas e na segunda coleta 13,9%, sendo que o leite foi o alimento que apresentou maior porcentagem de amostras acima do limite estabelecido pela legislação em vigor. A redução da contaminação por chumbo nos alimentos da região foi observada após as intervenções realizadas no ambiente, com a retirada de camada de 5 cm do solo superficial. Nas áreas onde não foram implementadas ações corretivas, os níveis de chumbo nos alimentos permaneceram elevados, indicando a importância da continuidade do programa de monitorização da área.

Palavras-Chave. chumbo, alimentos, espectrometria de absorção atômica, contaminação ambiental, Bauru, remediação.

ABSTRACT

A recycling acid-lead battery company located in the county of Bauru, State of São Paulo, Brazil, contaminated the soil of country houses around it. Exposure to lead can directly occur by particulate material inhalation. Such particulate material is emitted by either industrial processes or ingestion of dust, water and food grown in contaminated areas. This study aimed at determining lead concentrations in food (herbs, roots / tubers, fruit, eggs, and milk) samples grown and consumed in the area around the company before and after the soil was remedied. The first collection was performed in 2002 after the company was debarred whereas the second, in 2003 after some areas were remedied. Lead determinations were carried out by flame atomic absorption spectrometry. In the first collection, 39.3% of the samples analyzed were contaminated whereas in the second collection, 13.9%, considering that milk showed the greatest percentage of samples above the limit established by the current legislation. The decrease in food contamination by lead in the region was observed after some environmental interventions such as the removal of a 5-cm layer of superficial soil. In areas where there were no corrective interventions, lead levels in food remained high, indicating how important it is to continue the area monitoring program.

Key Words. lead, food, flame atomic absorption spectrometry, environmental contamination, Bauru, remediation.

INTRODUÇÃO

Uma empresa recicladora de baterias com produção de lingotes de chumbo, localizada no município de Bauru, São Paulo, foi interditada no início de 2002 após a constatação de níveis elevados de chumbo no ar pela Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB), com a finalidade de interromper a emissão de material particulado¹.

A exposição ao chumbo pode ocorrer diretamente por inalação de material particulado emitido pelo processo industrial ou por ressuspensão após a deposição no solo, ou ainda, por ingestão de poeira doméstica, água e alimentos de origem animal e vegetal produzido em locais próximos à fonte poluidora.

O chumbo é um metal altamente tóxico e apresenta efeito cumulativo. Este elemento interage com uma série de enzimas e sistemas fisiológicos, causando danos à saúde humana, com efeitos sobre a síntese do heme e possibilidade de causar danos aos sistemas nervoso central e periférico. As crianças são as mais susceptíveis à contaminação, devido à sua maior capacidade de absorção e também às diferenças de hábitos em relação aos adultos, como o de brincar na terra e levar constantemente a mão à boca, entre outros. Conseqüentemente, são mais pronunciados os efeitos adversos em crianças, do ponto de vista neurológico, provocando retardo no desenvolvimento psicomotor, diminuição da capacidade de audição e do quociente de inteligência, mesmo quando essa contaminação é traduzida por baixas concentrações de chumbo no sangue, em níveis de traços^{2, 3, 4}.

Diversos casos de contaminação têm sido relatados em todo o mundo, envolvendo processos de mineração, refino e uso de gasolina aditivada com chumbo tetraetila, os quais provocam a dispersão de chumbo no ambiente, podendo entrar na cadeia alimentar pela contaminação da água, alimentos de origem vegetal e animal⁵.

Na Europa, vários países industrializados avaliaram a questão da contaminação ambiental pelo chumbo com implicações ou riscos para a saúde humana, como na Rússia⁶, Alemanha⁷, França⁸ e Suécia⁹. Da mesma forma, o problema ocorreu na China¹⁰ e na Índia¹¹. Na África, o problema vem aumentando, passando a coexistir com outros problemas endêmicos de saúde.^{12, 13}

A Organização Mundial de Saúde e a Organização para Alimentação e Agricultura estabeleceram o valor da ingestão semanal provisória tolerável (PTWI) para chumbo de 25 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ de peso corpóreo¹⁴, que representa a soma das contribuições de todas as fontes de contaminação.

O chumbo é um metal estável no solo, podendo permanecer na localidade por muitos anos e causar danos à saúde da população, mesmo depois de cessada a fonte de contaminação (Small citado por Chatterjee¹¹). O grau de contaminação dos alimentos por chumbo depende da forma química, solubilidade, reatividade, biodisponibilidade e da natureza do solo quanto às características de composição, como o conteúdo de matéria orgânica e pH. A capacidade de absorção

de um contaminante pelo alimento varia conforme as espécies e variedades dos vegetais ou animais¹⁵.

Para implantar medidas de gerenciamento da qualidade ambiental da área foram realizados estudos preliminares no solo, na água, no ar e em sedimentos pela CETESB. Os dados obtidos nessas amostras revelaram teores elevados de chumbo¹. Tendo em vista que no entorno da empresa localizam-se chácaras e conjuntos residenciais, onde são produzidos alimentos para consumo próprio, as autoridades sanitárias preocupadas com a possível contaminação da população residente na área, iniciaram a monitorização dos alimentos da região. A área no entorno da empresa recicladora, num raio de 1000 m, caracterizava-se ao norte por um loteamento residencial popular, medianamente ocupado com ruas sem pavimentação; a nordeste, por um loteamento praticamente desocupado, por chácaras de alto padrão atrás da empresa; e a oeste da fábrica por loteamento densamente habitado, com ruas asfaltadas. No loteamento residencial popular e nas chácaras são produzidos alimentos e criados animais para consumo próprio, sem o propósito de comercialização.

O presente trabalho visou determinar as concentrações de chumbo em amostras de alimentos produzidos em área situada ao redor da fábrica recicladora de baterias antes e após a remediação do solo, pois estes apresentam importância na alimentação da população residente próxima à empresa, com o objetivo de avaliar o impacto da remediação nos níveis de chumbo nos alimentos.

MATERIAL E MÉTODO

Amostragem e preparação das amostras

As amostras foram colhidas pelas autoridades sanitárias no entorno da empresa recicladora, num raio de 1000 m, nas chácaras e nos loteamentos residenciais onde são produzidos alimentos e criados animais para consumo próprio.

Foram analisadas 28 amostras na primeira coleta realizada em 2002, dois meses após a interdição da empresa, sendo: 3 frutas, 1 legume, 12 verduras, 3 raízes/tubérculos; 4 leites e 5 ovos.

Na segunda coleta, após a interdição da empresa e remediação de algumas áreas, foram analisadas 36 amostras: 1 fruta, 4 legumes, 7 raízes/tubérculos, 16 verduras, 5 leites e 3 ovos.

As amostras de frutas e hortaliças foram lavadas com água corrente para a retirada das partículas sólidas, da superfície simulando o procedimento usualmente adotado para a limpeza antes do preparo destes alimentos. Após a remoção das partes não comestíveis as amostras foram trituradas em multiprocessador, pesadas e analisadas em triplicata.

Metodologia Analítica

A concentração de chumbo foi determinada segundo o método da AOAC¹⁶. Pesaram-se 25 g da amostra

previamente homogeneizada, que em seguida foi seca em estufa e queimada em bico de Bunsen. Para a mineralização foi usada uma mufla com temperatura controlada a 450 °C. As cinzas foram dissolvidas em ácido clorídrico. O chumbo foi determinado após complexação com APDC (pirrolidina ditiocarbamato de amônio) e posterior extração com MIBC (metil isobutil cetona) por espectrometria de absorção atômica utilizando chama e corretor de deutério, nebulizador de pérola de impacto e lâmpada de cátodo oco de chumbo. O equipamento utilizado foi um espectrômetro de absorção atômica com corretor de deutério, modelo Analyst 100, marca Perkin Elmer.

O padrão de chumbo foi adquirido da Merck (Titrisol), específico para análise espectroscópica. Os reagentes utilizados eram próprios para análise de traços de metais. A água utilizada no estudo foi obtida pelo sistema de purificação e filtração (com resistividade de 18,2 M Ω .cm⁻¹).

Toda a vidraria foi previamente lavada com detergente neutro, enxaguada e mergulhada por 48 horas em solução de ácido nítrico a 20%, para a descontaminação. Em seguida foi enxaguada com água destilada e deionizada.

Validação da metodologia

Para garantir a confiabilidade dos resultados foram utilizados os materiais de referência certificados NIST SEM 1570a – Trace Elements in Spinach Leaves e leite em pó fornecido pelo Food Analysis Performance Assessment Scheme (FAPAS), cujos valores de referência são 0,20 mg.kg⁻¹ e 0,741 mg.kg⁻¹. As porcentagens de recuperação para o chumbo nas amostras certificadas foram 96% e 88%, respectivamente.

Os limites de detecção e quantificação obtidos foram 0,003 mg.kg⁻¹ e 0,01 mg.kg⁻¹, respectivamente e foram calculados de acordo com procedimentos descritos em BRASIL¹⁷.

RESULTADOS

As concentrações de chumbo obtidas nas amostras analisadas encontram-se na tabela 1.

DISCUSSÃO

Dos tipos de alimentos analisados, o leite foi o que apresentou a maior porcentagem de amostras insatisfatórias quando comparadas com a legislação em vigor¹⁸ que estabelece um limite máximo de 0,05 mg.kg⁻¹. Esses dados são preocupantes, pois esse alimento é consumido principalmente por crianças que ingerem uma maior quantidade desse produto, tornando a sua contribuição para o PTWI significativa. Na segunda coleta, apesar da empresa ter sido interdita há mais de 1 ano, os níveis de chumbo no leite permaneceram elevados, pois os locais de produção das amostras de leite não passaram pelo processo de remediação.

Na primeira coleta 60% das amostras de ovos apresentaram teores de chumbo acima do limite máximo permitido¹⁹ de 0,10 mg.kg⁻¹. Em 2003, apesar da redução de 27% no número de amostras insatisfatórias, esta situação ainda é preocupante devido à forma de criação das aves, que vivem soltas em contato direto com o solo e não são alimentadas com ração controlada.

Entre as hortaliças analisadas a que apresentou maior concentração de chumbo foi a mandioca, o que confirma os dados de Kubota citado por Piotrowska¹⁵, segundo os quais as raízes normalmente contêm níveis mais elevados de chumbo que as partes aéreas das plantas. A variação dos teores de chumbo entre as partes dos vegetais pode estar relacionada aos diferentes períodos de exposição.

Tabela 1. Concentração de chumbo nas amostras de alimentos na base úmida, das coletas realizadas em 2002 e 2003 (em mg.kg⁻¹).

Ano	2002				2003			
	Nº de amostras analisadas	Valor Máximo (mg.kg ⁻¹)	Valor Mínimo (mg.kg ⁻¹)	% amostras acima do limite	Nº de amostras analisadas	Valor Máximo (mg.kg ⁻¹)	Valor Mínimo (mg.kg ⁻¹)	% amostras acima do limite
Leite*	4	0,11	0,04	75	5	0,28	0,02	60
Ovos***	5	0,23	0,07	60	3	0,25	0,02	33,3
Verduras**	12	1,30	ND	16,7	16	0,19	0,02	0
Raízes/Tubérculos	3	3,80	0,18	66,7	7	1,45	0,01	14,3
Legumes**	1	-	ND	0	4	0,06	0,01	0
Frutas**	3	0,38	ND	33,3	1	0,01	-	0
Total	28	-	-	39,3	36	-	-	13,9

ND: abaixo do limite de quantificação do método: 0,01 mg.kg⁻¹

*Limite máximo permitido para chumbo em leite¹⁸: 0,05 mg.kg⁻¹

** Limite máximo permitido para chumbo em alimentos¹⁹: 0,50 mg.kg⁻¹

*** Limite máximo permitido para chumbo em ovos¹⁹: 0,10 mg.kg⁻¹

As verduras, de um modo geral, apresentaram concentração de chumbo baixa quando comparadas com o limite máximo permitido pela legislação específica (que no Brasil é de $0,50 \text{ mg.kg}^{-1}$), podendo ser consideradas próprias para o consumo na 1ª coleta, com exceção de duas amostras, uma de hortelã e outra de almeirão, que apresentaram teores de chumbo de $1,0$ e $1,3 \text{ mg.kg}^{-1}$, respectivamente. Em 2003, na segunda etapa de avaliação, nenhuma verdura analisada neste estudo apresentou teor de chumbo acima do limite tolerado para este tipo de produto. Isso se deve, provavelmente, às atividades de remediação que ocorreram nas áreas residenciais, onde foi retirada uma camada de 5 cm de solo superficial das ruas, calçadas e quintais.

CONCLUSÕES

Os dados obtidos indicaram que a presença de chumbo no solo ocasionou aumento nos níveis deste metal nos alimentos produzidos na localidade, e pode ter contribuído para a exposição humana ao chumbo.

A diminuição dos níveis de chumbo nos alimentos produzidos nas áreas onde ocorreram a remediação do solo foi indicativa de que essas ações corretivas contribuíram para a melhoria da qualidade ambiental.

Nas áreas onde essas ações não ocorreram, que incluem as propriedades com produção de leite e ovos, foi observado que os níveis de chumbo permaneceram acima do limite estabelecido pela legislação, mesmo após um ano da interdição da fonte de contaminação. Essas áreas permaneceram inadequadas para a produção de leite e ovos e de alimentos mais susceptíveis à absorção de chumbo, como as raízes e tubérculos.

Assim, é necessário que as medidas de remediação prossigam, bem como o programa de monitorização dos alimentos, com a finalidade de reduzir o risco potencial que permanece em alguns locais da área de estudo.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à equipe de Vigilância Sanitária de Bauru, responsável pela coleta de amostras.

REFERÊNCIAS

1. CETESB 2002 Avaliação confirmatória da contaminação ambiental na área de influência da indústria "Acumuladores Ajax Ltda – Recuperadora de Chumbo" em Bauru (SP). - Informação Técnica 018/ECC/EQ/ERQ/02 v. 1 – Governo do Estado de São Paulo, Secretaria do Meio Ambiente, Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental – CETESB. 42 p.

2. WHO. World Health Organization. **IPCS. Environmental Health Criteria 165 – Inorganic Lead**. Geneva: WHO, 1995. 300p. Publish under the joint sponsorship of the United Nations Environmental Programme, The International Labour Organization and The World Health Organization.
3. Anku, V. D.; Harris, J. W. Peripheral neuropathy and lead poisoning in a child with sickle-cell anemia. **J. Pediatrics**, 85:337-40, 1974.
4. Erenberg, G.; Rinsler, S. S.; Fish, B. G. Lead neuropathy and sickle cell disease. **Pediatrics**, 54:438-41, 1974.
5. Paoliello, M. M. B. et al. Exposure of children to lead and cadmium from a mining area of Brazil. **Environ. Research Section A** 88:120, 2002.
6. Snakin, V.V.; Prisyazhnaya, A.A. Lead contamination of environment in Russia. **Sci. Total Environ.**, 256:95-101, 2000.
7. Meyer, I.; Heinrich, J.; Lippold, U. Factors affecting lead, cadmium, and arsenic levels in house dust in a smelter town in Eastern Germany. **Environ. Res.**, 81:32-44, 1999.
8. Leroyer, A. et al. Environmental lead exposure in a population of children in Northern France: factors affecting lead burden. **Am. J. Ind. Med.**, 38:281-89, 2000.
9. Berlund, M. et al. Impact of soil and dust lead on children's blood lead in contaminated areas of Sweden. **Arch. Environ. Health**, 55:93-7, 2000.
10. Shen, X.M.; Wu, S. H.; Yan, C.H. Impacts of low-level lead exposure on development of children: recent studies in China. **Clin. Chim. Acta**, 313:217-20, 2001.
11. Chatterjee, A.; Banerjee, R.N. Determination of lead and other metals in a residential area of greater Calcutta. **Sci. Total Environ.**, 227:175-85, 1999.
12. Nriagu, J. O.; Blankson, M. L.; Ocran, K. Childhood lead poisoning in Africa: a growing public health problem. **Sci. Total Environ.**, 181:93-100, 1996.
13. Oyedele, D. J. et al. Lead contamination of soils and vegetation in the vicinity of a lead smelter in Nigeria. **Sci. Total Environ.**, 172:189-95, 1995.
14. WHO. World Health Organization, Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. **Evaluation of certain food additives and contaminants**. Geneva, 1993.
15. Piotrowska, M. et al. The spatial distribution of lead concentrations in the agricultural soils and main crop plants in Poland. **Sci. Tot. Environ.**, 158:147-155, 1994.
16. AOAC. Association of Official Analytical Chemists. **Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 16th ed., Gaithersburg, Maryland, Chapter 9, p.16, 1995.
17. Brasil. INMETRO. Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos. DOC-CGCRE-008 – revisão 01- março 2003. Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br>. Acesso em: junho de 2003.
18. Brasil. Ministério da Agricultura. Secretaria de Vigilância Sanitária (Leis, Decretos, etc. Divisão Nacional de Vigilância Sanitária de Alimentos – DINAL -) Portaria nº 685, de 27 de agosto de 1998. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 24 de agosto de 1998.
19. Brasil, Secretaria de Vigilância Sanitária. Divisão Nacional de Alimentos (Leis, Decretos, etc. Divisão Nacional de Vigilância Sanitária de Alimentos – DINAL -) Portaria nº 16 de 13 de março de 1990. **Diário Oficial da União República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 15 de março de 1990.

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

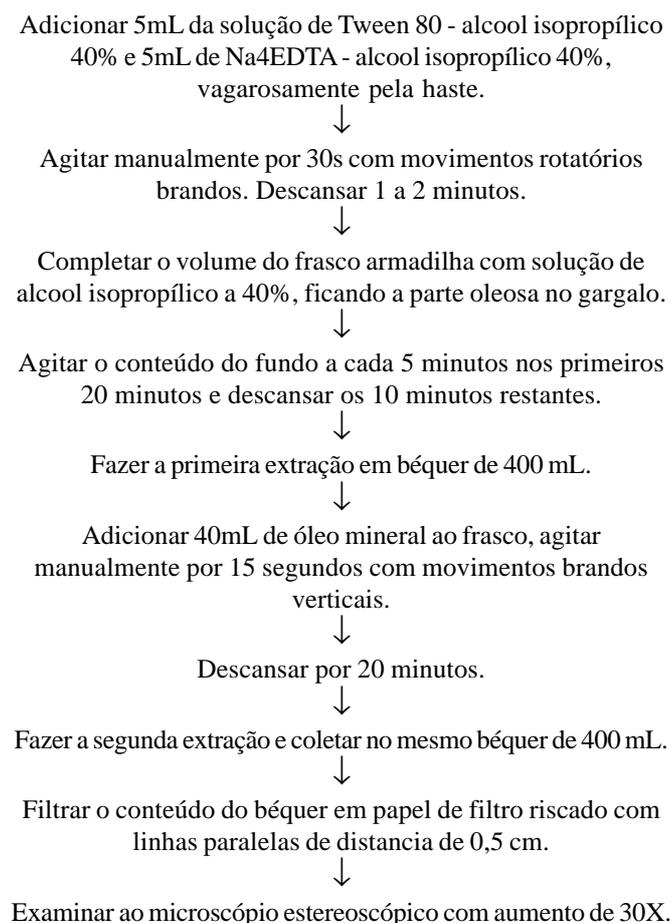
↓
Elevar o volume a marca de 400mL, cobrir com o vidro relógio ferver por 5 minutos com agitação magnética.

↓
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

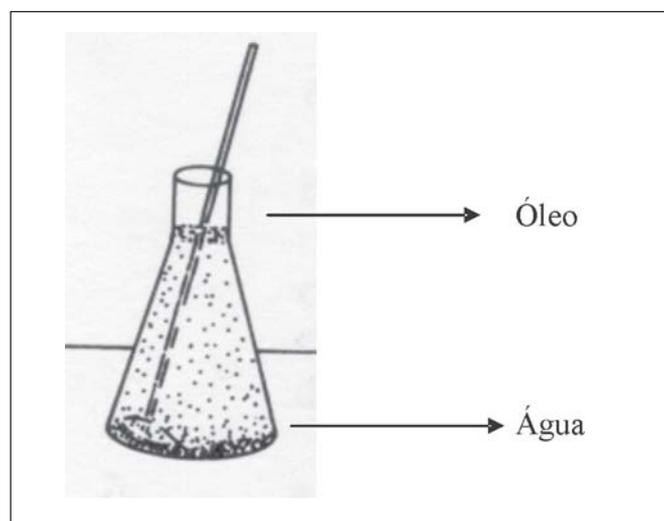


Figura 1. Frasco de Wildman (FDA Technical Bulletin nº2, 1978)

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 bēquer 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].

Infecção simultânea por Dengue 1 e 3 em Itapevi, SP, Brasil

Concurrent infection by Dengue 1 and 3 in Itapevi, SP, Brazil

RIALA6/982

Iray Maria ROCCO^{1*}; Fabíola Maiumi OSHIRO¹; Cecília Luiza Simões SANTOS²Endereço para correspondência: ¹Instituto Adolfo Lutz -Seção de Vírus Transmitidos por Artrópodos²Instituto Adolfo Lutz, Laboratório de Biologia Molecular - Av. Dr. Arnaldo 355 - 1246-902, São Paulo, SP, Brasil

e-mail: imrocco@uol.com.br

Recebido: 18/11/2003 - Aceito para publicação: 04/03/2004

RESUMO

Casos de infecções simultâneas por vírus dengue em um mesmo paciente podem ocorrer em epidemias em que circulam múltiplos sorotipos do vírus. No Brasil esse fato foi relatado pela primeira vez em Miranda, MS, em 1996 e em Barretos, SP, em 2001. Em ambos foram isolados dengue 1 e 2. Em 2003 foi observado mais um caso, em Itapevi, município da Grande São Paulo. O isolamento dos vírus foi obtido em cultura de células C6/36 e a identificação foi feita por imunofluorescência indireta com anticorpos monoclonais para os quatro sorotipos. Foram isolados vírus dengue tipo 1 e tipo 3, resultado confirmado pela reação de RT/PCR, usando RNA extraído do sobrenadante da cultura de células infectada. Este caso demonstra mais uma vez a importância do isolamento viral na vigilância epidemiológica do dengue, pois ele pode ajudar a determinar a frequência das infecções com dois ou mais sorotipos, assim como verificar se essas infecções podem estar associadas a formas mais severas da doença.

Palavras-Chave. dengue, infecção simultânea, isolamento de vírus

ABSTRACT

Simultaneous infection by dengue viruses in the same patient may occur during epidemics in which multiple dengue virus serotypes circulate. In 1996, this occurrence was reported for the first time in Brazil in Miranda, MS, and afterwards in Barretos, SP in 2001. In both instances the dengue viruses 1 and 2 were isolated. In 2003, in Itapevi - a town located in the Great São Paulo area, another evidence was reported. Viruses isolation was carried out in C6/36 cells culture, and identified by means of indirect immunofluorescence test, employing monoclonal antibodies produced for four Dengue serotypes. Dengue 1 and 3 were isolated, and they were confirmed by RT/PCR. For performing this technique, the RNA extracted from infected cells culture supernatant was employed. The data obtained from the present study corroborate the relevance of viral isolation for dengue epidemiological surveillance strategies, as it may give support in determining the frequency of infections with multiple serotypes, and also to investigate whether these infections might be associated with the severity degree of disease.

Key Words. dengue, concurrent infection, virus isolation

INTRODUÇÃO

O dengue é, depois da malária, a segunda mais importante doença tropical no mundo. Segundo a Organização Mundial de Saúde o dengue é endêmico em cerca de 100 países e metade da população mundial vive em áreas de risco². A incidência de infecções por dengue nas Américas têm aumentado drasticamente desde os anos 60, com a ocorrência da forma hemorrágica em novas áreas¹⁴. Fatores demográficos e sociais têm permitido que centros urbanos se tornem hiperendêmicos, com ampla distribuição do mosquito vetor *Aedes aegypti* e a presença dos 4 sorotipos de dengue⁵.

No Brasil a tendência de aumento da incidência da doença tem sido observada nos últimos anos². A introdução e rápida disseminação do dengue 3 mostrou a facilidade da circulação de novos sorotipos e cepas do vírus no país.

Em epidemias onde circulam múltiplos sorotipos é possível a ocorrência de infecções simultâneas por mais de um tipo de dengue em um mesmo indivíduo. O primeiro caso de dupla infecção foi documentado por Gubler e cols em 1982, em Porto Rico, com isolamento de dengue 1 e 4⁴. Outros casos de infecções simultâneas têm sido relatados^{8,9,13,17}. Loroño-Pino et al. estudaram a frequência dessas infecções em amostras de epidemias ocorridas na Indonésia entre 1975 a 1978, em Porto

Rico em 1994 e no México em 1996, com achados de duplas e triplas infecções simultâneas¹². No Brasil, esse fato já foi documentado por duas vezes; o primeiro em Miranda, MS¹⁵, em 1996 e o segundo, em Barretos, SP¹⁶, em 2001. Em ambos foram isolados dengue 1 e 2.

Em 2003 foi observado mais um caso de dupla infecção, em Itapevi, município da Grande São Paulo, que em 2003 teve 2.573 casos de dengue notificados, dos quais 2.154 foram confirmados, com isolamento dos sorotipos 1 e 3 (Dados do Centro de Vigilância Epidemiológica, SES-SP).

O objetivo desse trabalho é enfatizar a importância do isolamento viral para a detecção de infecções simultâneas por vírus dengue, possibilitando investigar a associação dessas infecções com formas mais graves da doença e a caracterização de possíveis cepas recombinantes.

MATERIAL E MÉTODOS

Isolamento e identificação dos vírus

A paciente, dona de casa de 44 anos residente em Itapevi, apresentou febre por dois dias, seguida de cefaléia, náuseas, prostração e mialgia, evoluindo para a cura sem maiores complicações.

O isolamento dos vírus foi realizado em tubo com culturas de células de mosquito *Aedes albopictus*, clone C6/36⁷, com 1 ml de meio Leibovitz (L-15), suplementado com 1% de aminoácidos não essenciais, 10% de triptose fostato e 10% de soro fetal bovino. No dia seguinte foi acrescentado 1 ml de meio L-15 sem soro, contendo 100UI/ml de penicilina e 100µl/ml de estreptomicina e foram inoculados 20µl de soro da paciente, colhido no segundo dia após o início dos sintomas. Após 9 dias à 28°C a cultura de células foi observada ao microscópio para verificar a presença de efeito citopático. As células foram desprendidas do tubo por agitação e sedimentadas por centrifugação por 10 minutos a 1.500 rpm. O sobrenadante foi estocado a -70°C e com o "pellet" das células, ressuscitado com PBS, foram realizados testes de imunofluorescência indireta³. No primeiro, foi utilizado fluido ascítico de camundongo anti dengue e anti imunoglobulina total de camundongo conjugada a isotiocianato de fluoresceína. A identificação final foi feita por imunofluorescência indireta, empregando anticorpos monoclonais fornecidos pelo CDC de Atlanta, segundo a técnica de Gubler et al.³

Diagnóstico molecular

O RNA viral foi extraído do sobrenadante da cultura de células, procedendo-se a síntese e amplificação do cDNA, segundo o protocolo descrito por Lanciotti et al¹¹. Inicialmente foi realizada a amplificação dos vírus dengue por oligonucleotídeos deduzidos de uma região consensual aos quatro sorotipos, seguida de re-amplificação (*Nested RT/PCR*) com iniciadores internos a esta seqüência comum e específicos para cada sorotipo. Os fragmentos de DNA obtidos nas reações

de *Nested RT/PCR*, com tamanhos distintos, correspondentes aos sorotipos, foram visualizados por análise eletroforética em gel de agarose corado com brometo de etídeo, para a tipagem molecular.

RESULTADOS

As culturas de células examinadas ao microscópio mostraram efeito citopático característico do vírus dengue, com a formação de sincícios e vacúolos. O teste de imunofluorescência apresentou reação positiva e a identificação com anticorpos monoclonais foi reagente para dengue tipo 1 e tipo 3. A reação de *Nested RT/PCR* detectou a presença de fragmentos de 482 pb e 290 pb, característicos de dengue tipos 1 e 3 respectivamente (Figura 1)

DISCUSSÃO

Desde 1986 epidemias de dengue vem ocorrendo no Brasil. Após anos de transmissão, algumas áreas se tornaram endêmicas com a circulação de 2 ou 3 sorotipos². A hiperendemicidade e a presença de vários sorotipos possibilitam a ocorrência de infecções simultâneas e oferecem a chance dos mosquitos *Aedes aegypti* se infectarem com 2 ou mais vírus. Experimentos em laboratório já demonstraram que o *A. aegypti* pode ser infectado por duplas combinações de diferentes vírus e que também pode transmitir-los simultaneamente^{1,10}. Embora não seja conhecido se a transmissão ocorre por 2 diferentes mosquitos ou por 1, infectado com 2 vírus, casos de duplas infecções tem sido relatados na Ásia e nas Américas^{4,8,9,12,15,16,17}.



Figura 1. Análise eletroforética em gel de agarose 1,5% dos produtos de *Nested RT/PCR*. Amostras de RNA, extraídas do fluido da cultura celular inoculada com: Soro da paciente com dupla infecção (2); Vírus dengue tipo 1, cepa Hawaii (3); Vírus dengue tipo 2, cepa NG2 (4); Vírus dengue tipo 3, cepa H87 (5); Vírus dengue tipo 4, cepa H241 (6). Controle negativo (7). O padrão de peso molecular está indicado à esquerda (1).

A detecção de mais um caso de dupla infecção por dengue no Brasil vem confirmar que técnicas simples como o isolamento de vírus e a imunofluorescência indireta são ferramentas tão precisas quanto a biologia molecular para identificação de infecções simultâneas. Atualmente, o diagnóstico de dengue, realizado por biologia molecular ainda é muito dispendioso para utilização em grande escala. Por isso a simplicidade e a alta especificidade da imunofluorescência são de grande importância na vigilância epidemiológica do dengue, pois possibilitam determinar a frequência das infecções com dois ou mais sorotipos e verificar se essas infecções estão associadas a formas mais severas da doença.

Embora no caso estudado esse fato não tenha sido observado, o aumento da frequência das epidemias e a ocorrência do dengue hemorrágico em áreas tropicais das Américas e da Ásia coincidem com a hiperendemicidade nessas regiões¹².

A diversidade genética que os vírus dengue apresentam está evidenciada pela existência dos quatro sorotipos e genótipos distintos, associados a cada um deles¹⁹. Um dos fatores que contribui para essa diversidade é a taxa relativamente alta de mutações que ocorre na replicação do vírus cujo material genético é RNA. A dupla infecção levanta também a possibilidade da recombinação genética, um fato possível de ocorrer em áreas de hiperendemicidade^{6,17,20}. Esse mecanismo é um processo raro em vírus RNA, demonstrado recentemente em vários membros da família Flaviviridae¹⁷. Salientamos que a condição essencial para a ocorrência da recombinação é a existência de co-infecção. Assim, consideramos ser importante a divulgação de casos de infecções simultâneas, como o aqui relatado, pois isso estimula pesquisas visando a caracterização de cepas recombinantes, para que se possa avaliar em que extensão este mecanismo pode estar ocorrendo em populações naturais dos vírus dengue.

REFERÊNCIAS

1. Chamberlain, R.W.; Sudia, W.E. Dual infections of Eastern and Western encephalitis virus in *Culex tarsalis*. *J. Infect. Dis.*, 101: 233-236,1957.
2. FUNASA, {<http://www.funasa.gov.br/epi/dengue>
3. Gubler, D.J. et al. Mosquito cell cultures and specific monoclonal antibodies in surveillance for dengue viruses. *Amer. J. trop. Med. Hyg.*, 33: 158-165,1984.
4. Gubler, D.J. et al. A case of natural concurrent human infection with two dengue viruses. *Amer. J. trop. Med. Hyg.*, 34: 170-173,1985.
5. Gubler, D.J. Epidemic dengue/Dengue haemorrhagic fever: a global health problem in the 21st century. *Dengue Bulletin, World Health Organization*, 21: 1-15, 1997.
6. Holmes, E.C.; Worobey, M.; Rambaut, A. Phylogenetic evidence for recombination in dengue virus. *Mol. Biol. Evol.*,16: 405-409, 1999.
7. Igarashi, A. Isolation of a Singh's *Aedes albopictus* clone sensitive to dengue and chikungunya viruses. *J. Gen. Virol.*, 40: 531-544, 1978.
8. Kanesa-Thanan; N. et al. Molecular and epidemiologic analysis of dengue virus isolates from Somalia. *Emerg. Infect. Dis.*, 4: 299-303, 1998.
9. Laille, M.; Deubel, V.; Saint-Marie, F.F. Demonstration of concurrent dengue 1 and dengue 3 infection in six patients by polymerase chain reaction. *J. Med. Virol.*, 34: 51-54,1991.
10. Lam, K.S.K.; Marshall, I. D. Dual infections of *Aedes aegypti* with arbovirus. *Amer. J. trop. Med. Hyg.*, 17: 625-636,1968.
11. Lanciotti, R.S. et al. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.*, 30: 41-47,1993.
12. Loroño-Pino, M.A. et al. Common occurrence of concurrent infections by multiple dengue virus serotypes. *Am.J. trop. Med. Hyg.*, 61(5): 725-730, 1999.
13. Maneekarn, N. et al. Applications of polymerase chain reaction for identification of dengue virus isolated from patient sera. *Microbiol. Immunol.*, 37: 41-47, 1993.
14. Pinheiro, F.P.; Chuit, R.C. Emergence of dengue hemorrhagic fever in the Americas. *Infect. Med.*, 244-251,1998.
15. Rocco, I.M.; Barbosa, M.L.; Kanomata, E.H.N. Simultaneous infections with dengue 1 and 2 in a Brazilian patient. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, 40(3): 151-154, 1998.
16. Santos, C.L.S. et al. Molecular characterization of dengue viruses type 1 and 2 isolated from a concurrent human infection. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, 45(1): 11-16, 2003.
17. Twiddy, S.S.; Holms, E.C. The extent of homologous recombination in members of the genus *Flavivirus*. *J.Gen. Virol.*, 84: 429-440, 2003.
18. Wang, W.K. et al. Concurrent infections by two dengue virus serotypes among dengue patients in Taiwan. *J. Microbiol. Immunol. Infect.*, 36(2): 89-95, 2003.
19. Westaway, E.G.; Blok, J. Taxonomy and evolutionary relationships of flaviviruses. In: *Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever*, edited by D.J. Gubler and G. Kuno, CAB International, Wallingford, Oxon, UK, p. 147-174, 1997.
20. Worobey, M.; Rambaut, A.; Holmes, E.C. Widespread intra-serotype recombination in natural populations of dengue virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96(13): 7352-7357, 1999.

Citologia de base líquida associada à captura de híbridos para DNA-HPV pode otimizar a qualidade diagnóstica do método de Papanicolaou?

Could liquid based cytology associated with hybrid capture II assay for HPV-DNA optimize the cytological diagnosis?

RIALA6/983

Maria Lúcia UTAGAWA¹, Sônia Maria Miranda PEREIRA¹, Adhemar LONGATTO FILHO¹, Cecília Roteli-MARTINS², Luciana Silva AGUIAR¹, Janaína Érika PITTOLI¹, Celso DI LORETO¹, Marina Yoshiê Sakamoto MAEDA¹, Laura MARTINS², Janice O. GALVANE², Kari SYRJÄNEN³.

*Endereço para correspondência: Instituto Adolfo Lutz¹, Hospital Leonor Mendes de Barros², São Paulo, SP - Instituto Superiore di Sanità, Roma Italia³

Recebido: 06/08/2003 – Aceito para publicação: 06/05/2003

RESUMO

A associação da citologia de base líquida (BL) e o teste de Captura de Híbridos II (HC2) para DNA HPV poderão otimizar o diagnóstico citológico, sobretudo os de origem indeterminada (ASCUS/AGUS). Avaliamos as amostras colhidas com o sistema DNA-CITOLIQU[®] (DIGENE-Brasil) para citologia de BL e HC2, de pacientes atendidas no Hospital Leonor Mendes de Barros. Foram realizados 842 exames de citologia de BL e HC2, onde 64 (7,6%) amostras apresentaram atipias de significado indeterminado (ASCUS/AGUS) de citologia na BL. O HC2 para DNA HPV de alto risco foi positiva em 16 (25%) amostras de ASCUS e quatro (6,2%) de atipia glandular (AGUS). De 748 amostras, 88,8% foram citologicamente negativas e destas 97 (11,5%) foram positivas para HPV de alto risco. Essas alterações estão associadas à infecção pelo HPV e, portanto, colocam a paciente em um grupo com conduta diferenciada da população normal. Adicionalmente, os casos com resultados negativos no exame citológico, que nos testes de DNA HPV foram positivos, demonstraram a elevada sensibilidade das técnicas biomoleculares em relação à morfologia. Concluímos que a citologia de BL associada ao HC2, pode melhorar a sensibilidade do método de Papanicolaou.

Palavras-Chave. método de Papanicolaou, ASCUS, captura de híbridos, citologia de base líquida, *reflex testing*.

ABSTRACT

Liquid based cytology and hybrid capture II assay (HC2) are thought to improve the cytological diagnosis chiefly those from undetermined origin (ASCUS/AGUS). We studied cervical samples collected with DNA CITOLIQU[®] System (DIGENE-Brazil) from patients referred to the Hospital Leonor Mendes de Barros, São Paulo - SP. HC2 for HPV-DNA was performed in samples from 842 women. Sixty four (7.6%) samples showed ASCUS. HC2 for high risk HPV-DNA was positive in 16 (25%) ASCUS and 4 (6.2%) AGUS. Among 748 samples, 88.8% were cytologically negative, and from these cases 97 (11.5%) were positive for high risk HPV-DNA. Consequently, women presenting negative cytology but HPV-DNA test positive, should be carefully observed, because they represent a high risk group, and their samples should be referred to a peer revision. We concluded that liquid-based cytology associated with HC2 for HPV-DNA assay may improve the sensitivity of Papanicolaou testing.

Key Words. Papanicolaou method, ASCUS, hybrid capture, liquid based cytology, reflex testing

INTRODUÇÃO

O Método de Papanicolaou tem sido universalmente preconizado para o rastreamento de lesões precursoras do câncer do colo uterino¹⁷, entretanto, recentes estudos de metaanálises têm mostrado que embora o Método de Papanicolaou apresente uma alta especificidade em torno de 98%, há ainda, uma baixa e preocupante sensibilidade ao redor de 51%^{1,13}. O elevado número de casos falso-negativos fez surgir várias propostas de melhorias no preparo e leitura de lâminas⁷. Equipamentos computadorizados foram desenvolvidos com a finalidade de dinamizar a leitura das lâminas; contudo o esfregão convencional, dependendo da habilidade de quem colhe a amostra, pode apresentar sobreposição de células, infiltrado inflamatório, hemácias, debris celulares e má fixação dificultando a leitura⁹. Partindo dessa premissa, foram desenvolvidos métodos em citologia de BL que proporcionaram o aprimoramento técnico no preparo das amostras, apresentação e melhoria na qualidade da amostra³.

A eficácia do Método de Papanicolaou passou a ser aprimorada e diferentes estudos comparativos com essa nova técnica têm mostrado seu potencial em identificar mais lesões cervicais do que o método convencional^{4,10}. Esse potencial pode estar diretamente relacionado ao método de preparo e ao sistema adotado para estudo. Em métodos *split-sample*, onde a amostra convencional é colhida prioritariamente à de base líquida, o rendimento parece ser ligeiramente inferior aos *direct to vial*, onde há apenas a coleta em base líquida^{2,12,18,22}. O método convencional está sujeito a múltiplos fatores que podem comprometer a qualidade de seu preparado, tais como a técnica e o instrumento de coleta, qualidade da fixação e coloração dos esfregãos¹⁴. A reprodutibilidade diagnóstica e a confiabilidade do método podem ser substancialmente melhorados com a formação profissional e educação continuada dos profissionais que realizam a leitura das lâminas²³.

A premente necessidade de se melhorar a qualidade do Método de Papanicolaou fez surgir, recentemente, em nosso meio um método de citologia de base líquida, que apresenta características de preservação de DNA, RNA e proteínas, capaz de viabilizar concomitantemente o teste de captura de híbridos.

Com a disponibilidade dessa tecnologia nos propusemos a avaliar seu potencial no chamado *Reflex testing* que tem sido proposto como um mecanismo de melhoria diagnóstica incorporando aos casos diagnosticados como atipias de células escamosas de significado indeterminado (ASCUS) o teste HC2 para DNA-HPV, conforme sugestão do consenso de Bethesda 2001. Esse procedimento, se utilizado de forma interpretativa, poderá levar o caso à revisão e o diagnóstico inicial de ASCUS poderá ser considerado lesão intraepitelial, posto que a dúvida seria dirimida mediante o resultado da HC2, embora o mesmo não seja aplicável ao AGUS por falta de evidências²³.

O objetivo deste estudo é avaliar o potencial da citologia em base líquida na identificação de lesões intraepiteliais cervicais

e correlacionar com o teste de captura híbrida para DNA-HPV de alto risco para otimização do Método de Papanicolaou.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram estudadas 842 amostras cérvicovaginais de mulheres atendidas no Hospital Leonor Mendes de Barros, participantes voluntárias do Projeto INCODEV ICA 4-CT-2001- (10013), no período de janeiro de 2002 a maio de 2003, nos quais se realizou: citologia de BL, HC2 para HPV de alto risco e biópsia.

Foi utilizado o sistema DNA -CITOLIQ (Digene-Brasil) para citologia de BL, que consiste de um kit de coleta composto por um tubete com 1ml de solução *Universal Collection Medium* (UCM) e escova. A coleta foi realizada no hospital utilizando-se a escova do kit, quebrando a haste após ter sido colocada dentro do frasco com líquido preservante. No laboratório as amostras foram homogeneizadas em vórtex por 20 segundos e 200 µl foram retiradas e dispensadas sobre um conjunto de lâminas/membrana de maneira uniforme e fixadas imediatamente em álcool absoluto. A coloração utilizada foi a de Papanicolaou. Do material residual do DNA-CITOLIQ, foi retirado 75 µl para realização do HC2 para DNA-HPV de alto risco, conforme protocolo do kit de HC2. As biópsias foram coletadas nos casos em que a colposcopia apresentava alterações significativas.

RESULTADOS

Dos 842 casos com citologia de citologia de BL e HC2 para detecção de DNA HPV de alto risco, obtivemos 16,4% (138/842) de positividade para DNA-HPV de alto risco.

Dos 7,6% (64/842) casos de atipias de significado indeterminado, 57 eram em células escamosas (ASCUS) e 7 de origem glandular (AGUS), sendo 68,7% (44/64) negativos e 31,3% (20/64) positivos para HC2 DNA-HPV de alto risco. Dos 24 casos com lesão; 23 lesões intraepiteliais e um carcinoma e 75% (18/24) foram positivos para HC2 DNA-HPV de alto risco. Dos 748 casos citologicamente negativos, 13% (97/748) foram positivos para HC2 DNA-HPV de alto risco e 87% (651/748) foram negativos.

A Tabela 1 mostra os resultados dos 842 casos de citologia de BL e HC2 para HPV de alto risco. A Tabela 2 mostra a correlação dos resultados de casos com biópsias, HC2 e citologia de BL. Nota-se que há uma relação entre os casos com lesão e HC2 positivo.

DISCUSSÃO

A implantação da citologia de BL associada a HC2 para DNA-HPV tem mostrado melhoria da qualidade do exame citológico. A HC2 para DNA-HPV tem sido utilizado na tentativa de se aumentar a acurácia diagnóstica da citologia. A positividade

Tabela 1. Correlação dos resultados de citologia de base líquida com o teste de captura II para HPV de alto risco.

CITOLOGIA	CAPTURA DE HÍBRIDOS II		TOTAL
	Negativo	Positivo	
Negativo	651	97	748
LSIL	4	11	15
HSIL	2	6	8
ASCUS	41	16	57
AGUS	3	4	7
Carcinoma Invasor	-	1	1
Insatisfatório	3	3	6
TOTAL	704	138	842

Tabela 2. Correlação dos resultados de casos com biópsias, captura de híbridos II para HPV de alto risco e citologia de base líquida.

Biópsia	CAPTURA DE HÍBRIDOS II							
	Negativo (n=39)		NIC 1 (n=9)		NIC 2 (n=4)		NIC 3 (n=2)	
	positivo	negativo	positivo	negativo	positivo	negativo	positivo	negativo
Citologia								
Negativo	3	25	-	1	-	-	2	-
ASCUS	2	4	5	1	2	-	-	-
AGUS	1	1	-	-	-	-	-	-
LSIL	-	2	-	-	-	-	-	-
HSIL	-	1	2	-	2	-	-	-
Total	6	33	7	2	4	-	2	-

de HC2 para DNA-HPV oncogênico representa um risco significativo de lesão, mesmo em pacientes citologicamente negativas⁶. Segundo Manos e cols esta associação, conhecida como *reflex testing*, tem se mostrado eficaz podendo detectar até 50% de HPV oncogênico em séries de ASCUS ressaltando o grande impacto que esses números podem traduzir em termos de conduta e valor preditivo¹¹. Parece-nos claro que, embora de significado impreciso pelos padrões citológicos, aceitos rotineiramente, esses casos positivos para HPV poderão ser interpretados como lesões de fato e não apenas como potencialmente suspeitos de lesão²³.

Dos 64 casos de ASCUS/AGUS observados em nossa série, 20 resultados tinham HC2 positivos para HPV de alto risco, com um percentual de positividade de 31%. Ou seja, quase um terço dos diagnósticos citológicos que representam uma indefinição poderiam ser reavaliados e mais apropriadamente encaminhados à colposcopia.

Nos Estados Unidos, aproximadamente dois milhões de ASCUS são relatados por ano, uma média de 2,9% de todos os resultados citológicos cérvico-vaginais. Em alguns laboratórios esse índice pode chegar a 9%²⁰. Em nossa série, esse índice foi de 7,6% (64/842). Embora 5% seja o índice máximo sugerido por

Bethesda¹⁸ como aceitável, esse diagnóstico poderá ser otimizado com recurso de biologia molecular. O teste de Papanicolaou tem limitações inerentes a métodos de avaliação subjetiva, pois depende de observações morfológicas, o que pode causar uma variabilidade interobservadores significativa.

Em nosso estudo, testes de Captura híbrida positivos foram encontradas em 97 amostras citologicamente negativas 97/748 (12,9%) e em 20 amostras com ASCUS/AGUS 20/64 (31,2%). Esses resultados processados em conjunto poderiam otimizar o diagnóstico citológico e diminuir drasticamente os índices de falsos negativos⁸. Apesar disso, o real impacto da citologia BL e HC2 para DNA- HPV são baseados na avaliação histopatológica. E nessa comparação tanto a citologia de BL quanto o HC2 para DNA-HPV apresentam correlação bastante significativa com biópsias revelando que o melhor desempenho da base líquida em relação ao método convencional tem sido confirmado pela histologia^{4,22} e pela positividade do HC2 para DNA-HPV¹⁶. Apesar da implantação da citologia em base líquida apresentar relatos de incremento diagnóstico em relação ao método convencional em programas de escrutínio^{5,15,21}, há ainda alguns relatos que são mais resistentes em reconhecer a necessidade de conversão de um método para outro¹⁹.

As alterações morfológicas na citologia ou histologia representadas pelo coilocito que, em grande parte traduziria a expressão morfológica da infecção pelo HPV, não são específicas ou sensíveis suficientes para identificar uma infecção por HPV oncogênico e, mais frequentemente, está associada às lesões de baixo grau. Esse é um fator limitante do método citológico devendo-se reconhecer que tal limite poderá ser superado com a adição de testes biomoleculares para a identificação de HPV de alto risco¹⁷. É importante reconhecer que o HPV pode ser detectado de maneira muito confiável pelo HC2 para DNA-HPV e que os resultados podem diferir extraordinariamente em relação ao método de Papanicolaou. Atualmente o teste disponível tem mostrado um bom desempenho, com sensibilidade superior a 90% para lesões de alto grau^{6,16}.

Recentemente, o FDA (*Food and Drugs Administration*) nos Estados Unidos aprovou o uso do chamado *DNA Pap Test*, onde a citologia em base líquida poderá ter o HC2 realizada concomitantemente⁸. Entre as muitas vantagens dessa estratégia está o fato de que ambos os testes oferecem um altíssimo valor preditivo negativo, o que pode dar à paciente um intervalo confiável de 5 anos entre um teste e outro.

REFERÊNCIAS

1. Bernstein, SJ; Sanchez-Ramos, L; Ndubisi, B. Liquid-based cervical cytology smear study and conventional papanicolaou smears: A metaanalysis of prospective studies comparing cytologic diagnosis and sample adequacy. **Am J Obstet Gynecol**, 185: 308-317, 2001.
2. Biscotti, CV et al. Thin-layer Pap test vs. Conventional pap smear. Analysis of 400 split-samples. **J Reprod Med**, 47: 9-13, 2002.
3. Bishop JW. Comparison of the CytoRich system with conventional cervical cytology. Preliminary data on 2032 cases from a clinical trial site. 41: 15-23, 1997.
4. Bishop, JW et al. Multicenter masked evaluation of Autocyte PREP thin layer with matched conventional smears. Including initial biopsy results. **Acta Cytol**, 42: 189-197, 1998.
5. Bolick, DR; Hellman, DJ. Laboratory implementation and efficacy assessment of the ThinPrep cervical cancer screening system. **Acta Cytol**, 42: 209-213, 1998.
6. Castle, PE et al. Absolute risk of a subsequent abnormal Pap among oncogenic human papillomavirus DNA-positive, cytologically negative women. **Cancer**, 95: 2145-2151, 2002.
7. Cohn, DE; Herzog, TJ. New innovations in cervical cancer screening. **Gynecologic Surgery and Oncology**, 44: 538-549, 2001.
8. FDA News. FDA approves expanded use of HPV test. <http://www.fda.gov/bbs/topics/news/2003/new00890.html>.
9. Ferenczy, A; Franco, E. Cervical-cancer screening beyond the year 2000. **Lancet-Oncology**, 2: 27-32, 2001.
10. Hessling JI et al. Effectiveness of thin layer preparations vs. Conventional pap smear in a blinded, split-sample study. Extended cytologic evaluation. **J Reprod Med**, 46: 880-886, 2001.
11. Manos, MM et al. Identifying women with cervical neoplasia using human papillomavirus DNA testing for equivocal Papanicolaou results. **JAMA**, 281: 1605-1610, 1999.
12. Marino, JF; Fremont-Smith, M. Direct-to-vial experience with AutoCyte PREP in a small New England regional cytology practice. **J Reprod Med**, 46: 353-358, 2001.
13. McCrory, D et al. **Evaluation of cervical cytology**. Evidence Report/Technology Assessment Number 5. Duke University, 290-97-0014; Agency for Health Care Policy and Research, 99-E010. Rockville, MD: Agency for Health Care Policy and Research, 1999.
14. Minge, L et al. Autocyte Prep System vs conventional cervical cytology. Comparison based on 2,156 cases. **J Reprod Med**, 45: 179-184, 2000.
15. Monsonego, J et al. Liquid-based cytology for primary cervical cancer screening: a multi-center study. **Br J Cancer**, 84: 360-366, 2001.
16. Petry, KU et al. Inclusion of HPV testing in routine cervical cancer screening for women above 29 years in Germany: results for 8,466 patients. **Br J Cancer**, 88: 1570-1577, 2003.
17. Saslow, D et al. American cancer society guideline for the early detection of cervical neoplasia and cancer. **CA Cancer J Clin**, 52: 342-362, 2002.
18. Solomon, D et al. The 2001 Bethesda System. Terminology for reporting results of cervical cytology. **JAMA**, 287: 2114-2119, 2002.
19. Sulik, SM et al. Are fluid-based cytologies superior to the conventional Papanicolaou test?. A systematic review. **J Fam Pract**, 50: 1040-1046, 2001.
20. Qudus, MR et al. Utility of HPV DNA Detection in thin-layer, liquid-based tests with atypical squamous metaplasia. **Acta Cytol**, 46: 808-812, 2002.
21. Vassilakos, P et al. CytoRich liquid-based cervical cytologic test. Screening results in a routine cytopathology service. **Acta Cytol**, 42: 198-202, 1998.
22. Vassilakos, P et al. Biopsy-based comparison of liquid-based, thin layer preparations to conventional Pap smears. **J Reprod Med**, 45: 11-16, 2000.
23. Wright Jr, TC et al. 2001 Consensus guidelines for the management of women with cervical cytological abnormalities. **JAMA**, 287: 2120-2129, 2000.

Avaliação da qualidade de Albumina 20% e Imunoglobulina G 5% produzidas pelo método de cromatografia líquida, no período de 5 anos

Quality evaluation of Albumin 20% and Immunoglobulin G 5% by means of liquid chromatography method: data from five years period-study

RIALA6/984

Kimiyuki TANAKA^{1*}, Eiko SAWATAN², Emília M. SHIGUEOKA², Georgia A. DIAS¹, Fernando ARASHIRO¹

* Endereço para correspondência: Av. Dr. Eneas de Carvalho Aguiar, 155 - 1º Andar - CEP 05304 - 000 São Paulo - Brasil
Fundação Pró-Sangue Hemocentro de São Paulo - Secretaria de Saúde - Governo do Estado de São Paulo

¹ Divisão de Pesquisa e Desenvolvimento Industrial

² Divisão de Controle de Qualidade de Hemoderivados

Recebido: 30/06/2003 - aceito para publicação 06/05/2004

RESUMO

A qualidade das soluções de albumina 20% e de imunoglobulina G 5%, produzidas na Fundação Pró-Sangue Hemocentro de São Paulo, foi avaliada pelo método de cromatografia líquida, durante o período de 5 anos. Durante esse período, os medicamentos foram estocados a temperatura de 4° C a 8° C. O método de análise utilizado foi o recomendado pela Portaria nº 2,419 de 17/12/1996 do Ministério da Saúde, Resolução nº 46 de 18/05/2000, Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Ministério da Saúde e Farmacopéia Européia (1997, 2ª edição). As avaliações de qualidade realizadas durante os últimos 5 anos não apresentaram quaisquer alterações nos valores obtidos quando da liberação dos produtos, com exceção da análise de distribuição molecular, na qual se constatou um leve aumento em porcentagem de dímeros nas soluções de albumina 20% e de IgG 5%. Na solução de IgG 5%, após 5 anos de estocagem, foi observada a presença de moléculas poliméricas. Apesar dessas alterações nos referidos produtos, os valores obtidos estão dentro das especificações estabelecidas pelo país.

Palavras-Chave. avaliação da qualidade de albumina, avaliação da qualidade de IgG, proteínas de plasma, controle de qualidade de hemoderivados.

ABSTRACT

The quality of albumin 20% and immunoglobulin G 5%, produced by Fundação Pró-Sangue Hemocentro de São Paulo was assessed by means of liquid chromatography method, for five years period. Immunoglobulin G 5% and albumin 20% were re-evaluated two and three years, respectively after being produced. Five years after manufacturing date, both products were assessed once again. During five years period-study, the products were stored at temperature ranging from 4° C to 8° C. The quality analysis was performed employing the method recommended by Regulation N. 2,419 of 17/12/1996 of the Brazilian Health Ministry, and by Resolution RDC N. 46, 18/05/2000 of the National Agency for Sanitary Surveillance - Brazilian Health Ministry, and European Pharmacopoeia 1997, 2nd edition. In quality assessments carried out for the last five years, no change was observed in the obtained values when compared to those presented at the time of the products release, with the exception in molecular analysis distribution, which presented a slight increase in dimmers percentage in albumin 20% and in immunoglobulin G 5% solutions. Also, the presence of polymers was detected in immunoglobulin 5% solution after five years storage. In spite of occurring these changes in the analyzed products, the observed values were within the specific requirement recommendation established by the country.

Key Words. plasma protein, quality control of albumin, quality control of IgG, quality evaluation of hemoderivatives

INTRODUÇÃO

A albumina é a proteína que se encontra em maior quantidade dentro do plasma humano, constituindo cerca de 4,5 g % em uma população normal, com massa molar entre 67.000 a 69.000 daltons. A albumina exerce duas funções importantes: uma de manutenção da pressão oncótica e a outra, na capacidade de fixar e transportar grande quantidade de ligantes livrando assim o organismo de produtos tóxicos¹. No Brasil, o consumo de albumina humana na concentração de 20% está em torno de 1.500.000 frascos de 50 ml por ano, segundo dados da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA/MS, 2001).

A imunoglobulina G (IgG) é encontrada em torno de 1,2 g % dentro do plasma humano. A sua massa molar está na faixa de 160.000 daltons e exerce função de defesa contra agentes estranhos ao organismo, atuando com um amplo espectro de anticorpos específicos antibacterianos e virais². A demanda brasileira de IgG 5% intravenosa é de aproximadamente, 280.000 frascos de 50 ml por ano, segundo dados da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA/MS, 2001).

Os medicamentos derivados de plasma humano, albumina 20%^{3,4,5} e imunoglobulina G (IgG) 5% líquida intravenosa^{6,7} foram produzidas em escala industrial em planta-piloto, com capacidade de processar 100 litros de plasma em cada lote, na Fundação Pró-Sangue Hemocentro de São Paulo, pelo método de cromatografia líquida. Para garantir a segurança biológica, a solução de albumina a 20% foi submetida à inativação viral, utilizando-se o método de pasteurização a 60° C por 10 horas^{8,9}. A solução de IgG a 5% foi submetida à dupla inativação viral, sendo uma delas com o solvente / detergente (1% de Tri n-butyl fosfato e 1% de Triton X-100) e a outra a pH 4,0 com pepsina^{10,11}. Todas as unidades de plasma usadas para fracionamento foram submetidas a testes sorológicos para Doença de Chagas, Sífilis, anti-HIV 1 e 2, anti-HTLV I e II, anti-HCV, anti-HBc e HBs-Ag no Departamento de Sorologia da Fundação Pró-Sangue Hemocentro de São Paulo (FPS/HSP). Foram utilizadas somente unidades com resultados negativos.

Os produtos foram avaliados por 5 anos e durante esse período ficaram estocados na temperatura de 4° C a 8° C. Todas as análises foram executadas com rigor quanto a estabilidade, pureza e contaminação viral, por serem produtos biológicos.

MATERIAL E MÉTODOS

Os métodos de avaliações foram realizados segundo a Portaria nº 2.419 de 17/12/1996 do Ministério da Saúde¹², Resolução RDC nº 46 de 18/05/2000, ANVISA – Ministério da Saúde¹³ e Farmacopéia Européia (1997), 2ª Edição¹⁴. As análises foram realizadas em 3 etapas: a primeira, para aprovação dos produtos. A segunda, nos períodos de vencimento de 3 anos para albumina 20% e 2 anos para IgG 5% líquida. A terceira e

última etapa após 5 anos, para ambos os produtos. Os valores de controle de qualidade obtidos para aprovação dos produtos foram considerados como padrão de referência para comparação. Os métodos utilizados para avaliações da qualidade dos produtos foram:

Avaliação da qualidade de solução de albumina 20%

Primeira etapa de análise para aprovação de solução de albumina 20%:- A pureza da albumina foi determinada por eletroforese de acetato de celulose e também por imunoeletroforese, utilizando-se soro anti-humano total contra a amostra (Figura 3). A concentração protéica foi determinada pelo método de biureto. O rendimento do produto foi calculado em relação à concentração de albumina no plasma a ser fracionado e à concentração de albumina no produto acabado. Foi determinada a presença do Ativador de Procalciferina (PKA) através do método de reação “end point”¹⁵, utilizando substrato cromogênico S-2302 (Chromogenix – Itália. O nível de alumínio presente no produto foi determinado pelo espectrofotômetro de absorção atômica pela Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais – Belo Horizonte. O teste de esterilidade foi realizado em membrana de steritest (Sterility Testing System – Millipore, USA). O pirogênio “in vivo” e a toxicidade foram testados no Laboratório Medlab Produtos Diagnósticos Ltda, São Paulo. O heme foi medido em espectrofotômetro em absorvância de 403 nm (Tabela 1 e Figuras 1 e 2).

A distribuição molecular da albumina foi avaliada pela cromatografia líquida utilizando gel de filtração Superdex 200 HR em coluna HiLoad™ 16/60 (Amersham Biosciences) (Tabela 1 e Figura 4).

Segunda etapa de análises nos períodos de vencimento:- Os valores obtidos foram idênticos aos iniciais, ou seja, aos produtos recém produzidos, com exceção da análise de distribuição molecular, na qual, no decorrer do tempo, até a data do vencimento, apresentou uma queda no valor de monômeros e ligeiro aumento de dímeros (Figura 5).

- Terceira etapa de análise após 5 anos de estocagem:- Nova análise foi realizada após 5 anos de estocagem e todos os valores encontravam-se normais, conforme o padrão. Quanto à distribuição molecular, novamente verificou-se alteração significativa. (Figura 6).

Testes Sorológicos

As amostras de cada lote de “pool” de plasma de 100 litros e de produtos acabados foram submetidos a testes sorológicos para anti-HIV 1 e 2, anti-HTLV I e II, anti-HCV e HBs-Ag por ELISA com duas procedências diferentes de conjuntos diagnósticos conforme a exigência da norma brasileira. Além desses, para HCV e HIV, foram realizados testes através da reação em cadeia da polimerase (PCR). Os kits usados foram das marcas Biomérieux bv (The Netherlands), Murex - Abbott (Republic of South Africa), Ortho-Clinical Diagnostics (USA), Amplicor[®] HCV, Roche (New Jersey, USA) e HIV (RNA) pela técnica de Nuclisens. Esses testes foram realizados no

Departamento de Sorologia e Departamento de Biologia Molecular da FPS/HSP.

Avaliação da qualidade de imunoglobulina G (IgG)

Primeira etapa de análise para aprovação de solução de IgG 5%:- A pureza de IgG líquida intravenosa, foi determinada por eletroforese de acetato de celulose e também por imunoeletroforese, utilizando-se soro anti-humano total contra a amostra (Figura 9). A concentração protéica foi determinada pelo método de biureto. O rendimento do produto foi calculado em relação à concentração de IgG no plasma a ser fracionado e à concentração de IgG no produto acabado. A distribuição molecular de IgG foi avaliada pela cromatografia líquida utilizando gel de filtração Superdex 200 HR em coluna HiLoad™ 16/60 (Amersham Biosciences). (Figura 10). As subclasses de IgG foram analisadas pelo método de imunodifusão radial (The Binding Site Inc., San Diego, CA, USA). Foi determinada a presença do Ativador de Procalcitrina (PKA) na IgG 5%, através do método de reação “end point”¹⁵, utilizando substrato cromogênico S-2302 (Chromogenix – Itália). A atividade anticomplementar (CH₅₀) foi determinada pelo método Mayer, utilizando complemento de coelho e hemácias de carneiro. O teste de esterilidade foi realizado em membrana de steritest (Sterility Testing System – Millipore, USA). O pirogênio “in vivo” e a toxicidade foram testados no Laboratório Medlab Produtos Diagnósticos Ltda, São Paulo. O nível de alumínio

presente no produto foi determinado pelo espectrofotômetro de absorção atômica na Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais, Belo Horizonte. As atividades de anti-pólio I-II e III, anti-sarampo e anti-herpes foram determinadas no Instituto Adolfo Lutz de São Paulo; anti-rubéola, anti-citomegalovírus e anti-streptolisina O foram determinadas no Laboratório de Imunologia Clínica de IAMSPE, São Paulo (Tabela 2, 3 e Figuras 7 e 8).

Segunda etapa de análises nos períodos de vencimento:- Os valores obtidos foram idênticos aos iniciais, com exceção da análise de distribuição molecular, na qual, no decorrer do tempo, até a data do vencimento, apresentou uma queda no valor de monômeros e ligeiro aumento de dímeros (Figura 11).

Terceira etapa de análise após 5 anos de estocagem:- Nova análise foi realizada após 5 anos de estocagem e todos os valores encontravam-se normais, conforme o padrão. Quanto à distribuição molecular novamente foram observadas alterações significativas (Figura 12).

RESULTADOS

Os valores obtidos nas análises realizadas em 20 lotes de soluções de albumina 20% e de IgG 5% líquida intravenosa, produzidas por método de cromatografia líquida, foram os seguintes:

Tabela 1. Características da solução de Albumina 20%.

Análise	Resultado	Especificação*
Rendimento (g/l plasma)	26,0+0,5	-
Concentração protéica (p/v)	20,0+1,0%	>95% - <105%
Pureza (electroforese de acetato de celulose)	>99,0%	>95%
Distribuição molecular		
Monômeros	99,0+0,3%	mono+dímeros=95%
Dímeros	1,0+0,3%	
Polímeros	não detectado	polímeros=5%
Pirogenios	Satisfatório	Satisfatório
Toxicidade	Satisfatório	Satisfatório
Caprilato de sódio	0,16mmol/g prot	-
Determinação de PKA	<5 IU/ml	<35 UI/ml
Alumínio	<50 µg/l	<200 µg/l
pH	6,8 to 7,0	6,7 to 7,3
Sódio	140+5 mmol/l	<160 mmol/l
Potássio	<0,05mmol/g prot	<0,05mmol/g prot
Heme (absorbância a 403 nm)	<0,04	<0,15
Anti-HIV 1 e 2	Negativo	Negativo
Anti-HCV	Negativo	Negativo
HBs-Ag	Negativo	Negativo
Anti-HTLV-I e II	Negativo	Negativo

N=20 * Portaria nº 2.419 - MS¹², Resolução-RDC nº 46 - ANVISA/ MS¹³ e European Pharmacopeia¹⁴.

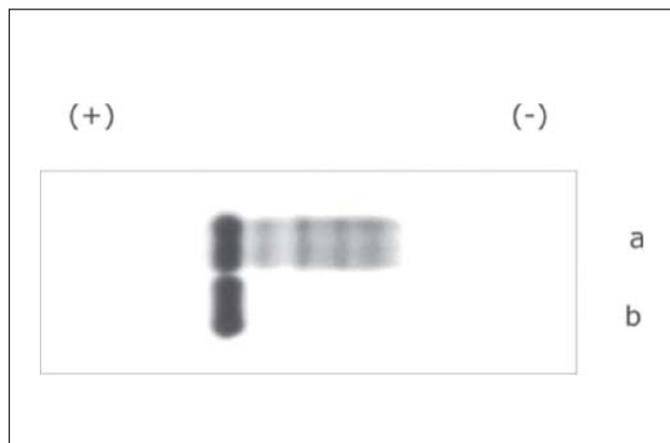


Figura 1. Eletroforese em acetato de celulose - a) "Pool" de plasma. b) Albumina

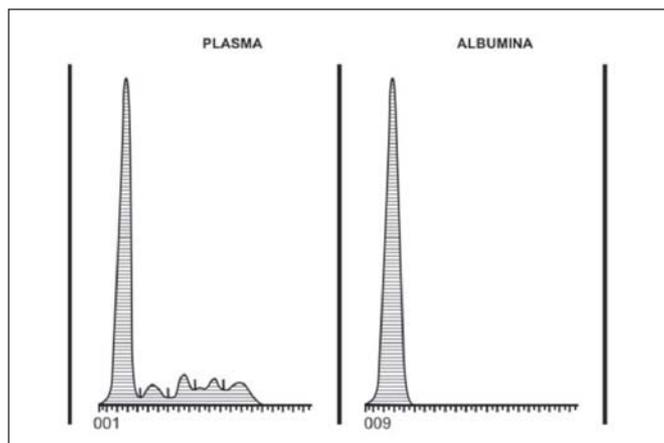


Figura 2. Perfil densitométrico de eletroforese em acetato de celulose

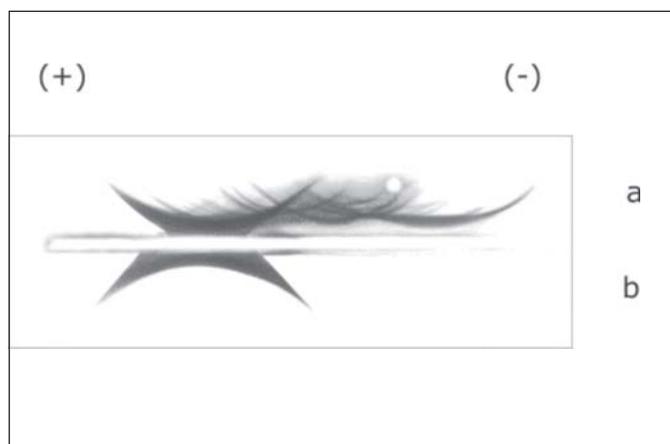


Figura 3. Imunoeletroforese - a) "Pool" de plasma. b) Albumina

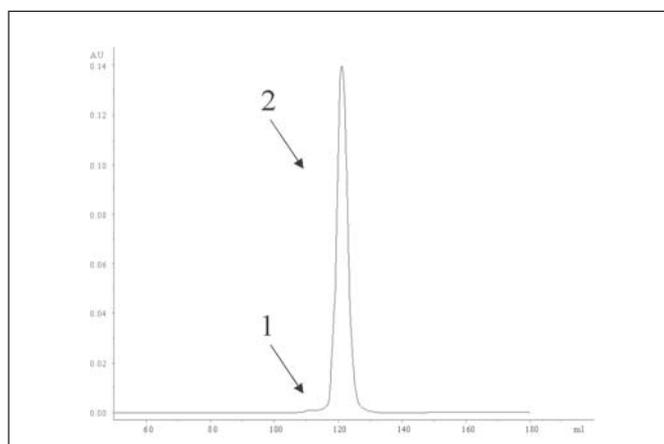


Figura 4. Determinação de polímeros da albumina em gel Sephadex 200, para aprovação e liberação do produto.

1 - Dímeros = 0,7 %
2 - Monômeros = 99,3%

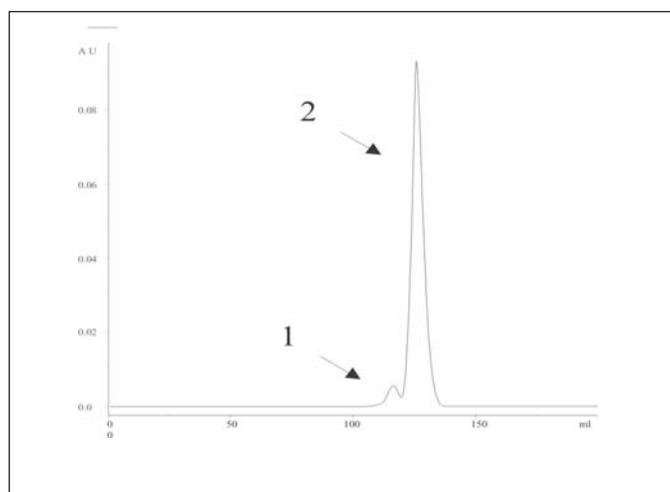


Figura 5. Determinação de polímeros da albumina em gel Sephadex 200, com 3 anos de estocagem após a data de vencimento.

1 - Dímeros = 1,8 %
2 - Monômeros = 98,2 %

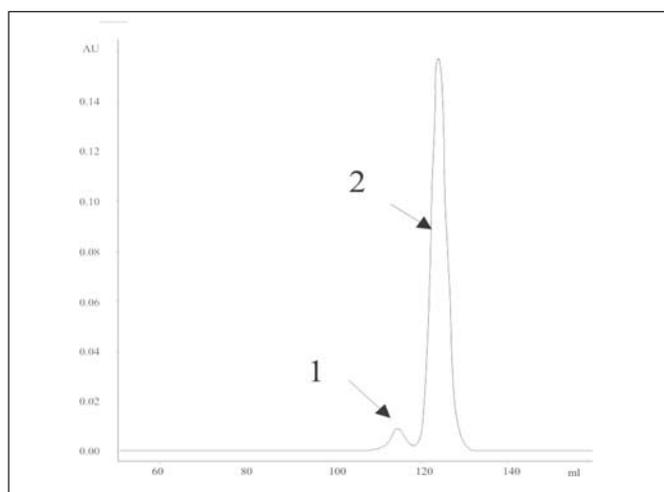


Figura 6. Determinação de polímeros da albumina em gel Sephadex 200, após 5 anos de estocagem.

1 - Dímeros = 3,0 %
2 - Monômeros = 97,0 %

Tabela 2. Características da Ig G 5% líquida intravenosa com dupla inativação viral.

Análise	Resultado	Especificação*
Concentração protéica	5,0 + 0,2%	>4,6 to <5,5%
Determinação de pH	4,5 – 5,0	4,0 – 7,4
Pureza (eletroforese)	> 98%	>95%
IgA	N.D.	-
IgM	N.D.	-
Anti-A hemaglutinina	< 1:8	< 1:64
Anti-B hemaglutinina	< 1:8	< 1:64
Atividade anticomplementar	< 0,55CH ₅₀ /mg IgG	< 1 CH ₅₀ /mg IgG
Determinação de PKA	< 5,0 IU/ml	< 35 IU/ml
Alumínio	< 50 ¼g/l	< 200 ¼g/l
Distribuição molecular		
Monómeros	98,8 + 0,5%	mono+dímeros=90%
Dímeros	1,2 + 0,5%	
Polímeros	N.D.	polímeros < 3%
Subclasses de IgG		
IgG ₁	58,4%	distribuição de subclasses similar ao plasma.
IgG ₂	32,8%	
IgG ₃	4,5%	
IgG ₄	2,3%	
Rendimento	3,8 + 0,2g/l plasma	-
Estabilidade (aquecimento 57°C/4h)	satisfatório	não deve gelificar
Pirogênio “in vivo”	satisfatório	satisfatório
Toxicidade	satisfatório	satisfatório
HBs-Ag	Negativo	Negativo
Anti-HCV	Negativo	Negativo
Anti-HIV 1 e 2	Negativo	Negativo
Anti-HTLV-I e II	Negativo	Negativo

N=20 ND=Não Detectado * Portaria nº 2.419 - MS¹², Resolução RDC nº 46 - ANVISA / MS¹³ e European Pharmacopoeia¹⁴

Tabela 3. Espectros de anticorpos em IgG 5% líquido intravenosa.

Anticorpos	Método	Título e/ou unidade
Anti-herpes	Imunofluorescência	1:128
Anti-pólio I	Teste de neutralização	1:256
Anti-pólio II	Teste de neutralização	1:128
Anti-pólio III	Teste de neutralização	1:64
Anti-sarampo	Inibição de hemaglutinação	1:64
Anti-rubeola	ELISA	765 UI/ml
Anti-citomegalovirus	ELISA	887 UI/ml
Anti-streptolisina O	Nefelometria	721 UI/ml

N=10



Figura 7. Eletroforese em acetato de celulose - a) "Pool" de plasma. b) Imunoglobulina G

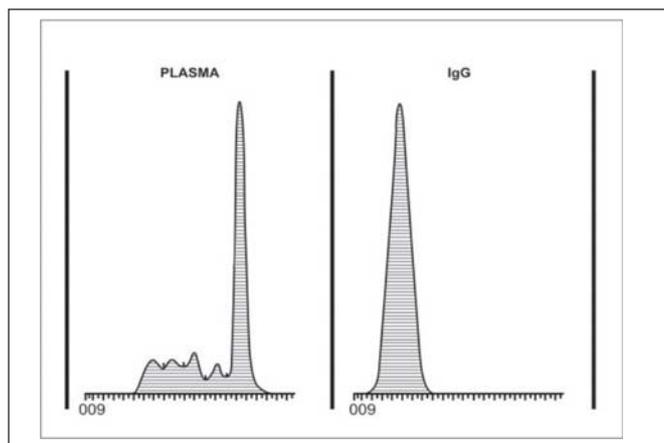


Figura 8. Perfil densitométrico de eletroforese em acetato de celulose

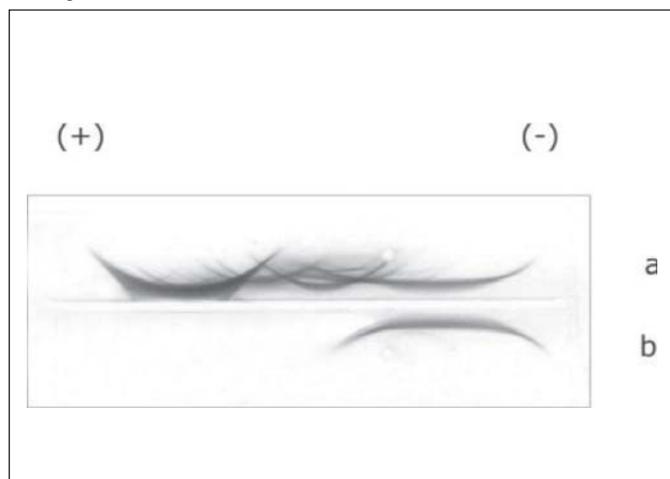


Figura 9. Imunoeletroforese - a) "Pool" de plasma. b) Imunoglobulina G

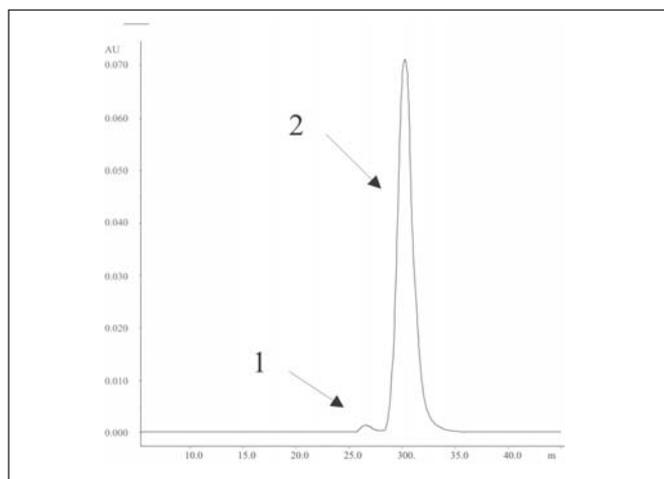


Figura 10. Determinação de polímeros de IgG em gel Sephadex 200, para aprovação e liberação do produto.

1 - Dímeros = 1,2 %
2 - Monômeros = 98,8 %

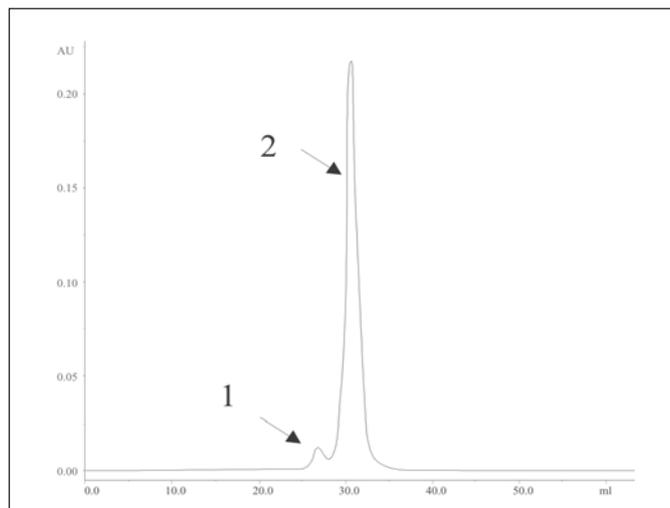


Figura 11. Determinação de polímeros de IgG em gel Sephadex 200, com 2 anos de estocagem, após data de vencimento.

1 - Dímeros = 2,5 %
2 - Monômeros = 97,5 %

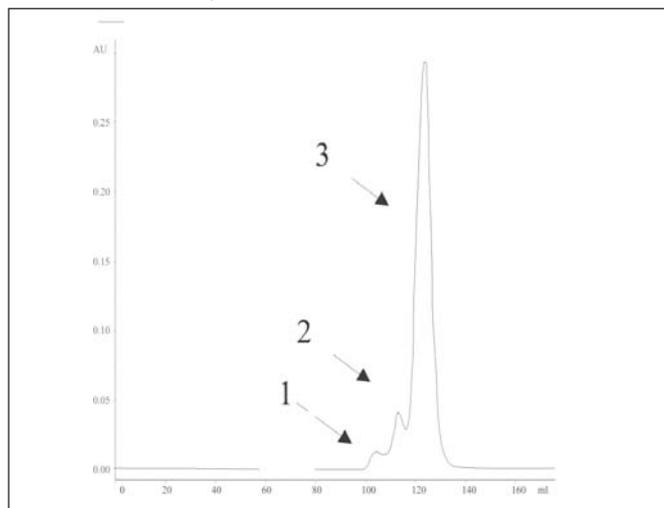


Figura 12 - Determinação de polímeros de IgG em gel Sephadex 200, após 5 anos de estocagem.

1 - Polímeros = 2,3 %
2 - Dímeros = 5,5 %
3 - Monômeros = 92,2 %

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

A qualidade das soluções de albumina 20% e de Imunoglobulina G 5% produzidas pelo método de cromatografia líquida na Fundação Pró-Sangue Hemocentro de São Paulo foi avaliada durante o período de 5 anos. Os métodos de análise utilizados foram os recomendados pela Resolução RDC nº 46 de 18 de maio de 2000, ANVISA – Ministério da Saúde¹³ e Farmacopéia Européia (1997), 2ª Edição¹⁴. A primeira análise foi realizada para aprovação dos produtos e os valores obtidos nessas avaliações de qualidade foram considerados como padrão para comparação posterior. A segunda análise foi realizada nos períodos de vencimento de 3 anos para albumina 20% e 2 anos para IgG 5%, e a terceira, após 5 anos para ambas. Os valores obtidos na segunda análise foram idênticos aos iniciais, com exceção da análise de distribuição molecular, na qual, no decorrer do tempo até a data de vencimento constatou-se uma queda no valor de monômeros e ligeiro aumento de dímeros. A albumina 20% apresentou queda de 99,0% para 98,2% de monômeros e aumento de dímeros de 0,7% para 1,8% (Figuras 4 e 5). Em relação à IgG 5%, também houve queda de 98,8% para 97,5% de monômeros e aumento de dímeros de 1,2% para 2,5%. (Figura 10 e 11) Após 5 anos de estocagem dos mesmos produtos, uma nova análise foi realizada e todos os valores encontraram-se normais, conforme o padrão, porém a distribuição molecular, novamente mostrou alteração significativa. A albumina 20% apresentou uma queda de 99,0% para 97,0% de monômeros e aumento de dímeros de 0,7% para 3,0% (Figuras 4 e 6). A solução de IgG 5% apresentou uma queda mais acentuada, de 98,8% para 92,2% de monômeros e aumento de dímeros de 1,2% para 5,5%. Uma alteração significativa foi observada em solução de IgG 5%, com a presença de 2,3% de polímeros (Figuras 10 e 12). Apesar das diferenças apresentadas pelos produtos, os valores obtidos estão dentro dos padrões de referência, recomendados pela Resolução RDC nº 46 e Farmacopéia Européia (1997).

Os resultados obtidos permitem concluir que a utilização do método de cromatografia líquida para produção industrial de medicamentos derivados de plasma humano, resultou em produtos de alto grau de pureza, boa estabilidade e bom rendimento. O método cromatográfico é uma tecnologia moderna e eficiente para produção de derivados de plasma e tem como característica principal não causar danos às moléculas protéicas durante o processamento. Além disso, este método tem a vantagem de introduzir o procedimento de dupla inativação viral para IgG durante o processo de produção, sem adicionar etapas especiais ao mesmo.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Dra. Érica Kitahara e Dra. Paula Kagueyama da Amersham Biosciences, e Dr. Oswaldo Koga da Millipore, pelo apoio e concessão de géis de cromatografia e de Pellicon Cassette System 100.000 daltons.

Agradecimento especial: Kimiyuki Tanaka agradece ao sr. Yoitiro Hiraiwa, “aquele que me colocou no trilho da vida para seguir avante e vencer; meu sucesso devo à você, muito obrigado Hiraiwa-sam”.

REFERÊNCIAS

1. Tanaka K. – **Fracionamento de plasma humano para obtenção de albumina em escala industrial pelo método de cromatográfico**. São Paulo, 1992. (Tese de doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo)
2. Ferri R. G., Calich V. L. G. e Vaz C. A. C.. - **Imunologia**. Editora Edgard Blücher Ltda São Paulo, 1977.
3. Curling J.M. - **Separation of Plasma Proteins**. Pharmacia Fine Chemicals A.B., Uppsala, Sweden, 1983.
4. Tanaka K. et al. - An alternative column chromatographic process for the production of human albumin. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, 29: 185-191, 1996.
5. Tanaka K. et al. – Purification of human albumin by the combination of the method of Cohn with liquid chromatography. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, 31: 1383-1388, 1998.
6. Tanaka K. et al. - A chromatographic method for the production of a human immunoglobulin G solution for intravenous use. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, 31: 1375-1381, 1998.
7. Tanaka K. et al. – High quality immunoglobulin G purified from Cohn fraction by liquid chromatography. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, 33: 27-30, 2000.
8. Gellis S. S. – Chemical clinical and immunological studies on the products of human plasma fractionation. Inactivation of the virus of homologous serum hepatitis in solutions of normal human serum albumin by means of heat. **Journal of Clinical Investigation**, 27: 238-244, 1948.
9. Murray R. e Diefenbach W. C. I. - Effect of heat on the agent of homologous serum hepatitis. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, 84: 230-231, 1953.
10. Horowitz B. et al. - Inactivation of viruses in labile blood derivatives: I. Disruption of lipid-enveloped viruses by tri (n-butyl) phosphate detergent combination. **Transfusion**, 25: 516-522, 1985.
11. Hamalainen E., Suomela H. and Kukkonen P. - Virus Inactivation during Intravenous Immunoglobulin Production. **Vox Sang.** 63:06-11, 1992.
12. Portaria nº 2.419 de 17/12/1996. Diário Oficial da União (19 / 12 / 1996). – Ministério da Saúde.
13. Resolução-RDC nº 46 de 18/05/2000. Diário Oficial da União (19 / 05 / 2000). – Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Ministério da Saúde.
14. European Pharmacopoeia - Maisonneuve S.A., Sainte Ruffine, France. 1997, 2nd edition Part II.
15. Sawatani E. et al. - Extração de substrato de procalcireina para determinação do ativador de procalcireina (PKA) na albumina e IgG humano. **LAES & HAES**, 114:168-174, 1998.

Avaliação dos testes empregados no diagnóstico laboratorial da tuberculose pulmonar em pacientes HIV positivos

Assessment of the laboratory tests employed for pulmonary tuberculosis diagnosis in HIV positive patients.

RIALA6/985

Andréa G. V. COELHO*, Líliliana A. ZAMARIOLI, Clemira M. P. V. REIS, Teresa Á. R. FIGUEIREDO

* Endereço para correspondência: Instituto Adolfo Lutz – Laboratório I de Santos, Seção Biologia Médica, Área de Micobactérias, Rua Silva Jardim, 90, Vila Nova, Santos – SP, CEP11015-020 – Tel: (13) 3232-5112 – e-mail: dea_gobetti@hotmail.com

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar os testes laboratoriais empregados no diagnóstico da tuberculose pulmonar e outras micobacterioses, em pacientes HIV positivos com suspeita de tuberculose pulmonar, atendidos no Centro de Referência em AIDS de Santos (CRAIDS) entre janeiro/1997 e dezembro/2000. Das 1.662 amostras de pacientes HIV positivos, 288 (17,3%) amostras de escarro foram positivas, das quais 169 (58,7%) por meio de técnica de baciloscopia e cultura, 103 (35,8%) pela técnica de cultura e 16 (5,5%) por meio de baciloscopia. Das amostras positivas, 216 (75%) delas foram originadas da primeira amostragem e, portanto, corresponderam às notificações do período. Dentre estas foram isoladas 191 (88,4%) micobactérias do complexo *Mycobacterium tuberculosis* e 25 (11,6%) de outras micobactérias. A maior ocorrência de tuberculose pulmonar em pacientes HIV positivos foi verificada no sexo masculino (71%), na faixa etária entre 30-40 anos (47%). O estudo ressalta a necessidade da realização da cultura e da identificação das espécies micobacterianas isoladas além da baciloscopia no diagnóstico da tuberculose pulmonar em pacientes co-infectados com o vírus HIV. Acreditamos ser este mais um subsídio importante para o conhecimento epidemiológico da coinfeção AIDS –TB, uma vez que 11,5% dos casos eram de micobacteriose e 35,8% de pacientes paucibacilares.

Palavras-Chave. tuberculose - HIV, micobactérias atípicas, diagnóstico laboratorial, pacientes HIV positivos.

ABSTRACT

The purpose of this study was to assess the laboratory tests employed for pulmonary tuberculosis diagnosis in HIV positive patients with suspected pulmonary tuberculosis (Tb) and other mycobacteria, who were attended at the AIDS REFERENCE CENTER, Santos-SP (CRAIDS), from January 1997 to December 2000. Analyzing 1662 sputum samples, 288 (17.3%) were positive being 169 (58.7%) by means of microscopy and culture technique, 103 (35.8%) by means of culture technique, and 16 (5.5%) by microscopy. Of positive samples, 216 (75%) represented as the first sample, thus corresponding with the notification of the period. Among them, *Mycobacterium tuberculosis* complex was isolated in 191 (88.4%) samples, and other mycobacterias were detected in 25 (11.6%). The major occurrence of pulmonary tuberculosis was in male (71%) HIV co-infected patients of the age varying from 30 to 40 years old (47%). This study shows that the culture procedure and typification of mycobacteria are necessary for the pulmonary tuberculosis diagnosis in HIV positive patients in addition to microscopy technique. We believe that this study is one most remarkable subsidy for epidemiological knowledge on AIDS-Tb co-infection, since 11.5% of positive samples were due to atypic mycobacteria, and 35,8% were paucibacilar.

Key Words. Tuberculosis - HIV, atypic mycobacteria, laboratory diagnosis, HIV positive patients.

INTRODUÇÃO

A tuberculose é a doença infecciosa mais comum da humanidade, de notificação compulsória, que constitui, desde a metade do século, um grave problema de Saúde Pública principalmente nos países em desenvolvimento, onde prevalecem a miséria e a desnutrição. Atualmente estima-se que cerca de 25% a 30% da população brasileira alberga o bacilo da tuberculose (TB), ocorrendo aproximadamente 90 mil casos da doença, que resultam em 5 mil óbitos anualmente. Esses números, porém, não traduzem a realidade, uma vez que se deve levar em conta a subnotificação decorrente das deficiências da rede de Saúde Pública, das dificuldades no diagnóstico ou até mesmo na identificação dos enfermos que não procuram os Postos de Saúde^{1,7,22}.

Diferente do que se imaginou nas décadas de 60 e 70, de que, com a conquista de uma potente quimioterapia a doença tenderia a um efetivo controle, entretanto a tuberculose recrudescceu em todo o mundo. Este recrudescimento foi facilitado por suas relações com a pandemia do HIV, pela ampliação da miséria da população desfavorecida, em contraste com o aumento da longevidade nas mais desenvolvidas, pela progressiva diminuição dos investimentos no setor de saúde e a deterioração dos serviços de assistência pública^{7,9}.

Estudos mostram que o bacilo da tuberculose se encontra em estado latente em cerca de 1/3 da população mundial, desta forma, é de se esperar um aumento nos casos de tuberculose num paciente imunodeprimido, como o infectado pelo HIV. A TB leva a óbito 32% dos indivíduos com AIDS, representando o triplo das mortes causadas por qualquer outra causa patológica nestes pacientes. Além disso, mulheres com tuberculose morrem mais do que todas as causas de mortalidade materna somadas; e mata mais jovens e adultos do que qualquer outra doença infecciosa. O risco anual de progressão para tuberculose-doença, entre os pacientes coinfectados pelo *Mycobacterium tuberculosis* – HIV, varia de 5% à 15%, contra 0,5% à 1% nos não co-infectados. A probabilidade de um indivíduo HIV negativo e infectado por tuberculose vir a adoecer durante toda a sua vida é cerca de 10%, enquanto para o HIV positivo a taxa de adoecimento é de 10% a cada ano^{7,18,21}.

No Brasil entre os casos de AIDS notificados pelo Ministério da Saúde (MS), a tuberculose é a terceira infecção mais freqüente (20%). Cerca de 29% dos pacientes com AIDS apresentam tuberculose no momento do diagnóstico e cerca de 50% dos infectados pelo HIV poderão ter tuberculose no decorrer de suas vidas. Em 1990, cerca de 4,2% de todos os casos de tuberculose foram atribuídos à infecção pelo HIV e em 1999 o município em estudo apresentou 564 casos de tuberculose, sendo 23,9% com sorologia positiva para o HIV^{4,6}.

A partir dos anos 80, com o advento da AIDS, a presença das micobactérias não tuberculosas (MNT) tornaram-se comuns em pacientes imunocomprometidos. Entre estas, *Mycobacterium kansasii* e *Mycobacterium avium* – *intracellulares* são espécies com alta freqüência de isolamento em doenças pulmonares

humanas. A prevalência de MNT no Brasil é de aproximadamente 6 por 1000 habitantes. Nos pacientes com HIV, 60% das MNT são representadas pelo complexo *Mycobacterium avium-intracellulare* e 16% pela *Mycobacterium kansasii*^{2,19}.

No Brasil, onde é alta a incidência da co-infecção TB/HIV, podemos esperar um aumento dos casos de MNT e de tuberculose extrapulmonar, assim o diagnóstico precoce e terapêutica apropriada para estes pacientes deve ser priorizada no intuito de diminuir a morbi/mortalidade associada à co-infecção¹⁸.

Assim, o presente estudo foi efetuado com o objetivo de avaliar os ensaios utilizados no diagnóstico laboratorial da tuberculose pulmonar em pacientes HIV positivos, atendidos no Centro de Referência em AIDS de Santos (CRAIDS).

MATERIAL E MÉTODOS

Entre janeiro/1997 a dezembro/2000, foram analisados 1662 amostras de escarro, de pacientes HIV positivos, com suspeita clínica de tuberculose pulmonar, procedentes do Centro de Referência em AIDS (CRAIDS) – Santos/SP. Deste total 1.212 representam primeira amostra (sintomáticos respiratórios) e 450 segunda e terceira amostra, conforme recomendações do Manual de Bacteriologia da Tuberculose¹⁶. Os dados dos pacientes, segundo sexo e faixa etária, foram verificados nas fichas de notificação procedentes do CRAIDS, e confrontados com os dados laboratoriais do Instituto Adolfo Lutz – Laboratório I de Santos.

Procedimentos Bacteriológicos

1 – Baciloscopia: foi realizado um esfregaço de cada amostra coletada e corado pelo Método de Ziehl-Neelsen. No caso de lâminas positivas realizou-se a contagem bacilar semiquantitativa conforme o índice baciloscópico recomendado pelo MS¹⁶.

2 – Cultura: os espécimes clínicos foram semeados em Meio de Lowestein-Jensen, após digestão e descontaminação pelo Método de Petroff^{16,17} e incubados a 37°C, por 60 dias e inspecionados semanalmente. Não havendo crescimento nos tubos após 60 dias, as culturas foram consideradas negativas.

3 – Identificação: culturas positivas foram encaminhadas ao IAL Central para identificação de acordo com as técnicas preconizadas pelo MS; observando-se a pigmentação das colônias, aspecto e realização de provas bioquímicas^{12,15,16}.

RESULTADOS

Do total de 1662 amostras de escarro analisados no diagnóstico de tuberculose pulmonar, provenientes de pacientes HIV+ atendidos no CRAIDS – Santos/SP, 1.212 espécimes eram de 1ª amostragem e 450 de 2ª e 3ª amostragem, representando 13% e 4% de culturas positivas respectivamente (Tabela 1). O

resultado segundo a técnica de cultura foi positivo em 288 (17,3%) sendo 169 (58,7%) detectadas através das técnicas de baciloscopia e cultura, 103 (35,8%) apenas pelo cultivo, isto é, apresentaram baciloscopia negativa e cultura positiva e 16 (5,5%) pela baciloscopia (Tabela 2).

No universo das 288 amostras de escarro positivas, 216 (75%) eram provenientes de sintomáticos respiratórios,

correspondendo assim a 1ª amostra, portanto de casos novos de tuberculose no período em análise (janeiro/1997 a dezembro/2000), as demais 72 (25%) amostras positivas representam a 2ª e 3ª amostra coletadas no período (Tabela 2).

Na Tabela 3 podemos verificar uma predominância do sexo masculino (71%) na faixa etária do 30-40 anos (47%) entre os pacientes HIV+ co-infectados pela TB.

Tabela 1. Exames realizados para diagnóstico de TB pulmonar, em pacientes HIV+, segundo a técnica de cultura, atendidos no CRAIDS – Santos/SP, no período de 1997 a 2000.

Ano	1ª. amostra		2ª. / 3ª. amostra		Total de amostras n° (%)
	P	N	P	N	
1997	66	226	20	90	402 (24)
1998	50	268	26	123	467 (28)
1999	53	263	11	92	419 (25)
2000	47	239	15	73	374 (23)
Total de amostras n° (%)	216 (13)	996 (60)	72 (4)	378 (23)	1662 (100)

P – positivo. N – negativo.

Tabela 2. Distribuição das 288 amostras de escarro positivas para diagnóstico de TB pulmonar, em pacientes HIV+, segundo técnica de baciloscopia e cultura, atendidos no CRAIDS – Santos/SP, no período de 1997 a 2000.

Ano	1ª. amostra			2ª. e 3ª. amostra			Total de amostras n° (%)
	BK(+) C(+)	BK(+) C(-)	BK(-) C(+)	BK(+) C(+)	BK(+) C(-)	BK(-) C(+)	
1997	37	01	28	14	00	06	86 (30)
1998	28	02	20	15	00	11	76 (26)
1999	26	09	18	08	00	03	64 (22)
2000	29	04	14	12	00	03	62 (22)
Total n° (%)	216 (75)				72 (25)		288 (100)

BK – baciloscopia, C – cultura, (+) – positivo, (-) – negativo

Tabela 3. Distribuição das 216 amostras de escarro positivas na 1ª. amostra, para diagnóstico de TB pulmonar, em pacientes HIV+, segundo sexo e faixa etária, atendidos no CRAIDS – Santos/SP, no período de 1997 a 2000.

Faixa Etária	Sexo		Total de amostras n° (%)
	Masculino	Feminino	
10 - 20	01	01	02 (1)
20 - 30	27	19	46 (20)
30 - 40	82	26	108 (47)
40 - 50	37	12	49 (27)
50 - 60	07	04	11 (5)
Total de amostras n° (%)	154 (71)	62 (29)	216 (100)

Tabela 4. Distribuição das 216 amostras de escarro positivas na 1ª. amostra, para diagnóstico de TB pulmonar, em pacientes HIV+, segundo o agente etiológico, atendidos no CRAIDS – Santos/SP, no período de 1997 a 2000.

Agente Etiológico	Total de amostras	%
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	191	88
<i>Mycobacterium kansasii</i>	03	1
<i>Mycobacterium avium</i>	04	2
<i>Mycobacterium terrae</i>	01	1
<i>Mycobacterium fortuitum</i>	11	5
<i>Mycobacterium scrofulaceum</i>	01	1
Outras n° (%)	05	2
Total de amostras	216	100

Dentre as 216 amostras de escarro positivas provenientes de pacientes coinfectados foi observado presença de *Mycobacterium tuberculosis* em 191 (88,4%) amostras, seguidas das demais micobactérias (11,6%) (Tabela 4).

DISCUSSÃO

O HIV tem profundo efeito na patogênese da tuberculose, pois em pacientes infectados pelo *Mycobacterium tuberculosis*, a coinfeção com HIV aumenta o risco de evolução da infecção para a doença ativa e a disseminação da tuberculose, o que acelera o processo epidêmico²⁰.

A infecção pelo vírus HIV produz uma disfunção progressiva do Sistema Imune, comprometendo a imunidade celular mediada pelos linfócitos CD4, tornando essas células incompetentes na defesa contra o microrganismo³.

Em pacientes HIV positivos com CD4 superior a 350 céls/mm³, a tuberculose é indistinguível daquela encontrada em pacientes não-infectados pelo HIV. A doença extrapulmonar ocorre em frequência igual ou pouco superior (10 a 20%) àquela observada nos pacientes com tuberculose não infectados pelo vírus. Nestes casos a dificuldade reside no diagnóstico da infecção pelo HIV. Nos infectados com HIV e com CD4 abaixo de 200 céls/mm³, a tuberculose ocorre tanto na forma extrapulmonar quanto na pulmonar. Nesta situação a positividade na forma pulmonar da baciloscopia de escarro e lavados brônquicos tende a ser baixa, tornando o diagnóstico difícil, atrasando o início da terapia antituberculose^{5,11,14}.

Devido à grande frequência de pacientes infectados por HIV em nossa região, a tuberculose deveria ser incluída no diagnóstico diferencial de virtualmente todas as condições

clínicas. Principalmente na fase avançada da infecção pelo HIV, todo e qualquer material obtido, deveria ser examinado para detecção da micobactéria^{10,13}.

No diagnóstico laboratorial da enfermidade, a sensibilidade da baciloscopia direta do escarro varia de 41% a 81%. Em pacientes na fase avançada da infecção pelo HIV esta sensibilidade diminui, além de ser mais difícil à obtenção do escarro⁸. Em nossos resultados a sensibilidade da baciloscopia foi de 64% e a cultura de 95%, proporcionando um acréscimo de 36% em relação ao total de casos diagnosticados; enfatizando assim a necessidade de acrescentar a realização da cultura, no diagnóstico da tuberculose nos pacientes coinfectados, conforme critérios estabelecidos pelo Programa de Controle da Tuberculose¹⁶. Além de oferecer maior sensibilidade, a técnica de cultura possibilita isolamento do microrganismo, a identificação do agente etiológico e estudos da resistência frente aos atuais quimioterápicos, informações estas que se mostram importantes na avaliação do tratamento e nos esquemas terapêuticos utilizados⁸.

Sendo assim, ressaltamos que a presença de bacilos álcool ácidos resistentes (BAAR) no escarro, bem como a presença de colônias de micobactéria na cultura, não fecham o diagnóstico nos pacientes com HIV, necessitando da identificação da espécie devido à frequência de micobacterioses (11,6%). Sendo confirmada a suspeita de micobactéria atípica, que é verificada pela ausência de resposta ao tratamento adotado nos pacientes com suspeita de albergar cepas multiresistentes, é necessário realizar alteração da terapia medicamentosa pois a maioria das cepas atípicas é resistente aos tuberculostáticos⁸.

Em pacientes HIV, o impacto da doença oportunista causada pelas micobacteriose, em particular pelo *Mycobacterium avium*, e seu significado na síndrome da AIDS são variáveis de região para região, apresentando taxas entre 1,1% e 45% ou mais²³. Em nosso estudo apresentou uma taxa de 2%.

Os dados desta avaliação confirmam ainda que a doença em pacientes coinfectados não ocorre de forma homogênea entre os sexos e faixas etárias, mostrando uma maior ocorrência no sexo masculino (71%) e na faixa etária dos 30 - 40 anos (47%).

Ao analisar os dados obtidos neste período, os autores ressaltam a importância de uma metodologia organizada e coerente com a realidade da região, evidenciando a necessidade de realizar a cultura bacteriológica no momento do diagnóstico além da baciloscopia, pois representou um aumento de 3% na positividade, e da identificação do agente etiológico, uma vez que 11% das cepas eram outras micobactérias, para que o laboratório possa ter um subsídio importante no conhecimento epidemiológico da coinfeção AIDS-TB e diagnóstico laboratorial da enfermidade, contribuindo com as ações de vigilância e melhoria do diagnóstico.

REFERÊNCIAS

1. Barco, P.; Cardoso, R.F. Tuberculose e Resistência a Drogas. **Rev. Laes & Haes**. 141: 130-44, 2003.
2. Barreto, A.M.W.; Campos, C.E.D. Micobactérias "não tuberculosas" no Brasil. **Bol. Pneumol. Sanit.** 8(1): 23-32, 2000.
3. Bender, B.S. et al. Role of the mononuclear phagocyte system in the immunopathogenesis of human immunodeficiency virus infection and the acquired immunodeficiency syndrome. **Rev. Infect. Dis.** 10: 1142 - 54, 1988.
4. BRASIL, Ministério da Saúde. **Boletim Epidemiológico Aids**. 6(2): set., 1994.
5. BRASIL, Ministério da Saúde. Programa Nacional de DST/Aids co-infecção TB/HIV/AIDS, 1994.
6. BRASIL, Ministério da Saúde/DNPS/CNCT. Controle da tuberculose: uma proposta de integração ensino-serviço. CNT/NUTES. 4ª. ed. Revisada, Rio de Janeiro, 1994.
7. BRASIL, Ministério da Saúde. MS/FNS/CRPHF/PNCT. Reunião de avaliação operacional e epidemiológica do PNCT na década de 80. Documento Básico. **Bol. Pneumol Sanit.** no. especial, 1993.
8. Fiúza de Melo, F.A. Tuberculose. In: Veronesi, R. F.. **Tratado de Infectologia**. São Paulo: Atheneu; 1996. p. 9114-42.
9. Fiúza de Melo, F.A. Tuberculose: um assunto atual e oportuno. **J. Pneumologia**. 19: III, 1993.
10. Haddad, D.J. **Micobactérias isoladas de pacientes portadores do vírus da imunodeficiência humana na Grande São Paulo: aspectos microbiológicos, epidemiológicos, clínicos e laboratoriais**. São Paulo, 1994 [Dissertação de Mestrado - Escola Paulista de Medicina].
11. Hopewell, P.C. Impact of human immunodeficiency virus infection on the epidemiology, clinical features, management and control of tuberculosis. **Clin. Infect. Dis.** 15: 540-7, 1992.
12. Kent, P.T.; Kubica, G.P. Identification test techniques. In: Public Health Mycobacteriology. **A guide for the Level III Laboratory**. Centers for Disease Control, Atlanta, p. 207, 1985.
13. Kritski, A.L. **Infecção pelo HIV em pacientes com tuberculose pulmonar ativa atendidos em dois sanatórios do Rio de Janeiro**. Rio de Janeiro, 1992 [Dissertação de Mestrado - Universidade Federal Rio de Janeiro].
14. Kritski, A.L. Tuberculose e infecção e HIV. In: Schecheter M.; Marangoni, D. (eds). **Manual de doenças infecciosas: conduta diagnóstica e terapêutica**. Guanabara Koogan: 465-71, 1993.
15. Levy, U. et al. A reevaluation of sputum microscopy and culture in the diagnoses of pulmonary tuberculosis. **Chest**. 95: 1193-7, 1989.
16. MINISTÉRIO DA SAÚDE, Programa Nacional de Combate da Tuberculose. Manual de Bacteriologia da Tuberculose, 1ª. ed. Rio de Janeiro. Fundação Nacional da Saúde, 1998.
17. Petroff, S.A. A new rapid method for the isolation and cultivation of tubercle bacilli directly from sputum and feces. **J. Exp. Med.** 21: 38, 1915.
18. Raviglione, M.C.; Sender, D.E.; Kochi, A. Global epidemiology of tuberculosis morbidity and mortality of a worldwide epidemic. **JAMA**. 273: 220-6, 1995.
19. Silva, E.A.M. et al. Ocorrência de infecção pulmonar devida ao *Mycobacterium kansasii*, em São Paulo, Brasil. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**. 47: 11-7, 1987.
20. Small, P.M.; Moss, A. Molecular epidemiology and the New Tuberculosis. Stanford University, 2000.
21. Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. Alguns dados sobre Tuberculose, 2000. Availabe, [http://www.nib.unicamp.br/sbpt/daddeptb.html].
22. Sutre, P.; Tem Dan, G.; Kochi, A. Tuberculosis: a global overview of the situation today. **Bull WHO**. 70: 149-59, 1992.
23. Woods, G.L.; Washington, J.A. Mycobacteria other than *Mycobacterium tuberculosis*: review of microbiologic and clinical aspects. **Rev. Infect. Dis.** 9: 275-94, 1987.

Atuação do Laboratório de Saúde Pública na elucidação do surto de diarreia causado por *Cyclospora cayetanensis* no município de General Salgado - SP.

Public Health Laboratory Action For Elucidation of Diarrhea Outbreak by *Cyclospora cayetanensis* in General Salgado Municipality , SP.

RIALA6/986

Rosa Maria ZINI^{1*}, Cecília Cristina M. SANTOS¹, Ivete Aparecida Z. C. ALMEIDA¹, Jacqueline T. M. PERESI¹, Cristiano C.A. MARQUES²

* Endereço para correspondência: 1.Instituto Adolfo Lutz - Laboratório I de São José do Rio Preto. Rua Alberto Sufredine Bertoni, 2325 - Maceno - São José do Rio Preto - SP - CEP: 15060-020.

2. Instituto Adolfo Lutz - Laboratório Central - São Paulo.

Recebido: 12/02/2004 - Aceito para publicação: 02/09/2004

RESUMO

O objetivo deste estudo foi relatar a ocorrência de um surto de diarreia, causado por *Cyclospora cayetanensis* no município de General Salgado - SP e o papel do Laboratório de Saúde Pública na sua elucidação e no posterior monitoramento dos casos de diarreia. No período de agosto de 1999 a dezembro de 2002 foram realizadas no Instituto Adolfo Lutz - Laboratório I de São José do Rio Preto, exames de amostras oriundas do município de General Salgado (SP), como descritos a seguir: 103 análises de potabilidade da água, segundo a recomendação de American Public Health Association; 130 coproculturas, incluindo nove pesquisas de cólera, de acordo com Pessoa *et al*, 1983 e Manual da Comissão Nacional de Cólera, 1991; 132 exames parasitológicos de fezes, incluindo parasitas oportunistas (método de sedimentação espontânea, técnica de centrifugação - sedimentação pela formalina - éter, coloração álcool - ácido resistente de Kinyoun modificada, autofluorescência e esporulação pelo dicromato de potássio à 2-2,5%) e 85 pesquisas de vírus [EIARA (m) - Bio Manguinhos / FIOCRUZ, Rio de Janeiro-RJ]. Das coproculturas realizadas, nove (6,9%) apresentaram-se positivas tendo sido identificadas as seguintes espécies bacterianas: *Shigella boydii*, *Shigella sonnei*, *Escherichia coli* O111 e O128, *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Saintpaul, *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Oranienburg e *Salmonella* spp. (não sorotipada). Presença de antígeno de rotavírus foi detectada em duas (2,4%) das amostras de fezes analisadas. A detecção de *Cyclospora cayetanensis* ocorreu em 16 (12,1%) delas. Quanto à análise de água, 23 (22,3%) amostras apresentaram bactérias do grupo coliforme, sendo quatro (17,4%) positivas também para coliformes fecais. A busca de soluções ao agravo que comprometeu a saúde coletiva do referido município resultou na elucidação do primeiro surto de *Cyclospora cayetanensis* no Brasil.

Palavras-Chave. *Cyclospora cayetanensis*, surto de diarreia, parasita.

ABSTRACT

The aim of this study was to report the occurrence of diarrhea outbreak by *Cyclospora cayetanensis* in General Salgado Municipality, SP, and the role of the Public Health Laboratory for its elucidation, and posterior monitoring of patients with diarrhea. At Regional Laboratory of Adolfo Lutz Institute in São José do Rio Preto - SP, during the period from August 1999 to December 2002, analyses of samples that came from General Salgado Municipality, SP were carried out. The following assays were performed: 103 water potability analyses, according to American Public Health Association guidelines; 130 coprocultures, including nine examinations for cholera, according to the technique described by Pessoa *et al*, 1983 and Cholera's National Commission Manual, 1992; 132 faeces parasitological examinations, including opportunistic agents (by means of autofluorescence assay, alcohol - acid resistant staining by modified Kinyoun technique, formol - ether sedimentation, sporulation by 2.5% potassium dichromate, and Hoffman

technique), and 85 virus detection by means of EIARA (m) - Bio Manguinhos/FIOCRUZ, Rio de Janeiro - RJ. Of coproculture-examinations, nine (6.9%) were positive for: *Shigella boydii*, *Shigella sonnei*, *Escherichia coli*, O11 and O128, *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Saintpaul, *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Oranienburg, and *Salmonella* spp (non serotyped). From water samples analyses, 23 (22.3%) were positive for bacterias from coliform group, and 4 four samples (17.4%) were also positive for fecal coliforms. Rotavirus antigen was detected in two (2.4%) fecal samples; and the occurrence of *Cyclospora cayetanensis* was observed in 16 (12.1%) samples. Owing to the investigation delineated for solving the injury threatening the health of population from General Salgado Municipality, the first outbreak of *Cyclospora cayetanensis* in Brazil could be described.

Key Words. *Cyclospora cayetanensis*, diarrhea outbreak, parasite

INTRODUÇÃO

A característica fundamental das atividades do Laboratório de Saúde Pública é contribuir para o estudo das soluções pertinentes aos principais agravos que comprometem a manutenção da saúde do cidadão. Para tanto, deve alimentar o sistema de saúde com as informações necessárias para a adequada tomada de decisões quanto às medidas de controle a serem adotadas pela sociedade e seus órgãos envolvidos com a preservação das condições globais do bem-estar da coletividade¹⁶.

O Instituto Adolfo Lutz como laboratório de saúde pública tem sido conduzido de maneira a procurar maior participação nas questões relativas à contaminação do meio ambiente, quando envolve risco de comprometimento à saúde humana, seja em nível do setor produtivo, seja no contexto geral da vida comunitária. O trabalho no desenvolvimento de estudos populacionais, sob a ótica laboratorial, integra equipes de Vigilância Sanitária e Epidemiológica, procurando objetividade nas ações que competem a estas instituições no controle de agravos de saúde pública¹⁶.

O desafio da Instituição consiste na conciliação das atividades de rotina e as de pesquisa básica e aplicada. A pesquisa obedece aos propósitos fundamentais de saúde pública participando no planejamento, na elaboração e na avaliação das ações de vigilância sanitária e epidemiológica.

As doenças transmitidas por alimentos (DTA) são uma importante causa no quadro de morbi-mortalidade em âmbito mundial, ainda consideradas como de ocorrência normal, apesar do acometimento de grande número de pessoas e das importantes perdas econômicas. A epidemiologia das DTA vem sofrendo rápida alteração nos últimos anos com o surgimento de patógenos emergentes, aumento da frequência dos já existentes ou relacionados a novos veículos, causas que devem ser investigadas como de interesse em saúde coletiva²⁹.

Cyclospora spp., um protozoário coccídeo unicelular, é um importante patógeno reconhecido como responsável por doença diarreica. Foi observada pela primeira vez em amostras fecais humanas em Papua Nova Guine em 1979³. Desde então, casos de infecção por este parasita tem sido relatados em diferentes áreas geográficas do mundo, podendo infectar indivíduos imunocomprometidos e imunocompetentes²³.

De acordo com estudos epidemiológicos, *Cyclospora cayetanensis* tem sido observada na África, América do Norte, Sul e Central, Bangladesh, sudeste da Ásia, Austrália, Inglaterra e oeste da Europa, cuja ocorrência tem sido relatada com marcada sazonalidade^{4,22,24}.

Em países desenvolvidos, surtos de *Cyclospora* tem atraído grande atenção, recentemente. Durante 1996 e 1997, ocorreram muitos surtos nos Estados Unidos acometendo mais de 850 indivíduos nos estados leste das Montanhas Rochosas, sendo epidemiologicamente relacionados ao consumo de framboesas⁶.

No ano de 1999, na tentativa de esclarecimento de surto de diarreia no município de General Salgado - SP, foram enviadas ao Instituto Adolfo Lutz - Laboratório I de São José do Rio Preto amostras de fezes para coprocultura e pesquisa de vírus (realizada no IAL Central), e de água de abastecimento público para exame bacteriológico. No ano seguinte repetiu-se o mesmo episódio e as pesquisas foram então direcionadas para parasitas oportunistas, considerando o aspecto cíclico e a sazonalidade da ocorrência, características de alguns parasitas.

OBJETIVO

O objetivo deste estudo foi relatar a ocorrência de um surto de diarreia, por *Cyclospora cayetanensis* no município de General Salgado - SP e o papel do Laboratório de Saúde Pública na sua elucidação e no posterior monitoramento dos casos de diarreia.

MATERIAL E MÉTODOS

No período de agosto de 1999 a dezembro de 2002 foram realizadas no Instituto Adolfo Lutz - Laboratório I de São José do Rio Preto, exames de amostras oriundas do município de General Salgado (SP), como descritos a seguir: 103 análises de potabilidade da água, segundo a American Public Health Association¹, a partir de agosto de 1999; 130 coproculturas, incluindo nove pesquisas de cólera, de acordo com Pessoa et al.²⁵ e Manual da Comissão Nacional de Cólera²⁰, a partir de outubro de 1999; 85 pesquisas de Adenovírus e Rotavírus

(EIARA (m) Bio Manguinhos), a partir de janeiro de 2001 e 132 exames parasitológicos de fezes, incluindo pesquisa de parasitas oportunistas (Método de sedimentação espontânea, técnica centrífugo - sedimentação pela formalina - éter, coloração álcool ácido resistente de Kinyoun modificada, autofluorescência e esporulação pelo dicromato de potássio a 2-2,5%)^{2,10,17,18,21,26}, a partir de maio de 2000.

Descrição das técnicas para detecção dos oocistos de *Cryptosporidium* spp. e *Cyclospora cayetanensis* em material fecal.

Técnica Centrífugo - Sedimentação Pela Formalina - Éter

Diluição da amostra fecal:

- aproximadamente 4 g de fezes diluídas em 10 mL de formalina - éter tamponada

Filtração:

- filtrar em gaze dupla, transferir para um tubo de ensaio e manter em geladeira até o prosseguimento

Extração de lipídios:

- adicionar éter etílico
- agitar e centrifugar por 8 minutos
- desprezar o sobrenadante
- ressuspender o sedimento

Preparação da lâmina:

- dispor sobre uma lâmina de vidro pré-lavada cerca de 10 microlitros do sedimento
- secar a temperatura ambiente
- fixar com metanol

Coloração álcool ácido resistente de Kinyoun modificada:

- cobrir a lâmina já fixada com fuccina carbólica
- corar em temperatura ambiente por 20 minutos
- lavar com água destilada para a retirada do excesso do corante
- lavar a lâmina com solução álcool-ácido por 2 minutos e em seguida com água destilada
- cobrir a lâmina com solução de azul de metileno
- secar em temperatura ambiente por três minutos
- lavar novamente com água destilada
- secar em temperatura ambiente

Leitura:

- prosseguir a leitura microscópica com objetiva de imersão (x100)

Microscopia Direta De Autofluorescência Para Detecção Dos Oocistos De *Cyclospora Cayetanensis* Em Material Fecal

Preparação da lâmina:

- dispor sobre a lâmina uma alíquota do sedimento descrito anteriormente

Leitura microscópica:

- proceder a leitura num microscópio de epifluorescência, utilizando filtros UV na faixa de 330-365 nm
- observar a presença de esferas azuis autofluorescentes

Esporulação

Preparo da amostra e leitura microscópica:

- diluir uma alíquota de fezes frescas com 3 mL de dicromato de potássio a 2,0 a 2,5% e manter a temperatura de 25° C
- proceder a leitura microscópica diária para a visualização da esporulação até o 12° dia

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Considerando que a imensa maioria das enfermidades que prevalecia e/ou prevalece em nosso meio tem etiologia de caráter transmissível, as estruturas dos laboratórios de saúde pública foram organizadas para enfrentá-las, havendo, portanto, grande incremento nessa área de atividade¹⁶.

É necessário que os procedimentos diagnósticos sejam colocados a serviço da saúde pública, tanto em regime de rotina diagnóstica, como de forma episódica, segundo imposto pelas ocorrências que se sucedem, ou seja, os surtos de doenças endêmicas e epidêmicas²⁷.

Do total de coproculturas realizadas, nove (6,9%) apresentaram-se positivas para diferentes agentes bacterianos tais como: *Shigella boydii*, isolada no ano de 2000; *Shigella sonnei*, *Escherichia coli* O111 e O128, *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Saintpaul e *Salmonella* spp. (não sorotipada) em 2001 e *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Oranienburg, em 2002.

Quanto à análise de água, 23 (22,3%) amostras apresentaram bactérias do grupo coliforme em 100mL, onde quatro (17,4%) foram positivas, também, para coliformes fecais. Quanto às amostras de fezes analisadas, constatou-se presença de antígeno de Rotavírus em duas (2,4%). A detecção de *Cyclospora cayetanensis* ocorreu em 16 (12,1%) delas (Figura 1).

As características da *Cyclospora cayetanensis* apresentadas por meio das técnicas empregadas e a

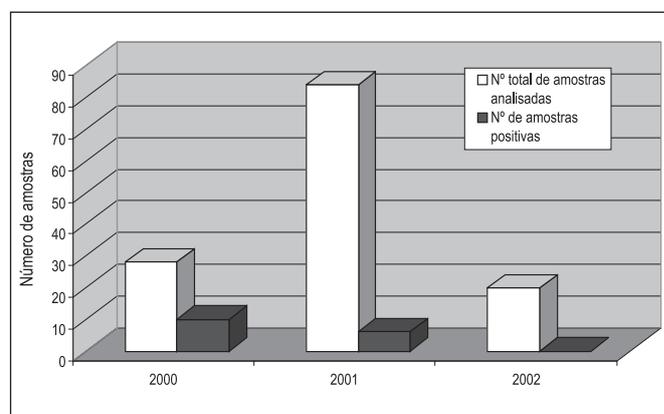


Figura 1. Distribuição anual de positividade de *Cyclospora cayetanensis* em amostras de fezes no período de 2000 a 2002.

Quadro

TÉCNICA	<i>Cyclospora</i>	<i>Cryptosporidium</i>
Coloração ácido resistente de Kinyoun modificada	<ul style="list-style-type: none"> Tamanho: 8-10 μm Coloração variável de rosa clara a púrpura intensa (algumas formas apresentam-se incolores) Oocistos em forma arredondada, podendo apresentar distorções e grânulos Parede de oocistos podendo apresentar aparência enrugada Esporozoítas não visíveis no interior dos oocistos 	<ul style="list-style-type: none"> Tamanho: 4-6 μm Coloração uniforme variando de rosa à púrpura Oocistos apresentam-se como estruturas ovóides ou esféricas Esporozoítas discerníveis no interior dos oocistos
Autofluorescência	<ul style="list-style-type: none"> Presente (a parede do oocisto adquire fluorescência intensa) 	<ul style="list-style-type: none"> Ausente
Esporulação	<ul style="list-style-type: none"> Ocorre em solução de dicromato de potássio a 2,0 - 2,5% em até 12 dias 	<ul style="list-style-type: none"> Não usual

diferenciação em relação a outros parasitas oportunistas como o *Cryptosporidium* encontram-se no quadro abaixo.

Neste estudo foi realizada a técnica de esporulação em duas das 16 amostras de fezes positivas para este agente, sendo que em uma delas foi possível a observação da presença de esporozoítas com os esporocistos, a partir do 5º dia.

O isolamento de bactérias patogênicas e a detecção de Rotavírus nas amostras fecais, durante a investigação do surto e o monitoramento das diarreias, podem ser considerados uma ocorrência esperada, tendo em vista a estimativa da Organização Mundial de Saúde - OMS de que, anualmente, nos países em desenvolvimento, ocorrem mais de 1 bilhão de casos de diarreia aguda em crianças menores de 5 anos, das quais 5 milhões chegam a óbito. Existem cálculos de que até 100 milhões de indivíduos em todos os países civilizados contraem doenças decorrentes de alimentos¹³.

Em relação à análise bacteriológica de água, a detecção de coliformes totais ocorreu nos meses de março e outubro de 2000; em abril, maio e novembro de 2001 e no período de março a junho de 2002. A pesquisa para coliformes fecais foi positiva apenas no ano de 2002, nos meses de março, abril e junho. A ausência de coliformes fecais, durante os períodos de vigência do surto, não descartou a possibilidade da água como veículo de transmissão do parasita, visto sua resistência à cloração. Vários surtos de *Cyclospora* no mundo foram associados à água, onde em muitos deles apresentava-se devidamente clorada⁸. Segundo Boletim Informativo do Centro de Vigilância Epidemiológica⁷, a presença de *Cyclospora* foi confirmada em amostras de água de abastecimento público do município de General Salgado, cuja análise foi realizada pelo Centers of Disease Control and Prevention - CDC de Atlanta⁹.

O primeiro exame positivo para *Cyclospora* ocorreu em setembro de 2000 com picos de detecção no trimestre correspondente aos meses de outubro, novembro e dezembro de 2000 e de 2001 (Figura 2). Esse período corresponde, na região, ao início do período de chuvas, que precede os meses de verão.

Embora no ano de 1999 não tenha sido realizado diagnóstico laboratorial para este parasita, houve registro de elevado número de casos de diarreia, neste mesmo período. Estes dados foram fornecidos pelo Grupo Técnico de Vigilância Epidemiológica da Direção Regional de Saúde - DIR XXII, quando da requisição de exames de coprocultura e pesquisa de vírus ao Instituto Adolfo Lutz - Laboratório I de São José do Rio Preto, os quais foram negativos, não elucidando, naquele ano, a etiologia do surto. Esta sazonalidade marcada é similar à observada na cidade de Guatemala e Kathmandu, cidades de clima subtropical, cujos casos de *Cyclospora* foram encontrados próximos ao período de chuvas^{5,15}.

Lima, no Peru, tem um padrão semelhante de detecção do parasita, porém, em períodos de ausência de chuvas, o que sugere que a sazonalidade não pode ser definida só em relação a esta característica. Bern et al.⁵ relataram que seriam necessários vários anos de vigilância em lugares com variações climáticas distintas, assim como conhecer melhor a biologia do parasita no meio ambiente para explicar porque as infecções por *Cyclospora* são flutuantes com as estações.

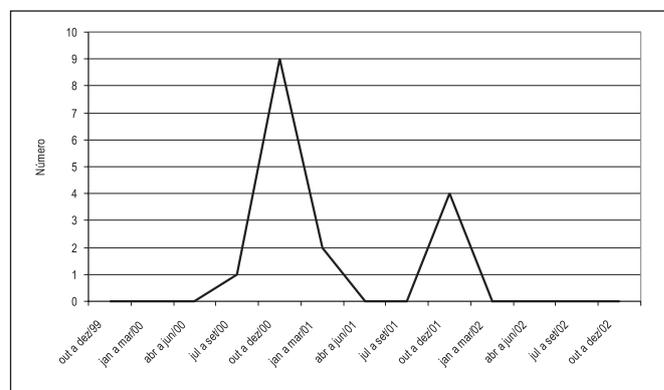


Figura 2. Distribuição trimestral do número de amostras fecais positivas para *Cyclospora cayetanensis* diagnosticadas no Laboratório I de São José do Rio Preto - SP.

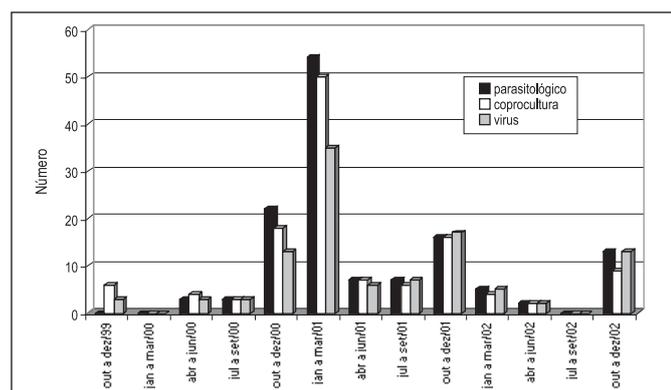


Figura 3. Distribuição trimestral das amostras fecais analisadas referentes ao surto de diarreia de General Salgado - SP.

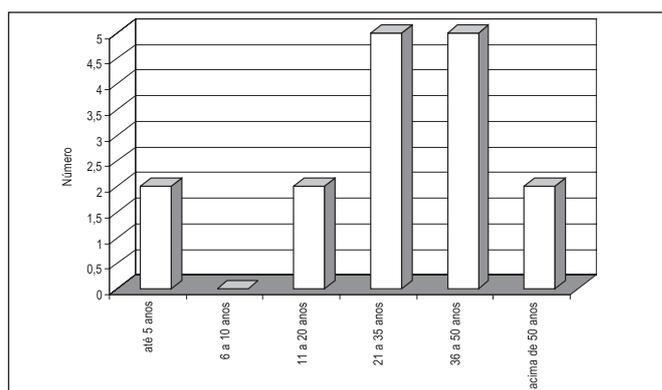


Figura 4. Distribuição, por faixa etária, de casos positivos para *Cyclospora cayetanensis* diagnosticados no IAL - Laboratório I de São José do Rio Preto - SP.

Nesse estudo, considerando o ano de 1999, quando houve somente o registro de diarreia, foram quatro anos de observação da periodicidade de casos positivos para *Cyclospora*, onde os três primeiros foram coincidentes e o último, ano de 2002, não houve registro de casos (Figura 2).

Ressaltamos ainda, que no período estudado, não houve detecção de *Cyclospora* nos primeiros seis meses de 2000 e entre os meses de março e setembro de 2001. No período de janeiro a março de 2001, apesar da grande demanda de amostras fecais para exame laboratorial (parasitológico, coprocultura e pesquisa de vírus) (Figura 3), indicando a permanência do quadro diarreico no município, a positividade para *Cyclospora* foi em apenas duas (12,5%) amostras, em relação ao total de detecção. Tal fato pode ser devido a uma característica própria do agente que consiste na eliminação intermitente dos oocistos nas fezes, ou ainda, ao tratamento precoce com trimetropim e sulfametoxazol mediante os primeiros sinais da doença, aumento da busca ativa ou a presença de outro agente etiológico associado.

Quanto à idade, a maior frequência de *Cyclospora* em General Salgado foi entre adultos de 21 a 35 anos e 36 a 50 anos (Figura 4), correspondendo aproximadamente, ao triplo de casos ocorridos neste município, em relação às crianças, jovens e idosos.

Nos países em desenvolvimento, especialmente em populações onde as condições de saúde são precárias, este protozoário está associado com diarreia em crianças (Ortega et al.²²). Em populações periurbanas, infecções e diarreias devido a *Cyclospora* são raras em adultos, exceto para aqueles que apresentam imunossupressão²³.

Resultados diferentes ao do presente estudo, em relação à faixa etária, também foram observados em outros relatos. Eberhard et al.¹¹, em estudo de coorte em população da pequena comunidade de Leogane - Haiti verificaram que a infecção por *Cyclospora* foi mais comum em crianças do que em adultos, fato coincidente com as ocorrências na Guatemala, Peru, Nepal e também em países desenvolvidos, cujo parasita é comumente associado a gastroenterites pediátricas^{5,14,19,23,28}.

Os dados gerados neste estudo permitiram concluir a importância das inúmeras e complexas atividades do Laboratório de Saúde Pública, na produção de conhecimentos necessários ao bom desempenho e otimização das ações de prevenção e controle. A busca de soluções ao agravo que comprometeu a saúde coletiva do município de General Salgado resultou na elucidação do primeiro surto de *Cyclospora cayetanensis* no Brasil.

REFERÊNCIAS

1. American Public Health Association. **Standard Methods for the examination for water and wastewater**, 18 th ed., 1992.
2. Ash, L. R.; Orihel, T. C. **Atlas of Human Parasitology**. Chicago:ASCP PRESS; 1997. 410p.
3. Ashford, R. W. Occurrence of na undescribed coccidian in Papua New Guinea. **Ann Trop. Med. Parasitol**, v. 73, p. 497-500, 1979.
4. Berlim, O. G. W. et al. Recovery of *Cyclospora* organisms from patients with prolonged diarrhea. **Clin. Infect. Dis.**, v. 18, p. 606-9, 1994.
5. Bern, C. et al. Epidemiologic studies of *Cyclospora cayetanensis* in Guatemala. **Emerging Infectious Diseases**, v. 5, n. 6, 1999.
6. Centers of Diseases Control and Prevention - CDC. Uptade: outbreaks of *Cyclospora cayetanensis* infection - United States and Canada, **MMWR**, v. 45, p. 611-2, 1996.
7. Centro de Vigilância Epidemiológica - Secretaria de Estado da Saúde - SP. Boletim Informativo, ano 17, n. 60, 2002.
8. Centro de Vigilância Epidemiológica - Secretaria de Estado da Saúde - SP. Ciclosporíase / *Cyclospora cayetanensis*. **Manual de doenças transmitidas por alimentos - INFORME-NET DTA** [http://www.cve.saude.sp.br/htm/hidrica/inf_cyclospora.htm].17 fevereiro 2001.
9. Centro de Vigilância Epidemiológica - Secretaria de Estado da Saúde - SP. Surto de diarreia relacionada com alimentos: um estudo caso - controle, General Salgado - SP, 1999-2000. [ftp.cve.saude.sp.gov.br/doc_tec/hidrica/dta_inqsurtogs.ppt]. 26 janeiro 2004].
10. De Carli, G. A. **Parasitologia clínica: diagnóstico de laboratório dos coccídios e microsporídios intestinais**. Edipucrs; 2000. 73p.
11. Eberhard, M. L. et al. *Cyclospora cayetanensis* Infections in Haiti: a common occurrence in the absence of watery diarrhea. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.60, n. 4, p. 584-6, 1999.
12. Eberhard, M. L.; Pieniasek, N. J.; Arrowood, M. J. Laboratory diagnosis of *Cyclospora* infections. **Arch. Pathol.Lab.Med.**, v. 121, 1997.
13. Germano, M. P. L.; Germano, M. I. S. **Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos**. São Paulo: Livraria Varela; 2001. 629p.

14. Hoge, C. W. et al. Prevalence of *Cyclospora* species and other enteric pathogens among children less than 5 years of age in Nepal. **J. Clin. Microbiol.**, v. 33, p. 3058-60, 1995.
15. Hoge, C. W. et al. Epidemiology of diarrhoeal illness associated with coccidian-like organism among travellers and foreign residents in Nepal. **Lancet**, v. 341, p. 1175-9, 1993.
16. Instituto Adolfo Lutz - São Paulo, SP - **100 anos do Laboratório de Saúde Pública**. São Paulo: Letras & Letras; 1992. 280p.
17. Leventhal, R.; Cheadle, R. **Parasitologia médica**. 4ª ed. Editorial Premier Ltda; 1997. p. 124-6.
18. Lima, A. O. et al. **Métodos de laboratório aplicados à clínica**. 5ª ed. Guanabara Koogan; 1977. 669p.
19. Madico, G. et al. Epidemiology and treatment of *Cyclospora cayetanensis* infection in Peruvian children. **Clin.Infect.Dis.**, v. 24, p. 977-81, 1997.
20. Ministério da Saúde. Comissão Nacional de Prevenção da Cólera - CNPC - **Manual de Diagnóstico Laboratorial da Cólera**. Brasília: 1ª ed.; 1992.
21. Neves, D. P. et al. **Parasitologia Humana**. São Paulo: Atheneu; 2000. 428p.
22. Ortega, Y. R. et al. Isolation of *Cryptosporidium parvum* and *Cyclospora cayetanensis* from vegetables collected in markets of an endemic region in Peru. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 57, n. 6, p. 683-6, 1997.
23. Ortega, Y. R. et al. *Cyclospora* species: a new protozoan pathogen of humans. **N. Engl. J. Med.**, v. 328, p. 1308-12, 1993.
24. Ortega, Y.R.; Sterling, C.R.; Gilman, R.H. *Cyclospora cayetanensis*. **Advanc. Parasit.**, v. 40, p.399-418, 1998.
25. Pessoa, G. V. A et al. Ocorrência de enterobactérias em São Paulo, no septênio 1970-1976. I - Sorotipos de *Salmonella* isolados e identificados. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, n. 38, p. 97-103, 1983.
26. Pessoa, S. B.; Martins, A.V. **Parasitologia médica**. 10 ed. Guanabara Koogan; 1977. p. 124-6.
27. São Paulo, Secretaria da Saúde do Estado de São Paulo, Coordenadoria dos Institutos de Pesquisa da Secretaria de Saúde. **Atas do Fórum Saúde**. São Paulo; 1992. 302p.
28. Soave, R.; Herwaldt, B. L.; Relman, D. A. *Cyclospora*. In: Hughes, J. M.; Conte, J. E. editors. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 12, n. 1, Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1998.
29. Tauxe, R. V. Emerging foodborne diseases: an evolving public health challenge. **Emerging Infectious Diseases**, v. 3, n. 4, p. 425-34, 1997.

Evaluation of dithiocarbamate and ethylenethiourea (ETU) residues in fruit and their implication for public health

Lemes, V. R. R. **Evaluation of dithiocarbamate and ethylenethiourea (ETU) residues in fruit and their implication for public health.** São Paulo, 2003. [Dissertação de mestrado-Faculdade de Saúde Pública – U.S.P]. Área: Saúde Ambiental. Orientador: Prof. Dr. Sérgio Colacioppo.

Ethylenethiourea (ETU) is a degradation and/or biotransformation toxic substance from ethylene-bisdithiocarbamate (EBDC) fungicides. It is reasonably stable, has high solubility in water and may represent a risk to populations consuming fruits and other foods. Sufficient evidence is available to indicate that it is carcinogenic in animals, but the evidence is inadequate for human beings. This study had the objective studying and validating analytical methods for determining dithiocarbamates and ETU levels in papaya; determining the levels of remaining residues of EBDC (mancozeb) from applications to papaya species *Carica papaya L.* cultivations and its metabolite ETU; determining the dissipation of these residues days after the application of mancozeb; and assessing the levels encountered and the risk to public health. The utilized method for determining the dithiocarbamates levels was spectrophotometry and determining ETU was high performance liquid chromatography. The samples were collected from three localities that are representative of papaya cultivation:

Lins (São Paulo), Linhares (Espírito Santo) and the extreme south of Bahia. The analytical methods assessed presented satisfactory results. The range of the recovery studies was from 70 to 110% for mancozeb, and from 80 to 110% for ETU. Depending on the level fortified, the coefficients of variation ranged from 3.7 to 13,3% for ETU and from 4,8 to 13,2% for mancozeb. The quantification limit for the method was 0.5 mg/kg for mancozeb and 0.01 mg/kg for ETU. All samples treated with mancozeb presented ETU residues ranging from 0.01 mg/kg to 0.32 mg/kg. The mancozeb levels ranged from 0.5 mg/kg to 2.1 mg/kg. In the dissipation study, the amounts of mancozeb residue remained practically unaltered, while the ETU levels fell from 0.14 mg/kg on the day of treatment to 0.04 mg/kg 12 days later. The contribution of the estimated mancozeb and ETU ingestion to the Acceptable Daily Ingestion (ADI) was 1,0% and 0,7%, respectively. Knowing that ETU is present in papaya serves as a warning for the need for knowledge of the levels present in foods consumed by the public.

*Tese disponível na Biblioteca da Faculdade de Saúde Pública da U.S.P. e do Instituto Adolfo Lutz.
e-mail: lemesvrr@ial.sp.gov.br

Contaminação por matérias estranhas e microrganismos em farináceos vendidos a granel e embalados em Ribeirão Preto-SP

Prado, S.P.T. **Contaminação por matérias estranhas e microrganismos em farináceos vendidos a granel e embalados em Ribeirão Preto-SP.** Ribeirão Preto-SP, 2002. [Dissertação de mestrado – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP].

Considerando a importância, em termos de saúde pública, da qualidade dos alimentos e os riscos que estes podem trazer ocasionalmente à saúde da população, aliado ao fato de os farináceos serem alimentos altamente energéticos e consumidos pela maioria da população, o presente trabalho teve como objetivo verificar as condições higiênico-sanitárias dos farináceos comercializados no município de Ribeirão Preto-SP. Foram avaliados os níveis de contaminação por matérias estranhas e por microrganismos presentes nos produtos, os

quais foram comparados segundo o tipo de estabelecimento e de acondicionamento e estações do ano. Foram analisadas 320 amostras de quatro diferentes tipos de farináceos, sendo 160 amostras a granel e 160 embaladas. Estes produtos foram colhidos em feiras livres, no mercado municipal, em supermercados e nas mercearias, totalizando 80 produtos para cada local de coleta, sendo 20 de farinha de milho, 20 de fubá, 20 de farinha de mandioca crua e 20 de polvilho azedo. O período de coleta foi de fevereiro de 2001 a janeiro de 2002. Para as

análises microbiológicas foram empregadas técnicas preconizadas no *Compendium of Methods for Microbiological Examination of Foods* (APHA, 1992) e para as análises microscópicas foram utilizados métodos descritos na *Association of Official Analytical Chemists International* (AOAC International, 2000). Das 320 amostras analisadas, 34,7% estavam em desacordo com a legislação em alguma das análises ou em ambas, sendo 31,6% pela análise microscópica e 4,4%, pela microbiológica. O farináceo mais contaminado foi o polvilho (55,0%), seguido do fubá (31,2%), farinha de mandioca (30,0%) e farinha de milho (22,2%). Diferença estatisticamente significativa entre os tipos de acondicionamento só foi encontrada no fubá, na análise microscópica. Quanto às estações

do ano, houve diferença significativa na análise microscópica, em todos os produtos, e na microbiológica, apenas para o fubá. Quanto aos tipos de estabelecimentos, não houve diferença significativa dos níveis de contaminação e produtos. São necessários programas de educação e treinamentos direcionados aos fabricantes e comerciantes, enfocando o controle das matérias-primas, os cuidados em cada etapa do processamento, a higiene dos equipamentos, as condições ambientais, o ataque das pragas; orientando-os sobre os fatores que influem sobre a qualidade desses farináceos, além do alerta aos consumidores com relação a esses problemas. Esses dados poderão servir como subsídios à ação da Vigilância Sanitária local, contribuindo para a melhoria dos produtos comercializados no município.

*Tese disponível na Biblioteca do Instituto Adolfo Lutz e na Biblioteca Central do Campus da USP – Ribeirão Preto-SP.
e-mail: sptprado@ial.sp.gov.br

Estudo comparativo entre métodos analíticos tradicionais e testes rápidos utilizados na avaliação da qualidade dos óleos e gorduras de fritura

Lopes, M. R. V. **Estudo comparativo entre métodos analíticos tradicionais e testes rápidos utilizados na avaliação da qualidade dos óleos e gorduras de frituras.** São José do Rio Preto, 2002. [Dissertação de mestrado/ Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNESP]

No presente trabalho foram analisadas 58 amostras de óleos e gorduras utilizados em processos de fritura de estabelecimentos comerciais do ramo de preparo de alimentos para o consumo imediato, como: barracas e feiras livres, cadeias de *fast food*, lanchonetes e pastelarias, restaurantes e cozinhas industriais da cidade de São José do Rio Preto-SP. Os objetivos foram determinar os níveis de alteração dos mesmos; estudar a validade de quatro provas rápidas, sendo o Kit Oil Test e o Monitor de Gordura 3M, adquiridos comercialmente e o ensaio de Perevalov e o teste de Solubilidade em Acetona-Metanol, realizados com reagentes preparados no laboratório e; colaborar com o serviço de vigilância sanitária fornecendo subsídios científicos para ações futuras de conscientização dos fabricantes quanto às boas práticas de fabricação e quanto ao compromisso de estar oferecendo alimentos inócuos à população. Para isto, foram empregadas metodologias analíticas tradicionais, tais como: análise da composição de ácidos graxos, determinação de compostos polares totais, porcentagem de ácidos graxos livres, índice de peróxidos, ácidos dienóicos conjugados e índice de refração. Paralelamente, em estudo comparativo, foram

aplicados quatro testes rápidos: ensaio de Perevalov, Kit Oil Test, Monitor de Gordura 3M e ensaio de Solubilidade em Acetona-Metanol (90:10). Foram estabelecidos como limite de alteração 25% para compostos polares, 1% para ácidos graxos livres e 10 meq/kg para índice de peróxidos. De acordo com os resultados obtidos, observou-se que das 58 amostras analisadas, 50 amostras (86,2%) eram óleo de soja, enquanto que apenas 7 amostras (12,1%) tratavam-se de gordura vegetal hidrogenada. Quanto à análise de composição em ácidos graxos nas amostras de óleos e gorduras, foi observado uma diminuição na concentração dos ácidos graxos polinsaturados, sugerindo perdas nutricionais, e um aumento proporcional dos ácidos graxos saturados. Observou-se, ainda, que das amostras totais analisadas, 20,7% deveriam ser descartadas por apresentar teor de compostos polares superior ao limite estabelecido para óleos e gorduras de fritura, com valores oscilando entre 3,91 e 45,69%; 15,5% por apresentar ácidos graxos livres acima de 1%, sendo que os valores encontraram-se entre 0,11 e 4,49% e; 5,2% das amostras apresentaram-se com índice de peróxidos acima de 10 meq/kg, variando de 0,67 a 16,86 meq/kg. Para os coeficientes

de correlação estabelecidos entre os métodos analíticos, observou-se que o melhor coeficiente obtido foi entre compostos polares totais e ácidos dienóicos conjugados (0,72). Já, os testes rápidos apresentaram 67,2% de resultados corretos para o ensaio de Perevalov; 87,9% quando utilizado o Kit Oil Test; 75,9% de acertos para o Monitor de Gordura 3M e; 62,1% de

resultados corretos para o ensaio de Solubilidade, quando comparados com o limite estabelecido para compostos polares totais. O Kit Oil Test foi o que apresentou melhor coeficiente de correlação com o teor de compostos polares totais (0,86) e menor ocorrência de resultados falsos (12,1%), quando comparado com os testes de Perevalov e Monitor de Gordura 3M.

Dissertação disponível na Biblioteca do Campus do IBILCE/
UNESP e na Biblioteca do Instituto Adolfo Lutz.
e-mail: marovigeta@ig.com.br

Seed characterization of six species of the genus *Theobroma* as compared to that of *Theobroma cacao* L.

Martini, M. H. **Seed characterization of six species of the genus *Theobroma* as compared to that of *Theobroma cacao* L.** - Campinas, 2004 [Tese de Doutorado – Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP]. Orientadora: Profa. Dra. Débora de Queiroz Tavares

Many investigations on the cellular reserves within the cotyledon mesophyll of the genus *Theobroma* have been carried out on *Theobroma cacao* seeds, the source of raw material for the production of chocolate. These studies demonstrated structural cellular changes due to fermentation, drying, and roasting processes during chocolate production. Recently the seeds of the *T. grandiflorum* have been analyzed due to their importance in the production of “cupulate”, a new product similar to chocolate. In the present work, we analyze the lipid-protein reserve cells and polyphenolic idioblasts derived from *T. cacao*, *T. grandiflorum*, *T. subincanum*, *T. bicolor*, *T. speciosum* and *T. obovatum*. Only phenolic cells were studied in *T. obovatum* and *T. microcarpum*. The distribution of lipid bodies was similar in all the species studied; that is, they were located at the periphery of the cell wall and demonstrated extremely susceptibility to heat, coalescing at temperatures above 30°C. The reserve protein was interspersed with lipid bodies and some starch granules. The polyphenolic cells were dispersed throughout the mesophyll and around

the vascular bundles in all the species studied. In *T. bicolor* and *T. speciosum* the polyphenolic cells were only observed around the vascular bundle and radicle parenchyma. Mucilage is a cellular secretion in the five species studied. Mucilage does not accumulate intracellularly; however, rarely we did observe mucilage in the cells of the mesophyll epidermis of *T. subincanum*. In *T. speciosum*, mucilage cells were abundant in the mesophyll and about 10% reached large dimensions without tissue disruption. The polyphenolic cells presented characteristic mucilage histochemistry, however their strict association with vascular bundles should direct their development towards polyphenol synthesis. Cotyledon mesophyll tissue is similar in all the species studied with respect to lipid-protein reserve. Immature cells demonstrated the capacity to synthesize all the reserves, but this capacity is not retained in the mature cell. The distribution of reserves in the mesophyll are most similar in *T. grandiflorum* and *T. subincanum*. *T. bicolor* showed a high protein content, lower lipid levels and low levels of polyphenolic cells.

Tese disponível na Biblioteca da FEA e BC/UNICAMP
e Biblioteca do IAL
e-mail: mhmartini@ial.sp.gov.br

Bioluminescence method for high-throughput screening of compounds against *Mycobacterium tuberculosis*

Sato, D. N. **Bioluminescence method for high-throughput screening of compounds against *Mycobacterium tuberculosis***. Araraquara – SP. 2003. [Tese de Doutorado – Área: Biotecnologia - Instituto de Química – UNESP Araraquara]

There has been an increase of *Mycobacterium tuberculosis* strains that are resistant to the current anti-TB agents, mainly through acquired resistance by therapeutic failure. This fact has underscored the need of a quick development of antimycobacterial drugs that are more effective than those currently in use. Moreover, new methodologies to determine the bactericidal activity of these compounds have been proposed. This study describes the use of bioluminescent strains of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv – ATCC 27974 and *Mycobacterium tuberculosis* Erdman ATCC 35801 both containing the plasmid pSMT1 constructed with *luxA* and *luxB* genes from *Vibrio harveyi* in a screening to evaluate the antimycobacterial activities of anti-TB agents. The standardization of the technique was performed using isoniazid and rifampicin, as a drug standard and the results of Minimal Inhibitory Concentration (MIC) were 0.03 µg/mL and 0.03 µg/mL, respectively. These values were totally compatible with those obtained with Microplate Alamar Blue Assay (MABA). The standardization of the bioluminescence

measurement of intracellular antimycobacterial activity was performed using the J774 murine macrophage-like cell line infected with *Mycobacterium tuberculosis* Erdman containing the plasmid pSMT1 and rifampicin as a drug standard and the result of MIC was 0.16 µg/mL similar with those obtained with the technique of colony forming unit (CFU). A total of 32 compounds were evaluated, 19 crude plants extracts and 13 synthetic compounds and the results of Minimal Inhibitory Concentration were compared with those obtained with the MABA. 02 crude plants extracts and 02 synthetic compounds were evaluated and the results of MIC and percent of inhibition were compatible with those obtained with the CFU technique. The overall agreements between the MICs obtained by MABA and the results obtained with the luciferase reporter strain of *Mycobacterium tuberculosis* and with bioluminescence measurement of intracellular antimycobacterial activity and the CFU technique encourage the use of this recombinant mycobacteria in high-throughput screening of compounds against *Mycobacterium tuberculosis*.

*Tese está disponível na Bibliotecas do Instituto de Química – UNESP Araraquara e Instituto Adolfo Lutz.
e-mail: satodn@netsite.com.br

Intestinal carriage of yeasts by children in hospitalar setting

Talarico, C. **Intestinal carriage of yeasts by children in hospitalar setting**- São Paulo-2003.[Tese de Mestrado-Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade São Paulo].Orientadora: Profa .Dra.Márcia de Souza Carvalho Melhem.

At the last decades the nosocomial infections caused by yeasts raised significantly especially by *Candida* yeasts. The infections source can be endogen or exogenous, since spores of unicellular and multicellular are kept viable for months and several yeasts species are found in skin and mucosa of healthy people. In a saprophytic state yeasts are found in the human gastrointestinal tract but the relationship between the

presence of these microorganisms and their pathology is associated with several facts such as: number, variety of sites colonized, effective use of antibiotics, associated infections caused by another microorganisms and mainly disturbance due to lack of immunity and metabolic. Yeasts in the gastrointestinal tract can be transmitted fecal-oral direct or indirectly from an individual to another. The transmission of a strain in a

saprophytic state to a host can result in colony followed by infection. The infection can be serious depending on the host conditions and the etiologic agent that includes virulent factor and resistance to antifungal drugs. These attributes are important to *Candida albicans* in which enzymes with phospholipase activity are responsible for virulent factors. Resistance phenotypes, otherwise it should occur more frequently in non-*albicans* species. Concerning the possibility of an endogen disease and the spread of virulent and resistant strains, from the gastrointestinal colony, studies that contribute to determine these agents that constitute the microbiota of patients, are important to know the natural story of nosocomial infections caused by yeasts. This work aims at evaluating the intestinal tract as a source of hospital infections by yeasts describing the remaining species in the first hours and a possible change depending on the time that may happen to virulent phenotypic and resistance to ant fungi. Two hundred eighty one yeast samples from sixty-six children attended in pediatric and semi-intensive units in 2 public hospitals located in São Paulo and Guarulhos cities in Brazil were analyzed. The fecal samples were collected at the first hours after and during their arrival at the hospital. To identify the yeasts according to their gender and species traditional methods were used, analyzing morphological and physiological aspects. The ability to produce enzymes phospholipase and proteinase was verified the same

way it was proposed by Price et al.1982 and Ruchel et al.1982. The sensibility to antifungals: amphotericin B (AMB), fluconazole (FZ), ketoconazole (CZ) e nistatin (NIS), was analyzed by the diffusion technical by disks (CECON São Paulo, Brazil). Resistant samples or with intermediate sensibility were confirmed by micro-dilution method according to NCCLS (1997) modified by EUCAST (2002). The isolated species were: *Candida tropicalis* (30%), *C.parapsilosis* (27%), *C.krusei* (4%), *Trichosporon cutaneum* e *T.inkin* (3%), *Rhodotorula mucilaginosa* e *R.glutinis* (2%), *C.guilliermondii* (2%), *C.glabrata* (1%) and *C.kefyr* (1%). Enzymatic activity was verified in most of the 84 *C.albicans* samples being 96% of phospholipase and 95% of proteinase production. Among the non-*albicans* species of *Candida* it was observed 97% of phospholipase and 67% of proteinase activity. Less sensitive samples to azoic drugs including resistant or SDD sensibility, which depends on the achieved dose, were found in 4.3% of the 281 samples of yeast. The hugest percentage was observed in *C.krusei* (90%). We can conclude that different yeast species occur in stools of pediatric population hospitalized, including virulent strains and antifungal resistant phenotypes. The persistent of these phenotypes in the intestinal tract during hospitalization period may represents a risk factor contributing to endogen infection, or play a role in dissemination of potential pathogens inside a nosocomial environment.

*Available in the library of Conjunto das Químicas da USP
Site: www.teses.usp.br and in the library
of Instituto Adolfo Lutz
e-mail: talarico_rico@ig.com.br

Contribution to the immunodiagnosis of human leptospirosis: emphasis to monoclonal antibodies

Ribeiro, M. A. **Contribution to the immunodiagnosis of human leptospirosis: emphasis to monoclonal antibodies.** São Paulo, 2003. [Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo]. Orientadora: Profa. Dra. Hermínia Yohko Kanamura.

The best serological test for leptospirosis laboratory diagnosis remains the microscopic agglutination test (MAT). Because of the complexity of MAT, we have been developed some rapid screening tests for leptospiral antibodies detection in the acute phase of infection. In the decade of 80, a passive hemagglutination test employing polysaccharide fractions of leptospires was considered appropriate for early diagnosis, but its antigen preparation included “common antigens” recognized by antibodies from 4% of healthy individuals. A new ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) employing

proteinase K resistant immunodominant antigens was developed and its potential diagnosis evaluated. This technique, the PK-ELISA, presented 89.9% sensitivity and 97.4% specificity, and satisfied the requirements needed for serological screening tests of human leptospirosis. However, some of the reagents used in its antigen preparation are imported and very unstable. So, it was proposed, in a “Cooperative Research Accordance” between Instituto Adolfo Lutz and Laboratório Fleury, to try new approaches with monoclonal antibodies. Two hibridomas secreting specific

monoclonal antibodies (MAb) were selected: one, against an epitope detected in 16 of 23 members of the genus *Leptospira* (clone A12P4) and the other, specific to the icterohaemorrhagiae serogroup (clone H7P1). The MAb A12P4, a G2 (IgG2B) immunoglobulin, reacted with an epitope present in the 16-18 kDa components of icterohaemorrhagiae serogroup and with the 75-84 kDa components of serovars copenhageni and canicola, after whole-cell lysates of the leptospire were separated by sodium dodecyl sulfate- polyacrylamide gel electrophoresis. The MAb H7P1, which is an IgG, reacted with an epitope common to several fractions of molecular weight above 21 kDa of strain RGA and with the 21-22 kDa and the 75-82 kDa components of strain M-20. Both monoclonal antibodies were employed in enzyme immunoassays for detecting specific antibodies in serum samples serially collected from 52 patients with leptospirosis, and from the control group, which consisted of sera from 57 patients with other diseases included in the

differential diagnosis, and from 68 healthy individuals. These tests, however, were not satisfactory. A new ELISA was developed in the present study employing an antigen suspension "AgMc", purified by affinity chromatography with CNBr-activated Sepharose 4B coupled to the monoclonal antibodies described above. The results obtained with this test were compared to the MAT and to the classical IgM ELISA (ELISA c). The new method, "AgMc ELISA", presented serological indices, relatively to reference test MAT, of 80.70 % and 83.33 % of sensitivity and specificity, respectively; positive and negative predictive values of 69.70 % and 90.10 %, respectively, and general agreement index of 82.49 %. So, this test was not considered a promising approach to rapid diagnosis of human leptospirosis. Moreover, the proportion of patients diagnosed as having leptospirosis by the "AgMc ELISA" and the MAT differ significantly. The possible explanations for the results obtained are discussed.

*Tese disponível na Biblioteca Digital da USP site www.teses.usp.br
e-mail: ribeiro_ma@hotmail.com

Experimentação Animal: princípios éticos e legislação

Sarmento, E. O. **Experimentação Animal: princípios éticos e legislação.** São Paulo; 2002. [Dissertação de Mestrado - Faculdade de Saúde Pública - Universidade de São Paulo]. Orientador: Prof. Dr. Paulo Antônio de Carvalho Fortes.

Em todo mundo, milhares de animais são utilizados em pesquisas, testes biomédicos e práticas de ensino, contribuindo para melhoria da qualidade de vida de seres humanos. No século XX, intensificou-se o debate em torno da moralidade do uso de animais em experimentos, o que se refletiu numa maior preocupação da sociedade com o bem-estar animal. Como resultado, ocorreram mudanças significativas nas políticas, leis e regulamentações relacionadas à proteção de animais, que passam a estabelecer recomendações básicas e critérios para utilização, com o objetivo de limitar a dor e o sofrimento impostos aos animais destinados à experimentação. Em geral, as leis e regulamentações incorporaram os princípios éticos propostos por Russell e Burch (3R's), que indicam a redução do uso (*reduction*), a adoção de métodos alternativos (*replacement*) e o refinamento das técnicas envolvidas na experimentação animal (*refinement*). À luz dos princípios dos Três Rs são analisadas leis e regulamentações de países da Europa e das Américas. O

Reino Unido possui a lei pioneira e tradição histórica na proteção de seus animais, centralizando no governo as ações de controle da experimentação animal, porém ultimamente tem investido na organização de comitês de ética institucionais. Nos Estados Unidos da América o sistema de controle é realizado através de políticas públicas e do funcionamento de comitês de ética para cuidado e uso de animais. O Canadá, pioneiro na implantação voluntária de comitês de ética voltados ao bem estar animal, conta com a supervisão de um conselho nacional para elaboração de políticas e regulamentações pertinentes. No Brasil, as regulamentações vigentes não garantem eficácia à promoção do bem estar ou não tratam especificamente da pesquisa com animais. Consideramos que a efetivação de medidas legais, a conscientização dos pesquisadores (3Rs), a implementação de comitês de ética são essenciais para garantia do bem-estar e a excelência das atividades técnico-científicas desenvolvidas em animais.

Dissertação disponível na biblioteca da Faculdade de Saúde Pública - USP
e-mail: evelynoliver@bol.com.br
evelynoliver@ial.sp.gov.br

AOS INTERESSADOS

AREVISTADO INSTITUTO ADOLFO LUTZ tem por finalidade a divulgação de trabalhos relacionados com as atividades laboratoriais em Saúde Pública. Os artigos destinados à revista serão recebidos apenas se redigidos de acordo com as normas apresentadas a seguir:

1) NORMAS PARA PUBLICAÇÃO

O trabalho submetido à publicação deve ser inédito, não sendo permitida a sua apresentação simultânea em outro periódico, conforme declaração a ser assinada pelos autores. Serão aceitos manuscritos em forma de artigos originais, revisões, relatos de casos, notas científicas, comunicações científicas e resumos de teses e dissertações. Os autores deverão informar na carta de encaminhamento em qual categoria o trabalho se enquadra. Os trabalhos redigidos em língua portuguesa ou inglesa, deverão ser enviados para o Setor de Publicações do Instituto Adolfo Lutz, em três cópias impressas, sendo uma completa e as outras duas omitindo os nomes dos autores e respectivas instituições, tanto na página de rosto quanto nos resumos em português e inglês. Após aprovação do trabalho, será solicitado aos autores o envio do artigo completo em disquete 3 ½ acompanhado de uma cópia impressa.

2) PUBLICAÇÃO DE UM MANUSCRITO

Os trabalhos serão aceitos para publicação após criticamente, revisados e avaliados por pareceristas indicados pela Comissão de Publicação. Os manuscritos revisados serão devolvidos aos autores para as devidas correções. O novo texto deverá retornar à Comissão que notificará a aceitação ou recusa do trabalho.

3) CATEGORIAS

Os seguintes tipos de trabalhos serão aceitos para publicação na Revista do Instituto Adolfo Lutz.

3.1) COMUNICAÇÃO CIENTÍFICA

É o relato sucinto de resultados parciais de um trabalho experimental digno de publicação, embora insuficientes ou inconsistentes para constituírem um artigo original. Deve ser relevante e que mereça rápida divulgação. Deve apresentar no máximo 4 páginas impressas, incluindo tabelas e figuras (no máximo duas tabelas ou 2 figuras ou uma tabela e uma figura) e até 10 referências. O texto deve conter todos os tópicos de um artigo científico, porém sem as divisões.

3.2) NOTA CIENTÍFICA

É o relato conciso de novas e importantes descobertas que requer divulgação rápida para garantir originalidade. A nota científica não deve conter tópicos, porém deve ser redigida de acordo com as instruções para preparação do artigo original. Deve apresentar no máximo 10 páginas, incluindo tabelas e figuras e até 10 referências.

3.3) RELATO DE CASO

Contempla principalmente a área médica, em que o resultado é anterior ao interesse de sua divulgação ou a ocorrência

dos resultados não é planejada. Inclui novas técnicas, terapias, diagnóstico, patologias, materiais e soluções inovadoras para problemas especiais, fenômenos anatômicos e fisiológicos. Deve conter os tópicos: introdução, objetivos, casuística ou resultados, discussão e conclusões e apresentar no máximo duas páginas incluindo figuras e tabelas e até 5 referências.

3.4) ARTIGO DE REVISÃO

Avaliação da literatura sobre determinado assunto, cuja divulgação possa contribuir para melhorar o conhecimento da área em questão. Deve ser subdividido em tópicos, conter resumos em inglês e português. O artigo deve ter um índice e conter no máximo 25 páginas.

3.5) RESUMOS DE TESES E DISSERTAÇÕES

Serão aceitos para publicação os resumos de teses e dissertações até um ano após a defesa. Deverão conter o nome do autor e seu endereço eletrônico, o nome do orientador, título da obra (em português e em inglês), nome da instituição em que foi apresentado o trabalho e ano de defesa. O resumo poderá ser publicado em língua portuguesa ou inglesa, sendo de total responsabilidade do autor o conteúdo do mesmo e também a sua revisão ortográfica e gramatical.

3.6) ARTIGO ORIGINAL

Relato completo de pesquisa original ainda não publicada. Deve apresentar no máximo 20 páginas impressas, incluindo figuras, tabelas e referências bibliográficas.

3.6.1) PREPARAÇÃO DO MANUSCRITO OU ARTIGO

Geral

Os textos devem ser redigidos com processador de texto Word for Windows 6.0 ou compatível, no formato A4, espaço duplo, fonte Times New Roman, tamanho 12. Se usar versão superior, enviar o arquivo em Rich Text Format (.rtf). Devem ser evitados arquivos compactados.

Estrutura:

Página de rosto: a) título do artigo; b) nome do(s) autor(es): nome seguido do último sobrenome por extenso e em caixa alta (ex.: Ana Maria C. D. da SILVA); c) local de trabalho indicado por número sobrescrito. O autor responsável e o seu endereço deverão estar assinalados com asterisco (*) para encaminhamento da correspondência.

Resumo: deve ser redigido em português, ser claro e conciso num único parágrafo, contendo objetivo, metodologias, resultados e conclusões. Não exceder 300 palavras.

Palavra-chave: podem ser utilizados até seis descritores que identifiquem o conteúdo do artigo.

Introdução: deve iniciar em página nova e deve conter os objetivos da pesquisa, justificativa de sua importância, apresentação das principais variáveis, definições necessárias e discussão do problema de acordo com a literatura pertinente.

Material e Métodos: o método deve estar claramente descrito e validado, de modo a possibilitar a sua reprodução. Qualquer modificação, em métodos já publicados, deve ser devidamente explicada.

Resultados: devem ser claros e concisos e podem apresentar tabelas e figuras quando necessárias, que devem ser auto explicativas.

Discussão: deve fornecer a interpretação dos resultados em função das informações apresentadas. Este item pode ser incluído no de resultados, não havendo necessidade de repeti-lo em item a parte.

Conclusão: deve ser clara, concisa podendo, em alguns casos, ser incluída no item discussão não havendo a necessidade de repeti-la em item a parte.

Agradecimentos: é opcional e deve vir após a discussão/conclusão.

Title, Abstract e Key Words: devem ser redigidos em inglês e seguir as recomendações apresentadas para a página de rosto, do resumo e das palavras-chave.

Referências: As referências devem ser citadas seguindo os “Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals” produzidos pelo International Committee of Medical Journal Editors, também conhecidos como Vancouver Style. Os autores devem seguir as diretrizes da quinta edição (Annals of Internal Medicine 1997; 126: 36-47 ou na página (website) <http://acponline.org/journals/resource/unifreqr/htm> .

As referências devem ser numeradas consecutivamente na ordem em que foram mencionadas a primeira vez no texto. Identifique as referências no texto, tabelas e legendas de ilustrações por numerais arábicos entre parênteses. As referências citadas em tabelas ou em legendas devem ser numeradas de acordo com a seqüência estabelecida pela sua primeira identificação no texto.

Segundo o Sistema Vancouver, deve-se evitar a utilização de resumos como referências; as “observações inéditas” e as “comunicações pessoais” não podem ser usadas como referências, mas as comunicações escritas (não verbais) podem ser inseridas entre parênteses no texto. Os artigos aceitos para publicação, porém, ainda não publicados, podem ser incluídos na relação das referências, bastando indicar a revista e citar entre parêntesis “no prelo”. Informações extraídas de manuscritos submetidos, porém ainda não aceitos, devem ser citados no texto como “observações inéditas” (entre parêntesis).

Os títulos das revistas devem ser abreviados de acordo com o estilo usado ou no Index Medicus seja pela List of Journals Indexed in Index Medicus ou no “website” <http://www.nlm.nih.gov> ou pelo Chemical Abstracts , ISI Science Citation Index, World List of Periodicals (publicado por Butterworks, Londres).

Exemplos

1. Artigos em revistas

1.1. Periódicos - Liste os primeiros seis autores seguidos por et al.

Telles MAS, Mosca A. Avaliação da técnica de microdiluição em placa para determinação de concentração inibitória mínima de isoniazida em cepas de Mycobacterium tuberculosis. Rev Inst Adolfo Lutz 2000; 59(1/2): 15-9.

1.2. Número com suplemento

Payne DK, Sullivan MD, Massie MJ. Women’s psychological reactions to breast cancer. Semin Oncol 1996; 23 (1 Suppl 2): 89-97.

1.3. Volume com suplemento

Maio FD. Determinação de chumbo sanguíneo: a importância de programas interlaboratoriais na avaliação da qualidade analítica laboratorial. Rev Inst Adolfo Lutz 2002; 61 (Suppl 1): 3.

1.4. Instituição como autor

The Cardiac Society of Australia and New Zealand. Clinical exercise stress testing. Safety and performance guidelines. Med J Aust 1996; 164: 282-4.

1.5. No prelo (forthcoming)

Leshner AI. Molecular mechanisms of cocaine addiction. N Engl J Med. No prelo 1996.

2. Livros e outras monografias

2.1. Indivíduo como autor

Ringsven MK, Bond D. Gerontology and leadership skills for nurses. 2nd ed. Albany (NY): Delmar Publishers; 1996.

2.2. Editor(es), compilador(es) como autor(es)

Norman IJ, Redfern SJ, editors. Mental health care for elderly people. New York: Churchill Livingstone; 1996.

2.3. Instituição como autor e editor

Institute of Medicine (US). Looking at the future of the Medicaid program. Washington: The Institute; 1992.

2.4. Capítulo num livro

Franco DBG, Landgraf M. Microorganismos patogênicos de importância em alimentos. In: Franco DBG, Landgraf, M, editores. Microbiologia dos Alimentos . 2nd ed. São Paulo: Ed Atheneu; 1996. p. 55-60.

2.5. Resumo/Trabalho de congresso publicados

DuPont B. Bone marrow transplantation in severe combined immunodeficiency with an unrelated MLC compatible donor. In: White HJ, Smith R, eds. Proceedings of the third annual meeting of the International Society for Experimental Hematology. Houston: International Society for Experimental Hematology, 1974: 44-6.

2.6. Dissertação/Tese

Cairns RB. Infrared spectroscopic studies of solid oxygen [Tese de doutorado]. Berkeley, California: University of California, 1965. 156 pp.

3. Material legal

A normalização proposta por Vancouver para legislação não se aplica à realidade brasileira, estudos estão sendo realizados, enquanto isto recomenda-se adotar as normas a seguir:

Os elementos essenciais são: jurisdição (ou cabeçalho da entidade no caso de se tratar de normas), título, numeração e data, emenda e dados da publicação.

Exemplos:

Portaria nº 695 de 1998 da Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 30 mar. 1998. Seção 1, nº 60-E, p. 5-6.

Resolução n.16, de 13 de dez. 1984 do Conselho Federal de Educação. Dispõe sobre reajustamento de taxas, ... e altera a redação do artigo 5 da Resolução n.1 de 14/1/83. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil], Brasília, DF, 13 dez. 1984. Seção 1, p. 190-191.

4. Material Eletrônico

4.1. Artigo de revista em formato eletrônico

Morse SS. Factors in the emergence of infectious diseases. *Emerg Infect Dis* [serial online] 1995 Jan-Mar [cited 1996 Jun 5]; 1(1):[24 screens]. Available from: URL: <http://www.cdc.gov/ncidod/EID/eid.htm>

4.2. Monografia em formato eletrônico

CDI, Clinical Dermatology Illustrated [monograph on CD-ROM], Reeves JRT, Maibach H. CME Multimedia Group, producers. 2nd ed. Version 2.0. San Diego: CME; 1995.

4.3. Arquivo de computador

Hemodynamics III: the ups and downs of hemodynamics [computer program]. Version 2.2. Orlando (FL): Computerized Educacional Systems; 1993.

5. Patente

Larsen CE, Trip R, Johnson CR, inventors; Novoste Corporation, assignee. Methods for procedures related to the electrophysiology of the heart. US patent 5,529,067. 1995 Jun 25.

Abreviaturas - devem ser evitadas ou usadas apenas as oficiais.

Unidades de medida e seus símbolos - utilizar as legais do Sistema Internacional de Metrologia.

Tabelas – as tabelas devem ser encaminhadas em folhas separadas e designadas no texto como “Tabelas”. A sua localização aproximada deve ser indicada no texto. Serão numeradas consecutivamente, com números arábicos e encabeçadas pelos respectivos títulos, que devem ser breves e indicar claramente o conteúdo. Os dados apresentados em tabela não devem ser repetidos em gráficos.

Ilustrações (fotografias, gráficos, desenhos, mapas etc.): as ilustrações devem ser encaminhadas em folhas separadas e

designadas no texto como “Figuras”: terão numeração única e seqüencial, em algarismos arábicos e devem apresentar na sua parte inferior e fora da área de reprodução, que devem ser breves e identificar claramente o seu conteúdo. As suas localizações aproximadas devem ser indicadas no texto. Todas as ilustrações devem ser tão claras que permitam sua reprodução com redução de 6,5 cm no sentido da largura, sem perda de nitidez ou legibilidade. As ilustrações coloridas estão sujeitas à confirmação. Se as ilustrações enviadas já tiverem sido publicadas, mencionar a fonte e a permissão para a reprodução.

Da Publicação

1. Os trabalhos destinados à publicação na **Revista do Instituto Adolfo Lutz** deverão ser encaminhados à Biblioteca do Instituto Adolfo Lutz, Setor de Publicações, Av. Dr. Arnaldo, 355, Cerqueira César, São Paulo/SP, 01246-902, a/c: Rocely Bueno.

2. A publicação de artigos na Revista está condicionada à aprovação da Comissão de Redação de Publicações Oficiais do Instituto Adolfo Lutz, que poderá sugerir ao autor alterações no original. Este original só será aceito quando tiver o visto desta comissão.

3. Todo trabalho entregue para publicação deverá ser assinado pelo autor e trazer endereço para correspondência ou endereço eletrônico. No caso de mais de um autor, deverá ser expressamente indicado o responsável pela publicação.

4. Os trabalhos serão publicados em ordem cronológica de aprovação, salvo o caso especial de comunicação e nota científica, que terá prioridade.

5. A data de recebimento e a de aprovação do artigo constarão obrigatoriamente no final do mesmo.

6. As provas tipográficas serão revisadas pela Comissão de Redação de Publicações Oficiais do Instituto Adolfo Lutz. Essa Comissão se reserva o direito de introduzir alterações nos originais, visando a manutenção da homogeneidade e a qualidade da publicação, respeitando, porém, o estilo e as opiniões dos autores.

7. É permitida a reprodução, no todo ou em parte, de artigos publicados na Revista do Instituto Adolfo Lutz, desde que sejam indicados a origem e o nome do autor, de conformidade com a legislação sobre direitos autorais.

Da Distribuição

A Revista Adolfo Lutz é distribuída gratuitamente a entidades governamentais, culturais, ou em permuta de periódicos nacionais ou estrangeiros.

ISSN 0073-9855



9 770073 985009