

REVISTA DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ

ISSN 0073-9855
RIALA6



GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO
SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE

Volume 73 número 1, 2014

INSTITUTO ADOLFO LUTZ

Diretor Geral do Instituto Adolfo Lutz
Hélio Hehl Caiaffa Filho

Editor Chefe
Pedro Luiz Silva Pinto

Editor Adjunto
Adriana Bugno

Editores Assistentes
Neuza Kasumi Shirata Iso
Aurea Silveira da Cruz Garçon
Christiane Asturiano Ristori Costa
Gisele Letícia Alves
Iracema de Albuquerque Kimura
Jacqueline Tanury Macruz Peresi
Lucile Tiemi Abe Matsumoto
Márcia Liane Buzzo
Raquel dos Anjos Fazioli
Sérgio Dovidauskas
Virginia Bodelão Richini Pereira
Thales de Brito
Lílian Nunes Schiavon
Sylia Rehder

Núcleo de Acervo
Rocely Aparecida Bueno Moita

Conselho Editorial / Editorial Board

Adele Caterino-de-Araújo, São Paulo, Brasil.
Alexandre Januário da Silva, Atlanta, EUA
Antonio Ruffino Netto, Ribeirão Preto, Brasil.
Bernadette Dora G. de Melo Franco, São Paulo, Brasil.
Delia Rodrigues Amaya, Campinas, Brasil.
Elizabeth de Souza Nascimento, São Paulo, Brasil.
Elizabeth Castañeda, Bogotá, Colômbia.
Eliseu Alves Waldman, São Paulo, Brasil.
Fernando C. Schmitt, Porto, Portugal.
Gordon S. Shephard, Cape Town, África do Sul.
Guilherme Prado, Belo Horizonte, Brasil.
Hans P. van Egmond, Bilthoven, Holanda.
Heitor Franco de Andrade Junior, São Paulo, Brasil.
John Gilbert, York, UK.
Juan Carlos Palomino, Antuérpia, Bélgica.
Lígia Bicudo de Almeida Muradian, São Paulo, Brasil.

Luz Elena Cano Restrepo, Medellín, Colômbia.
Maria José Mendes Gianini, Araraquara, Brasil.
Marluce Bibbo, Pennsylvania, EUA.
Martin Emilio Munk, Copenhagen, Dinamarca.
Myrna Sabino, São Paulo, Brasil.
Paul W. Flinn, Kansas, EUA.
Pedro Paulo Chieffi, São Paulo, Brasil.
Regina Maura Bueno Franco, Campinas, Brasil.
Susana Córdoba, Buenos Aires, Argentina.
Terezinha de Jesus Andreoli Pinto, São Paulo, Brasil.
Thales de Brito, São Paulo, Brasil.
Vanessa Yardley, London, UK.
Venâncio Avancini Ferreira Alves, São Paulo, Brasil.
Vera Akiko Maihara, São Paulo, Brasil.
Vera Lucia Garcia Calich, São Paulo, Brasil.

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

1941
2014, 73(1)

ISSN 0073-9855 CDD₁₈614.07205

RIALA 6
ISSN 1983-3814 versão *on line*
ISSN 2176-3844 CD-ROM

(* ASSOCIAÇÃO PAULISTA DE BIBLIOTECÁRIOS. Grupo de Bibliotecários Biomédicos.
Normas para catalogação de publicações seriadas especializadas, São Paulo, Ed. Polígono, 1.072.

Os artigos publicados na Revista do Instituto Adolfo Lutz são indexados por: Abstracts on Hygiene and Communicable Diseases; 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; e Virology Abstracts.

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

Portal de Revistas Saúde SP
<http://periodicos.ses.sp.bvs.br>

Portal de Revista em Veterinária e Zootecnia
<http://revistas.bvs-vet.org.br/rialutz>

Cartas ao editor:
Endereço / Address
Núcleo de Acervo
Av. Dr. Arnaldo, 355, 01246-902 São Paulo/ SP – Brasil
Tel/ Fax. + 55 11 3068-2869
E-mail: rial@saude.sp.gov.br



**GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO
SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE**

Coordenadoria de Controle de Doenças
Instituto Adolfo Lutz

REVISTA DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ

Volume 73 número 1, 2014
Janeiro – Março 2014

Publicação trimestral/Quarterly publication
Solicita-se permuta/Exchange desired

Rev Inst Adolfo Lutz. 2014; 73 (1)

■ ARTIGO DE REVISÃO/ REVIEW ARTICLE

1584 **Astaxantina: seu uso como corante natural alimentício**

Astaxanthin: its use as natural food dye

Micheli de Moraes FERREIRA, Helena Pereira da Silva ZAMITH, Shirley ABRANTES.....1-8

1585 **Métodos para detecção de soja *Roundup Ready*® em grãos e produtos de soja por reação em cadeia da polimerase: revisão e análise crítica das práticas de validação**

Methods for detecting the *Roundup Ready*® soy in soybeans and soy products by polymerase chain reaction: a review and critical analysis of current practices of validation

Carolina Sheng Whei MIAW, Gláucia Celeste de Souza AMÂNCIO, Jovita Eugênia Gazzinelli Cruz MADEIRA, Scheilla Vitorino Carvalho de SOUZA9-25

■ ARTIGO ORIGINAL/ ORIGINAL ARTICLE

1586 **Comparison of different statistical approaches used to evaluate the performance of participants in a proficiency testing program**

Comparação de diferentes métodos estatísticos utilizados para avaliar o desempenho de participantes em um programa de ensaio de proficiência

Camila Cardoso de OLIVEIRA, Paulo TIGLEA, José Carlos OLIVIERI, Maria de Fátima Henriques CARVALHO, Márcia Liane BUZZO, Alice Momoyo SAKUMA, Maria Cristina DURAN, Miriam Solange Fernandes CARUSO, Daniel GRANATO.....26-31

1587 **Elevados teores de sódio em alimentos industrializados consumidos pela população brasileira**

High sodium contents in processed foods consumed by Brazilian population

Márcia Liane BUZZO, Maria de Fátima Henriques CARVALHO, Edna Emy Kumagai ARAKAKI, Richard MATSUZAKI, Daniel GRANATO, Carmen Silvia KIRA32-39

1588 **Validação de metodologia QuEChERS-acetato para a análise de multirresíduo de agrotóxicos em amostras de soja e de extrato solúvel de soja utilizando cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial**

Validation of acetate QuEChERS methodology for pesticides multiresidue analysis in soybean samples and soybean-soluble extract using by means of high-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry

Adherlene Vieira GOUVÊA, Maria Helena Wohlers Morelli CARDOSO, Lucia Helena Pinto BASTOS, Cristiane BARATA SILVA, Nina Daddario ORTIZ, Armi Wanderley da NÓBREGA, Silvana do Couto JACOB40-58

1589 **Development and validation of analytical method for determining the artificial dyes in breakfast cereals by means of high performance liquid chromatography**

Desenvolvimento e validação de método analítico para determinação de corantes artificiais em cereais matinais utilizando cromatografia líquida de alta eficiência

Luana Limoeiro FERRÃO, Shirley de Mello Pereira ABRANTES.....59-66

1590 **Good manufacturing practice in Brazilian wheat mills with particular reference to the flour fortification**

Boas práticas de fabricação em moinhos de trigo brasileiros com particular referência à fortificação de farinha

William Cesar LATORRE, Célia COLLI67-76

1591	Caracterização, teor de polifenóis totais e atividade antioxidante em diferentes tipos de erva-mate (<i>Ilex paraguariensis</i> St. Hill.) para chimarrão	
	Characterization and determination of the total polyphenols contents and the antioxidant activity in four types of yerba mate (<i>Ilex paraguariensis</i> St. Hill.) for preparing <i>chimarrão</i>	
	Clarissa Obem dos SANTOS, Simone César TRINDADE, Márcia Liliane Rippel SILVEIRA, Roberta Oliveira SANTOS, Cláudia Kaehler SAUTTER	77-86
1592	Avaliação da rotulagem e dos teores de gordura de leite e produtos lácteos inspecionados nos Programas de Vigilância Sanitária	
	Assessment of the labeling and the fat content in milk and lactic products inspected in the Health Surveillance Programs	
	Janice Ramos de SOUSA	87-95
1593	Development of a HPLC/MS/MS methodology for determining 3-O-methyldopa in human plasma and its application in a bioequivalence study	
	Desenvolvimento de metodologia baseada em HPLC/MS/MS para a determinação de 3-O-metildopa em plasma humano e sua aplicação a estudos de bioequivalência	
	Heliana Figueiredo MARTINS, Douglas Pereira PINTO, Viviane de Assis NASCIMENTO, Marlice Aparecida Sipoli MARQUES, Fábio Coelho AMENDOEIRA	96-105
1594	Epidemiologia da coinfeção por HIV/HCV em um hospital escola de Catanduva, São Paulo – Brasil	
	Epidemiology of HIV/HCV co-infection in patients attended at an university hospital school at in Catanduva, São Paulo – Brazil	
	Adriana Antonia da Cruz FURINI, Daniela da Costa PRATES, Ana Paula PEZZINI, Luiz Carlos RABECIN JUNIOR, Beatriz Botacin REGINO, Arlindo SCHIESARI JUNIOR, Ricardo Luiz Dantas MACHADO.....	106-112
 ■ COMUNICAÇÃO BREVE/BRIEF COMMUNICATION		
1595	Serviços de alimentação comercial: fator de risco para a saúde pública?	
	Commercial food services: risk factor for public health?	
	Maria Regina Sarkis Peixoto JOELE, Consuelo Lima SOUSA, Lúcia de Fátima Henriques LOURENÇO.....	113-117
1596	Raiva animal na cidade do Rio de Janeiro: emergência da doença em morcegos e novos desafios para o controle	
	Animal rabies in the city of Rio de Janeiro: emergency of the disease in bats and the new challenges for its control	
	Priscilla Gomes de SOUZA, Barbara Maria Padão Montes do AMARAL, Clayton Bernardinelli GITTI	119-124
 ■ NOTA CIENTÍFICA/ SCIENTIFIC NOTE		
1597	Zoological techniques parameters of <i>Proechimys guyannensis</i> (Rodentia, Echimydae) bred in captivity	
	Parâmetros zootécnicos de <i>Proechimys guyannensis</i> (Rodentia, Echimydae) criados em cativeiro	
	Ana Paula MADUREIRA, Stela Rechinelli PASSOS, Daniela Regina RESENDE, Nazaré Fonseca de SOUZA, Antonio-Carlos Guimarães de ALMEIDA, Marcos Santos ZANINI.....	125-130
1598	Deteção de anticorpos anti-<i>Toxoplasma gondii</i> em felinos domésticos	
	Detection of anti- <i>Toxoplasma gondii</i> antibodies in domestic felines	
	Caroline Sobotyk de OLIVEIRA, Giovana CAMILLO, Gustavo Cauduro CADORE, Cássia BAGOLIN, Sonia Terezinha Lopes dos ANJOS, Luis Antônio SANGIONI, Fernanda Silveira Flores VOGEL	131-133
 ■ INSTRUÇÕES AOS AUTORES.....		133-139

Astaxantina: seu uso como corante natural alimentício

Astaxanthin: its use as natural food dye

RIALA6/1584

Micheli de Moraes FERREIRA^{1*}, Helena Pereira da Silva ZAMITH², Shirley ABRANTES³

*Endereço para correspondência: ¹Departamento de Tecnologia de Alimentos, Instituto de Tecnologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rodovia BR 465, km 7, Seropédica, RJ, Brasil. CEP: 23.890-000. Tel: (21) 2682-1023 (ramal 206) Fax: (21) 3787-3742. E-mail: michelimedvet@yahoo.com.br

²Departamento de Farmacologia e Toxicologia, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz

³Departamento de Química, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz

Recebido: 14.07.2013 - Aceito para publicação: 06.02.2014

RESUMO

A cor e a aparência dos alimentos são os primeiros atributos fundamentais, se não os mais importantes a serem avaliados pelos consumidores no momento da sua aquisição. Os alimentos podem ser mais nutritivos, seguros e econômicos, no entanto, se não forem atraentes, sua aquisição não ocorrerá. O salmão é basicamente um peixe branco que se torna rosado pela ingestão do camarão. O pigmento vermelho armazenado presente no músculo ou na casca do camarão e que se acumula no tecido adiposo é adquirido pela ingestão das algas e dos organismos unicelulares pelos camarões do mar. Os carotenóides utilizados nas indústrias alimentícia, farmacêutica, de cosméticos e de ração são corantes naturais responsáveis pelas cores amarela, laranja e vermelha. O salmão criado em aquíicultura não tem acesso aos organismos citados acima, entretanto é adicionada à sua ração a astaxantina (ATX), substância que confere a cor rosada à sua carne. A ATX (3,3'-dihidroxi-beta,beta-caroteno-4,4'-diona) é um pigmento carotenóide oxigenado, que confere a característica de coloração rosa-avermelhada a alguns peixes, crustáceos, aves e microrganismos. A ATX apresenta potente atividade na eliminação de radicais livres e na proteção quanto à peroxidação de lipídios e quanto aos danos causados pela oxidação das membranas celulares e de tecidos.

Palavras-chave. salmão, carotenóide, alimento.

ABSTRACT

The color and appearance of food are the first fundamental attributes, if not the most important, to be evaluated by consumers at the time of its acquisition. The food can be more nutritious, safer and more economical, however, if it is not attractive, its acquisition will not occur. Basically, salmon is a white fish that becomes pink by eating shrimp. The stored red pigment existing in the shrimp muscle or shell, which is accumulated in the adipose tissue, is acquired through the ingestion of algae and unicellular organisms by the marine shrimps. The carotenoids employed in the food, pharmaceutical, cosmetics and feed industries are natural colorants responsible for providing yellow, orange and red colors. As the salmon raised in aquaculture do not have access to the organism above mentioned, the astaxanthin (ATX), a substance that gives a pinkish color to salmon meat, is added to their feed. ATX (3,3'-dihydroxy-beta,beta-carotene-4,4'-dione) is a oxygenated carotenoid pigment which confers the characteristic reddish-pink coloration to certain fish, crustaceans, birds and microorganisms. The ATX has potent activity in removing the free radicals and protecting against the lipid peroxidation and the damage caused by oxidation of cell and tissues membranes.

Keywords. salmon, carotenoids, food.

INTRODUÇÃO

A cor é a primeira informação que temos de um alimento. A partir da cor bem como da textura podemos classificar qualquer alimento inicialmente, por exemplo, em agradável/aceitável ou mesmo repugnante. Geralmente são fatores facilmente perceptíveis e avaliados pelos consumidores, que podem ser altamente nutritivos e conferir ganhos a saúde. A aceitação do alimento está, pois, diretamente e principalmente relacionada à sua aparência.

A aparência de um alimento também pode contribuir de forma inversa quanto à avaliação pelo consumidor, pois, um alimento com poucos nutrientes pode ter sua apresentação melhorada para que seja mais requisitada, pelo menos em um primeiro instante. A cor acompanhada pela primeira impressão da textura faz parte do apelo comercial do produto.

Os carotenóides são corantes naturais responsáveis pelas cores amarela, laranja e vermelha, utilizados nas indústrias alimentícia, farmacêutica, de cosméticos e ração. A produção biotecnológica de carotenóides vem se destacando devido a fatores tais como possibilidade de utilização de substratos de baixo custo para a bioprodução; denominação de substâncias naturais; pequeno espaço para produção e, controle das condições de cultivo. Muitos micro-organismos produzem carotenóides, porém nem todos são industrialmente interessantes¹. Em animais aquáticos, possui muitas funções, tais como proteção de ácidos graxos poliinsaturados contra oxidação, proteção contra radiação ultravioleta, entre outros².

A astaxantina (3,3'-dihidroxi-beta,beta-caroteno-4,4'-diona) é um pigmento carotenóide oxigenado, que confere a característica de coloração rosa-avermelhada de alguns peixes, crustáceos, aves e micro-organismos, apresentando forte atividade de eliminar radicais livres e proteger contra peroxidação de lipídios e danos causados pela oxidação das membranas celulares e tecidos. Como os carotenóides não são sintetizados pelos animais, atualmente é crescente o seu uso como alimento funcional e suplemento farmacêutico. Sua adição é utilizada como suplemento alimentar nas dietas de peixes e crustáceos em aquicultura, fornecendo característica de pigmentação destes animais, e na criação de aves domésticas visa aumentar a cor da gema do ovo, incrementando sua qualidade e aceitação no mercado consumidor³.

Sendo assim este estudo visa abordar as diferentes formas de emprego da astaxantina (ATX) na produção de alimentos.

Estrutura Química e Propriedades Biológicas da ATX

A ATX (Figura 1) é um pigmento encontrado em animais aquáticos, tais como lagosta, siri e camarão. Este pigmento protege contra radicais livres, peroxidação lipídica, danos oxidativos ao colesterol lipoproteico de baixa densidade, oxidação dos ácidos graxos poliinsaturados essenciais e proteção contra os efeitos da luz ultravioleta (UV) nas membranas celulares e tecidos⁴.

Devido à alta taxa de insaturação, fatores tais como calor, luz e ácidos ocasionam isomerização dos carotenóides trans, que é a forma mais estável na natureza, para a forma cis (Figura 2) promovendo ligeira perda de cor e atividade pró-vitamínica. Os carotenóides são também susceptíveis às oxidações enzimáticas ou não enzimáticas, que dependem da estrutura do carotenóide, disponibilidade de oxigênio, presença de enzimas, metais, pró-oxidantes e antioxidantes, alta temperatura e exposição à luz⁵.

Os pigmentos podem absorver luz especificamente UV e visível do espectro, o restante é transmitido ou refletido, e apresentam cor. A estrutura responsável pela absorção da luz é o grupamento cromóforo, que nos carotenóides se caracteriza pelas duplas ligações conjugadas. Cada carotenóide é caracterizado por um espectro de absorção eletrônica. Assim, a espectroscopia de absorção é uma importante técnica na análise de carotenóides⁶.

A maioria dos carotenóides são tetraterpenoides com quarenta carbonos (C40) e 8 unidades isoprenoides, ligados de tal forma que a molécula é linear e simétrica, com a ordem invertida no centro. A estrutura básica acíclica C40 pode ser modificada por hidrogenação, desidrogenação, ciclização ou oxidação. A característica de absorção de luz destes pigmentos dá-se devido à cadeia de duplas ligações conjugadas que atua como cromóforo, sendo necessário, aproximadamente, sete ligações duplas conjugadas para que o carotenóide apresente coloração. O sistema de duplas ligações conjugadas também confere a estes pigmentos alta reatividade química, podendo ser facilmente isomerizados e oxidados, principalmente quando submetidos a condições não controladas de processamento e/ou estocagem, mais especificamente em produtos naturais (frutas). Além disso, o calor, a luz, o oxigênio e enzimas como lipoxigenase e/ou

ácidos presentes em frutas levam a alterações ou parcial destruição dos pigmentos. A exposição destes pigmentos a tais agentes resulta na formação de isômeros *cis*, epóxidos, diminuição da cor, perda da atividade pró-vitamínica A e quebra da cadeia¹.

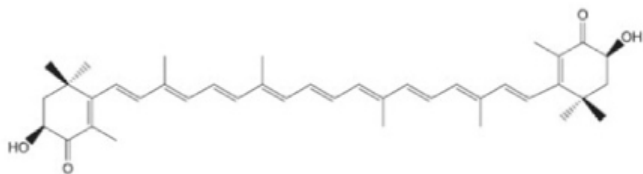


Figura 1. Estrutura da ATX_{trans}

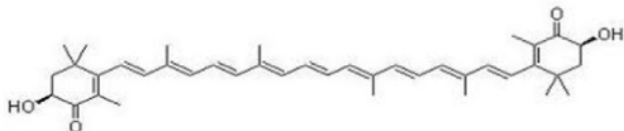


Figura 2. Estrutura da ATX *cis*

Após ingestão, devido a sua lipossolubilidade, a ATX é incorporada em micelas no intestino delgado, se difundindo passivamente na luz intestinal junto com os ácidos graxos. A ATX é incorporada em quilomícrons e estes após perderem sua fração lipídica, tornam-se suficientemente pequenos para passar através dos capilares sanguíneos, chegando ao fígado, principal órgão para metabolismo e excreção de carotenóides. Neste órgão, a ATX é catabolizada até seus metabólitos. O mecanismo exato pelo qual a ATX é metabolizada no fígado é desconhecido, mas a porção deste carotenóide não metabolizada é incorporada as lipoproteínas de muito baixa densidade antes de chegar a corrente sanguínea novamente⁷.

Apesar da ausência da atividade pró-vitamina A, a ATX possui inúmeras propriedades farmacológicas incluindo atividades antioxidante, antiinflamatória⁸, imunomoduladora, anticâncer⁹ e antidiabetes¹⁰. Entre tais propriedades, sua atividade antioxidante parece ser responsável pelas demais. A ATX apresentou potencial antioxidante superior a outros carotenóides como zeaxantina, luteína, cantaxantina, e β -caroteno e 100 vezes maior que o α -tocoferol¹¹. Essa superioridade estaria relacionada à estrutura química, onde os anéis polares da ATX removeriam espécies reativas de oxigênio

na superfície, enquanto a cadeia carbonada agiria no interior da membrana¹². No anel polar da ATX, o grupo hidroxila no átomo de carbono três é apontado como principal sítio de remoção de radicais livres.

Alguns autores têm descrito o efeito protetor da ATX contra danos oxidativos induzidos por radicais hidroxilas e oxigênio singlete¹³. Além disso, tem sido demonstrado que peróxido de hidrogênio, oxigênio singlete e radical superóxido estimulam a biossíntese da ATX em fungos, provavelmente como uma resposta de defesa antioxidante^{14,15,16}.

Fontes da ATX e seu emprego na indústria

A ATX é o principal pigmento carotenóide encontrado em animais aquáticos. Ele tem sido utilizado como uma fonte de pigmentação para peixes marinhos na aquicultura e também está sendo investigado para alimentos, cosméticos e aplicação médica, devido à sua alta atividade antioxidante. Os micro-organismos, alga do gênero *Haematococcus*, a levedura vermelha *Phaffia rhodozyma*, e o invertebrado *Euphausia superba* (krill), etc, são fontes de ATX. ATX sintética (Figura 2) é produzida por algumas empresas por meio de complexas reações químicas e seu mercado foi estimado em 100 milhões de dólares por ano no início dos anos 90. No entanto, não é, na mesma forma como encontrada na natureza, e sua estabilidade e atividade são mais baixas do que o produto natural. A astaxantina foi primeira isolada e identificada a partir de lagostas, em 1938, e muitos estudos foram realizados para extrair astaxantina a partir de várias fontes, por solventes orgânicos¹⁷.

A deposição de ATX em trutas e salmões é muito mais eficiente, comparativamente a outros carotenóides, sendo que a maioria dos criadores utiliza ATX sintética. Contudo, o custo deste insumo é elevado, aliado ao fato de que suas formulações podem conter configurações químicas indesejadas de ATX e seus derivados, diminuindo sua eficiência na pigmentação^{18,19}. Adicionalmente, observa-se uma tendência mundial à utilização de fontes naturais de nutrientes e à exclusão de componentes sintéticos da cadeia alimentar. Tais fatores têm aumentado o interesse em fontes naturais de ATX, sendo que diversas empresas têm investido na obtenção deste pigmento, a partir de fontes naturais²⁰. Atualmente, as fontes naturais mais promissoras de ATX são a microalga *Haematococcus pluvialis*²¹ e a levedura *Phaffia rhodozyma*²². Neste contexto, a necessidade de obtenção de ATX a partir de fontes naturais com elevada

produtividade, sustentabilidade e baixo custo, aliado ao uso de processos eficientes de extração e quantificação daquele carotenóide, vem direcionando pesquisas nesta área, buscando incrementos de qualidade e redução do custo do pescado produzido em cativeiro.

A aplicação mais comum tem sido na aquicultura, para a alimentação direta ou indireta de algumas espécies de peixes, moluscos, crustáceos e de diversos organismos forrageiros de interesse econômico. São empregadas espécies da família *Bacillariophyceae* (*Chaetoceros* spp. Ehrenberg, *Thalassiosira* spp. Cleve, *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin e *Skeletonemacostatum* Greville), da família *Haptophyceae* (*Isochrysis* spp. Parke), *Cryptophyceae* (*Rhodomonas* spp. Karsten), *Chrysophyceae* (*Monochrysis* spp. Skuja), *Prasinophyceae* (*Tetraselmis* spp. Stein), *Cyanophyceae* (*Arthrospira* spp. e *Spirulina* spp.) e *Chlorophyceae* (*Chlorella* spp, *Dunaliella* spp. e *Scenedesmus* spp. Bourrely), dentre outras classes e diversas espécies²³.

Emprego da ATX na indústria de alimentos

Com a intenção de solucionar este problema, várias pesquisas têm sido conduzidas com o objetivo de buscar fontes alternativas de pigmentos carotenóides a serem adicionadas à ração de galinhas poedeiras para melhorar a coloração das gemas e a ração de peixes para conferir cor à musculatura do pescado. Devido à tendência atual para o uso de produtos naturais, muitas algas, leveduras, vegetais e micro-organismos estão sendo estudados e recomendados para utilização como suplemento pigmentante^{21,24-28}.

A retenção de carotenóides em animais depende da eficiência de absorção do transporte do aparelho digestivo, dos mecanismos de deposição em diversos tecidos, do metabolismo e da taxa de excreção. Taxas de retenção na dieta de carotenóides em salmonídeos variam de acordo com fatores tais como: sexo, tamanho, espécie e composição da dieta, mas estão geralmente na faixa de 1-18 %. Os níveis de carotenóides em salmonídeos cultivados apresentam grandes variações entre indivíduos da mesma espécie, e os valores reportados para salmonídeos selvagens podem representar as diferenças comparativas na capacidade de depositar carotenóides. Fatores que podem também contribuir para a observação são as diferentes fontes de pigmento na dieta, o tamanho do peixe, as diferentes fases de maturação e genética²⁹.

ATX e a Aquicultura

No Brasil, a aplicação de corantes diretamente na carne do pescado é proibida, inclusive pelo *Codex Alimentarius*. Entretanto conforme a Resolução nº 1, de 7 de março de 2008 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, o seu uso na ração para promoção de cor na musculatura, é permitido. Como não dispomos de leis brasileiras sobre o assunto, nos baseamos em legislações internacionais em relação à segurança alimentar. Os limites que impomos a outros países quando da exportação de pescado colorido artificialmente por ração segue, principalmente, a União Europeia. O Art. 1º da resolução tem a seguinte redação:

Adotar a expressão “Peixe de cultivo: coloração resultante do corante utilizado na ração” em todos os rótulos aplicáveis aos produtos que contenham peixes provenientes da aquicultura cuja coloração da musculatura tenha sido obtida por meio da alimentação com rações adicionadas de corantes.

O salmão, que é um grande peixe da família *Salmonidae*, é peculiar aos mares e rios europeus, sendo muito procurado pela sua apreciadíssima carne rosada, muito saborosa, e criado em aquicultura, especialmente a espécie *Salmo salar*. O salmão do oceano Atlântico volta do mar à água doce para se reproduzir, quase sempre ao mesmo rio em que nasceu. À medida que se aproxima a época da procriação, a cabeça do macho muda de forma, alongando e curvando a mandíbula inferior em forma de gancho e a carne ganha uma coloração esbranquiçada. Enquanto o salmão do oceano Pacífico morre após a reprodução, o do Atlântico se reproduz mais de uma vez.

O salmão é basicamente um peixe branco. O pigmento vermelho é adquirido através das algas e dos organismos unicelulares, que são ingeridos pelos camarões do mar; o pigmento é armazenado no músculo do camarão ou na casca. Quando os camarões são ingeridos pelo salmão, estes também acumulam o pigmento nos seus tecidos adiposos. Como a dieta do salmão é muito variada, o salmão natural apresenta uma enorme variedade de cores, desde branco ou cor-de-rosa suave a vermelho vivo. Permanece na água doce nos dois ou três primeiros anos de vida antes de ir para o mar. Suporta temperaturas baixas em água doce ou salgada. O salmão adulto é alimento de focas, ursos, tubarões,

baleias e seres humanos.

O Chile é o segundo produtor mundial desse pescado. Através dos anos, sua indústria se desenvolveu e hoje é responsável por um abastecimento mundial considerável. Destaca-se a importância da "Fundación Chile", instituição de capital pública-privada voltada para assistência técnica a alguns projetos, tendo como principais funções verificar a necessidade da incorporação de novas tecnologias³⁰. Como qualquer empreendimento de capital de risco, esta Fundação registrou muitos fracassos, mas também muitos casos de sucesso, como o cultivo de salmões³¹. A partir de um projeto piloto de 1981 para o cultivo de salmões em jaulas, em água doce (tecnologia desenvolvida na Noruega e Suécia), houve a primeira produção comercial em 1986-1987, duplicando no período seguinte. No ano de 1988 o ciclo se completou, quando o projeto começou a gerar lucros e a Fundação vendeu o projeto a uma companhia japonesa de pescados e mariscos comestíveis. Nos anos 1990, a exportação de salmão se tornou uma das mais importantes³².

O Chile exportou para o Brasil US\$ 192 milhões, em 2009, sendo que 81 % desse valor, num total de US\$ 156 milhões, foram da categoria salmão. Em volume, o produto também representou 81 % do total importado pelo país, com 36 mil toneladas de um total de 44 mil toneladas importadas pelo país. Nota-se que quase 100 % dos salmões importados têm sua origem no Chile (Tabela 1).

É interessante observar que houve um direcionamento das vendas de salmão e trutas para o mercado brasileiro quando ocorreu a crise internacional a partir de 2008. Segundo dados do Banco Central do Chile, o país exportou estes dois produtos para o mundo num total de US\$ 2.327.500.000 em 2008. Em 2009, houve um recuo para US\$ 2.029.400.000, representando

um decréscimo de 13%. Paralelamente, o Brasil passou a importar mais deste país, chegando a 21 %. Ou seja, a participação relativa brasileira nas compras do Chile foi aumentada em plena crise econômica internacional. Sem desconsiderar que houve um aumento de 10 % no preço médio do pescado importado do Chile entre 2008 e 2009. Portanto, devido à estabilidade econômica brasileira, ao crescimento da renda média nacional e ao esforço exportador das empresas chilenas, o país apresentou um comportamento destoante dos demais compradores mundiais.

O consumo nacional de salmão em quilogramas teve aumento total de 16 % em relação a 2008. Neste período apenas os salmões congelados, cuja participação relativa é a segunda em importância, tiveram suas compras aumentadas em 76 %. Os salmões frescos, maior item da categoria, apresentaram redução de 2 % na comparação com 2008. Os salmões defumados tiveram uma queda de 4 % entre 2008 e 2009 (Tabela 1).

Nota-se que os salmões congelados tiveram aumento no volume e valor importados. Houve pequeno aumento de preço em comparação ao ano anterior, 7 %³³.

O Chile foi o principal fornecedor de pescado para o mercado brasileiro com 261 milhões de dólares em 2010. De acordo com dados do governo chileno, o Brasil foi o terceiro destino das exportações chilenas de pescado com US\$ 247 milhões, cerca de 12 % do total exportado em valores monetários³⁴.

O salmão cultivado segue como o segundo produto mais importado, sendo o Chile seu maior fornecedor, que exporta também grandes quantidades de truta para o mercado brasileiro, além de outros pescados.

Porém como o *habitat* natural do salmão são as águas europeias onde está presente sua alimentação em abundância, em uma criação em cativeiro, é preciso

Tabela 1. Importações brasileiras de salmões nos anos 2008 e 2009

Produtos	2008			2009			2009		
	Kg	US\$	US\$/kg	Kg	US\$	US\$/kg	Kg	US\$	US\$/kg
Salmões frescos	24.0052.436	104.429.634,00	4,34	23.513.358	121.917.644,00	5,19	-2%	17%	19%
Salmões congelados	7.137.611	17.758.566,00	2,49	12.577.251	33.507.209,00	2,66	76%	89%	7%
Salmões defumados	74.068	898.029,00	12,12	71.283	861.349,00	12,08	-4%	-4%	-
Total	31.264.115	123.068.229,00	3,94	36.161.892	156.286.202,00	4,32	16%	27	10%

Fonte: Ministério da Pesca e Aquicultura - Boletim estatístico da pesca e aquicultura, 2008-2009

que se adicione um complemento à alimentação desse pescado, sendo assim uma alternativa usada para se chegar a uma coloração típica da carne é o uso da ATX, que já está presente de forma natural na alimentação dos peixes europeus.

No cultivo de peixes como a tilápia vermelha e de crustáceos, a ATX é comumente adicionada à ração animal para compensar a falta da ocorrência natural deste pigmento. Além de promover a pigmentação, o crescimento e a sobrevivência dos animais cultivados, este pigmento também estimula o sistema imunológico de trutas. No entanto, o estímulo não é suficiente para que a ATX seja incluída como um agente imuno-estimulante nas formulações alimentares²⁷.

Os ovos de galinha são uma rica fonte de nutrientes vitais e, por isso, são comumente usados na alimentação humana. O grau de pigmentação das gemas de ovos depende basicamente do desejo do consumidor e varia com a área geográfica, tradição e cultura.

ATX e avicultura

Em muitas áreas de mercado ao redor do mundo, consumidores e indústrias que produzem alimentos contendo ovos em sua formulação (maionese, misturas para bolos, produtos de confeitaria, massas, e outros) preferem gemas de ovos fortemente coloridas, sendo difícil resistir ou ignorar essa tendência cultural e comercial^{24,25,34-36}. Em geral, o uso de rações ricas em carotenóides, ou de suplementos carotenóides na ração, efetivamente, mantém ou aumenta a coloração. Estas práticas têm se tornado o principal meio de conseguir a coloração desejada em vários produtos de origem animal, incluindo gemas de ovos³⁷.

Akiba et al²⁴ avaliaram o potencial pigmentante da gema de ovos com *Phaffia rhodozyma*, uma levedura contendo altos teores de oxicarotenóides em comparação com a páprica, uma fonte pigmentante de ocorrência natural, e os resultados mostraram que a levedura pode ser uma fonte útil para o propósito almejado.

ATX natural derivada de *Haematococcus* tem sido usado com sucesso como pigmento para gemas de ovos. Galinhas White Leghorn foram alimentadas com uma dieta basal durante duas semanas para esgotar seus níveis de carotenóides; no momento do início do experimento, obtendo ovos com uma média de pontuação de 4 cores no indicador ou tabela de cores Roche. Novas dietas foram preparadas e suplementadas com 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 3,0 mg.kg⁻¹ de ATX a partir de homogeneizado de

Haematococcus, que foram fornecidas aos animais por um período de quatro semanas. Após cerca de sete dias, os pigmentos de gema de ovo atingiram pontuações estáveis de 5,8; 7,9; 9,4; 10,1 e 11,8 na escala de cores, obtidas de galinhas alimentadas com rações suplementadas com 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 3,0 mg.kg⁻¹ de ATX, respectivamente. As pontuações de cor foram correlacionadas com um aumento de concentrações de ATX, zeaxantina e luteína nas gemas³⁸.

Trans-ATX foi detectada nos músculos (0,1 a 0,3 µg.g⁻¹) e fígado (0,3-1,1 mg.g⁻¹) de frangos alimentados com levedura, *Phaffia rhodozyma*, mas não em frangos de controle, a concentração de *trans*-ATX subiu parcialmente na proporção da concentração da ATX na dieta. O valor da cor da carne do peito foi intensificada com o aumento da ATX na dieta, embora este resultado não fosse estatisticamente significativo. Enquanto a ATX seja parcialmente metabolizada para idoxantina e crustaxantina, no fígado de galinha, é provável que a pigmentação da carne seja principalmente devido a ATX, que é diretamente incorporada na carne. A função biológica de carotenóides tem recebido uma atenção significativa nos últimos anos. A ATX mostra uma maior atividade antioxidante e propriedades imunomoduladoras em tecidos animais. ATX depositada (0,1 a 1,1 µg.g⁻¹) em tecidos pode ser de interesse em termos da prevenção da peroxidação do tecido em carne de galinha e, desse modo, poderia ser uma fonte de alimentação para consumo humano, que também tenha uma função adicional biológica²⁴.

Há uma quantidade crescente de evidências que sugerem que a ATX supera os benefícios antioxidantes do β-caroteno, zeaxantina, cantaxantina, vitamina C e vitamina E. Também têm demonstrado que a ATX pode proteger a pele dos efeitos nocivos da radiação ultravioleta, relacionada com a idade e degeneração macular, proteger contra cânceres induzidos quimicamente, aumentar lipoproteínas de alta densidade e melhorar o sistema imunitário. Estudos epidemiológicos têm demonstrado uma correlação entre o aumento de ingestão de carotenóides e redução da incidência de doença cardíaca coronária e certos tipos de câncer, degeneração macular e aumento de resistência a infecções virais, bacterianas, fúngicas e parasitárias. Estudos indicam que o mecanismo para esta proteção é um atributo, em parte, devido ao aumento direto da resposta imune pelos carotenóides. Efeitos anticarcinogênicos dos carotenóides são susceptíveis de serem atribuíveis ao seu

efeito antioxidante, de modo como os radicais livres de oxigênio estão relacionados com o processo de iniciação e propagação de câncer³⁸.

CONCLUSÃO

A ATX é um carotenóide que oferece grande utilização na indústria de alimentos, sendo usada inicialmente em criações de animais como aditivo a ração, como no caso da aquicultura do salmão e na avicultura de ovos.

A extração da ATX em meio *in natura* se torna inviável em razão dos custos elevados, porém a obtenção de uma ATX, através da produção e extração de algas, mostrou ser uma alternativa mais econômica e eficiente para a obtenção deste corante.

REFERÊNCIAS

1. Valduga E, Tastsch PO, Tiggemann L, Treichel H, Toniazzo G, Zeni J. Produção de carotenóides: microrganismos como fonte de pigmentos naturais. *Quim Nova*.2009;32(9):2429-36.
2. Higuera-Ciajara I, Félix-Valenzuela L, Goycoolea FM. Astaxanthin: a review of its chemistry and applications. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2006;46(2):185-96.
3. Fonseca RAS, Burkert JFM, Kalil SJ, Burkert CAV. Seleção de linhagem de *Phaffia rhodozyma* para produção de astaxantina. *In: XXI Congresso de Iniciação Científica e Tecnológica em Engenharia, VI Feira de Protótipos*. CRICTE: Rio Grande do Sul; 2006.
4. Hu ZC, Zheng YG, Wang Z, Shen YC. pH control strategy in astaxanthin fermentation bioprocess by *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Enz Microb Technol*.2006;84:164-6.
5. Johnson EA, Schroeder WA. Singlet oxygen and peroxy radicals regulate carotenoid biosynthesis in *Phaffia rhodozyma*. *J Biol Chem*.1995;270(31):18374-9.
6. Gross J. *Pigments in vegetables: chlorophylls and carotenoids*. New York: Van Nostrand Reinhold; 1991.
7. Rajasingh H, Oyehaug L, Vage DI, Omholt SW. Carotenoid dynamics in Atlantic salmon. *BMC Biol*.2006;4:1-15.
8. Kurashige M, Okimasu E, Inoue M, Utsumi K. Inhibition of oxidative injury of biological membranes by astaxanthin. *Physiol Chem Phys Med NMR*.1990; 22(1):27-38.
9. Chew BP, Park JS, Wong MW, Wong TS. A comparison of the anticancer activities of dietary beta carotene, canthaxanthin and astaxanthin in mice vivo. *Anticancer Res*.1999;19(3A):1849-53.
10. Uchiyama K, Naito Y, Hasegawa G, Nakamura N, Takahashi J, Yoshikawa T. Astaxanthin protects beta-cells against glucose toxicity in diabetic db/db mice. *Redox Rep*.2002;7(5):290-3.
11. Naguib YMA. Antioxidant activities of astaxanthin and related carotenoids. *J Agric Food Chem*.2000;48(4):1150-4.
12. Goto S, Kogure K, Abe K, Kimata Y, Kitahama K, Yamashita E, et al. Efficient radical trapping at the surface and inside the phospholipid membrane is responsible for highly potent antiperoxidative activity of the carotenoid astaxanthin. *Biochim Biophys Acta*.2001;1512(2):251-8.
13. Wu TH, Liao JH, Hou WC, Huang FY, Maher TJ, Hu CC. Astaxanthin protects against oxidative stress and calcium-induced porcine lens protein degradation. *J Agric Food Chem*.2006;54(6):2418-23.
14. Schroeder WA, Johnson EA. Antioxidant role of carotenoids in *Phaffia rodhozyma*. *J Gen Microbiol*.1993;139:907-12.
15. Schroeder WA, Johnson EA. Singlet oxygen and peroxy radicals regulate carotenoid biosynthesis in *Phaffia rhodozyma*. *J Biol Chem*.1995;270(31):18374-9.
16. Liu YS, Wu JY. Hydrogen peroxide-induced astaxanthin biosynthesis and catalase activity in *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Appl Microbiol Biotechnol*.2006;73(3):663-8.
17. Lim G-B, Lee S, Lee E, Haam S, Kim W. Separation of astaxanthin from red yeast *Phaffia rhodozyma* by supercritical carbon dioxide extraction. *Biochem Eng J*.2002;11:181-7.
18. Latscha T. *Carotenoids: their nature and significance in animal feeds*. Basel: Hoffman-La Roch; 1990. 110 p.
19. Torrissen OJ, Christiansen R. Requirements for carotenoids in fish diets. *J Appl Ichthyol*.1995;11(3-4):225-30.
20. McCoy M. Astaxanthin market a hard one to crack. *Chem Eng News*.1999;77(14):15-7.
21. Gouveia L, Gomes E, Empis J. Potential use of microalgae (*Chlorella vulgaris*) in the pigmentation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) muscle. *Z Lebensm Unters Forsch*.1996;202:75-9.
22. Moriel DG, Chociai MB, Machado IMP, Fontana JD, Bonfim TMB. Effect of feeding methods on the astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* in fed-batch process. *Braz Arch Biol Technol*.2005;48(3):397-401.
23. Muller-Feuga A. Microalgae for aquaculture. *In: Richmond A, editor. Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology*. Oxford: Blackwell Science; 2004. p.352-64.
24. Akiba Y, Sato K, Takahashi K, Matsushita K, Komiyama H, Tsunekawa H, et al. Meat color modification in broiler chickens by feeding yeast *Phaffia rhodozyma* containing high concentrations of astaxanthin. *J Appl Poult Res*.2001;10:154-61.
25. El Boushy AR, Raterink R. Egg yolk pigmentation. *World Rev Anim Prod*.1992;27(1):49-62.
26. Ogawa M, Maia EL, Fernandes AC, Nunes ML, Oliveira MEB, Freitas ST. Waste from the processing of farmed shrimp: a source of carotenoid pigments. *Ciênc Tecnol Aliment*.2007;27(2):333-7.
27. Ponsano EHG, Pinto MF, Garcia Neto M, Lacava PM. Evaluation of *Rhodocyclus gelatinosus* biomass for broiler pigmentation. *J Appl Poult Res*.2002;11(1):77-82.
28. Tolasa S, Cakli S, Ostermeyer, U. Determination of astaxanthin and canthaxanthin in salmonid. *Eur Food Res Technol*.2005;221:787-91.
29. Ffrench-Davis R. Debty-Equity swaps in Chile. *In: Economic reforms in Chile: from dictatorship to democracy*. Michigan, EUA: Michigan Press; 2002. 263 p.

30. Agosin M. Comercio y crecimiento en Chile. Rev CEPAL.1999;68:79-100.
31. CEPAL. América Latina y el Caribe: políticas para mejorar la inserción en la economía mundial. Santiago de Chile: Fondo de Cultura Económica; 1998.
32. Brasil. Ministério da Pesca e Aquicultura. Boletim estatístico da pesca e aquicultura: Brasil 2008-2009. Brasília: MPA; 2010. 99 p.
33. Brasil. Ministério da Pesca e Aquicultura. Boletim estatístico da pesca e aquicultura: Brasil 2010. Brasília: MPA; 2012.
34. Bauernfeind JC. Carotenoid vitamin A precursors and analogs in food and feeds. J Agric Food Chem.1972;20(3):456-73.
35. Marusich WL, Bauernfeind JC. Oxycarotenoids in poultry feeds. In: Bauernfeind JC, editor. Carotenoids as colorants and vitamin A precursors. New York: Academic Press; 1981. p. 319-462.
36. Williams WD. Origin and impact of color on consumer preference for food. Poultry Sci.1992;71(4):744-6.
37. Hudon J. Biotechnological applications of research on animal pigmentation. Biotechnol Adv. 1994;12(1):49-69.
38. Lorenz RT, Cysewski GR. Commercial potential for *Haematococcus microalgae* as a natural source of astaxanthin. Trends Biotechnol.2000;18(4):160-7.

Métodos para detecção de soja *Roundup Ready*[®] em grãos e produtos de soja por reação em cadeia da polimerase: revisão e análise crítica das práticas de validação

Methods for detecting the *Roundup Ready*[®] soy in soybeans and soy products by polymerase chain reaction: a review and critical analysis of current practices of validation

RIALA6/1585

Carolina Sheng Whei MIAW¹, Gláucia Celeste de Souza AMÂNCIO², Jovita Eugênia Gazzinelli Cruz MADEIRA², Scheilla Vitorino Carvalho de SOUZA^{1*}

*Endereço para correspondência: ¹Laboratório de Bromatologia, Unidade de Pesquisa Análise de Alimentos (BRO-UPAA), Departamento de Alimentos (ALM), Faculdade de Farmácia (FAFAR), Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG, Av. Antônio Carlos 6627, Campus da UFMG, Pampulha, CEP 31.270-010. Belo Horizonte, MG, Brasil. E-mail: scheilla@bromatologiaufmg.com.br.

²Laboratório de Biologia Molecular (LBM), Divisão de Vigilância Sanitária e Ambiental (DIVISA), Diretoria do Instituto Octávio Magalhães (IOM), Fundação Ezequiel Dias (FUNED). Belo Horizonte, MG, Brasil.

Recebido: 16.05.2013 - Aceito para publicação: 06.03.2014

RESUMO

A informação sobre a origem transgênica de alimentos é muito relevante. Conforme a legislação brasileira e de outros países, o consumidor deve ser informado da natureza transgênica dos alimentos ou ingredientes que contenham ou que sejam produzidos a partir de organismos geneticamente modificados (OGM), com presença acima de um limite estabelecido. A necessidade de monitorar a presença e determinar o percentual de OGM em alimentos tem gerado uma constante demanda pelo desenvolvimento de metodologias capazes de detectar, identificar e quantificar o DNA exógeno. Entretanto, esses métodos necessitam ser validados para garantir confiabilidade aos resultados. No presente trabalho, a validação de métodos para detecção de soja *Roundup Ready*[®] em grãos e produtos de soja por reação em cadeia de polimerase foi contextualizada. Considerando-se atuais tendências em validação de métodos, os guias para validação de métodos específicos para OGM não contemplam todos os parâmetros necessários para avaliar a adequação aos propósitos de uso dos métodos, principalmente no caso de métodos qualitativos. Os parâmetros de desempenho mais frequentemente citados na literatura foram precisão (repetitividade), sensibilidade, linearidade e veracidade para metodologias quantitativas e taxas de sensibilidade e seletividade para qualitativas. Contudo, importantes parâmetros têm sido negligenciados nos processos de validação de métodos deste escopo analítico.

Palavras-chave. validação de métodos, reação em cadeia da polimerase, organismos geneticamente modificados, soja, *Roundup Ready*[®].

ABSTRACT

Information on the origin of transgenic foods is quite relevant. According to the Brazilian and other countries legislations, the consumer must be informed about the nature of transgenic foods and ingredients, which contain or being produced from genetically modified organisms (GMOs), in amount above the established limit. Thus, there is a growing need for evaluating the occurrence of GMOs, and to determine the percentage of them in food. This need has generated a demand for developing methods to detect, identify and quantify the exogenous DNA. However, these methods need to be validated to ensure reliability of the results. This review paper evaluated the validation of methodologies for detecting the *Roundup Ready*[®] soybean in grain and soybean products by polymerase chain reaction. Considering the current trends in method validation, the specific guides for validating GMOs do not include all of the parameters required to assess the fitness for its purpose, especially in the case of qualitative methods. The most frequent parameters reported in the literature were accuracy, precision (repeatability), linearity and sensitivity for quantitative methods, and rates of sensitivity and selectivity for qualitative methods. However, important parameters have been neglected in the validation procedures of this analytical scope.

Keywords. method validation, polymerase chain reaction, genetically modified organisms, soy, *Roundup Ready*[®].

INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max* L. Merrill) é um dos produtos agrícolas mais importantes nacional e mundialmente. A safra 2013/2014 de soja no mundo está estimada em 285,30 milhões de toneladas, sendo o Brasil o segundo maior produtor desta oleaginosa com a produção de 85 milhões de toneladas¹. Sob o ponto de vista nutricional, a soja é uma importante fonte proteica, além de possuir funcionalidade reconhecida por órgãos regulamentadores nacionais e internacionais².

Vários países (Estados Unidos, Canadá, Japão, Brasil, Argentina, Comunidade Europeia, entre outros) aprovam a produção e/ou a comercialização de alimentos geneticamente modificados (GM). As principais culturas de organismos geneticamente modificados (OGM) são soja, algodão, canola e milho e os principais objetivos da transformação genética são a melhoria da qualidade, da produtividade e das características da planta e o desenvolvimento de resistência às pragas³.

No Brasil, estão aprovados para comercialização 37 produtos agrícolas transgênicos, sendo 19 de milho, 5 de soja, 12 de algodão e 1 de feijão⁴. De acordo com o Decreto nº 4.680, de 24 de abril de 2003, o consumidor deve ser informado da natureza transgênica dos alimentos ou ingredientes alimentares que estiverem sendo comercializados e que contenham ou que sejam produzidos a partir de OGM, com presença acima do limite de 1 % do produto⁵.

Nos países da União Europeia, a rotulagem obrigatória é prevista em produtos que apresentam 0,9 % ou mais de OGM nos ingredientes individuais que entraram no seu preparo. Na Suíça, o limite é de 0,1 % e na Rússia e Japão de 5 %. Nos EUA, embora a recente legislação não exija a rotulagem, o governo recomenda fazê-la voluntariamente, exigindo apenas que as empresas produtoras de alimentos contendo OGM notifiquem órgãos reguladores, como *Food and Drug Administration* (FDA), *United States Department of Agriculture* (USDA) e *Environmental Protection Agency* (EPA), antes de o novo produto ser comercializado⁶.

Desta forma, é fundamental que os laboratórios governamentais e do setor produtivo estejam interessados em desenvolver, padronizar e validar métodos para uma eficaz detecção e quantificação de OGM em alimentos, visando garantir conformidade com requisitos regulamentares e adequada informação ao consumidor^{6,7}.

Métodos baseados na detecção do ácido

desoxirribonucleico (DNA), especialmente a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), têm sido recomendados por órgãos internacionais de regulamentação, pesquisa, comércio e certificação para detecção e quantificação de OGM em matérias-primas e alimentos⁸. Isto se deve à maior estabilidade destas moléculas quando comparadas às proteínas. Contudo, os métodos necessitam ser validados para que os resultados obtidos sejam considerados confiáveis. A validação de métodos constitui o estudo dos parâmetros de desempenho de métodos quantitativos e qualitativos, visando à avaliação de sua adequação ao propósito de uso (*fitness for purpose*). Trata-se de um requisito fundamental em sistemas de gestão da qualidade e em processos de acreditação de laboratórios⁹. No entanto, apesar da publicação de alguns documentos orientativos relacionados especificamente à validação de métodos para análise de OGM em alimentos^{10,11}, a estruturação de procedimentos de validação ainda constitui um gargalo para a conformidade de sistemas de gestão da qualidade dos laboratórios da área.

OBJETIVOS

No presente trabalho é apresentada uma discussão sobre as principais técnicas para detecção de soja *Roundup Ready*[®] (RR[®]) em grãos e produtos de soja por PCR, incluindo uma análise crítica dos documentos orientativos relacionados à validação de métodos para detecção de OGM e dos trabalhos de validação publicados na literatura, frente às atuais abordagens sobre o tema.

Análise de OGM em alimentos

A detecção de OGM é baseada na sequência de DNA exógeno ou na proteína transgênica. As etapas analíticas envolvidas na determinação de OGM em alimento são: i) detecção (triagem) de OGM; ii) identificação do OGM, para revelar quais eventos estão presentes e se são autorizados; e iii) quantificação do OGM, para checar a necessidade de declaração na rotulagem ou não, conforme a legislação¹².

Como o DNA é uma molécula estável, alimentos processados são geralmente analisados por métodos baseados na pesquisa desta molécula. Assim, a detecção de DNA recombinante em alimentos é possível por PCR, técnica que consiste na amplificação seletiva de sequências específicas da molécula de DNA. Esta técnica

é considerada sensível, seletiva, segura, capaz de detectar uma ampla variedade de eventos e de distinguir as variedades GM que apresentam diferentes construções gênicas, mas expressam a mesma proteína¹³.

Independentemente da variedade de métodos utilizados para análise de DNA, a PCR, nos seus diferentes formatos, tem sido a técnica recomendada pelos órgãos reguladores internacionais e amplamente aplicada na detecção e quantificação de OGM em alimentos e rações, bem como aceita para fins de avaliação da conformidade com propósitos regulamentares¹².

Quantidades significativas de DNA amplificável são, geralmente, difíceis de serem obtidas a partir de alimentos processados uma vez que o DNA pode ser degradado durante o processamento do alimento. A qualidade do DNA varia de acordo com o material em análise, o grau de processamento ao qual a amostra foi submetida e o método de extração aplicado. A pureza do DNA pode ser afetada por vários contaminantes presentes nas matrizes alimentares. Estes contaminantes podem ser substâncias originárias da amostra (polissacarídeos, lipídeos e polifenóis) ou químicas utilizados durante o procedimento de extração do DNA. Tais componentes são conhecidos por causarem problemas na análise de PCR, pois podem interagir irreversivelmente com as proteínas e ácidos nucleicos, inibindo a PCR¹³.

Devido a estes efeitos, a detecção e quantificação de OGM, estabelecidas durante a validação, devem ser específicas para a matriz a ser analisada, não podendo ser extrapolada para outras. A menor quantidade de DNA extraído da matriz alvo ou o comprometimento da integridade das moléculas de DNA causam o aumento dos limites de detecção e quantificação, expressos em termos de DNA transgênico em relação ao DNA total da matriz. Em casos em que a eficiência da extração é extremamente baixa, a reprodutibilidade do método é baixa e os valores de limite de detecção e quantificação desconhecidos, o que pode gerar resultados falso-negativos¹⁴.

Segundo Holst-Jensen et al¹⁵, testes de detecção de OGM em alimentos podem ser agrupados em quatro categorias, com diferentes níveis de seletividade.

Categoria 1 – Métodos para triagem: a maioria dos OGM apresenta vários elementos genéticos como o promotor *CaMV P-35S*, o terminador *CaMV T-35S*, ambos do vírus do mosaico da couve-flor, ou o terminador *T-NOS* derivado do gene da nopalina sintetase do *Agrobacterium tumefaciens*. Os vetores de clonagem mais comumente utilizados são plasmídeo *pBR322* e seus

derivados que contêm genes codificadores de resistência a ampicilina (*bla*) ou neomicina/kanamicina (*nptII*). Assim, métodos baseados nesta categoria possuem amplas aplicações para triagens de OGM. Porém, métodos para triagem não podem ser utilizados para a identificação de um OGM específico, visto que a maioria dos OGM disponíveis possui um ou mais destes elementos. Além disso, estes ocorrem naturalmente em algumas plantas e micro-organismos do solo, sendo que a sua presença não implica necessariamente na presença de DNA derivado de um OGM.

Categoria 2 – Métodos gene-específicos: genes de interesse também podem ocorrer naturalmente, mas são frequentemente alterados. Métodos baseados na pesquisa do gene de interesse são mais específicos que os métodos de triagem, pois um resultado positivo obtido com um método de categoria 2 normalmente implica na presença de DNA derivado de OGM e, em muitos casos, é possível identificar o OGM do qual este DNA é derivado.

Categoria 3 – Métodos baseados na construção específica: estes métodos visam junções entre elementos adjacentes do transgene inserido, por exemplo, a junção entre o promotor e o gene de interesse. Com estes métodos um resultado positivo aparecerá apenas na presença de material GM e será possível identificar a fonte do DNA de forma mais segura do que com a utilização de métodos de categoria 2.

Categoria 4 – Métodos evento-específicos: o alvo deste método é a junção entre o genoma receptor e o DNA inserido no locus de integração, sendo esse local característico de cada evento de transformação. No entanto, estes métodos apresentam limitações. Quando dois OGM são cruzados (dois diferentes milhos GM como T25 e MON810), o híbrido descendente pode conter modificações genéticas incluindo os alvos dos dois eventos e será indistinguível dos organismos genitores em uma análise de PCR. Este fenômeno é conhecido como estaqueamento (*gene stacking*).

Além da categorização, novas estratégias para análise de OGM em alimentos e rações vêm sendo desenvolvidas como a adotada por laboratórios da *European Network of GMO Laboratories* (ENGL), baseada na matriz de triagem de OGM. A primeira etapa desta abordagem consiste em escolher testes de triagem que permitem a análise de uma ampla diversidade de OGM. Ao comparar os resultados obtidos com dados tabelados, que descrevem a presença/ausência de sequências específicas em eventos individuais, o analista avalia quais

possíveis eventos podem estar presentes na amostra. A identificação/confirmação do OGM é realizada em uma segunda etapa por meio de métodos evento-específicos. Quando um resultado não indica a presença de nenhum OGM registrado, esta amostra é considerada como não conhecida e testes adicionais são necessários para elucidar a origem dos sinais positivos na triagem¹⁶⁻¹⁸.

Com intuito de preencher lacunas obtidas quando se aplica a matriz de triagem de OGM obtendo-se um resultado inconclusivo da amostra, Block et al¹⁹ construíram um banco de dados de OGM e de seus elementos genéticos no projeto intitulado GMOseek. A matriz GMOseek é composta por dados de 328 eventos com 247 elementos diferentes presentes em suas respectivas construções. Possui eficácia para a recuperação de dados em um formato flexível, o qual permite adaptação para ser utilizada em países que possuem diferentes legislações para OGM. A matriz proporciona uma visão geral, de forma rápida e fácil, de todos os elementos genéticos e sua presença ou ausência em inúmeros OGM encontrados no mercado global.

Os métodos baseados na PCR, que levam em conta o conhecimento prévio da sequência de nucleotídeos dos elementos genéticos integrados no genoma, são normalmente utilizados. OGM com modificações genéticas insuficientemente caracterizadas representam um desafio na análise de alimentos contendo tais sequências. Assim, novas estratégias para a caracterização e identificação molecular estão sendo desenvolvidas, como, por exemplo, o sequenciamento de nova geração ou *Next Generation Sequencing* (NGS)²⁰.

O NGS é uma técnica de alto rendimento para o sequenciamento de genomas inteiros, embora seu elevado custo seja, ainda, impedimento para análises de rotina. Durante o NGS, uma amostra de DNA genômico é cortada em pequenos fragmentos que são sequenciados em milhões de reações paralelas. As cadeias de bases identificadas, chamadas *reads*, são alinhadas e comparadas com um genoma de referência (ressequenciamento). Quando não se tem o genoma de referência do organismo estudado é preciso gerar ou montar esse genoma pela primeira vez. O conjunto completo de *reads* alinhados ou montados revela a sequência completa do genoma da amostra de DNA²⁰.

PCR

A PCR, desenvolvida em 1983 por Kary Banks Mullis, é uma técnica que permite a amplificação de

segmentos de DNA *in vitro*. Neste processo, o DNA pode ser multiplicado artificialmente através de ciclos repetidos de duplicação, sendo a reação catalisada pela enzima Taq DNA polimerase. A técnica é baseada na amplificação exponencial seletiva de uma quantidade reduzida de DNA de um conjunto de células, correspondendo a um mecanismo de síntese artificial de DNA num processo em cadeia que imita a replicação do DNA²¹.

Essa técnica é utilizada para detectar uma ou mais sequências alvo (PCR multiplex), nas diferentes categorias (triagem, gene-específico, construção-específica ou evento específico). Em uma análise de PCR qualitativa o objetivo é detectar a presença ou ausência de uma determinada sequência alvo, por meio de respostas binárias. A PCR quantitativa permite a medição do produto da PCR e o monitoramento da reação em um sistema fechado, por meio da medição da intensidade de fluorescência em cada ciclo de amplificação. Para a quantificação, podem ser utilizadas curvas padrão (absoluta ou relativa) ou métodos comparativos para análise de dados²².

Tipos de PCR

PCR convencional

Na PCR convencional, aplicada às análises qualitativas, o DNA deve ser extraído e purificado. Os *primers* se destacam dentre os componentes deste tipo de PCR como aqueles que muito influenciam na seletividade. Esta é uma técnica rápida, barata, segura e não requer muito espaço em laboratório. Em termos de equipamento requer termociclador, sistema de eletroforese, transluminador e equipamento para fotodocumentação. Entretanto, esta técnica apresenta alguns fatores limitantes como: i) a necessidade de conhecer antecipadamente a sequência de DNA a ser amplificada para a síntese de *primers* específicos; ii) a possibilidade de contaminação da amostra por DNA estranho (alta sensibilidade da técnica); iii) a dificuldade em aplicar a PCR para sequências maiores que 5000 pb; e iv) a incorporação errada de bases durante a replicação²¹.

Em testes de triagem de OGM, a presença de bandas específicas de tamanho esperado nos perfis de eletroforese da amostra e do controle positivo significa a provável presença de OGM, enquanto a ausência desta banda no controle negativo é esperada. Vale ressaltar que os controles devem ser materiais de referência certificados (MRC) ou amostras sabidamente positivas ou

negativas. Assim, quando o produto da PCR proveniente da amplificação do DNA recombinante apresentar o fragmento esperado no perfil de eletroforese da amostra, o resultado positivo indica a provável presença de uma modificação genética, porém não é possível identificar o tipo de modificação ou organismo que foi modificado¹⁵.

PCR Multiplex

A PCR multiplex, aplicada em análises qualitativas e quantitativas, é uma técnica robusta, rápida e confiável que permite a detecção de várias sequências de DNA simultaneamente. Por meio da combinação de diversos pares de iniciadores em uma mesma reação é possível obter um grande número de informações em pouco tempo e com economia de reagentes em relação à PCR convencional²³.

Trata-se de uma técnica mais trabalhosa para padronização, pois a combinação de diferentes iniciadores pode resultar na amplificação de sequências não-alvo e, quando há mais de um fragmento alvo sendo amplificado em uma reação, estes competirão pelos reagentes. Assim, é necessário muito cuidado ao se realizar a validação de métodos por PCR multiplex²³.

Nested PCR

Na *Nested PCR*, técnica qualitativa, sequências específicas de DNA são amplificadas a partir de uma mistura complexa de DNA. É possível construir iniciadores para amplificar um único *locus* de um genoma inteiro. De uma única molécula, é possível produzir mais de um bilhão de cópias muito rapidamente. No entanto, a possibilidade de amplificar a sequência de DNA não desejável também é aumentada mais de um bilhão de vezes. A seletividade da PCR é determinada pela seletividade dos iniciadores da PCR. Assim, na *Nested PCR* dois pares de iniciadores são usados para um único *locus*. O primeiro par amplifica o *locus* como na PCR convencional. O segundo par de iniciadores liga-se a uma região mais interna do produto da primeira amplificação, produzindo um fragmento mais curto do que o primeiro. A vantagem da *Nested PCR* é que se o fragmento amplificado não for o esperado, a probabilidade dessa região ser amplificada pela segunda vez pelo segundo conjunto de iniciadores é reduzida²³.

PCR em Tempo Real

A PCR em Tempo Real pode ser utilizada tanto em análises qualitativas quanto em quantitativas.

A PCR em Tempo Real é utilizada e recomendada pelo *Joint Research Center* (JRC) para detecção e quantificação de OGM em alimentos e rações. A reação é monitorada ciclo a ciclo, associando a amplificação do alvo em cada ciclo com a emissão de uma determinada quantidade de fluorescência. A fluorescência é originada durante a hibridização do DNA alvo com sondas marcadas com fluoróforos específicos. A intensidade de sinal emitida é proporcional à quantidade de DNA alvo amplificado e aumenta exponencialmente em cada ciclo de amplificação. Pelo registro de sinal fluorescente em cada ciclo, é possível monitorar a reação de PCR durante a fase exponencial e o primeiro aumento significativo de fluorescência corresponde à quantidade inicial de cópias de DNA alvo. Nesta fase, é possível determinar um valor de intensidade de fluorescência em que todas as amostras podem ser comparadas. Este valor é denominado *threshold* e é calculado em função da fluorescência basal (*background*). A quantidade de ciclos de PCR requerida para que cada amostra emita fluorescência suficiente para alcançar este ponto é definido como *cycle threshold* ou Ct. O Ct é específico para cada amostra e é inversamente proporcional à quantidade inicial de DNA alvo^{14,23,24}.

Em análises qualitativas o elemento alvo é detectado baseado na presença ou ausência do mesmo utilizando valores de Ct ou na fluorescência ao final da reação (*endpoint*). Não é necessária a construção de uma curva de calibração padrão, mas é indicado incluir controles positivos e negativos, além de amostras sabidamente negativas que mimetizem o preparo da amostra. Quando a amostra controle positivo apresentar uma mudança significativa na fluorescência, pode ser um indicativo que os resultados negativos das amostras desconhecidas são negativos reais, e não apenas o resultado de uma falha da reação de PCR, que poderia ser causada por problemas com os *primers*, sondas, tampão ou polimerase²².

A PCR em Tempo Real oferece muitas vantagens técnicas como a reduzida probabilidade de contaminação, processamento automatizado, monitoramento em tempo real e não necessidade de análise pós-reação. Porém, apresenta desvantagens como o elevado custo do equipamento e as elevadas exigências técnicas e científicas requeridas para o correto manuseio e manutenção do equipamento²².

Validação de métodos

A validação compreende a confirmação da

adequação de determinado método para o propósito de uso, podendo ser estruturada em processos intra ou interlaboratoriais. A validação se faz necessária para métodos não normalizados (métodos desenvolvidos ou adotados pelo laboratório). Para métodos normalizados, validados em estudos interlaboratoriais, o laboratório deve confirmar que tem condições de operar adequadamente o método antes de implantá-lo em sua rotina²⁵.

Os estudos interlaboratoriais ou colaborativos envolvem a análise de uma mesma amostra (ou amostras idênticas), pelo mesmo método de ensaio, em diferentes laboratórios, para determinar os parâmetros de desempenho de um método. Estes estudos incluem medidas em condições de repetitividade e reprodutibilidade²⁶. Validações intralaboratoriais correspondem a estudos analíticos que envolvem um único laboratório, utilizando um mesmo método, para analisar a mesma ou diferentes amostras, sob diferentes condições, em um intervalo de tempo justificado²⁵.

Análise crítica dos documentos orientativos

Diversos documentos genéricos são adotados como referências para a validação intralaboratorial de métodos, como o documento orientativo DOQ-CGCRE-008 do Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO)²⁷, o guia publicado pelo EURACHEM²⁸ e o guia harmonizado pela *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC International), *International Standards Organization* (ISO) e *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC)⁹. Ainda não existe um guia harmonizado para a validação de métodos qualitativos, apesar de haver uma iniciativa da IUPAC no desenvolvimento de um modelo²⁹, além de publicações sobre o tema³⁰⁻³⁴.

Em relação à validação de métodos de análise de OGM em alimentos, em 2008, Zel et al³⁵ publicaram um trabalho considerando a legislação Europeia vigente. Neste documento foram apontados dois importantes aspectos da validação na área: i) a possibilidade de validação modular; e ii) a necessidade da flexibilidade no escopo de acreditação dos laboratórios da área; ambos

em detrimento do constante aumento de novos OGM no mercado.

Atualmente, existem dois guias específicos publicados para a validação de métodos de análise de OGM.

O documento *Definition of minimum performance requirements for analytical methods of GMO* criado pelo *European Network of Genetically Modified Organism Laboratories* (ENGL)¹⁰ e acolhido pelo *Joint Research Center* (JRC) inclui recomendações para validação de métodos para análise de OGM pelo *European Union Reference Laboratory for GM Food and Feed*, as quais fornecem o embasamento científico necessário para implementar a legislação de OGM no mercado europeu.

O guia do CODEX ALIMENTARIUS¹¹ *Guidelines on criteria for methods for the detection and identification of foods derived from biotechnology* trata sobre os procedimentos necessários à validação de métodos de detecção, identificação e quantificação de sequências específicas de DNA e de proteínas em alimentos obtidos por técnicas de biotecnologia, com distinção entre os quantitativos e qualitativos por PCR ou *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA). Neste documento também é citada a validação modular, a qual define um método como a combinação de todas as etapas experimentais necessárias para estimar o mensurando em uma matriz particular, que podem incluir as etapas de extração de DNA, de quantificação ou de determinação da presença/ausência do analito. Na abordagem modular, é possível usar a mesma preparação da amostra em combinação com o mesmo DNA extraído para diversas análises subsequentes, contanto que o processo do método validado permaneça o mesmo. Seria inapropriado, contudo, substituir um processo de extração de DNA diferente, em um método validado, sem a realização de estudos adicionais para demonstrar que a substituição não afeta o desempenho do método.

Nas Tabelas 1 e 2 estão elencados os parâmetros de desempenho descritos nos principais guias, documentos orientativos e referências sobre validação de métodos

Tabela 1. Parâmetros de desempenho propostos na literatura para validação de métodos quantitativos

Parâmetro	EURACHEM ²⁸	THOMPSON et al ⁹	ENGL ¹⁰	INMETRO ²⁷			CODEX ALIMENTARIUS ¹¹
				Elementos menores ou traços	Propriedades físicas	Elementos em maior teor	
Adequação ao uso (<i>fitness for purpose</i>)	-	Sim	-	-	-	-	-
Aplicabilidade	-	Sim	Sim	-	-	-	Sim ^{XI}
Eficiência	-	-	Sim ^V	-	-	-	Sim ^{XI}
Extração e purificação do DNA ^I	-	-	'Sim	-	-	-	-
Faixa de trabalho	Sim	Sim	Sim ^{VI}	Sim	Sim	Sim	Sim ^{XII}
Incerteza de medição	Sim	Sim	-	-	-	-	-
Limite de detecção	Sim	Sim	Sim	Sim	-	-	Sim
Limite de quantificação	Sim	Sim	Sim	Sim	-	-	Sim
Linearidade	Sim ^{II}	Sim ^{IV}	Sim ^{VII}	Sim ^{IX}	Sim ^{IX}	Sim ^{IX}	Sim ^{XII}
Praticabilidade	-	-	Sim	-	-	-	Sim
Precisão	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
Recuperação	Sim	Sim	-	Sim ^X	Sim ^X	Sim ^X	-
Repetitividade	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
Reprodutibilidade	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
Robustez	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
Seletividade	Sim ^{III}	Sim	Sim ^{VIII}	Sim	Sim	Sim	Sim
Sensibilidade	Sim	Sim	-	Sim ^{IX}	Sim ^{IX}	Sim ^{IX}	Sim
Variação de matriz	-	Sim	-	-	-	-	-
Veracidade (<i>trueness</i>)	Sim	Sim	Sim	Sim ^X	Sim ^X	Sim ^X	Sim

I Concentração, estado de fragmentação e pureza do extrato no documento ENGL¹⁰

II Faixa linear e de trabalho no guia do EURACHEM²⁸

III Confirmação de identidade e seletividade no guia do EURACHEM²⁸

IV Calibração e linearidade, incluindo efeitos de matriz, no documento harmonizado AOAC/ISO/IUPAC (THOMPSON et al.9)

V Eficiência da amplificação no documento ENGL¹⁰

VI Faixa dinâmica no documento ENGL¹⁰

VII Coeficiente R² no documento ENGL¹⁰

VIII Especificidade no documento ENGL¹⁰

IX Sensibilidade e linearidade no documento do INMETRO²⁷

X Tendência e recuperação no documento do INMETRO²⁷

XI Eficiência considerada no guia do CODEX ALIMENTARIUS¹¹ junto ao parâmetro aplicabilidade

XII Faixa dinâmica ou de quantificação, incluindo linearidade, no guia do CODEX ALIMENTARIUS¹¹

Tabela 2. Parâmetros de desempenho propostos na literatura para validação de métodos qualitativos

Parâmetro	EURACHEM ²⁸	THOMPSON et al ⁹	TRULLOLS, et al ³⁰	CARDENAS e VALCÁRCEL ³¹	ELLISON e FEARN ³²	INMETRO ²⁷ Propriedades físicas	CODEX ALIMENTARIUS ¹¹
Acordância e concordância	-	-	-	-	Sim	-	-
Adequação ao uso (fitness for purpose)	-	Sim	-	-	-	-	-
Confiabilidade ^I	-	-	-	Sim	Sim	-	-
Limite de detecção	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
Rastreabilidade	-	-	-	Sim	-	-	-
Região de perda de confiabilidade	-	-	Sim	Sim	Sim	-	-
Representatividade	-	-	-	Sim	-	-	-
Robustez	-	Sim	Sim	Sim	-	Sim	Sim
Taxa de falso-negativo	Sim	-	Sim	Sim ^V	Sim	-	Sim
Taxa de falso-positivo	Sim	-	Sim	Sim ^V	Sim	-	Sim
Taxa de seletividade (especificidade)	Sim ^{II}	Sim ^{III}	Sim ^{IV}	Sim ^V	Sim ^{VI}	Sim ^{III}	-
Taxa de sensibilidade	-	-	Sim	Sim ^V	Sim ^{VI}	-	-

I Taxa de confiabilidade, eficiência, índice de Youden e taxa de verossimilhança em CARDENAS e VALCÁRCEL³¹ e ELLISON e FEARN³²

II Confirmação de identidade e seletividade/especificidade no guia do EURACHEM²⁸

III Seletividade no documento do INMETRO³¹ e AOAC/ISO/IUPAC (THOMPSON et al.⁹)

IV Taxa de especificidade em TRULLOLS et al.³⁰

V Falso-negativo, falso positivo, especificidade e sensibilidade em CARDENAS e VALCÁRCEL³¹

VI Especificidade e sensibilidade em ELLISON e FEARN³²

quantitativos e qualitativos, respectivamente.

Pode-se observar que em nenhum caso todos os parâmetros são considerados em uma única referência. Além disto, em muitos casos a terminologia adotada para designação dos parâmetros não se apresenta de forma harmonizada, destacando-se o parâmetro seletividade, tratado na maioria das vezes como especificidade, apesar de haver uma recomendação da IUPAC para promoção do uso do primeiro em detrimento do segundo na área de química analítica³⁶. Tal recomendação é para que o termo seletividade seja promovido para expressar a extensão na qual um método em particular pode ser utilizado para determinar analitos, sob determinadas condições, na presença de outros componentes de comportamento similar.

Enquanto a seletividade pode ser graduada, a especificidade não. Segundo a IUPAC, um método é ou não específico, sendo que poucos o são³⁶.

Hübner et al³⁷ apresentam uma abordagem diferente, tratando especificidade como a capacidade de um método detectar uma substância ou uma classe de substâncias, sem interferência de outros componentes presentes na amostra e seletividade como a capacidade de um método detectar componentes diferentes, em paralelo, sem interferência recíproca.

Considerando-se que os métodos para detecção de OGM em alimentos determinam: i) partes ou junções de um determinado evento, as quais também podem estar presentes em eventos distintos daquele sob investigação; ou ii) um evento

específico, o qual pode ser estaqueado (*gene stacked*), optou-se por seguir a recomendação da IUPAC no presente trabalho.

Para métodos quantitativos (Tabela 1), em todas as referências são tratados os parâmetros clássicos de um processo de validação, que correspondem a faixa de trabalho, limite de detecção e quantificação, linearidade, precisão sob condições de repetitividade e reprodutibilidade, robustez, seletividade e veracidade (*trueness*).

Os parâmetros não considerados no documento do ENGL¹⁰ são adequação ao uso, incerteza de medição, recuperação, sensibilidade e variação de matriz. No guia do CODEX ALIMENTARIUS¹¹ não são abordados adequação ao uso, extração e purificação do DNA, incerteza de medição, recuperação e variação de matriz.

A adequação para uso é a propriedade dos dados produzidos por um processo de medição habilitar seus usuários a tomarem decisões tecnicamente corretas para o propósito estabelecido, o que envolve resultados da validação, da estimativa da incerteza, entre outros requisitos²⁵. Thompson et al⁹ incluem a incerteza de medição e adequação ao uso como parâmetros de desempenho quantitativos.

A estimativa da incerteza é um indicador chave tanto da adequação para uso de um método quanto da confiabilidade dos resultados analíticos obtidos em um laboratório. Este parâmetro cobre todas as fontes de erros do processo analítico, além daquelas obtidas nos processos de validação de métodos. Na prática, embora os dados provenientes de validações intralaboratoriais de métodos e de estudos colaborativos constituam a base da estimativa da incerteza, estes dados representam somente uma parte desta, sugerindo que a estimativa da incerteza seja considerada como mais do que simplesmente um parâmetro de desempenho de validação de métodos²⁵.

Assim, apesar da relação estrita dos processos de validação de métodos com a estimativa da incerteza de medição, visto que dados obtidos em estudos de validação intra ou interlaboratoriais podem ser utilizados para composição da incerteza,

em uma abordagem “*top-down*”, a estimativa da incerteza é, muitas vezes, tratada em documentos orientativos específicos. No *Guidance document on measurement uncertainty for GMO testing laboratories* do JRC são estabelecidas formas de estimar a incerteza da medição para métodos quantitativos de análises de OGM por PCR em Tempo Real. No referido documento é citado ainda que, apesar do reconhecimento da importância da estimativa da incerteza de medição em análises qualitativas, os trabalhos sobre esta questão ainda estão em fase de desenvolvimento³⁸.

Muitas vezes, a recuperação também não é abordada como parâmetro de desempenho em processos de validação, mas sim como uma ferramenta para avaliação dos parâmetros veracidade e precisão^{9,27}.

A sensibilidade não é tratada como parâmetro fundamental da validação por algumas referências, por ser um parâmetro arbitrário que depende de ajustes no instrumento de medição⁹.

Thompson et al⁹ incluem o estudo da variação de matriz como parte do processo de validação, porém não existe consenso sobre a inclusão deste parâmetro na validação de métodos. A incerteza gerada pela variação de matriz deve ser quantificada separadamente, pois ela não é levada em consideração em outra etapa do processo de validação. Se não houver conhecimento detalhado de todos os componentes da matriz, haverá uma incerteza extra nos resultados devido ao efeito de matriz variável.

O parâmetro extração e purificação do DNA descrito no documento do ENGL¹⁰ considera que o DNA extraído deve ser de qualidade adequada e que esta depende da concentração, integridade estrutural e pureza do DNA extraído. Este parâmetro não é considerado no protocolo de validação quantitativa do CODEX¹¹.

A praticabilidade, abordada nos documentos específicos para análise de OGM^{10,11}, considera a quantidade de amostras que podem ser processadas dentro de um determinado tempo, os custos fixos para implementar o método e o custo aproximado

por amostra, dificuldades de ordem prática sobre o uso diário ou em condições especiais, bem como outros fatores que podem ser de grande importância para os operadores.

Desta forma, os parâmetros quantitativos tratados nos documentos orientativos específicos para validação de métodos para detecção de OGM por PCR cumprem com os parâmetros considerados fundamentais para tais processos de validação.

Para métodos qualitativos, nos documentos do INMETRO²⁷ e EURACHEM²⁸ são considerados os parâmetros seletividade e limite de detecção. Estudos de robustez são tratados no documento do INMETRO²⁷, mas não no guia EURACHEM²⁸. Nesse guia são mencionados estudos das taxas de falsos resultados para validação de métodos qualitativos²⁸.

No guia harmonizado pela AOAC/ISO/IUPAC⁹ não é feita distinção entre métodos qualitativos e quantitativos ao apresentar os parâmetros de desempenho da validação. Contudo, a seletividade é tratada como um parâmetro essencialmente qualitativo e a aplicação dos parâmetros limite de detecção e robustez estão implícitos nas definições apresentadas.

Para validação de métodos qualitativos (Tabela 2), no guia do CODEX¹¹ são tratados os parâmetros limite de detecção, taxa de falso-positivos, taxa de falso-negativos e robustez. No entanto, as atuais abordagens metrológicas para a validação de métodos qualitativos sinalizam para uma análise mais aprofundada na validação desses ensaios, visando à verificação da qualidade e confiabilidade das respostas binárias obtidas. Assim, além dos parâmetros previstos no guia, a literatura trata a necessidade de avaliação de outros parâmetros como: confiabilidade – relacionada à exatidão, taxa de sensibilidade (sensibilidade), taxa de seletividade (seletividade), região de perda de confiabilidade – associada à incerteza, acordância e concordância – correspondentes à precisão, representatividade e rastreabilidade³⁰⁻³⁴.

O estudo da confiabilidade, taxas de falsos

resultados e representatividade é importante, pois estes são atributos relacionados à qualidade dos resultados analíticos e estão também relacionados com a rastreabilidade e região de perda de confiabilidade. Já sensibilidade, seletividade, precisão e robustez são associadas ao processo analítico e considerados parâmetros base para os anteriores³¹.

Especificamente para a PCR Multiplex, o estudo de efeitos competitivos é citado como um parâmetro necessário, embora na maioria das vezes omitido nos estudos de validação³⁹.

Vale destacar que parâmetros como falsos resultados e limite de detecção são tratados de forma particular pelo JRC no caso de análise de eventos não autorizados¹⁷.

Portanto, em relação aos métodos qualitativos, mais do que para os quantitativos, existe a necessidade de adequação do guia específico para validação de métodos para detecção de OGM em alimentos, publicado pelo CODEX ALIMENTARIUS¹¹, no sentido de inclusão de estudos de parâmetros específicos e fundamentais para uma avaliação segura da adequação ao uso de provas binárias. No caso do documento do ENGL¹⁰ é necessária a inclusão de todas as figuras de mérito para validação de métodos qualitativos, visto que não são apresentadas abordagens de validação para este tipo de método.

Validações de métodos para o evento RR[®] em soja e produtos de soja

Em 2011, o JRC publicou um compêndio de métodos de referência qualitativos e quantitativos validados para análise de OGM⁸. Nesta publicação foram definidos os principais parâmetros de desempenho de validação, tendo como referências os documentos do ENGL¹⁰ e do CODEX ALIMENTARIUS¹¹, além do documento da IUPAC²⁶ para validações interlaboratoriais. Na Tabela 3 estão relacionadas publicações sobre validação de métodos quantitativos e qualitativos para a determinação de soja RR[®] em soja e produtos de soja, incluindo aquelas relacionadas no

Tabela 3. Estudos de validação de métodos quantitativos e qualitativos para detecção de soja *Roundup Ready*[®] em soja e produtos de soja por reação em cadeia da polimerase

Matriz	Sequência alvo	Tipo de validação	Tipo de método	Técnica analítica	Parâmetros de desempenho avaliados	Uso de MRC	Referência
Derivados de soja	Promotor <i>CaMV</i> 35S, gene CTP e gene <i>CP4EPSPS</i> /gene da lectina	Intralaboratorial	Qualitativo	PCR convencional e Nested PCR	Especificidade, limite de detecção e sensibilidade	NÃO	40
Grãos de soja	Promotor <i>CaMV</i> 35S e terminador <i>T-NOS</i> /gene da lectina	Interlaboratorial	Qualitativo	PCR convencional	Especificidade, limite de detecção, sensibilidade e taxas de falsos resultados	SIM (IRMM)	41
Misturas e alimentos processados contendo ingredientes derivados de soja (soja acidificada, fórmula infantil e biscoito)	Junção 3'do evento específico RR [®] (<i>T-NOS</i>)/gene da lectina	Intralaboratorial	Quantitativo	PCR em Tempo Real (TaqMan [®])	Eficiência, especificidade, limite de detecção, limite de quantificação, linearidade, precisão (repetitividade), sensibilidade e veracidade	SIM (IRMM)	42
Misturas e alimentos processados contendo ingredientes derivados de soja (soja acidificada, fórmula infantil e biscoito)	Promotor <i>CaMV</i> 35S e terminador <i>T-NOS</i>	Interlaboratorial	Qualitativo	PCR convencional	Taxas de falso-resultado e sensibilidade	NÃO	43
Farinha de soja e alimentos disponíveis no comércio	Gene de construção específica RR [®] e promotor <i>CaMV</i> 35S/gene da lectina	Interlaboratorial	Quantitativo	PCR competitiva e PCR em Tempo Real (TaqMan [®] e FRET)	Eficiência, especificidade, faixa de quantificação (trabalho), limite de detecção, limite de quantificação, linearidade, precisão (repetitividade e reprodutibilidade), robustez, seletividade ¹ , sensibilidade e veracidade	SIM (IRMM)	37
Soja, misturas de soja, trigo e preparado para biscoito com soja RR [®] e produtos processados derivados de soja adquiridos do comércio (tofu, óleo de soja, bebidas de soja, croquete de camarão, pão, biscoito com chocolate e ração para bovino)	Promotor <i>CaMV</i> 35S e terminador <i>T-NOS</i> /gene da lectina	Intralaboratorial	Qualitativo	PCR convencional	Limite de detecção e sensibilidade	SIM (IRMM)	44
	Promotor <i>CaMV</i> 35S/gene da lectina		Quantitativo	PCR em Tempo Real (Light Cycler)	Linearidade e sensibilidade		

Cont. Tabela 3

Sementes de soja RR®	Gene de construção específica RR®, promotor <i>CaMV</i> 35S e terminador <i>T-NOS</i>	Interlaboratorial	Quantitativo	PCR em Tempo Real	Limite de detecção, limite de quantificação, precisão (repetitividade e reprodutibilidade), veracidade	SIM (NFRI).	45
Biscoitos e bolos de ameixa com soja 0 e 100 % RR®	Sequência da construção sintética <i>CP4EPSPS</i> /gene da lectina	Intralaboratorial	Quantitativo	PCR em Tempo Real Multiplex (TaqMan®)	Aplicabilidade, eficiência, limite de detecção, limite de quantificação, linearidade, precisão (repetitividade e reprodutibilidade intralaboratorial) e sensibilidade	SIM (IRMM)	46
Sementes de soja RR® e não GM	Fragmento de 84 pb da região recombinante inserida no genoma da planta/gene da lectina	Interlaboratorial	Quantitativo	PCR em Tempo Real (TaqMan®)	Eficiência, linearidade, precisão (repetitividade e reprodutibilidade), sensibilidade e veracidade	NÃO	47
Soja RR® e não GM	Promotor <i>CaMV</i> 35S e gene <i>CP4EPSPS</i> /gene da lectina	Interlaboratorial	Qualitativo	PCR em Tempo Real Multiplex acoplado a microensaio de hibridização direta dos amplicons (DualChip® GMO)	Especificidade, limite de detecção, representatividade, robustez, sensibilidade, taxas de falso-resultado	SIM (IRMM)	48
Soja em pó, grãos de soja e salsicha	Promotor <i>CaMV</i> 35S, gene <i>CP4EPSPS</i> e terminador <i>T-NOS</i> /gene da lectina	Intralaboratorial	Qualitativo	PCR convencional	Limite de detecção e sensibilidade	SIM (Fluka)	14
			Quantitativo	PCR em Tempo Real (TaqMan® GMO Soy 35S Detection Kit)	Limite de quantificação, linearidade, precisão (repetitividade), sensibilidade e veracidade		
Soja e farelo de soja	Promotor <i>CaMV</i> 35S, terminador <i>T-NOS</i> e gene de construção específica RR®/gene da lectina	Intralaboratorial	Qualitativo	PCR convencional	Aplicabilidade, especificidade, limite de detecção, robustez, seletividade ¹ e sensibilidade	SIM	49
Sementes e grãos de soja RR® e não GM	Fragmento de 84 pb da região recombinante inserida no genoma da planta/gene da lectina	Interlaboratorial	Quantitativo	PCR em Tempo Real (TaqMan®)	Especificidade, limite de detecção, limite de quantificação, linearidade, precisão (repetitividade e reprodutibilidade), sensibilidade e veracidade	NÃO	50

Continua

Cont. Tabela 3

Alimentos, rações, sementes e DNA	Promotor <i>CaMV</i> 35S e terminador <i>T-NOS</i>	Intralaboratorial	Qualitativo	PCR em Tempo Real Hexaplex (TaqMan [®])	Efeitos competitivos ^{II} , especificidade, estabilidade, limite de detecção, confiabilidade, robustez e sensibilidade	SIM (IRMM)	39
Soja em pó, ração adquirida no comércio e biscoito preparado com farinha de soja 100 % RR [®] e não GM	Fragmento de 84 pb da região recombinante inserida no genoma da planta /gene da lectina	Intralaboratorial	Quantitativo	PCR em Tempo Real (Pico Green [®])	Eficiência, linearidade, precisão (repetitividade), sensibilidade e veracidade	SIM (IRMM ERM BF410d)	51
Soja em pó, soja, bebida de soja, leite de soja em pó, fórmulas infantis, proteína texturizada de soja, farinha de soja, farelo de soja, fibra de soja, sopa desidratada, produtos cárneos, comida vegetariana, massas, cookies e ração	Promotor <i>CaMV</i> 35S/gene da lectina	Intralaboratorial	Quantitativo	PCR em Tempo Real Duplex (TaqMan [®])	Eficiência, limite de detecção, limite de quantificação, linearidade, precisão (repetitividade e reprodutibilidade), sensibilidade e veracidade	SIM (IRMM 410S)	24
Tecidos de folha de soja RR [®]	Plasmídeo pJANUS [™] -02-001 (formado pela junção de uma parte específica do evento RR [®] e uma parte da construção específica da gene da lectina)	Interlaboratorial	Quantitativo	PCR em Tempo Real	Eficiência, faixa dinâmica (faixa de trabalho), linearidade, limite de detecção, praticabilidade, precisão (repetitividade e reprodutibilidade), veracidade	NÃO	52
Farinha de soja e biscoitos preparado com farinha de soja RR [®] e não GM	Junção entre <i>CP4EPSPS</i> e <i>T-NOS</i> /gene da lectina	Intralaboratorial	Quantitativo	PCR em Tempo Real Duplex (TaqMan [®] MGB-NFQ)	Eficiência, especificidade, limite de detecção, limite de quantificação, linearidade, precisão (repetitividade), sensibilidade e veracidade	SIM (IRMM)	53
Soja	Gene de construção específica RR [®] , promotor <i>CaMV</i> 35S e terminador <i>T-NOS</i> /gene da lectina	Intralaboratorial	Quantitativo	PCR em Tempo Real (Qiagen [®] Plant Mini Kit)	Eficiência, limite de detecção, linearidade, precisão (repetitividade e reprodutibilidade intralaboratorial), sensibilidade e veracidade	SIM (IRMM and GeMMA Proficiency test material)	54
Farinha de soja	Junção entre CTP e <i>CP4EPSPS</i> / gene da lectina	Interlaboratorial	Quantitativo	PCR em Tempo Real (TaqMan [®])	Exatidão e precisão (repetitividade e reprodutibilidade)	NÃO	8
Farinha de soja	Junção entre CTP e <i>CP4EPSPS</i> / gene da lectina	Interlaboratorial	Quantitativo	PCR em Tempo Real Duplex (TaqMan [®])	Especificidade e precisão (repetitividade e reprodutibilidade)	SIM (IRMM 410)	8

Continua

Cont. Tabela 3

Farinha de soja	Junção entre <i>CaMV 35S</i> e <i>CTP</i> /gene da lectina	Interlaboratorial	Quantitativo	PCR em Tempo Real (TaqMan [®])	Precisão (repetitividade e reprodutibilidade)	SIM (IRMM 410)	8
DNA	Integração da região da borda 5' entre o inserto do evento RR [®] e o gene da soja/gene da lectina	Interlaboratorial	Quantitativo	PCR em Tempo Real (TaqMan [®])	Eficiência, linearidade, precisão (repetitividade e reprodutibilidade), sensibilidade e veracidade	NÃO	8
Biscoito de soja	Promotor <i>CaMV 35S</i>	Interlaboratorial	Qualitativo	PCR convencional	Especificidade, sensibilidade e taxas de falso-resultados	NÃO	8
Grãos de soja	Promotor <i>CaMV 35S</i> /gene da lectina	Interlaboratorial	Qualitativo	PCR convencional	Especificidade, sensibilidade e taxas de falso-resultados	SIM (IRMM 410)	8
Soja	Terminador <i>T-NOS</i> /gene da lectina	Interlaboratorial	Qualitativo	PCR convencional	Especificidade, sensibilidade e taxas de falso- resultados	SIM (IRMM 410)	8
Biscoitos de soja e milho	Terminador <i>T-NOS</i>	Interlaboratorial	Qualitativo	PCR convencional	Especificidade, sensibilidade e taxas de falso-resultados	NÃO	8
Soja	Junção entre <i>CaMV 35S</i> e <i>CTP</i> /gene da lectina	Interlaboratorial	Qualitativo	PCR convencional	Especificidade, sensibilidade e taxas de falso-resultados	SIM (IRMM 410)	8
Farinha de soja	Junção entre <i>CaMV 35S</i> e <i>CTP</i> /gene da lectina	Interlaboratorial	Qualitativo	PCR convencional	Especificidade, sensibilidade e taxas de falso-resultados	SIM (Fluka)	8
Sementes de soja	Gene de construção específica RR [®] /gene da lectina	Interlaboratorial	Qualitativo	PCR convencional	Acordância, concordância, especificidade, limite de detecção, sensibilidade, taxas de falso-resultados	NÃO	55
Farinha de soja	Promotor <i>CaMV 35S</i> , terminador <i>T-NOS</i> e gene <i>CP4 EPSPS</i> /gene da lectina	Intralaboratorial	Qualitativo	PCR em Tempo Real	Especificidade, extração e purificação do DNA, limite de detecção e sensibilidade	NÃO	56
Sementes de soja	Gene de construção específica RR [®] , gene da lectina e promotor <i>CaMV 35S</i>	Interlaboratorial	Quantitativo	PCR em Tempo Real (TaqMan [®])	Limite de detecção, precisão (repetitividade e reprodutibilidade) e veracidade	NÃO	57

Todos os parâmetros de desempenho para os quais tenham sido apresentados materiais e métodos e resultados foram relacionados nesta tabela, independentemente da declaração do estudo do parâmetro pelos autores.

CaMV-35S: promotor 35S do vírus do mosaico da couve-flor; *CP4EPSPS*: CP4 5-enol-piruvato-chiquimato-3-fosfato sintase; *CTP*: peptídeo de trânsito para o cloroplasto; DNA: ácido desoxirribonucléico; FRET: *fluorescence resonance energy transfer*; GM: geneticamente modificado; IRMM: *Institute for Reference Materials and Measurements*; MGB-NFQ: *minor groove binder-non-fluorescent quencher*; MRC: material de referência certificado; NFRI: *National Food Research Institute*; PCR: reação em cadeia da polimerase; RR[®]: *Roundup Ready*[®]; *T-NOS*: terminador do gene nopalina sintetase do *Agrobacterium tumefaciens*.

I Parâmetros seletividade e especificidade tratados separadamente.

II Parâmetro não previsto nos guias específicos, mas tratado na literatura como fundamental para validações de métodos por PCR Multiplex.

compêndio do JRC.

Em relação aos métodos quantitativos, os parâmetros precisão sob condições de repetitividade, veracidade, linearidade, reprodutibilidade e sensibilidade e foram os mais investigados, presentes em 94, 78, 72, 72 e 67 % das publicações, respectivamente. Apesar de fundamentais, os parâmetros eficiência, limite de detecção e quantificação e seletividade estavam presentes em 56, 56, 44 e 28 % dos estudos, respectivamente.

Faixa de trabalho (11 %), aplicabilidade, robustez e praticabilidade (6 %) foram os parâmetros de desempenho menos frequentes nos estudos de validação de métodos para determinação de soja RR[®] em alimentos por PCR. Os parâmetros não avaliados em nenhuma das publicações consideradas neste levantamento foram: adequação ao uso, extração e purificação do DNA, incerteza, recuperação e variação de matriz.

Como discutido anteriormente, os parâmetros evidenciados como menos frequentes não estão previstos nos documentos específicos do ENGL¹⁰ e CODEX ALIMENTARIUS¹¹ e muitos destes são tratados na literatura como complementares à validação e não como parte de tais processos. Provavelmente, seja este o motivo de não terem sido contemplados nos estudos relacionados.

Considerando as validações intralaboratoriais os parâmetros mais estudados foram sensibilidade, linearidade, repetitividade, exatidão e eficiência (100, 100, 88, 75 e 75 %, respectivamente). Os limites de quantificação e de detecção foram estudados em 63 % das publicações, enquanto reprodutibilidade, seletividade e aplicabilidade foram os menos estudados (38, 25 e 13 %, respectivamente).

Em relação aos estudos interlaboratoriais os parâmetros mais frequentes foram repetitividade e reprodutibilidade (100 % de frequência nas publicações), característicos deste tipo de validação. Exatidão, linearidade, limite de detecção, sensibilidade e eficiência também foram estudadas em 80, 50, 50, 40 e 40 % das publicações. Os parâmetros menos estudados foram seletividade, limite de quantificação (30 %), faixa de trabalho (20 %), robustez e praticabilidade (10 %).

Para métodos qualitativos, os parâmetros mais frequentemente avaliados foram taxa de sensibilidade e de seletividade, que foram considerados, respectivamente, em 100 e 81 % dos trabalhos elencados neste levantamento. As taxas de falsos resultados, rastreabilidade e limite de detecção foram investigados, respectivamente, em 63, 56

e 56 % das publicações sobre validação de métodos para detecção de soja RR[®] em produtos de soja por PCR. Os parâmetros menos frequentes foram robustez (19 %), confiabilidade (6 %) e acordância e concordância (6 %) e representatividade (6 %). Cumpre considerar que foram considerados representativos os trabalhos que atenderam as recomendações relativas à validação de métodos qualitativos, as quais indicam 30 replicatas por nível como um mínimo necessário²⁶. Além disso, o parâmetro que representa a incerteza de medição em métodos qualitativos, região de perda de confiabilidade, não foi estimado nos trabalhos relacionados.

Considerando as validações intralaboratoriais os parâmetros mais estudados foram taxa de sensibilidade e limite de detecção (100 % dos estudos), seguidos de taxa de seletividade e rastreabilidade (67 e 50 %). Os menos estudados foram robustez, confiabilidade e taxas de falsos resultados (33, 17 e 0 %).

Dentre os trabalhos de validação interlaboratorial os parâmetros mais frequentes foram taxa de sensibilidade e taxa de falsos-resultados (100 %), seguida de taxa de seletividade (90 %) e rastreabilidade (60 %). Os parâmetros menos frequentes foram limite de detecção (30 %), acordância, concordância, robustez e representatividade (10 %).

Considerando-se os trabalhos publicados a partir de 2009, ou seja, posteriores à publicação do documento do ENGL¹⁰, observou-se que os parâmetros de desempenho recomendados neste guia não foram totalmente incorporados às práticas de validação da área. Para métodos quantitativos, parâmetros como eficiência, limite de quantificação, seletividade, faixa de trabalho, praticabilidade, extração/purificação do DNA, robustez e aplicabilidade foram abordados em menos de 50 % dos trabalhos. Para métodos qualitativos, os parâmetros limite de detecção e robustez foram reportados em apenas 33 e 11 % dos estudos.

CONCLUSÃO

A PCR é recomendada por órgãos internacionais de regulamentação, pesquisa, comércio e certificação para realização de análises de detecção e quantificação de OGM em matérias-primas e alimentos. Pela análise comparativa dos documentos orientativos para validação de métodos foi detectada a necessidade de inclusão de parâmetros críticos para uma adequada avaliação de desempenho de métodos qualitativos nos

documentos orientativos específicos como taxas de confiabilidade, de sensibilidade, de seletividade, região de perda de confiabilidade, acordância, concordância, representatividade e rastreabilidade. Considerando-se a revisão da literatura sobre o tema, observou-se que as orientações dos guias específicos da área de OGM não tem sido totalmente incorporadas às práticas de validação, sendo importante o incentivo à implementação de processos adequados de validação para análises de OGM em alimentos.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

REFERÊNCIAS

1. United States Department of Agriculture - USDA. Production, supply and distribution Online [acesso 2014 Jan 07]. Disponível em: [http://www.fas.usda.gov].
2. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou saúde. Alegações de propriedade funcional aprovadas. [acesso 2011 Ago 31]. Disponível em: [http://portal.anvisa.gov.br/].
3. James C. Preview: global status of commercialized biotech/GM crops - 2011. ISAAA Briefs No. 42. Ithaca, NY: ISAAA, 2011.
4. Brasil. CTNBio. Aprovações comerciais. [acesso 2014 Jan 07] Disponível em: [http://www.ctnbio.gov.br].
5. Brasil. Decreto número 4.680, de 24 de abril de 2003. Regulamenta o direito à informação, assegurado pela Lei no 8.078, de 11 de setembro de 1990, quanto aos alimentos e ingredientes alimentares destinados ao consumo humano ou animal que contenham ou sejam produzidos a partir de organismos geneticamente modificados, sem prejuízo do cumprimento das demais normas aplicáveis. Diário Oficial [da] União, Brasília, DF, 24 abr. 2003.
6. Thomson J. Genetically modified food crops for improving agricultural practice and their effects on human health. *Trends Food Sci Tech*.2003;14:210-28.
7. Ahmed FE. Detection of genetically modified organisms in foods. *Trends Biotechnol*.2002;20(5):215-23.
8. Joint Research Center - JRC. Compendium of reference methods for GMO analysis. Reference reports. 2011 [acesso 2011 Set 27]. Disponível em: [http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/gmomethods/pcr/GMO-JRC_Reference%20Report_2011.pdf].
9. Thompson M, Ellison SLR, Wood R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. *Pure Appl Chem*.2002;74(5):835-55.
10. European Network of GMO Laboratories - ENGL. Definition of minimum performance requirements for analytical methods of GMO testing. Version 13-10-2008. [acesso 2013 Ago 30]. Disponível em: [http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/doc/Min_Perf_Requirements_Analytical_methods.pdf].
11. CODEX ALIMENTARIUS. ALINORM 10/33/23. Joint FAO/WHO Food Standards Programme Codex Alimentarius Commission. Thirty-third Session, Geneva, 5-9 July 2010. Report of the thirty-first session of the Codex Committee on methods of analysis and sampling. Budapeste. 2010.
12. Petit L, Baraige F, Balois AM, Bertheau Y, Fachel P. Screening of genetically modified organisms and specific detection of Bt176 maize in flours and starches by PCR-enzyme linked immunosorbent assay. *Eur Food Res Technol*.2003;217:83-9.
13. Greiner R. Methods for identification and quantification of genetically modified material in agricultural crops, processed food and animal feed in relation to regulatory requirements. *JBL*.2004;1(2):81-5.
14. Marcelino FC, Guimarães MFM, De-Barros EG. Detection and quantification of Roundup Ready[®] soybean residues in sausage samples by conventional and real-time PCR. *Ciênc Tecnol Aliment*.2008;28:38-45.
15. Holst-Jensen A, Rønning SB, Lövseth A, Berdal KG. PCR technology for screening and quantification of genetically modified organisms (GMOs). *Anal Bioanal Chem*.2003;375(8):985-93.
16. Waiblinger HU, Grohmann L, Mankertz J, Engelbert D, Pietsch K. A practical approach to screen for authorised and unauthorised genetically modified plants. *Anal Bioanal Chem*.2010;396:2065-72.
17. Joint Research Center - JRC. Overview on the detection, interpretation and reporting on the presence of unauthorised genetically modified materials. 2011 [acesso 2014 Jan 15]. Disponível em: [http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/doc/2011-12-12%20ENGL%20UGM%20WG%20Publication.pdf]
18. Holst-Jensen A, Bertheau Y, De Loose M, Grohmann L, Hamels S, Hougs L, et al. Detecting un-authorized genetically modified organisms (GMOs) and derived materials. *Biotechnol Adv*.2012;30:1318-35.
19. Block A, Debode F, Grohmann L, Hulin J, Taverniers I, Kluga L, et al. The GMOseek matrix: a decision support tool for optimizing the detection of genetically modified plants. *BMC Bioinformatics*.2013;14:256.
20. Wahler D, Schauer L, Bendiek J, Grohmann L. Next-Generation Sequencing as a Tool for Detailed Molecular Characterisation of Genomic Insertions and Flanking Regions in Genetically Modified Plants: a Pilot Study Using a Rice Event Unauthorised in the EU. *Food Anal Method*.2013;6(6):1718-27.
21. Oliveira TMS. PCR em tempo real: métodos e aplicações [dissertação de mestrado]. Aveiro:Universidade de Aveiro; 2010.
22. Stratagene. Introduction to Quantitative PCR: Methods and Application Guide. 2007. [acesso 2014 Jan 13]. Disponível em: [http://qcbs.ca/wiki/_media/stratagene_introduction_to_quantitative_pcr_methods_and_application_guide.pdf]
23. Conceição FR, Moreira AN, Binsfeld PC. Detecção e quantificação de organismos geneticamente modificados em alimentos e ingredientes alimentares. *Ciênc Rural*.2006;36(1):315-24.
24. Branquinho MR, Ferreira RTB, Cardarelli-Leite P. Survey of compliance with labeling legislation in food containing GMOs in Brazil. *J Food Compos Anal*.2010;23(3):220-5.
25. Souza SVC. Procedimento para validação intralaboratorial de métodos de ensaio: delineamento e aplicabilidade em análises de alimentos [tese de doutorado]. Belo Horizonte (MG): Universidade Federal de Minas Gerais; 2007.

26. Horwitz W. Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies. *Pure Appl Chem*.1995;67:331-43.
27. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial - INMETRO. DOQ-CGCRE-008. Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos. Rio de Janeiro: INMETRO; 2010. 35p.
28. EURACHEM. The fitness for purpose of analytical methods: a laboratory guide to method validation and related topics. Teddington: LGC; 1998. 61 p.
29. International Union of Pure and Applied Chemistry - IUPAC. Establishment of guidelines for the validation of qualitative and semi-quantitative (screening) methods by collaborative trial: a harmonized protocol [acesso 2013 Jun 06]. Disponível em: [http://www.iupac.org/web/ins/2005-024-2-600].
30. Trullols E, Ruisánchez I, Rius FX. Validation of qualitative analytical methods. *Trend Anal Chem*.2004;23(2):137-45.
31. Cárdenas S, Valcárcel M. Analytical features in qualitative analysis. *Trend Anal Chem*.2005;24(6):477-87.
32. Ellison SLR, Fearn T. Characterising the performance of qualitative analytical methods: Statistics and terminology. *Trend Anal Chem*.2005;24(6):468-76.
33. Gondim CS, Junqueira RG, Souza SVC. Tendências em validação de métodos de ensaios qualitativos. *Rev Inst Adolfo Lutz*.2011;70(4):433-47.
34. Gondim, CS. Validação de métodos qualitativos: delineamento de procedimento e aplicação na pesquisa de resíduos de sulfonamidas em leite cru [dissertação de mestrado]. Belo Horizonte (MG): Universidade Federal de Minas Gerais; 2012.
35. Žel J, Mazzara M, Savini C, Cordeil S, Camloh M, Štebih D, et al. Method validation and quality management in the flexible scope of accreditation: an example of laboratories testing for genetically modified organisms. *Food Anal Method*.2008;1;61-72.
36. Vessman J, Stefan RI, van Staden JF, Danzer K, Lindner W, Burns DT, et al. Selectivity in analytical chemistry. *Pure Appl Chem*.2001;73(8):1381-6.
37. Hübner P, Waiblinger HU, Pietsch K, Brodmann P. Validation of PCR methods for quantitation of genetically modified plants in food. *J AOAC Int*.2001;84(6):1855-64.
38. Trapmann S, Burns M, Broll H, MacArthur R, Wood R, Zel J. Guidance document on measurement uncertainty for GMO testing laboratories. European Commission. Report: EUR 22756 EN/2 – 2009.
39. Bahrdt C, Krech AB, Wurz A, Wulff D. Validation of a newly developed hexaplex real-time PCR assay for screening for presence of GMOs in food, feed and seed. *Anal Bioanal Chem*.2010;396(6):2103-12
40. Meyer R, Jaccoud E. Detection of genetically modified in processed food production: development and validation of a PCR assay for the specific detection of glyphosate tolerant soybeans. In: Ninth European Conference on Food Chemistry, Proceedings... Interlaken, Switzerland. 1997;1:23-28.
41. Lipp M, Brodmann P, Pietsch K, Pauwels J, Anklam E, Borchers T, et al. IUPAC collaborative trial study of a method to detect genetically modified soy beans and maize in dried powder. *J AOAC Int*.1999;82(4):923-8.
42. Berdal KG, Holst-Jensen A. Roundup Ready soybean event-specific real-time quantitative PCR assay and estimation of the practical detection and quantification limits in GMO analyses. *Eur Food Res Technol*.2001;213(6):432-8.
43. Lipp M, Bluth A, Eyquem F, Kruse L, Schimmel H, Van den Eede G, et al. Validation of a method based on polymerase chain reaction for the detection of genetically modified organisms in various processed foodstuffs. *Eur Food Res Technol*.2001;212(4):497-504.
44. Taverniers I, Windels P, Bockstaele EV, De Loose M. Use of cloned DNA fragments for event-specific quantification of genetically modified organisms in pure and mixed food products. *Eur Food Res Technol*.2001;213(6):417-24.
45. Shindo Y, Kuribara H, Matsuoka T, Futo S, Sawada C, Shono J, et al. Validation of Real-Time PCR Analyses for Line-Specific Quantitation of Genetically Modified Maize and Soybean Using New Reference Molecules. *J AOAC Int*.2002;85(5):1119-26.
46. Foti N, Onori R, Donnarumma E, Santis B, Miraglia M. Real-time PCR multiplex method for the quantification of Roundup Ready soybean in raw material and processed food. *Eur Food Res Technol*.2006;222:209-16.
47. Joint Research Center - JRC. Event specific method for the quantification of soybean line 40-3-2 using real-time PCR. Validation report. 2007 [acesso 2013 Set 27]. Disponível em: [http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/summaries/40-3-2_val_report.pdf].
48. Leimanis S, Hamels S, Nazé F, Sneyers M, Mbella GM, Hochegger R. Validation of the performance of a GMO multiplex screening assay based on microarray detection. *Eur Food Res Technol*.2008;227:1621-32.
49. Sieradzki Z, Mazur M, Kwiatek K. Validation of procedures based on PCR reactions for detection and identification of genetically modified maize and soybean. *Bull Vet Inst Pulawy*.2008;52:611-4.
50. Joint Research Center - JRC. Report on the validation of a DNA extraction method for soybean seeds. 2009 [acesso 2013 Set 27]. Disponível em: [http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/summaries/356043-5_DNAExtr_report.pdf].
51. Bellocchi G, De Giacomo M, Foti N, Mazzara M, Palmaccio E, Savini C, et al. Testing the interaction between analytical modules: an example with Roundup Ready[®] soybean line GTS 40-3-2. *BMC Biotechnol*.2010;5;10-55.
52. Lievens A, Bellocchi G, De Bernardi D, Moens W, Savini C, Mazzara M, et al. Use of pJANUS[™]-02-001 as a calibrator plasmid for Roundup Ready soybean event GTS-40-3-2 detection: an interlaboratory trial assessment. *Anal Bioanal Chem*.2010;396(6):2165-73.
53. Samson MC, Gulli M, Marmiroli N. Quantitative detection method for Roundup Ready soybean in food using duplex real-time PCR MGB chemistry. *J Sci Food Agric*.2010;90(9):1437-44.
54. Scholtens IM, Kok EJ, Hougs L, Molenaar B, Thissen JT, Van der Voet H. Increased efficacy for in-house validation of real-time PCR GMO detection methods. *Anal Bioanal Chem*.2010;396(6):2213-27.
55. Kodama T, Kasahara M, Minegishi Y, Futo S, Sawada C, Watai M, et al. Qualitative PCR method for Roundup Ready soybean: interlaboratory study. *J AOAC Int*.2011;94(1):224-31.
56. Mano J, Harada M, Takabatake R, Furui S, Kitta K, Nakamura K, et al. Comprehensive GMO detection using real-time PCR array: single-laboratory validation. *J AOAC Int*.2012;95(2):508-16.
57. Takabatake R, Onishi M, Koiwa T, Futo S, Minegishi Y, Akiyama H, et al. Development and interlaboratory validation of quantitative polymerase chain reaction method for screening analysis of genetically modified soybeans. *Biol Pharm Bull*.2013;36(1):131-4.

Comparison of different statistical approaches used to evaluate the performance of participants in a proficiency testing program

Comparação de diferentes métodos estatísticos utilizados para avaliar o desempenho de participantes em um programa de ensaio de proficiência

RIALA6/1586

Camila Cardoso de OLIVEIRA*, Paulo TIGLEA, José Carlos OLIVIERI, Maria de Fátima Henriques CARVALHO, Márcia Liane BUZZO, Alice Momoyo SAKUMA, Maria Cristina DURAN, Miriam Solange Fernandes CARUSO, Daniel GRANATO

*Endereço para correspondência: Instituto Adolfo Lutz, Coordenadoria de Controle de Doenças, Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo. Av. Dr Arnaldo, nº 355, 01246-902, São Paulo, SP, Brazil. Tel: (+55) 11 3068-2821. E-mail: estatistica@ial.sp.gov.br

Recebido: 26.06.2013 - Aceito para publicação: 31.03.2014

ABSTRACT

Five statistical approaches were applied for assessing the performance of participants in 19 rounds (2007-2011) of the Proficiency Testing Program for lead in blood determination (PEP-Pbs), conducted by *Instituto Adolfo Lutz*. The performance evaluation was provided by using the z-score. The following statistical approaches were tested: 1 – mean and standard deviation, after rejecting outliers; 2 – median and normalized inter-quartile range; 3 – robust mean and robust standard deviation; 4 – robust mean and standard deviation for proficiency assessment of 3 µg/100 mL (for concentrations up to 40 µg/100 mL and a standard deviation for proficiency assessment of 7.5 % of the assigned value (for concentrations above 40 µg/100 mL); 5 – robust mean and standard deviation for proficiency assessment of 2 µg/100 mL (for concentration up to 40 µg/100 mL) or 5 % of the assigned value (for concentrations above 40 µg/100 mL). The approach 4 showed to be the most adequate statistical methodology to assess the performance of participating laboratories in the PEP-Pbs.

Keywords. proficiency testing program, inter-laboratory comparison programs, z-score, statistical techniques.

RESUMO

Cinco abordagens estatísticas foram aplicadas para avaliar o desempenho dos participantes em 19 rodadas (2007-2011) do Programa de Ensaio de Proficiência para determinação de chumbo em sangue (PEP-Pbs), organizado pelo Instituto Adolfo Lutz. A avaliação de desempenho foi realizada utilizando-se o índice-z, e as seguintes abordagens estatísticas foram testadas: 1 - média e desvio padrão, após a exclusão dos valores dispersos; 2 - mediana e intervalo interquartil normalizado; 3 - média robusta e desvio padrão robusto; 4 - média robusta e desvio padrão de proficiência de 3 µg/100 mL (para concentrações de até 40 µg/100 mL) e desvio padrão de proficiência de 7,5 % do valor designado (para concentrações superiores a 40 µg/100 mL); 5 - média robusta, desvio padrão de proficiência de 2 µg/100 mL (para concentrações de até 40 µg/100 mL) e desvio padrão de proficiência de 5 % do valor designado (para concentrações acima de 40 µg/100 mL). A abordagem 4 mostrou-se mais adequada para avaliar o desempenho dos laboratórios participantes do PEP-Pbs.

Palavras-chave. ensaio de proficiência, comparação interlaboratorial, índice-z, técnicas estatísticas.

INTRODUCTION

Proficiency testing programs are designed to evaluate the analytical performance of participating laboratories, making it possible to accomplish a critical evaluation of the validity of experimental assays carried out routinely and also to identify analytical problems and facilitate the implementation of necessary corrective actions^{1,2}. A Proficiency Testing Program provider (PT schemes) is responsible for conducting the statistical analysis and supply an indicator of the performance of all participants.

The participation of laboratories in proficiency testing activities is usually evaluated in the process of accreditation of assays by ISO/IEC 17025 or ISO 15189^{3,4}. In order to meet this metrological demand in Brazil, in 2004, *Instituto Adolfo Lutz* (IAL) was authorized as a provider of Proficiency Testing Program for Lead in Blood (PEP-Pbs) by the *Rede Brasileira de Laboratórios Analíticos em Saúde* (REBLAS) from *Gerência Geral de Laboratórios de Saúde Pública* (GGLAS) from the *Agência Nacional de Vigilância Sanitária* (ANVISA). In 2011, *Instituto Adolfo Lutz* was accredited by the *Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia* (INMETRO) as the first provider of proficiency testing program for lead in blood in Brazil, according to ISO/IEC17043⁵. Currently, the PEP-Pbs has financial support from the Instituto Adolfo Lutz and from the *Rede de Sangue e Hemoderivados* (REDSANG-SIBRATEC/FINEP), and therefore, the participating laboratories have no expenses by adhering to the PEP-Pbs. The frequency of the PEP-Pbs is quarterly and the participation is open to public and/or private laboratories.

In each round, three test items (sufficiently homogeneous and stable) are sent to laboratories. The test samples consist of bovine blood spiked with lead at concentrations ranging from 10 to 100 µg/100 mL. This concentration range covers the reference values established as clinically important for the evaluation of environmental and occupational human exposure.

The exposure of children to lead is evaluated based on the reference established by the Centers for Disease Control and Prevention (CDC), which associates adverse effects in children even at blood lead concentrations below 10 µg/100 mL⁶. The uncertainty associated with results in this concentration range should be carefully evaluated by clinical laboratories, because the analytical results are used to provide reliable

data that can direct individual treatment interventions appropriately. Likewise, the laboratory must provide adequate answers to occupational exposure issues in order to describe correctly the exposed individuals. It is, therefore, recommended that laboratories that conduct epidemiological and occupational studies look for information regarding tools that check for performance assessment of their measurements.

Regarding PT schemes, it is of paramount importance to assess the performance of each participating laboratory by using statistical methods. In this sense, the PEP-Pbs provider established a statistical criterion based on the following: the assigned value was obtained from the mean of participants results within the range of ± 2 standard deviations from the overall average and the criterion for acceptance was defined by $+6 \mu\text{g}/100 \text{ mL}$ of the assigned value for concentrations up to $40 \mu\text{g}/100 \text{ mL}$ or $\pm 15 \%$ of the assigned value when the lead concentration was higher than $40 \mu\text{g}/100 \text{ mL}$ ⁷. The data from each laboratory were considered satisfactory when the results were within this range, whereas the performance was considered unsatisfactory when data were outside the range. The tolerance range adopted by PEP-Pbs provider was the same employed by other programs, such as *Programa interlaboratorios de control de calidad* (PICC) – *plomo en sangre* from the *Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo* – Zaragoza (Spain), Korean analytical quality assurance program (KAQUA) from Industrial Health Research Institute in Korea and by the Blood Lead proficiency testing program from Occupational Safety & Health Administration (OSHA), USA⁸⁻¹⁰.

As well outlined by Kisets¹¹, a correct choice of proper performance indicator sometimes presents drawbacks, which come from the lack of international consensus and well-founded criteria of proving the choice of an optimal method, including the statistical procedures. Indeed, from a methodological standpoint, both statistical approach and its application are far from being perfect. Therefore, the assessment of different statistical methods is essential to evaluate the performance of laboratories in PT schemes. The need to promote the continuous improvement of laboratories implies that the statistical methods used to assess the performance of laboratories in proficiency testing program be improved in order to assure the quality of the analytical results. Certainly, it is important to PT scheme providers and participants to know if there would be any significant

difference in the evaluation results when different performance statistics methods are applied¹². Based on these considerations, this study compared the suitability of different statistical approaches for determining the assigned value and the standard deviation for proficiency assessment, considering three concentration ranges of lead in blood. This work also aimed to improve the statistical approach that has been currently used by this proficiency testing program.

MATERIAL AND METHODS

Samples

In PEP-Pbs, three samples with different concentration levels of lead in blood were sent to the laboratories in each round, in which an average of 20 laboratories participated. This study evaluated data from 19 rounds in the period between 2007 and 2011, totaling 57 samples with different lead concentrations (within the range of 10 to 100 µg/100 mL).

The participating laboratories could use the analytical technique of their choice to determine lead in blood. The used techniques were as follows: graphite furnace atomic absorption spectrometry (ETAAS), flame atomic absorption spectrometry (FAAS) or inductively coupled argon plasma mass spectrometry (ICP-MS). Each laboratory provided three results (replicates) for each sample. Different statistical approaches were assessed in relation to their suitability in three concentration ranges: I (10 - 30 µg/100 mL); II (30 - 50 µg/100 mL); III (50 - 100 µg/100 mL).

Data treatment

The result of each laboratory was converted to the z-score, according to Equation (1):

$$z = \frac{x_i - \bar{X}}{\hat{\sigma}} \quad (1)$$

Where \bar{X} is the mean of the values reported by the laboratory is the assigned value and the standard deviation for proficiency assessment¹³.

The criteria used to assess the performance of each laboratory were $|z| \leq 2$, satisfactory; $2 < |z| < 3$, questionable; $|z| \geq 3$, unsatisfactory.

The assigned value was obtained by consensus among participants of the round for each sample. Estimates of the assigned value and the standard deviation for proficiency assessment, considered in the z-score expression, were calculated using five statistical approaches, as described below:

Approach 1

The assigned value and standard deviation for proficiency assessment were obtained by the arithmetic mean and standard deviation of the means of results from laboratories, after rejecting outliers detected by Cochran and Grubbs tests^{14,15}.

Approach 2

The assigned value and the standard deviation for proficiency assessment were obtained by the median and by the normalized interquartile range (NIQR) from the results of each laboratory¹⁶. In the current work, NIQR was used to estimate the SD once this method is recommended by NATA and many PT providers in Brazil use this statistical criterion.

Approach 3

The assigned value and the standard deviation for proficiency assessment were obtained by the robust mean and robust standard deviation. The robust parameters were determined by using the Algorithm A^{13,17}.

Approach 4

The assigned value was obtained by the robust mean as calculated by the Algorithm A (approach 3). The standard deviation for proficiency assessment was assigned at 3 µg/100 mL for concentrations up to 40 µg/100 mL and also a value of 7.5 % of the robust mean for concentrations above 40 µg/100 mL was assessed. These tolerance ranges are currently employed by other international PT providers, such as OSHA¹⁰.

Approach 5

The assigned value was obtained by the robust mean as calculated by the Algorithm A (approach 3). The standard deviation for proficiency assessment was assigned at 2 µg/100 mL for concentrations up to 40 µg/100 mL or 5.0 % of the robust mean for concentrations above 40 µg/100 mL. These tolerance ranges are currently employed by the Clinical Laboratory Improvement Amendments (CLIA)¹⁸.

Comparison of the percentage of acceptable z-scores in the concentration ranges

The z-test for dependent samples was used in order to compare the percentage of acceptable z-scores for each approach for the three concentration ranges of lead in blood. A p-value above 0.05 showed that there were no significant statistical differences between percentages.

RESULTS AND DISCUSSION

The objective of this article was to discuss the use of five different statistical approaches to assess the performance of participating laboratories in PEP-Pbs, including a traditional approach with outlier detection (approach 1), another one based on the median and NIQR (approach 2), another approach based on the algorithm A - recommended by ISO 13528 (approach 3) - and finally, a practical approach that takes into account a fit-for-purpose criterion to establish a specified target value (approaches 4 and 5) for improvement of PEP-Pbs statistical analysis. It is worthy to state that the IUPAC encourages basing the scoring methods on fitness for purpose criterion¹⁹.

The methods took into account the different concentration ranges that the participating laboratories routinely analyze. The influence of different concentration levels on the performance of measurement methods to quantify lead in blood was also considered.

From the experimental results, about 50 % of data (29 mean data sets) did not present a normal distribution and, approximately, 70 % (45 mean data sets) presented outliers, according to Shapiro-Wilk and Cochran/Grubbs tests, respectively. Furthermore, all data sets presented unimodality and most part of them were roughly symmetric.

The statistical approach 1, which uses a classical statistics, provides the best estimate of the true value and the dispersion of the population for a data set only when the results are normally distributed with no outliers. Therefore, this approach was unsuitable to evaluate the performance of participating laboratories of PEP-Pbs, because even if outliers are removed, the data still may not follow a normal distribution. Furthermore, this procedure has the disadvantage that simple versions of the outlier tests may mislead if two or more outliers are present²⁰. Thus, the approaches 2, 3, 4 and 5, which used robust methods, were more

suitable to the data because they are not significantly influenced by the presence of outliers in the data sets and are unaffected by deflection of the normal distribution²¹. Even though the z-score calculated by the conventional method (mean and standard deviation) provides a valid indicator to assess the performance of laboratories in interlaboratory comparison programs, it is recommended that other statistical approaches be tested to determine the assigned values (measures of central tendency and dispersion)²².

In the current study, the statistical approach 2 was considered not adequate for PEP-Pbs because this method is more robust for asymmetric data, which is not the case of most part of the PEP-Pbs data²³. Furthermore, it presented z-score values slightly higher than the values calculated with approach 3. When the concentration of lead in blood was in the range of 10 to 30 µg/100 mL, the NIQR value was low. Indeed, the standard deviation (SD) obtained by NIQR was lower than the considered fitness for purpose, in other words, 28 % of the NIQR were lower than the SD adopted in the approach 4 and 11 % of the NIQR were lower than the SD adopted in the approach 5, resulting in a considerably number of laboratories with unsatisfactory performance that would require the laboratories to improve performance unnecessarily.

The statistical approach 3, recommended by ISO 13528, which uses the robust mean and the robust standard deviation calculated by Algorithm A, is more suitable to be applied when the distribution is approximately symmetrical. Based on this consideration, approach 3 presented no disadvantages such as approaches 1 and 2.

The median is substantially more variable than the mean when the data are not outlier contaminated²⁴. Thus, the robust mean calculated by the Algorithm A (approaches 4 and 5) was selected as an estimate to determine the assigned value for the PEP-Pbs. Srnková and Zbiral²⁵ compared the performance measured by the z-score of several laboratories in the determination of minerals in different materials in proficiency testing programs using three statistical techniques: i) mean and standard deviation, ii) robust mean and robust standard deviation; and iii) robust mean and standard deviation of Horwitz. The authors found that the procedure ii) was more suitable for the data matrix.

The statistical approach 4 was adequate to assess the performance of laboratories. This approach is based

on fitness for purpose criterion as recommended by IUPAC¹⁹, where a maximum reproducibility standard deviation internationally adopted was considered for SD for proficiency assessment.

In order to investigate whether SD of fitness for purpose could be reduced, were selected nine laboratories (expert) that presented at least 80 % of satisfactory z-scores in the last 10 rounds. The reproducibility SD of these expert laboratories results was calculated using the method proposed by ISO 5725¹⁴. In this sense, the mean reproducibility SD was found to be 2.74 $\mu\text{g}/100\text{ mL}$ for concentrations up to 40 $\mu\text{g}/100\text{ mL}$ and 3.88 $\mu\text{g}/100\text{ mL}$ (6.5 % of assigned value) for concentrations higher than 40 $\mu\text{g}/100\text{ mL}$. These results are slightly lower than the internationally employed, showing that the use of this reproducibility SD was suitable to be adopted by PEP-Pbs at all concentration levels. In other words, the internationally used criterion was deemed suitable to be applied in PEP-Pbs.

The approach 5, used by some PT providers such as CLIA, considers the SD as 2 $\mu\text{g}/100\text{ mL}$ for concentrations up to 40 $\mu\text{g}/100\text{ mL}$ and 5.0 % of the robust mean for concentrations above 40 $\mu\text{g}/100\text{ mL}$. In the current work, this approach was studied in order to observe data behavior since this criterion is more stringent. In fact, by using the statistical approach 5, higher values of z-scores were obtained for 88 % of the data sets as compared to those obtained by the other statistical approaches and, consequently, presented the highest proportion of unsatisfactory results in all concentration levels of lead in blood.

Figure 1 shows the percentages of laboratories that obtained a satisfactory performance in the PEP-Pbs and the percentages of satisfactory performance when different statistical approaches were used to evaluate the performance of the participating laboratories. It is possible to observe that the percentages of satisfactory performance as calculated by the statistical approaches 1 and 3, for the three concentration ranges, were similar ($p > 0.05$). The approach 2 presented similar percentages of satisfactory performance to approaches 1, 3 and 4, for the concentration ranges I and II. The percentages of satisfactory performance calculated by the approach 4 were similar to the ones obtained by the approach used in the PEP-Pbs, for all concentration ranges of lead in blood.

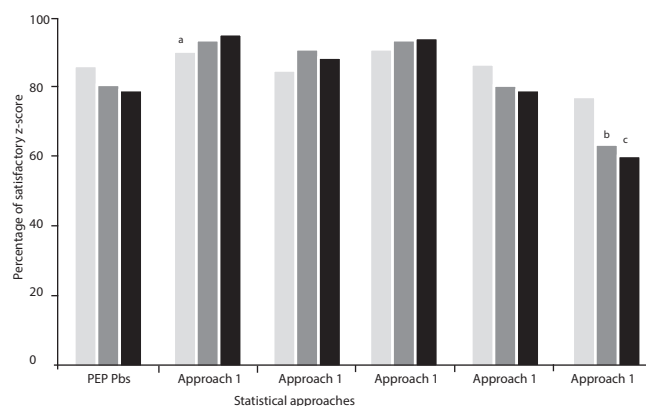


Figure 1. Percentages of acceptable z-scores in the concentration ranges of lead in blood, where Range I (light grey): 10-30 $\mu\text{g}/100\text{ mL}$; Range II (dark grey): 30-50 $\mu\text{g}/100\text{ mL}$ and Range III (black): 50-100 $\mu\text{g}/100\text{ mL}$. Different letters for the same concentration range represent statistically different percentages ($p < 0.05$)

By using the statistical approach 5, the lowest percentages of satisfactory performance were obtained in all concentration ranges of lead in blood. Therefore, this procedure is more restrictive since it uses the smallest standard deviation for proficiency assessment, resulting in only 78.6 %, 64.7 % and 61.3 % of satisfactory results in the concentration ranges 10-30 $\mu\text{g}/100\text{ mL}$, 30-50 $\mu\text{g}/100\text{ mL}$ and 50-80 $\mu\text{g}/100\text{ mL}$, respectively.

In summary, it is widely known that one statistical approach should be used considering the distribution of data, resistance to outliers and closeness to expected values.

CONCLUSION

Data analysis and statistical treatments showed that the approach 1, which used classical statistics, was not considered suitable to estimate the central tendency and the standard deviation for PEP-Pbs results due to the fact that data distribution did not follow a normal distribution even if outliers were removed. The approach 2, which used the median and the normalized interquartile range, was considered unsuitable because most part of the data was not asymmetric, resulting in inadequate z-scores especially for samples with low concentrations of lead in blood (10 to 30 $\mu\text{g}/100\text{ mL}$). The approach 3 showed no disadvantages in relation to approaches 1 and 2, but the approach 4 is more suitable for the PEP-Pbs as compared to approach 3, once it uses a prescribed standard deviation for proficiency assessment, presenting a more appropriate performance assessment with regards to the purpose of

the PT scheme. The approach 5 was more stringent than the others because it uses a lower standard deviation as compared to the deviations obtained by the other approaches for most part of the samples. If PT providers adopt the approach 5, one may induce an analytical quality improvement of participants test results. This is the goal when a proficiency test is organized, however, it may be not technically feasible for some of participating laboratories. Thus, the approach 4 was chosen to evaluate the analytical performance of laboratories that take part of the proficiency testing program for determination of lead in blood at concentrations ranging from 10 to 100 µg/100 mL from the 50th round onwards. Despite the performance evaluation of laboratories using the statistical method described by approach 4 be similar those obtained by PEP-Pbs, the statistical analysis was amended to use the z-score, widely disseminated and understood by participants which include questionable performance while the provider only assessed participants performance as satisfactory or unsatisfactory. Therefore, providers should conduct studies based on different approaches statistics in order to get an estimate more accurate of PT SD, and to assess the performance of laboratories since there is no international consensus on which methods more suitable to the experimental data.

Overall, it is suggested that PT providers use a score to evaluate laboratories performance in which the assigned value is obtained independently of the participants data and also consider the uncertainty of the experimental results.

REFERENCES

1. Svegl F, Strupi JS, Svegl IG. Proficiency testing of chloride content in different types of Portland cement. *Accred Qual Assur*.2006;11:414-21.
2. Senyuva HZ, Gilbert J. Assessment of the performance of pesticide-testing laboratories world-wide through proficiency testing. *Trends Anal Chem*.2006;25:554-62.
3. ISO/IEC 17025. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. 2005.
4. ISO 15189 - Medical laboratories - Requirements for quality and competence. 2012.
5. ISO/IEC 17043. Conformity assessment - General requirements for proficiency testing.2010.
6. Department of Health and Human Services (United States). Preventing lead poisoning in young children 2005. [access 2012 Jul]. Available in [http://www.cdc.gov/nceh/lead/publications/PrevLeadPoisoning.pdf].
7. Maio FD, Zenebon O, Tiglea P, Okura RIS, Sakuma AM. Evaluation of statistical criteria applicable to interlaboratory comparisons for lead in blood. *Rev Inst Adolfo Lutz*.2006;65:89-93.
8. Instituto Nacional de Seguridad e Higiene em el Trabajo (Espanha). Programa interlaboratorios de control de calidad (PICC) – plomo en sangre. [access 2012 Jul]. Available in [http://www.insht.es/portal/site/Insht].
9. Yang JS, Lee MY, Park IJ, Moon YH, Kang SK. Korean analytical quality assurance (KAQUA) program for biological monitoring. *Int Arch Occup Environ Health*.1997;69:361-6.
10. Occupational Safety & Health Administration (United States). [access 2012 Jul]. Available in [http://www.osha.gov/SLTC/bloodlead/protocol.html].
11. Kisset D. Performance indication improvement for a proficiency testing. *Accred Qual Assur*.2006;10:461-5.
12. Wong SK. A comparison of performance statistics for proficiency testing programmes. *Accred Qual Assur*. 2007;12:59-66.
13. ISO 13528. Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparisons. 2005.
14. ISO 5725-2. Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results. Part 2 - Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method. 1994.
15. Chui QSH, Barros CB, Silva TD. Parâmetros r e R obtidos de programa interlaboratorial - Como usá-lo. *Quím. Nova*.2009;32:2209-13.
16. National Association of Testing Authorities (Australia). Guide to NATA Proficiency Testing. [access 2012 Jul].Available in [http://www.dicocare.org/Bibliografia/B_4_Summary_Statistics_NATA_PT_2004_Feb.pdf].
17. ISO 5725-5. Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results. Part 5 - Alternative methods for the determination of the precision of a standard measurement method. 1994.
18. Bio-Rad Laboratories, Inc. (United States). [access 2012 Jul]. Available in [http://www.qcnet.com/Portals/0/PDFs/CLIALimits%283-3-04%29.pdf].
19. Thompson M, Ellison SLR, Wood R. The International Harmonized Protocol for the Proficiency Testing of Analytical Chemistry Laboratories (IUPAC Technical Report).*Pure Appl Chem*.2006;78:145-96.
20. Royal Society of Chemistry (United Kingdom). Analytical Methods Committee No.6 Robust statistics: a method of coping with outliers. 2001.
21. Willink R. What is robustness in data analysis? *Metrologia*.2008;45:442-7.
22. Elftheriou P, Papastefanou H. Measuring performance in analytical measurements. *Accred Qual Assur*.2009;14:67-71.
23. Rosario P, Martínez JL, Silván JM. Comparison of different statistical methods for evaluation of proficiency test data. *Accred Qual Assur*.2008;13:493-9.
24. Ellison SLR, Barwick VJ, Farrant TJD. Practical statistics for the analytical scientist – A Bench Guide.2th ed. Cambridge (UK):RSC Publishing;2009.
25. Srnková J, Zbiral J. Comparison of different approaches to the statistical evaluation of proficiency tests. *Accred Qual Assur*.2009;14:467-71.

Elevados teores de sódio em alimentos industrializados consumidos pela população brasileira

High sodium contents in processed foods consumed by Brazilian population

RIALA6/1587

Márcia Liane BUZZO^{1*}, Maria de Fátima Henriques CARVALHO¹, Edna Emy Kumagai ARAKAKI¹, Richard MATSUZAKI¹, Daniel GRANATO², Carmen Silvia KIRA³

*Endereço para correspondência: 1Núcleo de Contaminantes Inorgânicos, Centro de Contaminantes, Instituto Adolfo Lutz. Av. Dr. Arnaldo, 355, Cerqueira Cesar, São Paulo, SP, Brasil. E-mail: marcialiane@ial.sp.gov.br

²Núcleo de Análise e Tratamento de Dados, Centro de Materiais de Referência, Instituto Adolfo Lutz

³Núcleo de Química, Física e Sensorial, Centro de Alimentos, Instituto Adolfo Lutz

Recebido: 04.02.2014 - Aceito para Publicação: 31.03.2014

RESUMO

O sódio é um mineral essencial para a regulação dos fluidos intra e extracelulares, e atua na manutenção da pressão sanguínea. Dieta inadequada com ingestão de sal em grande quantidade pode causar doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) como hipertensão arterial, enfermidades cardiovasculares, acidentes cerebrovasculares, entre outras; portanto, diminuir o consumo desse mineral pode reduzir os fatores de riscos de tais enfermidades. No presente estudo foi determinado o teor de sódio em diferentes tipos de alimentos industrializados consumidos pela população brasileira: salgadinho à base de milho, biscoito, hambúrguer, salsicha e macarrão instantâneo, utilizando-se a técnica de espectrometria de emissão atômica com plasma de argônio acoplado indutivamente (ICP OES). Os elevados teores de sódio detectados nos produtos revelaram a importância de efetuar a implementação e manutenção de programas de monitoramento de alimentos no país, com o fornecimento de ferramenta para auxiliar as indústrias produtoras no controle de adição de sódio nos produtos industrializados. Ademais, este recurso poderá dispor de dados para recomendar às autoridades competentes o estabelecimento em dispositivo legal de valores restritivos de adição de sódio nos processamentos desses alimentos, para garantir a oferta de alimentos mais saudáveis à população, com vistas à promoção de adequada saúde pública.

Palavras-chave. sódio, alimentos industrializados, espectrometria de emissão atômica com plasma de argônio acoplado indutivamente (ICP OES).

ABSTRACT

Sodium is an essential compound for regulating the intracellular and extracellular mineral fluids, and for maintaining the blood pressure. An inadequate diet with ingestion of large quantities of salt may cause the chronic non-communicable diseases (NCDs) such as hypertension, cardiovascular diseases, cerebrovascular accidents, among others; thus, decreasing the intake of this mineral can reduce the risk factors of such diseases. The present study aimed at determining the sodium contents in some processed foods consumed by the Brazilian population: corn-based snacks, biscuit, hamburger, sausage and noodles, by means of inductively coupled plasma atomic emission spectrometry technique (ICP OES). The high sodium contents detected in these products revealed the importance of implementation and maintenance of food monitoring programs in the country. These strategies will provide tools to assist the food producers for controlling the sodium addition in processed products. Also, these actions will yield data which will be useful for the competent authorities to establish a legal provision which limits the amount of sodium added into the processed food, to ensure the offering of healthy foods to the population, in order to promote satisfactory public health.

Keywords. sodium, processed foods, inductively coupled plasma atomic emission spectrometry (ICP OES).

INTRODUÇÃO

O sódio é um mineral essencial para a regulação dos fluidos intra e extracelulares, atuando na manutenção da pressão sanguínea. Seu consumo moderado é necessário para o bom funcionamento do organismo. Porém, uma dieta inadequada com ingestão de grande quantidade de sódio, pode estar associada com doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) como a hipertensão arterial, enfermidades cardiovasculares e acidentes cerebrovasculares, diabetes e obesidade, de modo que diminuir o consumo desse mineral pode reduzir os fatores de riscos de tais enfermidades¹⁻⁵. De acordo com o Ministério da Saúde, seguindo a tendência mundial, no Brasil as DCNT são a causa de 72 % das mortes e 75 % dos gastos com atenção à saúde no Sistema Único de Saúde⁶.

Pesquisas recentes⁷⁻⁹ apontam que, em muitos casos, o consumo de sódio supera o recomendado pela Organização Mundial da Saúde, que preconiza dois gramas de sódio por dia, equivalentes a cinco gramas de sal¹⁰. Populações de vários países excedem este valor recomendado, como o Canadá (3.400 mg), Finlândia (3.300 mg), Reino Unido (3.800 mg), e Brasil (12.000 mg)¹¹. Assim, a maior parte da população mundial em todas as faixas etárias consome níveis de sódio além de suas necessidades^{1,12-14}.

O consumo excessivo de sal está relacionado à mudança na dieta alimentar ocorrida em função da urbanização e demanda da vida moderna, que estimula a maior ingestão de alimentos processados e industrializados, e menor consumo de frutas e hortaliças. Dentre os produtos industrializados ricos em sódio consumidos pela população em geral, e apontados na literatura, destacam-se: hambúrguer, salsicha, presunto, salgadinho à base de milho, enlatados, biscoitos salgados, queijos, bolacha, entre outros^{1,5,6,15,16}.

De acordo com a Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF) do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE)¹⁷, o consumo diário de sódio no Brasil entre os anos de 2008 e 2009 indicou que cada brasileiro consumiu 4,46 g, correspondente a 11,38 g de sal. A principal origem do sódio no domicílio foi o sal de cozinha, correspondendo a 59,7 %, enquanto que 11,8 % referem-se à alimentação realizada fora do domicílio, totalizando 71,5 % do sódio ingerido no país. Segundo a Associação Brasileira das Indústrias da Alimentação, a ingestão de sódio pelo consumidor nas classes de renda de A a E, demonstrou maior consumo de sódio

da população na classe A, onde os produtos do setor industrial foram responsáveis pela ingestão de 33,2 % desse nutriente no país, indicando que os consumidores com maior poder aquisitivo tendem a ingerir mais sódio e a incluírem em suas dietas menor proporção de alimentos não processados¹⁸. A produção do mercado brasileiro em 2012 de massas alimentícias e de biscoitos no país foi de 1.250 mil toneladas de biscoitos e 187,8 mil toneladas de massas instantâneas, correspondendo a uma taxa de crescimento do setor de 2,5 % com relação ao ano de 2011^{18,19}. Ainda, mais de 30 % das vendas da indústria de alimentos no mercado interno são direcionados atualmente à alimentação produzida por estabelecimentos que preparam e fornecem alimentação fora do lar (Food Service), com crescimento de taxas superiores a 13 % ao ano nos últimos dez anos. Na Europa e nos EUA, este segmento é responsável por 50 % a 60 % do consumo de alimentos.

De forma a reverter este quadro e no contexto da promoção da alimentação saudável, surgiu a necessidade de se propor um monitoramento dos teores de sódio nos produtos industrializados. Atualmente, a redução do consumo de sódio e a reformulação do perfil nutricional de alimentos estão entre as diretrizes da Política Nacional de Alimentação e Nutrição (PNAN) do Ministério da Saúde²⁰. Assim, com o propósito de melhoria da qualidade dos alimentos consumidos no país, o presente estudo tem como objetivo a determinação do teor de sódio em diferentes tipos de alimentos processados e industrializados consumidos pela população brasileira (salgadinho à base de milho, biscoito, hambúrguer, salsicha e macarrão instantâneo). O trabalho visa subsidiar as autoridades competentes para o estabelecimento de valores limites de adição de sódio no processamento destes alimentos, a fim de fundamentar o controle e a fiscalização de produtos consumidos pela população, bem como indicar a importância da manutenção de programas de monitoramento de alimentos no país, como ferramenta para auxiliar os fabricantes a se adequarem às necessidades da população brasileira, com vistas à promoção da Saúde Pública.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras

Para as avaliações dos teores de sódio foram analisadas um total de 382 amostras de alimentos, colhidos em diferentes pontos do Estado de São Paulo,

de marcas distintas, produzidas por diversos fabricantes do país, e distribuídas em: 26 amostras de macarrão instantâneo de diferentes sabores, 20 amostras de biscoito de polvilho, 36 amostras de biscoito água e sal, 29 amostras de biscoito salgado, 35 amostras de biscoito cream cracker, 120 amostras de salgadinho à base de milho de diferentes sabores, 54 amostras de salsicha de diferentes tipos e 62 amostras de hambúrguer de diferentes tipos. Os alimentos foram colhidos dentro do prazo de validade.

Método analítico

As amostras foram trituradas e homogeneizadas, não sendo submetidas a qualquer pré-tratamento. As tomadas de ensaio consistiram de alíquotas de 1,0 g de amostra, que foram transferidas para frasco erlenmeyer de 125 mL, e acrescentados 2,5 mL de ácido clorídrico concentrado de grau analítico (Merck). A digestão das amostras foi efetuada sobre chapa elétrica ajustada na faixa de temperatura entre 100-120 °C, por duas horas. A seguir as amostras foram filtradas em papel de filtro quantitativo, recolhidas em balões volumétricos de 25 mL e o volume foi completado quantitativamente com água ultrapura (Millipore). Foram preparados dois brancos do reagente para cada tomada de ensaio.

Os teores de sódio nas amostras foram determinados por emprego da técnica de Espectrometria de Emissão Atômica com Plasma de Argônio Indutivamente Acoplado (ICP OES). A curva de calibração foi preparada pela diluição de solução padrão de sódio com concentração de 10.000 mg/L (Spexcertiprep), em solução de ácido clorídrico de grau

analítico (Merck) a 10 % (v/v), para as concentrações de 2,5 – 10,0 – 25,0 – 50,0 – 100,0 mg/L. O resultado para cada amostra foi obtido pela média da análise de três replicatas independentes.

Validação do método analítico

Para a garantia da confiabilidade dos resultados obtidos²¹, a exatidão e a precisão do método analítico foram avaliadas empregando-se adição de padrão de sódio em dois níveis de concentração distintos em sete amostras independentes, para cada tipo de produto analisado. Para as determinações dos valores de limite de detecção (LD) e de limite de quantificação (LQ), para os diferentes tipos de alimentos analisados, foram realizadas sete preparações independentes de branco para cada produto, os quais foram adquiridos no comércio local.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Validação do método analítico

Os valores de limite de detecção e de quantificação foram calculados como três e dez vezes para cada produto industrializado, respectivamente. Para cada produto, nos níveis de concentração avaliados, os parâmetros de exatidão e precisão foram expressos como porcentagem de recuperação e coeficiente de variação, respectivamente. A Tabela 1 apresenta os resultados da validação do método analítico para os parâmetros de exatidão, precisão, coeficiente de correlação, limites de detecção e de quantificação, empregando-se adição de padrão de sódio em diferentes concentrações.

Tabela 1. Parâmetros de validação do método analítico: limite de detecção, limite de quantificação, exatidão e precisão

Produto alimentício	LD (mg/kg)	LQ (mg/kg)	Concentração de sódio adicionada (mg/kg)	Recuperação (%)	CV (%)
Salgadinho à base de milho	1,5	5,1	8,0	91,8	2,4
			16,0	94,1	3,4
			20,0	89,4	2,3
Biscoito	1,7	5,6	40,0	92,1	2,4
			20,0	107,6	2,7
Hambúrguer	1,4	4,6	40,0	99,7	2,5
			20,0	90,7	1,6
Salsicha	1,8	6,0	40,0	97,1	4,5
			20,0	79,2	3,0
Macarrão instantâneo	1,9	6,3	40,0	79,7	3,6

LD: limite de detecção; LQ: limite de quantificação; CV: coeficiente de variação

A análise dos parâmetros de validação do método (Tabela 1) indica que os resultados obtidos são adequados para a determinação de sódio, em diferentes níveis, nos produtos estudados. O preparo das amostras utilizando a hidrólise ácida aliada ao emprego da técnica de Espectrometria de Emissão Atômica com Plasma de Argônio Indutivamente Acoplado mostrou-se rápido, permitindo o processamento simultâneo de um número relativamente grande de amostras.

Avaliação dos teores de sódio das análises dos produtos

A Tabela 2 apresenta a análise descritiva dos teores de sódio obtidos nos diferentes tipos de produtos industrializados consumidos pela população, em cumprimento ao Programa Paulista de Alimentos.

A análise descritiva dos resultados obtidos para os diferentes tipos de alimentos industrializados consumidos pela população revela que a média do teor de sódio foi superior para o produto macarrão instantâneo entre os alimentos industrializados, bem como para o produto salsicha entre os alimentos cárneos industrializados, quando comparados aos demais tipos de produtos analisados apresentados na Tabela 2. Observou-se que na literatura científica nacional não estão descritos valores referentes às análises laboratoriais de determinação do teor de sódio nos tipos de produtos apresentados no presente estudo, dificultando assim a comparação dos resultados obtidos.

A comparação efetuada entre os teores médios de sódio obtidos nos diferentes tipos de produtos analisados (Tabela 2) apresenta valores compatíveis com aqueles indicados em tabelas de composição de alimentos nacionais e internacionais (Tabela 3), exceto para o produto macarrão

instantâneo, para o qual foi observado valor médio de sódio superior. Porém, com relação aos teores máximos de sódio obtidos no presente estudo verificou-se que estes foram superiores aos valores máximos observados nas tabelas de composição de alimentos (Tabela 3). Assim, este estudo revela a importância da implantação e manutenção de programas de monitoramento de sódio em alimentos no país, como ferramenta para auxiliar os produtores a se adequarem às necessidades da população, com vistas à promoção da Saúde Pública.

Costa e Machado¹, em estudo realizado para verificação do consumo de sal, alimentos ricos em sódio e pressão arterial em crianças de escolas das redes privada e pública no Estado do Rio Grande do Sul, concluíram que a maior frequência do consumo de alimentos ricos em sódio foi de produtos industrializados (salgadinhos, salsicha, queijos, cachorro quente e pizza), sendo que o alimento rico em sódio correlacionado a níveis elevados de pressão arterial sistólica foi o do tipo enlatado. Tavares et al²⁶ pesquisaram o estado nutricional e o consumo alimentar de crianças de creches públicas e privadas no Amazonas e verificaram elevado consumo de energia e de sódio em ambos os tipos de creches, acima do limite tolerável de ingestão, sendo que crianças de creches públicas consomem mais sódio quando comparadas com aquelas pertencentes às creches particulares. Matuk et al²⁷ avaliaram qualitativamente a composição das lancheiras de crianças do ensino fundamental de escolas privadas da Grande São Paulo e encontraram que, apesar de alguns aspectos positivos, a composição mostrou-se inadequada, contendo excesso de alimentos industrializados, geralmente ricos em açúcares, gorduras e sódio (sucos artificiais, bolachas/bolos/barra de cereais

Tabela 2. Análise descritiva dos resultados obtidos dos teores de sódio em diferentes tipos de produtos alimentícios industrializados consumidos pela população

Produto alimentício	N	Média	Desvio padrão	Mediana	Valor mínimo	Valor máximo
Macarrão instantâneo	26	1794,2	179,6	1820,0	1435,4	2160,3
Biscoito de polvilho	20	924,0	164,7	938,1	603,3	1139,0
Biscoito água e sal	36	736,2	171,4	782,3	358,7	985,2
Biscoito salgado	29	763,5	150,5	776,6	401,9	1111,0
Biscoito cream cracker	35	760,1	176,3	797,2	435,6	1071,8
Salgadinho à base de milho	120	739,8	231,3	709,4	117,6	1470,6
Salsicha	54	1083,6	174,9	1047,7	801,7	1647,8
Hambúrguer	62	711,0	135,9	695,4	361,9	1022,6

Unidade: mg/100g; N: número de amostras

recheados e/ou com cobertura e embutidos) e com baixa presença de frutas, verduras e legumes.

Com relação à população jovem brasileira, Dishchekenian et al⁵ delinearão que o padrão Fast Food (cafeteria, hambúrguer, maionese, bolacha, entre outros) apresentou associação positiva com o colesterol, lipoproteína de baixa densidade e pressão arterial sistólica e diastólica em estudantes adolescentes de escola pública da cidade de São Paulo. Veiga et al¹⁴ estimaram a prevalência de inadequação da ingestão de micronutrientes entre adolescentes brasileiros e observaram elevadas prevalências de inadequação no consumo de sódio, muito acima do recomendado, indicando que o elevado conteúdo de sódio na dieta dos adolescentes pode estar associado ao alto consumo de alimentos industrializados. Assumpção et al²⁸ avaliaram a qualidade global da dieta e a adequação do consumo de cada componente da dieta de adolescentes segundo fatores demográficos, socioeconômicos e índice de massa corporal (IMC) e concluíram que adolescentes com sobrepeso/obesidade apresentaram médias de ingestão superiores nos grupos de colesterol e de sódio, e médias inferiores nos grupos das frutas, leite e derivados e variedade da dieta.

O elevado consumo de sódio é um importante fator relacionado a doenças cardiovasculares e renais também na população adulta brasileira. Um estudo realizado por Araujo et al¹² demonstrou que a dieta do brasileiro vêm apresentando maior participação de alimentos processados, com ingestão de sódio acima do tolerável em mais de 70 % na população adulta brasileira para ambos os sexos. Nishimura et al³ elaboraram proposta de agrupamento de alimentos para a investigação da associação entre consumo alimentar e risco de

desenvolvimento de diabetes tipo 2 e doenças associadas na população de nipo-brasileiros, e evidenciaram que os novos grupos de alimentos incluindo biscoito, preparações ricas em sódio e salgados, incorporam evidências recentes da associação entre dieta e desenvolvimento de diabetes tipo 2. Neumann et al² descreveram que o consumo de alimentos de risco para doenças cardiovasculares segundo escolaridade e renda familiar entre funcionários públicos de São Paulo está correlacionada ao consumo de quantidades inadequadas de alimentos com alto teor calórico, gorduras saturadas, sódio e açúcar, sendo isso atribuído ao fato que a maioria dos funcionários se alimenta no restaurante do local de trabalho.

O presente estudo aponta também a grande variabilidade dos resultados obtidos entre os teores mínimos e máximos de sódio nos diferentes tipos de alimentos, em um mesmo subgrupo de produto (Tabela 4) com variação de 50,5 % (macarrão instantâneo) até 1150,5 % (salgadinho à base de milho). A variabilidade também foi observada quando da avaliação dos valores declarados de sódio na rotulagem dos alimentos em estudo com variação de 169,0 % (hambúrguer) até 9061,7 % (biscoito de polvilho). Marques e Camara²⁹ avaliaram os teores de sódio de 221 rótulos de diferentes tipos de produtos industrializados de diferentes marcas, dos grupos: maionese, massas, leite, refrigerantes, catchup, margarina, bolachas, enlatados, molho de tomate, produtos cárneos congelados; e encontraram resultados semelhantes àqueles do presente estudo. Os produtos que apresentaram maior variabilidade dos teores de sódio por porção estabelecida no rótulo foram: macarrão instantâneo, refrigerante, refrigerante diet, bolacha recheada de chocolate, enlatados vegetais e enlatados de origem animal; enquanto que com relação

Tabela 3. Comparação dos teores de sódio presentes em diferentes tipos de produtos alimentícios industrializados, apresentados em tabelas de composição de alimentos distintas e valores máximos de sódio obtidos no estudo

Produto alimentício	Phillipi ²²	Franco ²³	TACO/USDA ²⁴	INSA ²⁵	Valor máximo
Macarrão instantâneo	1600	–	1516	–	2160,3
Biscoito de polvilho	188,058 – 930	250	–	–	1139,0
Biscoito água e sal	300 – 930	835,6	–	548	985,2
Biscoito salgado	510 – 860	–	1072	–	1111,0
Biscoito cream cracker	300 – 930	–	854	366	1071,8
Salgadinho à base de milho	550 – 1035,55	–	–	–	1470,6
Salsicha	1200 – 1426	1009,2	1120 – 1370	1008	1647,8
Hambúrguer	657,5 – 946,25	–	869	64	1022,6

Unidade: mg/100g

ao teor médio de sódio e o valor diário de referência de sódio considerado na pesquisa, os produtos macarrão instantâneo e lasanha congelada apresentaram maior percentual de variabilidade dos teores de sódio por porção estabelecida no rótulo. Assim, a comparação entre as porcentagens destas variabilidades apontam para a necessidade de as autoridades estabelecerem valores mais restritivos de adição de sódio nestes tipos de alimentos, que deve ser feita de modo a evitar também a ingestão de quantidades excessivas do nutriente, apontando mais uma vez para a importância do estabelecimento de política em dispositivo legal para valores limites de adição de sódio nos processamentos nestes tipos de alimentos para fundamentar o controle e a fiscalização de produtos industrializados consumidos pela população.

Ainda, inúmeras pesquisas vêm comprovando ao longo do tempo, que a terapia dietética com restrição de sódio é essencial para a prevenção e controle das DCNT como, hipertensão e diabetes^{1-3,30}, indicando que o consumo alimentar é considerado um dos principais determinantes passíveis de modificação. Assim, considerando a Ingestão Diária Recomendada (IDR) para o sódio e os produtos estudados, para os maiores teores de sódio obtidos para cada produto, os resultados indicam que a ingestão diária de somente 100 g, de um dos tipos de alimentos analisados, corresponde a uma faixa entre 49,3 % (biscoito água e sal) e 108,0 % (macarrão instantâneo) da IDR. Este fato reforça a necessidade de tomada de ações governamentais junto às indústrias produtoras de alimentos processados com relação ao controle de adição de sódio nestes tipos de produtos, visando garantir a oferta de alimentos mais saudáveis à população, principalmente crianças e jovens, por tratar-se de populações mais vulneráveis, além da promoção da Saúde Pública do país.

Esta ingestão inadequada de alimentos ricos em sódio pela população têm levado autoridades de diversos países à promoção de intervenções com estabelecimento de programas estratégicos para a redução do sódio adicionado aos produtos industrializados, programas de criação de logotipos em embalagens de alimentos com apelo ao teor de sódio, bem como campanhas publicitárias em mídia a fim de estimular a população a utilizar menor quantidade de sal durante o processo de cozimento de alimentos³¹⁻³⁷, visando, desta forma, minimizar o impacto na Saúde Pública. O Brasil encontra-se dentre os países das Américas que assumiram o compromisso de pactuação de redução do consumo de sódio pela

Tabela 4. Variação, em porcentagem, entre os teores de sódio declarados na rotulagem e os obtidos neste estudo (máximo e mínimo), para os diferentes tipos de produtos alimentícios industrializados analisados de um mesmo subgrupo

Produto alimentício	Variabilidade entre teores mínimo e máximo de sódio declarados em rotulagem, %	Variabilidade entre teores mínimo e máximo de sódio obtidos nas análises, %
Macarrão instantâneo	256,9	50,5
Biscoito de polvilho	9061,7	88,8
Biscoito água e sal	381,0	174,7
Biscoito salgado	240,2	176,4
Biscoito cream cracker	381,0	146,1
Salgadinho à base de milho	449,7	1150,5
Salsicha	1100,0	105,5
Hambúrguer	169,0	182,6

população proposto pela Organização Pan-americana da Saúde (OPAS). A construção de estratégias para a redução do teor de sódio em alimentos processados para 5 g de sal por dia até 2020, propõe uma ação central entre o governo e indústrias de alimentos com metas de redução voluntária, gradual e sustentável dos teores máximos de sódio em alimentos processados^{34,37}. Dentre os alimentos pactuados para a redução de sódio no país, nas categorias prioritárias de produtos, encontram-se aqueles analisados no presente estudo.

Desta forma, os resultados analíticos obtidos no presente estudo visam oferecer o panorama geral dos teores de sódio encontrados nos diferentes tipos de alimentos processados e industrializados, fornecendo ferramenta para tomada de decisão de autoridades competentes sobre a necessidade de implantação de programas estratégicos de monitoramento, permitindo o acompanhamento sistemático do teor de sódio nestes tipos de alimentos consumidos pela população, visando ainda reduzir as doenças e óbitos associados ao consumo excessivo de sódio no país.

CONCLUSÃO

Os elevados teores de sódio encontrados em diferentes tipos de produtos consumidos pela população brasileira, revelam a importância dos resultados obtidos

neste estudo para a tomada de decisão de autoridades competentes sobre a necessidade de implementação e manutenção de programas de monitoramento de alimentos estratégicos no país; permitindo assim, o acompanhamento sistemático do teor de sódio nestes tipos de alimentos consumidos e fornecendo uma ferramenta para auxiliar os produtores a se adequarem no controle de adição de sódio nos produtos industrializados. Recomenda-se ainda às autoridades competentes o estabelecimento em dispositivo legal, de valores restritivos de adição de sódio nos processamentos destes tipos de alimentos, visando fundamentar o controle e a fiscalização dos produtos consumidos pela população, visando garantir a oferta de alimentos mais saudáveis à população e, desta forma, reduzir as doenças e óbitos associados ao consumo excessivo de sódio, com vistas à promoção da Saúde Pública no país.

REFERÊNCIAS

- Costa FP, Machado SH. O consumo de as e de alimentos ricos em sódio pode influenciar na pressão arterial das crianças? *Cienc Saúde Coletiva*.2010;15(Supl. 1):1383-9.
- Neumann AICP, Shirassu MM, Fisberg RM. Consumo de alimentos de risco e proteção para doenças cardiovasculares entre funcionários públicos. *Rev Nutr*.2006;19(1):19-28.
- Nishimura RY, Damião R, Gimeno SGA, Ferreira SRG, Sartorelli DS. Grupos de alimentos para investigação de risco para diabetes tipo 2 e doenças associadas. *Rev Bras Epidemiol*.2011;14(3):531-6.
- Fernandes PS, Bernardo CO, Campos RMMB, Vasconcelos FAG. Evaluating the effect of nutritional education on the prevalence of overweight/obesity and on foods eaten at primary schools. *J Pediat*. 2009;85(4):315-21.
- Dishchekian VRM, Escrivão MAMS, Palma D, Ancona-Lopez F, Araujo EAC, Taddei JAAC. Padrões alimentares de adolescentes obesos e diferentes repercussões metabólicas. *Rev Nutr*.2011;24(1):17-29.
- Brasil. Ministério da Saúde. Doenças crônicas não transmissíveis. [acesso 2013 Jun 21]. Disponível em: [http://www.portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cmf?idtxt=31877&janela=1].
- Espríela MC, Palma GM. Fuentes Alimentarias de sal/sodio en mujeres, Costa Rica. *Rev Costarric Salud Publica*.2011;20:90-6.
- Nilson EAF, Jaime PC, Resende DO. Iniciativas desenvolvidas no Brasil para a redução do teor de sódio em alimentos processados. *Rev Panam Salud Publica*.2012;32(4):287-92.
- Levings J, Cogswell M, Curtis CJ, Gunn J, Neiman A, Angell SY. Progress toward sodium reduction in the United States. *Rev Panam Salud Publica*.2012;32(4):301-6.
- Organização Mundial da Saúde - OMS. Ingesta de sodio en adultos y niños. [acesso 2013 Jun 21]. Disponível em: [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/85224/1/WHO_NMH_NHD_13.2_spa.pdf].
- Bureau of Nutritional Sciences. Guidance for the Food Industry on reducing sodium in processed foods. Guidance for the food industry on reducing sodium in processed foods, 2012. Canadá. [acesso 2013 Jun 26]. Disponível em: [http://www.gftc.ca/knowledge-library/file.aspx?id=5895745d-8ea5-47b2-9bf1-e41e3b20b570].
- Araujo MC, Bezerra IN, Barbosa FS, Junger WL, Yokoo EM, Pereira RA, et al. Consumo de macronutrientes e ingestão inadequada de micronutrientes em adultos. *Rev Saúde Pública*.2013;47(1 Supl):177S-89S.
- Godoy FC, Andrade SC, Morimoto JM, Carandina L, Goldbaum M, Barros MBA, et al. Índice de qualidade da dieta de adolescentes residentes no distrito do Butantã, município de São Paulo, Brasil. *Rev Nutr*.2006;19(6):663-71.
- Veiga GV, Costa RS, Araujo MC, Souza AM, Bezerra IN, Barbosa FS. Inadequação do consumo de nutrientes entre adolescentes brasileiros. *Rev Saúde Pública*. 2013;47(1 Supl):212S-21S.
- Landeta MC, Pighín AF, Marchesich C, Cabrera MM, Marchini M. Composición centesimal y contenido de minerales en comidas rápidas: hamburguesas y salchichas de viena de primeras marcas crudas y cocidas. *Diaeta*.2012;30(139)18-24.
- Pereira RA, Andrade RG, Sichieri R. Mudanças no consumo alimentar de mulheres do Município do Rio de Janeiro, Brasil, 1995-2005. *Cad Saúde Pública* 2009;5(11):2419-32.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE. Pesquisa de Orçamentos Familiares. [acesso 2013 Jun 21]. Disponível em: [http://www.ibge.gov.br/home/xml/pof_2008_2009.shtm].
- Associação Brasileira das Indústrias da Alimentação – ABIA. Cenário do consumo de sódio no Brasil. [acesso 2013 Set 19]. Disponível em: [http://www.abia.org.br/sodio/perspectivaindustria.asp].
- Associação Brasileira das Indústrias de Massas Alimentícias e Pão e Bolos Industrializados. – ABIMA. [acesso 2013 Set 19]. Disponível em: [http://www.abima.com.br/estatistica_massa.php].
- Brasil. Ministério da Saúde. Política Nacional de Alimentação e Nutrição – PNAN. [acesso 2013 Jun 21]. Disponível em: [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/2d_081111.pdf].
- Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia – INMETRO. Orientação sobre validação de método analítico. DOQ-CGCRE-008 – revisão 04. 2011. Disponível em: [http://www.inmetro.gov.br/sidoq/arquivos/Cgcre/DOQ/DOQ-Cgcre-8_04.pdf].
- Philippi ST. Tabela de Composição de Alimentos-Suporte para decisão nutricional. 3ª ed. Barueri: Manole; 2012.
- Franco G. Tabela de composição química dos alimentos. 9ª ed. Ed. Atheneu, 2012.
- Tabela Brasileira de Composição de Alimentos – TACO. 4ª ed. 2011. [acesso 2013 Jul 10]. Disponível em: [http://www.unicamp.br/nepa/taco/tabela.php?ativo=tabela].
- Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge – INSA. 2006. [acesso 2013 Jul 10]. Disponível em: [http://www.insa.pt/sites/INSA/Portugues/AreasCientificas/AlimentNutricao/AplicacoesOnline/TabelaAlimentos/Paginas/TabelaAlimentos.aspx].

26. Tavares BM, Veiga GV, Yuyama LKO, Bueno MB, Fisberg RM, Fisberg M. Estado nutricional e consumo de energia e nutrientes de pré-escolares que frequentam creches no município de Manaus, Amazonas: existem diferenças entre creches públicas e privadas? *Rev Paul Pediatr*.2012;30(1):42-50.
27. Matuk TT, Stancari PCS, Bueno MB, Zaccarelli EM. Composição de lancheiras de alunos de escolas particulares de São Paulo. *Rev Paul Pediatr*.2011;29(2):157-63.
28. Assumpção D, Marilisa Barros BA, Fisberg RM, Carandina L, Goldbaum M, Cesar CLG. Qualidade da dieta de adolescentes: estudo de base populacional em Campinas, SP. *Rev Bras Epidemiol*.2012;15(3):605-16.
29. Marques AA, Camara SAV. Fator de risco para hipertensão: teor de sódio nos alimentos. [acesso 2013 Jul 10]. Disponível em: [[http://www.portal.estacio.br/media/4036280/fator de risco para hipertensão_teor de sódio nos alimentos. pdf](http://www.portal.estacio.br/media/4036280/fator_de_risco_para_hipertensao_teor_de_sodio_nos_alimentos.pdf)].
30. He FJ, MacGregor GA. A comprehensive review on salt and health and current experience of worldwide salt reduction programmes. *J Hum Hypertens*.2009;23:363-84.
31. Sanz-Valero J, Sebastián-Ponce MI, Wanden-Berghe C. Intervenciones para reducir el consumo de sal a través del etiquetado. *Rev Panam Salud Publica*.2012;31(4):332-7.
32. Crovetto MM, Durán TM, Guzmán RM, Miranda CH. Estudio descriptivo de la frecuencia y duración de la publicidad alimentaria emitida en la programación de canales de televisión asociados a Anatel. *Rev Chil Nutr*.2011;38(30):290-9.
33. Ferrante D, Apro N, Ferreira V, Virgolini M, Aguilar V, Sosa M, et al. Feasibility of salt reduction in processed foods in Argentina. *Rev Panam Salud Publica*.2011;29(2):69-75.
34. Barquera S, Appel LJ. Reduction of sodium intake in the Americas: a public health imperative. *Rev Panam Salud Publica*.2012;32(4):253-4.
35. Levings J, Cogswell M, Curtis CJ, Gunn J, Neiman A, Angell SY. Progress toward sodium reduction in the United States. *Rev Panam Salud Publica*.2012;32(4):301-6.
36. Blanco-Metzler A, Montero-Campos MÁ, Núñez-Rivas H, Gamboa-Cerda C, Sánchez G. Avances en la reducción del consumo de sal y sodio en Costa Rica. *Rev Panam Salud Publica*.2012;32(4):316-20.
37. Nilson EAF, Jaime PC, Resende DO. Iniciativas desenvolvidas no Brasil para a redução do teor de sódio em alimentos processados. *Rev Panam Salud Publica*.2012;34(4):287-92.

Validação de metodologia QuEChERS-acetato para a análise de multirresíduo de agrotóxicos em amostras de soja e de extrato solúvel de soja utilizando cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial

Validation of acetate QuEChERS methodology for pesticides multiresidue analysis in soybean samples and soybean-soluble extract by means of high-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry

RIALA6/1588

Adherlene Vieira GOUVÊA^{1*}, Maria Helena Wohlers Morelli CARDOSO¹, Lucia Helena Pinto BASTOS¹, Cristiane BARATA SILVA¹, Nina Daddario ORTIZ², Armi Wanderley da NÓBREGA¹, Silvana do Couto JACOB¹

*Endereço para correspondência: ¹Laboratório de Alimentos e Contaminantes, Instituto Nacional de Controle da Qualidade em Saúde (INCQS), Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ). Av. Brasil, 4365 – Mangueiros, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 21040-900. E-mail: adherlene.gouvea@incqs.fiocruz.br, adherlene@gmail.com.

²Unidade Proteômica, Departamento de Bioquímica, Instituto de Química (IQ), Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ)
Recebido: 15.03.2013 - Aceito para publicação: 12.03.2014

RESUMO

Com o aumento da utilização da soja e seus derivados na alimentação humana torna-se importante a avaliação da possibilidade de contaminação desses produtos por resíduos de agrotóxicos. Neste contexto, este estudo efetuou a validação da metodologia QuEChERS-acetato, para análise de 144 resíduos de agrotóxicos em soja e no extrato solúvel de soja por meio de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial. Os parâmetros avaliados foram: seletividade (efeito matriz nos dois tipos de amostras), linearidade (faixa de trabalho, significância da regressão e homogeneidade dos resíduos da regressão), exatidão (recuperação), precisão (repetitividade) e limite de detecção e de quantificação. As curvas analíticas apresentaram $R^2 \geq 0,95$ e $r \geq 0,98$ na faixa de trabalho (0,002 a 0,200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). A exatidão e precisão em dois níveis de fortificação das duas matrizes apresentaram valores de 70 a 120 % de recuperação e $\text{CV}(\%) \leq 20$ %, respectivamente. O limite de detecção e de quantificação apresentou resultados satisfatórios. A metodologia validada possibilitou a determinação de 122 substâncias na matriz soja e 124 na matriz de extrato solúvel de soja.

Palavras-chave. soja, agrotóxicos, estudos de validação, cromatografia líquida, espectrometria de massas.

ABSTRACT

The possibility of occurring the soy and soy derivatives samples contamination with pesticide residues has become significant due to the increased use of these products in human nourishment. In this context, the present study aimed at validating the acetate QuEChERS multiresidue methodology for analyzing 144 pesticide residues in soybean samples and soybean soluble extract using high-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. The parameters evaluated were: selectivity (matrix effect in the two sample types), linearity (working range, regression significance, homogeneity of the regression residues), accuracy (recovery), precision (repeatability) and limits of detection and quantification. The analytical curves presented $R^2 \geq 0.95$ and $r \geq 0.98$ in the working range (0.002 to 0.200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). The accuracy and precision evaluated at two levels of fortification of two matrices presented values of recovery in the 70-120 % range and $\text{CV}(\%) \leq 20$ %, respectively. The limits of detection and quantification showed satisfactory results. The validated methodology allowed to perform the determination of 122 substances in the matrix soybean and 124 in the soluble extract of soybean.

Keywords. soybeans, pesticides, validation studies, chromatography, liquid, mass spectrometry.

INTRODUÇÃO

O uso indiscriminado dos agrotóxicos em desrespeito às indicações agrônômicas acarreta a presença de resíduos de agrotóxicos nos alimentos, em quantidades superiores àquelas estabelecidas na legislação, podendo expor a população a possíveis agravos à saúde.

Quando são utilizados agrotóxicos de uso não autorizado, a exposição da população que consome esses alimentos contaminados é de maior gravidade, visto que não existem estudos toxicológicos que possibilitem estabelecer, em âmbito nacional, limites seguros de resíduos que não causem danos aos consumidores desses alimentos.

A soja é a cultura agrícola que mais cresceu nas últimas três décadas e corresponde a 49 % da área plantada em grãos do país. O cultivo é feito especialmente nas regiões centro-oeste e sul do país¹. Dados da safra de 2010/2011 indicam que o Brasil é o segundo maior produtor mundial de soja, atrás apenas dos Estados Unidos^{2,3}.

Há evidências de que nos últimos anos a inclusão de produtos à base de soja vem intensificando-se na alimentação humana, pois o grão é um dos alimentos mais completos em relação às proteínas⁴. A indicação de uso de alimentos à base de soja também inclui pessoas com histórico familiar de osteoporose e câncer de próstata⁵.

Para a cultura da soja, atualmente, são permitidos no Brasil cerca de cento e cinquenta e cinco agrotóxicos, treze produtos biológicos, quatro ferormônios sintéticos, quatro reguladores de crescimento e cinco compostos inorgânicos. Dentre os agrotóxicos permitidos, vinte e nove são da classificação toxicológica I, trinta e um da classificação toxicológica II, sessenta e nove da classificação toxicológica III e vinte e seis da classificação toxicológica IV⁶.

O avanço da tecnologia impacta no aumento da produção e do consumo de soja e seus derivados, sendo necessário o desenvolvimento de métodos para controle destes produtos visando verificar o cumprimento da legislação a fim de prever o aparecimento de danos à saúde.

As análises de resíduos de agrotóxicos em alimentos são muito dispendiosas principalmente no que se refere à utilização de materiais de referência para a quantificação e identificação dessas substâncias devido ao elevado número de agrotóxicos que devem ser investigados. Outro fator determinante para o elevado custo dessa análise é a necessidade de utilização de equipamentos sofisticados para atender aos limites requeridos e treinamento de técnicos especializados⁷.

Dificuldades existem no que se refere à quantidade de substâncias permitidas para o uso e controle de pragas na produção de alimentos, a diversidade das características físico-químicas dessas substâncias e o uso indevido de agrotóxicos não permitidos na legislação vigente.

Porém, são os resultados dessas análises o referencial para se avaliar os níveis de resíduos de agrotóxicos que chegam à mesa do consumidor e, também, serve como subsídio técnico-científico para as ações de vigilância no sentido de prevenir agravos à saúde da população devido à exposição a estas substâncias químicas.

Neste desafio os métodos de análise adequados são denominados multirresiduais que englobam a quantificação destes agrotóxicos em uma mesma corrida cromatográfica.

Pizzutti et al⁸ realizou seu estudo com cento e sessenta e nove agrotóxicos em grãos de soja utilizando o método multirresíduo Luke modificado o qual consiste em uma extração com acetona, éter de petróleo e diclorometano. Uma desvantagem do método é a utilização de grande quantidade de solvente.

O método multirresíduo denominado QuEChERS (“Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe”) desenvolvido em 2003 por Anastassiades et al⁹ tem como vantagens o fato de ser rápido, fácil, econômico, efetivo, robusto e seguro. Diversas modificações foram realizadas ao longo do tempo nesse método, com o objetivo de aumentar a aplicação para diversas matrizes, com altos percentuais de recuperação (>85 %) para substâncias de diferentes polaridades e volatilidades além da redução da quantidade de solventes orgânicos utilizados¹⁰.

Pizzutti et al¹¹ também realizou um estudo comparativo desses cento e sessenta e nove agrotóxicos analisados com o método multirresíduo Luke modificado⁸ e com uma diferente versão do método QuEChERS-acetato utilizando acetoneitrila acidificada, sulfato de magnésio anidro e acetato de sódio anidro, sem a etapa de “clean up”. Ambos os métodos demonstraram ser adequados para a utilização na matriz grãos de soja respeitando os critérios internacionais de qualidade. Os resultados encontrados mostraram um melhor desempenho do método QuEChERS-acetato nos critérios de exatidão e precisão em relação ao método Luke modificado.

No entanto, a etapa de “clean-up” é essencial para resultados satisfatórios, aumentando a eficiência do método em relação ao número de substâncias com

resultados adequados para os critérios de exatidão e precisão, promovendo robustez e confiabilidade. Outro fator determinante na utilização dessa etapa consiste na manutenção das condições de uso do equipamento, pois componentes não voláteis da matriz podem ficar aderidos no conjunto injetor-insersor e também na coluna cromatográfica alterando a resposta do sistema e aumentando a frequência de manutenções necessárias¹⁰.

O desenvolvimento e aprimoramento do QuEChERS para diferentes matrizes foi um marco na análise de resíduos de agrotóxicos pois agregou rapidez, facilidade de execução, economia, precisão e exatidão.

Informações de identificação, quantificação e confirmação da presença dos resíduos dessas substâncias são importantes para avaliação do risco real pelo qual a população consumidora está exposta. O avanço da cromatografia líquida associada à espectrometria de massas sequencial subsidia esta necessidade elencando-se como a principal técnica utilizada para a análise de resíduos de agrotóxicos com o maior número de substâncias monitoradas.

Para a utilização de métodos não oficiais, ou seja, que não possuem uma comprovação de atendimento a requisitos para uma aplicação específica, é necessária a submissão do método a um processo de validação. Este processo é a comprovação, através de evidência objetiva, que os requisitos para uma aplicação ou uso específico pretendido são atendidos¹².

A validação de métodos tem por objetivo confirmá-los como adequados para o uso pretendido. Este procedimento se aplica a métodos não normalizados, criados ou desenvolvidos pelo próprio laboratório, normalizados usados fora dos escopos para os quais foram concebidos ampliações e modificações de métodos normalizados¹³.

Os estudos de validação devem ser representativos e adequados para as substâncias de interesse, nos níveis delimitados pela legislação vigente, além de apresentar parâmetros aceitáveis de desempenho analítico que sejam capazes de garantir a confiabilidade dos resultados.

A seletividade, uma das etapas da validação, é a avaliação da presença de interferentes das substâncias de interesse na matriz da amostra a ser utilizada na validação. Os experimentos de avaliação de seletividade incluem ensaios com amostras com e sem o analito pesquisado¹³. Esta etapa do processo deve ser assegurada para não comprometer os outros parâmetros da validação a serem avaliados.

A construção de curvas analíticas é uma prática comum em laboratório, sendo este passo de extrema importância para a obtenção de resultados precisos e com boa exatidão¹⁴. De acordo com o trabalho a ser desenvolvido, uma faixa de concentração do analito na qual o método pode ser aplicado deve ser definida, sendo denominada faixa de trabalho. Essa faixa deve cobrir os níveis de concentração para os quais o ensaio será aplicado. Nas análises de multirresíduos, como no caso dos agrotóxicos, o valor da faixa de trabalho deve abranger o menor e o maior LMR permitido para o grupo de substâncias estudadas.

Para a quantificação do analito na amostra é necessário que se conheça a dependência entre a resposta medida e a concentração do analito. A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em análise¹⁵. Levando-se em consideração que a maioria dos métodos analíticos utiliza relações lineares para quantificação analítica, o exame de uma função de calibração para a linearidade é uma figura de desempenho importante na validação de um método analítico¹⁶. A faixa de trabalho, com uma resposta linear é denominada faixa linear.

Bazilio et al¹⁴ apresentam uma planilha eletrônica, intitulada “Planilha para Avaliação de Premissas” para cálculo e avaliação da linearidade de curvas analíticas. Os parâmetros de regressão podem ser estimados com o auxílio desta planilha. Outros resultados apresentados são a avaliação da homogeneidade dos resíduos da regressão, r , R^2 e a significância da regressão.

A matriz da amostra pode conter componentes que interferem no desempenho da medição, podendo haver acréscimo ou redução do sinal, sendo que a magnitude do efeito também pode depender da concentração. Se o efeito matriz for significativo, a linearidade, a tendência e a precisão estarão seriamente comprometidas¹³.

O processo de preparação dos padrões de calibração pode ser simplificado se os mesmos forem preparados com soluções simples do analito. Porém, é necessário que seja avaliada uma possível incompatibilidade da matriz analisada antes da sua utilização no preparo dos padrões¹⁷.

O efeito matriz pode variar de ocorrência e intensidade, porém algumas técnicas apresentam uma maior magnitude do efeito. Desta forma, se a técnica utilizada não é inerte ao efeito matriz é necessária a avaliação no processo de validação para a garantia de um

resultado fidedigno¹⁸.

Souza¹⁹ descreve um procedimento analítico para avaliação do efeito matriz, na qual uma curva analítica preparada, em solvente, é comparada através do teste *t* com uma curva preparada na presença da matriz da amostra. Quando as curvas analíticas preparadas não diferem estatisticamente entre si considera-se que o efeito matriz não é significativo.

O limite de detecção (LD) representa a menor concentração do analito que pode ser detectada e o limite de quantificação (LQ) representa a menor concentração do analito que pode ser quantificada. Um dos métodos de determinação destes limites é o método da relação sinal/ruído (S/R). O LD é a concentração que produziu um sinal 3 vezes maior do que o ruído da linha de base; e o LQ é a concentração que produziu um sinal 10 vezes maior do que o ruído da linha de base²⁰. Os limites de detecção e quantificação adequados para a análise multirresíduos de agrotóxicos têm valores inferiores aos LMR das substâncias estudadas.

Os estudos dos limites de detecção e quantificação feitos através da adição da solução de interesse na amostra branco avaliada no estudo de seletividade antes do processo de extração são denominados fortificação da amostra.

Outro parâmetro avaliado no processo de validação é a exatidão que é o grau de concordância existente entre o valor encontrado e o valor aceito como verdadeiro, sendo avaliada numericamente através da tendência. Esta é uma combinação de componentes de erros aleatórios e sistemáticos podendo ser expressa como a recuperação analítica. Um dos processos utilizados para avaliação da tendência é a realização de ensaios de recuperação e os valores aceitáveis de recuperação estabelecidos pelo SANCO¹⁸ são 70-120 %.

A precisão representa a dispersão de resultados entre ensaios independentes de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões em determinadas condições¹⁵, pode ser expressa de três formas: precisão intermediária, reprodutibilidade e repetitividade sendo que esta última é avaliada pelo coeficiente de variação (CV(%)) e/ou estimativa do desvio padrão relativo (DPR(%)).

Os ensaios de recuperação para avaliação da exatidão e precisão também são feitos através da fortificação de amostras em diferentes níveis de concentrações e replicatas de análise.

As condições de repetitividade podem ser

caracterizadas com: um mesmo procedimento de medição, um mesmo observador, um mesmo instrumento usado sob mesmas condições, um mesmo local e repetições no menor espaço de tempo possível¹³. Os valores aceitáveis de DPR(%) ou CV(%) definidos pelo SANCO¹⁸ são ≤ 20 %.

Em vista do aumento da utilização da soja e seus derivados na alimentação humana com ênfase em populações específicas como crianças, doentes, homens, mulheres e idosos, torna-se importante a avaliação destes alimentos quanto à contaminação de resíduos de agrotóxicos. Esta importância se refere à garantia do direito do consumidor às informações confiáveis a cerca dos alimentos comercializados.

Nesse contexto, o desenvolvimento desse estudo teve por finalidade validar o método QuEChERS-acetato^{9,21} para a análise de cento e quarenta e quatro resíduos de agrotóxicos em soja e no extrato solúvel de soja utilizando a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial - CLAE-EM/EM (High Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry/ Mass Spectrometry - HPLC-MS/MS). O trabalho permitiu fornecer subsídios para avaliação da situação atual do consumo desses alimentos, disponíveis no mercado nacional em relação à presença destes resíduos.

MATERIAL E MÉTODOS

Reagentes, solventes e soluções

Os reagentes e solventes utilizados para o desenvolvimento do trabalho foram o acetato de etila grau resíduo, o acetato de sódio grau para análise, a acetona grau resíduo e o ácido acético glacial grau cromatografia líquida, fornecidos pela TEDIA (EUA), a acetonitrila grau cromatografia líquida, o formato de amônio grau para análise e o sulfato de magnésio anidro grau para análise, fornecidos pela Sigma-Aldrich (EUA), a água tipo I, o detergente Extran[®] alcalino grau para análise, fornecido pela Merck (EUA), o metanol grau espectrometria de massas, fornecido pela J. T. Baker (EUA), o sorvente amina primária- secundária ("primary secondary amine" - PSA) grau para análise, fornecida pela Varian (EUA).

As soluções estoques dos agrotóxicos foram preparadas a partir dos padrões de agrotóxicos adquiridos do Dr. Ehrenstofer (Alemanha), com certificado de análise e grau de pureza superior a 95 %, diluídos em

acetato de etila e metanol dependendo da solubilidade de cada substância. As soluções estoque foram preparadas na concentração nominal de 100 µg.mL⁻¹, de acordo com a pureza definida no seu certificado e a aplicação pretendida. A partir dessas soluções foi preparada uma mistura na concentração nominal de 1 µg.mL⁻¹. Com essa mistura foram preparadas todas as soluções de trabalho nas seguintes concentrações nominais: 0,002; 0,004; 0,008; 0,01; 0,02; 0,04; 0,08; 0,1 e 0,2 µg.mL⁻¹.

Equipamentos e condições operacionais

Foi utilizado o cromatógrafo líquido de ultra eficiência (Waters, EUA) modelo ACQUITY UPLCTM equipado com um sistema binário de bombas, injetor automático, degaseificador e forno para a coluna. A coluna utilizada para a separação cromatográfica foi de fase reversa AlltimaTM C₁₈ com 5 µm de tamanho de partícula, 3,2 mm de diâmetro interno e 150 mm de comprimento (Grace, EUA). A pré-coluna utilizada foi o cartucho SecurityGuard C₁₈ com 4 mm de diâmetro interno e 3 mm de comprimento (Phenomenex, EUA). O detector acoplado foi o detector de massas sequencial (Waters, EUA) modelo Quattro Premier XETM equipado com uma fonte de ionização Electro Spray Ionization

(ESI) (Z-SprayTM) operando no modo positivo e estação de trabalho MassLynxTM Versão 4.1.

As condições operacionais utilizadas no cromatógrafo líquido foram o volume de injeção de 5 µL, a vazão da fase móvel constante de 0,3 mL.min⁻¹, a temperatura do forno da coluna constante de 40 °C, a temperatura do amostrador constante de 8 °C e o tempo total de corrida de 38 min. Na eluição por gradiente, as fases móveis utilizadas no estudo foram a fase denominada A: formato de amônio 5 x 10⁻³ mol.L⁻¹ com 10 % de metanol e a fase denominada B: metanol.

As condições operacionais utilizadas no espectrômetro de massas sequencial foram a voltagem do capilar de 0,98 kV, a temperatura da fonte ESI⁺ em 120 °C, a temperatura do gás de dessolvatação (N₂) de 400 °C, o fluxo do gás do cone (N₂) de 50 L.h⁻¹, o fluxo do gás de dessolvatação (N₂) de 800 L.h⁻¹ e a pressão do gás de colisão (Argônio) de 3,5 x 10⁻³ mbar.

Na Tabela 1 estão relacionadas as transições selecionadas para a quantificação e confirmação de cada substância selecionada para o estudo de acordo com as referências consultadas²²⁻³⁹. A letra “s” ao lado do nome das substâncias indica o uso permitido para a cultura da soja.

Outros equipamentos utilizados para a realização

Tabela 1. Condições analíticas para detecção e quantificação das substâncias selecionadas para o estudo

Nº	Substância	Transição Quantificação MRM		Transição Confirmação MRM		Espécie do Íon Precursor	Espécie do Íon Precursor	Voltagem do Cone (V)	Energia de Colisão Quant. (eV)	Energia de Colisão Confirm. (eV)	Tr (min)	
1	3-Hidroxi-Carbo- furano	237,9	>	162,8	237,9	>	180,8	[M + H] ⁺	18	15	10	8,40
2	Abamectina (s)	890,5	>	567,1	890,5	>	305,0	[M + NH ₄] ⁺	20	20	15	19,26
3	Acefato (s)	183,9	>	142,8	183,9	>	94,6	[M + H] ⁺	20	25	10	4,21
4	Acetamiprido (s)	223,1	>	125,9	223,1	>	90,0	[M + H] ⁺	35	35	22	8,66
5	Aldicarbe	190,5	>	115,6	190,5	>	88,7	[M + H] ⁺	12	14	5	10,56
6	Aldicarbe Sulfona	223,1	>	76,0	223,1	>	86,0	[M + H] ⁺	25	10	14	5,18
7	Aldicarbe Sulfóxido	207,0	>	88,9	207,0	>	131,9	[M + H] ⁺	20	14	10	4,69
8	Ametrina	228,1	>	186,0	228,1	>	96,0	[M + H] ⁺	30	25	20	14,99
9	Azaconazole	300,1	>	158,9	300,1	>	230,9	[M + H] ⁺	30	25	16	13,93
10	Azametifós	325,0	>	111,9	325,0	>	138,9	[M + H] ⁺	25	35	24	11,32
11	Azinfós-Etílico	345,5	>	131,8	345,5	>	159,8	[M + H] ⁺	15	18	10	15,80
12	Azinfós-Metilico	318,0	>	131,9	318,0	>	104,2	[M + H] ⁺	15	24	16	14,25
13	Azoxistrobina (s)	404,1	>	372,0	404,1	>	328,9	[M + H] ⁺	15	30	16	14,11
14	Benalaxil	325,9	>	147,9	325,9	>	293,9	[M + H] ⁺	20	20	20	16,56
15	Boscalida	343,0	>	307,0	343,0	>	271,2	[M + H] ⁺	30	30	20	14,69
16	Bromuconazol (s)	376,0	>	70,1	376,0	>	158,9	[M + H] ⁺	35	25	35	15,47

Continua

Cont. Tabela 1

Nº	Substância	Transição Quantificação MRM		Transição Confirmação MRM		Espécie do Íon Precursor	Espécie do Íon Precursor	Voltagem do Cone (V)	Energia de Colisão Quant. (eV)	Energia de Colisão Confirm. (eV)	Tr (min)	
17	Bupirimate	316,8	>	107,6	316,8	>	271,7	[M + H] ⁺	35	25	20	16,18
18	Bupropenzina (s)	306,1	>	201,0	306,1	>	115,9	[M + H] ⁺	20	16	12	17,95
19	Butocarboxim Sulfóxido	207,0	>	88,0	207,0	>	75,0	[M + H] ⁺	20	10	10	4,42
20	Cadusafós	271,4	>	159,0	271,4	>	215,0	[M + H] ⁺	25	15	10	17,27
21	Carbaril	219,0	>	144,9	219,0	>	126,9	[M + NH4] ⁺	10	35	16	12,45
22	Carbendazim (s)	192,0	>	159,9	192,0	>	132,0	[M + H] ⁺	25	30	16	10,23
23	Carbofurano	222,1	>	122,9	222,1	>	164,9	[M + H] ⁺	25	25	12	11,82
24	Carbossulfano (s)	381,0	>	160,0	381,0	>	118,0	[M + H] ⁺	30	20	15	20,22
25	Ciazofamida	324,6	>	107,6	324,6	>	260,7	[M + H] ⁺	20	15	10	15,71
26	Cimoxanil	199,0	>	127,9	199,0	>	110,9	[M + H] ⁺	20	18	10	9,51
27	Ciproconazol (s)	292,1	>	70,1	292,1	>	124,9	[M + H] ⁺	25	18	30	15,29
28	Ciprodinil	226,1	>	92,9	226,1	>	107,9	[M + H] ⁺	45	35	25	17,08
29	Ciromazina	166,8	>	60,0	166,8	>	124,8	[M + H] ⁺	30	18	18	5,14
30	Clofentezina	303,0	>	137,9	303,0	>	101,9	[M + H] ⁺	20	35	14	17,27
31	Clorbromuron	294,5	>	205,6	294,5	>	181,6	[M + H] ⁺	25	20	20	15,18
32	Clorfenvinfós	359,0	>	98,8	359,0	>	126,9	[M + H] ⁺	25	24	22	16,56
33	Clorpirifós (s)	349,5	>	197,7	349,5	>	96,7	[M + H] ⁺	20	30	21	18,52
34	Clotianidina (s)	250,0	>	168,9	250,0	>	131,8	[M + H] ⁺	20	14	14	7,96
35	Coumafós	363,0	>	307,0	363,0	>	289,0	[M + H] ⁺	26	16	24	16,66
36	Cresoxim-Metílico (s)	313,7	>	266,7	313,7	>	115,7	[M + H] ⁺	15	15	5	16,37
37	Demeton-S-Metílico	230,7	>	88,9	230,7	>	61,1	[M + H] ⁺	12	30	10	12,11
38	Desmedifam	318,2	>	181,9	318,2	>	135,9	[M + NH4] ⁺	20	30	14	13,61
39	Diazinona	305,1	>	169,0	305,1	>	96,9	[M + H] ⁺	25	35	22	16,75
40	Diclorvós	220,9	>	126,9	220,9	>	108,8	[M + H] ⁺	25	18	18	11,85
41	Difenoconazol (s)	406,1	>	250,9	406,1	>	187,8	[M + H] ⁺	35	40	25	17,16
42	Dimetoato	230,0	>	198,8	230,0	>	124,8	[M + H] ⁺	20	22	10	8,78
43	Dimetomorfe	388,1	>	300,9	388,1	>	165,0	[M + H] ⁺	35	30	20	14,93
44	Diniconazol	326,1	>	70,1	326,1	>	158,9	[M + H] ⁺	35	25	30	17,19
45	Dissulfotom	274,7	>	61,0	274,7	>	88,8	[M + H] ⁺	12	35	10	17,27
46	Diurum (s)	233,0	>	72,0	233,0	>	159,9	[M + H] ⁺	25	18	25	13,92
47	Dodemorfe	282,3	>	115,9	282,3	>	97,9	[M + H] ⁺	40	29	21	24,60
48	Epoconazol (s)	330,1	>	120,9	330,1	>	122,9	[M + H] ⁺	35	25	20	15,80
49	Espinosade A (s)	732,6	>	142,0	732,6	>	98,1	[M + H] ⁺	50	59	31	22,60
	Espinosade D (s)	746,5	>	142,0	746,5	>	98,1	[M + H] ⁺	45	55	31	23,78
50	Etiofencarbe-Sulfona	275,1	>	106,9	275,1	>	201,0	[M + NH4] ⁺	15	22	10	7,17
51	Etiofencarbe-Sulfóxido	242,1	>	106,9	242,1	>	184,9	[M + H] ⁺	15	25	10	7,35
52	Etiona	384,6	>	198,7	384,6	>	142,7	[M + H] ⁺	20	25	10	18,01
53	Etiprole	414,1	>	350,9	414,1	>	396,9	[M + NH4] [±]	15	25	9	14,38
54	Etirimol	210,1	>	97,9	210,1	>	140,0	[M + H] ⁺	40	25	22	13,87

Continua

Cont. Tabela 1

Nº	Substância	Transição Quantificação MRM		Transição Confirmação MRM		Espécie do Íon Precursor		Espécie do Íon Precursor	Voltagem do Cone (V)	Energia de Colisão Quant. (eV)	Energia de Colisão Confirm. (eV)	Tr (min)
55	Etoprofós	243,0	>	131,0	243,0	>	97,0	[M + H] ⁺	25	30	20	15,88
56	Etrinfós	293,0	>	265,0	293,0	>	125,0	[M + H] ⁺	35	25	15	16,75
57	Famoxadona	391,7	>	330,8	391,7	>	237,7	[M + NH ₄] ⁺	15	18	10	16,28
58	Fenamidona	312,1	>	92,0	312,1	>	236,1	[M + H] ⁺	25	25	14	14,57
59	Fenamifós	304,1	>	216,9	304,1	>	201,9	[M + H] ⁺	30	35	24	15,91
60	Fenarimol (s)	330,6	>	267,6	330,6	>	80,8	[M + H] ⁺	30	25	25	15,63
61	Fenazaquina	307,2	>	57,2	307,2	>	161,0	[M + H] ⁺	30	25	19	20,87
62	Fenbuconazole	336,8	>	69,8	336,8	>	124,7	[M + H] ⁺	30	20	25	15,71
63	Fenhexamide	301,9	>	96,8	301,9	>	55,0	[M + H] ⁺	35	40	25	15,47
64	Fenoxicarbe	302,1	>	88,0	302,1	>	115,9	[M + H] ⁺	20	18	12	15,99
65	Fenpiroximato	422,3	>	366,1	422,3	>	134,9	[M + H] ⁺	30	17	31	19,17
66	Fenpropimorfe	304,2	>	147,0	304,2	>	130,0	[M + H] ⁺	45	25	31	21,71
67	Fentiona	279,0	>	168,9	279,0	>	104,9	[M + H] ⁺	25	25	18	16,54
68	Fentiona Sulfóxido	294,7	>	108,9	294,7	>	279,7	[M + H] ⁺	30	30	15	12,11
69	Fluazifope-P-Butílico (s)	384,0	>	282,0	384,0	>	328,0	[M + H] ⁺	25	25	20	17,51
70	Flufenacete	364,1	>	193,9	364,1	>	151,9	[M + H] ⁺	20	18	10	15,47
71	Fluquinconazol (s)	375,7	>	348,8	375,7	>	107,9	[M + H] ⁺	35	40	20	15,55
72	Flusilazole	316,1	>	247,0	316,1	>	165,0	[M + H] ⁺	35	25	18	15,91
73	Flutriafol (s)	302,1	>	70,1	302,1	>	122,9	[M + H] ⁺	25	16	30	13,10
74	Fosalona	368,0	>	182,0	368,0	>	111,0	[M + H] ⁺	25	45	15	16,84
75	Fosmete	317,9	>	159,9	317,9	>	132,9	[M + H] ⁺	20	40	20	14,25
76	Fostiazato	284,1	>	103,9	284,1	>	227,8	[M + H] ⁺	20	22	10	12,79
77	Furatiocarbe	383,2	>	194,9	383,2	>	252,0	[M + H] ⁺	25	18	12	17,69
78	Hexitiazoxi	352,8	>	227,8	352,8	>	167,8	[M + H] ⁺	20	25	15	18,43
79	Imazalil	297,1	>	69,1	297,1	>	158,9	[M + H] ⁺	35	18	24	16,75
80	Imidacloprido (s)	256,1	>	174,9	256,1	>	209,0	[M + H] ⁺	25	20	12	7,65
81	Indoxacarbe	528,1	>	202,9	528,1	>	217,9	[M + H] ⁺	30	40	25	16,75
82	Iprovalicarbe	321,2	>	118,9	321,2	>	203,0	[M + H] ⁺	20	18	10	15,38
83	Isoprotilolane	291,1	>	188,8	291,1	>	230,9	[M + H] ⁺	20	22	12	15,08
84	Isoxaflutol	359,5	>	250,6	359,5	>	220,0	[M + H] ⁺	20	35	15	13,34
85	Isoxationa	313,7	>	104,7	313,7	>	285,5	[M + H] ⁺	20	15	10	16,83
86	Linuron (s)	249,0	>	159,9	249,0	>	181,9	[M + H] ⁺	20	20	16	14,87
87	Malationa	331,0	>	126,9	331,0	>	98,9	[M + H] ⁺	20	25	12	14,93
88	Mefenacete	299,1	>	147,9	299,1	>	119,9	[M + H] ⁺	20	25	16	15,38
89	Mefosfolan	270,0	>	139,8	270,0	>	195,9	[M + H] ⁺	35	25	14	11,41
90	Mepronil	270,1	>	118,9	270,1	>	91,0	[M + H] ⁺	30	40	25	15,08
91	Metalaxil	280,1	>	220,0	280,1	>	192,0	[M + H] ⁺	25	18	12	13,44
92	Metamidofós (s)	141,9	>	93,9	141,9	>	124,8	[M + H] ⁺	30	12	14	3,94
93	Metconazol (s)	320,1	>	70,1	320,1	>	124,8	[M + H] ⁺	35	18	40	16,83

Continua

Cont. Tabela 1

Nº	Substância	Transição Quantificação MRM		Transição Confirmação MRM		Espécie do Íon Precursor		Espécie do Íon Precursor	Voltagem do Cone (V)	Energia de Colisão Quant. (eV)	Energia de Colisão Confirm. (eV)	Tr (min)
94	Metidationa	303,0	>	84,9	303,0	>	144,8	[M + H] ⁺	20	22	12	14,05
95	Metiocarbe	226,1	>	121,0	226,1	>	168,9	[M + H] ⁺	20	20	10	14,82
96	Metiocarbe Sulfona	275,1	>	121,9	275,1	>	200,9	[M + NH ₄] ⁺	15	24	14	8,84
97	Metiocarbe Sulfoxido	242,1	>	184,9	242,1	>	121,9	[M + H] ⁺	25	30	14	7,91
98	Metobromuron	258,5	>	147,7	258,5	>	169,6	[M + H] ⁺	20	15	20	13,44
99	Metomil (s)	162,9	>	105,9	162,9	>	88,0	[M + H] ⁺	15	10	10	6,25
100	Metoxifenoazida (s)	368,8	>	148,7	368,8	>	312,8	[M + H] ⁺	15	15	10	14,93
101	Mevinfós	225,0	>	193,0	225,0	>	127,0	[M + H] ⁺	20	15	10	8,42
102	Miclobutanil (s)	289,1	>	70,1	289,1	>	124,9	[M + H] ⁺	30	18	30	15,08
103	Monocrotofos	224,0	>	126,8	224,0	>	97,9	[M + H] ⁺	20	14	16	6,52
104	Ometoato	214,0	>	124,8	214,0	>	182,8	[M + H] ⁺	25	22	10	4,52
105	Oxadixil	279,1	>	219,0	279,1	>	132,3	[M + H] ⁺	20	25	12	10,51
106	Oxamil-Oxima	162,9	>	72,0	162,9	>	89,9	[M + H] ⁺	20	12	16	4,62
107	Paclobutrazol	294,1	>	70,0	294,1	>	124,9	[M + H] ⁺	30	18	35	14,92
108	Pencicuirom	329,1	>	124,9	329,1	>	218,0	[M + H] ⁺	30	30	16	17,01
109	Picoxistrobina (s)	368,1	>	144,9	368,1	>	204,9	[M + H] ⁺	15	25	10	15,88
110	Pimetrozina	218,1	>	104,9	218,1	>	78,3	[M + H] ⁺	30	35	18	6,07
111	Butóxido de Piperonila	356,3	>	176,9	356,3	>	119,0	[M + NH ₄] ⁺	20	37	11	18,20
112	Piraclostrobina (s)	388,1	>	163,0	388,1	>	193,9	[M + H] ⁺	25	25	12	16,75
113	Pirazofós	374,0	>	222,0	374,0	>	194,0	[M + H] ⁺	40	35	20	17,08
114	Piridabem	365,2	>	147,0	365,2	>	309,0	[M + H] ⁺	25	27	13	19,59
115	Piridafentiona	341,1	>	188,9	341,1	>	92,0	[M + H] ⁺	35	40	25	15,18
116	Pirifenoxi	295,1	>	92,9	295,1	>	66,1	[M + H] ⁺	35	40	22	16,07
117	Pirimetanil	200,1	>	106,9	200,1	>	82,0	[M + H] ⁺	45	25	25	15,38
118	Pirimicarbe	239,1	>	72,0	239,1	>	182,0	[M + H] ⁺	30	20	16	13,20
119	Pirimifós-Etílico	333,5	>	197,7	333,5	>	305,5	[M + H] ⁺	35	25	18	18,11
120	Pirimifós-Metílico	306,1	>	107,9	306,1	>	67,1	[M + H] ⁺	30	40	30	17,08
121	Piriproxifem (s)	322,2	>	95,9	322,2	>	184,9	[M + H] ⁺	25	15	23	18,38
122	Procloraz	376,0	>	308,0	376,0	>	266,0	[M + H] ⁺	20	15	15	17,01
123	Profenofós (s)	374,8	>	304,6	374,8	>	346,7	[M + H] ⁺	25	20	15	17,82
124	Propargito	368,3	>	231,1	368,3	>	175,0	[M + NH ₄] ⁺	20	15	11	18,43
125	Propiconazol (s)	342,1	>	158,9	342,1	>	69,1	[M + H] ⁺	35	20	30	16,66
126	Propizamida	255,6	>	189,6	255,6	>	172,6	[M + H] ⁺	25	25	15	15,29
127	Propoxur	210,1	>	110,9	210,1	>	92,9	[M + H] ⁺	15	25	12	11,73
128	Quinalfós	298,8	>	162,8	298,8	>	146,8	[M + H] ⁺	25	20	25	16,56
129	Tebuconazol (s)	307,8	>	124,7	307,8	>	69,9	[M + H] ⁺	30	20	35	16,37
130	Tebuconazole (s)	352,8	>	132,9	352,8	>	296,8	[M + H] ⁺	10	20	10	15,88
131	Tebuconazole (s)	334,2	>	116,9	334,2	>	144,9	[M + H] ⁺	45	35	25	17,88
132	Terbufós	289,0	>	103,0	289,0	>	57,0	[M + H] ⁺	10	10	10	18,01
133	Tetraconazol (s)	372,0	>	158,9	372,0	>	70,1	[M + H] ⁺	35	22	35	15,38

Continua

Cont. Tabela 1

Nº	Substância	Transição Quantificação MRM		Transição Confirmação MRM		Espécie do Íon Precursor	Espécie do Íon Precursor	Voltagem do Cone (V)	Energia de Colisão Quant. (eV)	Energia de Colisão Confirm. (eV)	Tr (min)	
134	Tiabendazol (s)	202,0	>	174,9	202,0	>	130,9	[M + H] ⁺	45	30	25	12,15
135	Tiacloprido (s)		>	125,8	253,0	>	90,0	[M + H] ⁺	35	40	20	9,57
136	Tiametoxam (s)	292,1	>	210,9	292,1	>	180,9	[M + H] ⁺	20	22	12	6,43
137	Tiodicarbe (s)	355,0	>	87,9	355,0	>	107,9	[M + H] ⁺	20	16	16	12,59
138	Tiofanox-Sulfona	268,1	>	76,0	268,1	>	57,2	[M + NH ₄] ⁺	10	12	10	8,02
139	Triazofós (s)	314,1	>	161,9	314,1	>	118,9	[M + H] ⁺	25	35	18	15,29
140	Triclorfom	256,9	>	108,8	256,9	>	126,8	[M + H] ⁺	25	20	18	8,73
141	Trifloxistrobina (s)	409,2	>	185,9	409,2	>	145,0	[M + H] ⁺	25	40	14	17,01
142	Triflumizol	346,1	>	278,0	346,1	>	73,1	[M + H] ⁺	15	18	10	17,43
143	Vamidotiona	287,7	>	145,8	287,7	>	117,5	[M + H] ⁺	20	25	12	8,20
144	Zoxamida	336,0	>	186,9	336,0	>	158,9	[M + H] ⁺	30	40	25	16,75

do trabalho foram: balanças analíticas modelos XP205 e AG245 (precisão de 5 casas decimais) fabricante Mettler Toledo (EUA), agitador modelo MS3 Digital e processador de sólidos modelo M20 fabricante IKA (EUA), banho ultrassom modelo 2510RMTM fabricante Branson Ultrasonics (EUA), centrífuga modelo T16 fabricante Beckman, liquidificador industrial modelo 36BL55 fabricante Ametek (EUA) e unidade de evaporação com fluxo de nitrogênio modelo Reacti Therm III Reacti Vap III fabricante Thermo Fisher Cientific (EUA).

Os gases utilizados para o estudo foram o nitrogênio e o argônio com pureza maior que 99,995 % e 99,999 %, respectivamente.

Método de extração QuEChERS-acetato

O método multirresíduo QuEChERS-acetato foi utilizado para a validação nas matrizes soja e extrato solúvel de soja adquiridas em mercado local^{19,21}.

Para a matriz soja foi feita a extração de 2 g de amostra com 3 mL de água adicionados à 15 mL de uma solução de acetonitrila com 1 % de ácido acético glacial. Após agitação foi adicionado 6 g de sulfato de magnésio anidro e 1,5 g de acetato de sódio e novamente agitado seguido de uma centrifugação (3000 RPM, 5 min, 20 °C). Em uma alíquota de 2 mL do sobrenadante foi adicionado 100 mg de sulfato de magnésio anidro e 50 mg de PSA sendo promovidas uma nova agitação e centrifugação (3000 RPM, 5 min, 20 °C). Após este procedimento 1 mL do sobrenadante foi evaporado sob atmosfera de nitrogênio e o resíduo foi reconstituído com metanol. Esta solução foi filtrada em filtro para

solventes orgânicos com tamanho de partícula 0,22 µm e injetado no cromatógrafo líquido com detector por massas sequencial.

Para a matriz extrato solúvel de soja o processo se inicia com a extração de 15 g de amostra direto com a solução de acetonitrila com 1 % de ácido acético. O restante do procedimento segue a mesma sequência anteriormente descrita.

Validação do método QuEChERS-acetato

Os parâmetros avaliados no processo de validação do método foram: seletividade, linearidade, faixa de trabalho e faixa linear, exatidão (recuperação) e precisão (repetitividade), limite de detecção e de quantificação.

A seletividade foi verificada analisando-se uma amostra de soja e outra de extrato solúvel de soja. Ambas foram avaliadas quanto à presença de interferentes das substâncias selecionadas para o estudo. Foram preparadas soluções em metanol nas concentrações nominais anteriormente descritas para determinação da faixa de trabalho das curvas analíticas. Foram evaporados 1 mL do extrato branco da soja e do extrato solúvel de soja e adicionados aos resíduos da evaporação os pontos das curvas analíticas sendo assim feita a avaliação das curvas analíticas nas duas matrizes. Para determinação da faixa de trabalho linear das curvas analíticas, foram considerados valores adequados de $R^2 \geq 0,95$ e $r \geq 0,98$, regressão linear significativa ($p < 0,001$) e homogeneidade dos resíduos ($\alpha = 0,05$). O efeito matriz foi calculado considerando-se as curvas preparadas em metanol e nas matrizes soja e extrato solúvel de soja. Foi utilizada

a planilha desenvolvida por Bazilio et al¹⁴ para todos os cálculos de linearidade das curvas analíticas.

Para a avaliação da exatidão (recuperação) e precisão (repetitividade) foram utilizados ensaios de fortificação com as amostras avaliadas anteriormente no parâmetro seletividade. A amostra de soja foi fortificada em dois níveis nas concentrações nominais de 0,01 e 0,2 mg.kg⁻¹ com quatro replicatas de cada nível. Para a amostra de extrato solúvel de soja também foram fortificados dois níveis, porém com concentrações nominais de 0,01 e 0,03 mg.kg⁻¹ em quatro replicatas de cada nível. Foram pesadas oito amostras de soja com duas gramas. Essas amostras foram separadas em dois grupos de quatro amostras. No primeiro grupo foram adicionados a cada uma das quatro amostras uma solução de fortificação de concentração nominal de 0,02 µg.mL⁻¹ correspondendo ao 1º nível de fortificação com quatro replicatas na concentração nominal final de 0,01 mg.kg⁻¹. Para obtenção desse nível de fortificação a alíquota de evaporação foi de 2 mL. No segundo grupo de amostras foram adicionados a cada uma das quatro amostras uma solução de fortificação de 0,2 µg.mL⁻¹ correspondendo ao 2º nível de fortificação com quatro replicatas na concentração nominal final de 0,2 mg.kg⁻¹. Para obtenção desse nível de fortificação o volume de acetoneitrila adicionado foi de 10 mL. Para o extrato solúvel de soja foram pesadas também oito amostras de soja com quinze gramas. Essas amostras foram separadas em dois grupos de quatro amostras. No primeiro grupo foram adicionados a cada uma das quatro amostras uma solução de fortificação de concentração nominal de 0,02 µg.mL⁻¹ correspondendo ao 1º nível de fortificação com quatro replicatas na concentração nominal final de 0,01 mg.kg⁻¹. No segundo grupo de amostras foram adicionados a cada uma das quatro amostras uma solução de fortificação de 0,2 µg.mL⁻¹ correspondendo ao 2º nível de fortificação com quatro replicatas na concentração nominal final de 0,03 mg.kg⁻¹. Os critérios de aceitação para esses parâmetros de desempenho, definidos pelo SANCO¹⁸ são limites de 70 a 120 % de recuperação e valores aceitáveis de DPR(%) ou CV(%) ≤ 20 %. O limite de quantificação foi definido como sendo a menor concentração adicionada na matriz que obteve resultado satisfatório para os parâmetros de linearidade, exatidão, precisão e uma relação S/R maior que 10.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Avaliação das curvas analíticas

Das cento e quarenta e quatro substâncias estudadas, quatro delas (benalaxil, dodemorfe, espinosade e quinalfós) apresentaram resultados insatisfatórios de acordo com a avaliação dos critérios estabelecidos nas condições analíticas do trabalho. O mesmo comportamento das substâncias nas curvas preparadas em solvente e nas preparadas na matriz soja foi observado. Para a curva preparada na matriz extrato solúvel de soja três substâncias (dissulfotom, fentiona e pirifenoxi) apresentaram resultados insatisfatórios além das quatro já observadas no estudo da matriz soja.

As substâncias com resultados satisfatórios para todos os critérios estabelecidos representaram 97 % (140) da totalidade para a soja e 95 % (137) para o extrato solúvel de soja.

As curvas analíticas estudadas demonstraram ser adequadas para o estudo de acordo com os critérios estabelecidos. Além da quantificação com curvas o documento do SANCO¹⁸ também permite a quantificação através de um cálculo pontual, ou seja, com apenas um ponto da curva, os critérios estabelecidos pelo documento são: o ponto pode ter uma concentração com uma variação permitida de ± 20 % em relação à concentração da substância na amostra se o LMR é excedido, quando o LMR não é excedido essa variação pode ser de até ± 50 %.

Além disso, a quantificação pontual pode fornecer resultados mais fidedignos do que a quantificação com a curva analítica se a resposta do detector é variável com o tempo¹⁸.

Quanto ao efeito matriz, foi observado que em trinta e cinco (24 %) das substâncias possuíam tal interferência para a matriz soja e cinco (3 %) para a matriz extrato solúvel de soja.

Avaliação da exatidão, precisão e definição do limite de detecção e quantificação

Na matriz soja, das cento e quarenta e quatro substâncias estudadas, dezenove agrotóxicos (abamectina, carbossulfano, ciproconazol, ciromazina, clorfenvinfós, clorpirifós, diclorvós, dissulfotom, diurom, espinosade, fenazaquina, fentiona, fosmete, isoxaflutol, linuron, metamidofós, metomil, pirifenoxi e tiobencarbe) representando 13 % do total das substâncias selecionadas para o estudo obtiveram resultados insatisfatórios de acordo com os critérios estabelecidos para os ensaios

de exatidão e de precisão, dentre eles o ciproconazol e o espinosade que são permitidos para o uso na cultura. Para o extrato solúvel de soja quinze substâncias (abamectina, diclorvós, diuron, epoxiconazol, espinosade, etirimol, famoxadona, fenpiroximato, fentiona, fosmete, imazalil, isoprothiolana, isoxaflutol, pirimifós-etílico e terbufós) representando 10 % do total das substâncias selecionadas para o estudo tiveram o mesmo comportamento sendo que quatro delas (abamectina, diuron, epoxiconazol e espinosade) são permitidas para o uso na cultura da soja. Do total das cento e quarenta e quatro substâncias estudadas, setenta e cinco substâncias (52 % do total)

tiveram resultados satisfatórios para ambas as matrizes estudadas. Cinco (3,5 % do total) apenas para a matriz soja e quarenta e quatro (31 % do total) apenas para a matriz extrato solúvel de soja. Para a matriz soja oitenta substâncias (55 % do total) tiveram resultados satisfatórios enquanto que para a matriz extrato solúvel de soja o total foi de cento e dezenove substâncias (83 % do total). Estes resultados estão descritos nas Tabelas 2 e 3. A letra “s” ao lado do nome das substâncias indica o uso permitido para a cultura da soja.

Para as substâncias presentes nas Tabelas 4 e 5 a avaliação de exatidão e de precisão foi realizada

Tabela 2. Resultados da avaliação da exatidão, precisão e limite de detecção e quantificação para a matriz soja

Substância	Exatidão - Recuperação (%)		Precisão - Repetitividade CV (%)		Limite de Quantificação mg.kg ⁻¹
	1º Nível	2º Nível	1º Nível	2º Nível	
Aldicarbe	90	89	17	4	0,010
Aldicarbe Sulfona	80	89	12	4	0,010
Aldicarbe Sulfóxido	79	87	3	4	0,010
Ametrina	90	83	9	3	0,010
Azaconazole	88	83	3	7	0,010
Azinfós-Metílico	79	92	8	9	0,010
Azoxistrobina (s)	90	95	1	6	0,010
Boscalida	77	83	12	12	0,010
Buprofenzina (s)	80	88	4	8	0,010
Butocarboxim Sulfóxido	83	89	3	4	0,010
Cadusafós	88	94	15	3	0,010
Carbaril	87	95	5	3	0,010
Carbendazim (s)	76	89	5	4	0,010
Carbofurano	84	89	1	3	0,010
Ciazofamida	86	102	14	5	0,011
Cimoxanil	78	82	8	7	0,010
Ciprodinil	101	90	1	1	0,010
Clotianidina (s)	83	108	2	5	0,010
Diazinona	118	92	5	2	0,014
Dimetomorfe	103	81	3	4	0,010
Diniconazol	89	79	3	9	0,012
Etiofencarbe-Sulfona	78	94	9	5	0,010
Etiofencarbe-Sulfóxido	77	90	3	4	0,008
Etiona	82	82	4	10	0,010
Etiprole	77	85	8	7	0,010
Fenamidona	77	94	5	4	0,010
Fenhexamide	86	70	8	8	0,010
Fenpiroximato	70	70	3	12	0,010

Cont. Tabela 2

Substância	Exatidão - Recuperação (%)		Precisão - Repetitividade CV (%)		Limite de Quantificação mg.kg ⁻¹
	1º Nível	2º Nível	1º Nível	2º Nível	
Fenpropimorfe	81	83	1	5	0,010
Fentiona Sulfóxido	83	89	6	5	0,010
Flufenacete	85	90	1	7	0,010
Fluquinconazol (s)	75	89	10	10	0,010
Flusilazole	89	87	5	3	0,011
Flutriafol (s)	73	92	5	4	0,010
Fosalona	106	100	3	8	0,010
Fostiazato	83	93	3	3	0,010
Furatiocarbe	110	86	5	6	0,010
Hexitiazoxi	86	70	5	7	0,010
Imazalil	76	70	16	9	0,010
Imidacloprido (s)	86	93	6	3	0,010
Iprovalicarbe	88	113	7	9	0,010
Isoprothiolane	80	97	10	7	0,010
Isoxationa	91	88	5	8	0,010
Malationa	106	92	4	8	0,010
Mefenacete	90	96	2	7	0,010
Mefosfolan	89	93	3	4	0,011
Mepronil	118	95	3	4	0,010
Metalaxil	86	102	1	4	0,010
Metconazol (s)	83	90	6	4	0,010
Metiocarbe	78	87	5	5	0,010
Metobromuron	82	95	8	3	0,010
Ometoato	78	84	4	3	0,010
Oxadixil	95	100	2	1	0,010
Oxamil-Oxima	71	90	5	5	0,010
Pencicuirom	84	97	2	4	0,010
Butóxido de Piperonila	82	73	3	9	0,010
Piraclostrobina (s)	119	95	4	5	0,010
Pirazofós	110	76	4	2	0,010
Piridabem	83	75	1	7	0,010
Piridafentiona	107	90	1	2	0,010
Pirimetanil	89	91	13	4	0,005
Pirimicarbe	87	96	3	3	0,010
Pirimifós-Etílico	85	81	10	10	0,010
Pirimifós-Metílico	99	98	2	6	0,010
Piriproxifem (s)	73	76	4	12	0,010
Procloraz	90	86	3	9	0,010
Profenofós (s)	77	71	5	6	0,010
Propargito	80	83	5	8	0,009
Propiconazol (s)	97	88	3	7	0,010

Continua

Cont. Tabela 2

Substância	Exatidão - Recuperação (%)		Precisão - Repetitividade CV (%)		Limite de Quantificação mg.kg ⁻¹
	1º Nível	2º Nível	1º Nível	2º Nível	
Propoxur	88	85	3	9	0,011
Tebufenpirade	74	75	4	13	0,010
Terbufós	87	93	4	13	0,010
Tetraconazol (s)	86	91	5	8	0,005
Tiabendazol (s)	74	75	9	5	0,010
Tiacloprido (s)	93	94	7	7	0,010
Tiofanox-Sulfona	81	98	3	4	0,010
Triazofós (s)	114	90	3	6	0,010
Trifloxistrobina (s)	107	92	2	4	0,010
Triflumizol	93	88	2	9	0,011
Vamidotiona	81	94	6	3	0,020

Tabela 3. Resultados da avaliação da exatidão, precisão e limite de detecção e quantificação para a matriz extrato solúvel de soja

Substância	Exatidão - Recuperação (%)		Precisão Repetitividade CV (%)		Limite de Quantificação mg.kg ⁻¹
	1º Nível	2º Nível	1º Nível	2º Nível	
3-Hidroxi-Carbofurano	96	85	3	6	0,012
Acefato (s)	90	78	2	8	0,014
Acetamiprido (s)	99	119	2	7	0,013
Aldicarbe	102	88	2	10	0,013
Aldicarbe Sulfona	99	82	1	5	0,013
Aldicarbe Sulfóxido	96	84	3	8	0,013
Ametrina	92	92	10	7	0,013
Azaconazole	97	101	2	12	0,013
Azametifós	94	86	1	6	0,013
Azinfós-Etílico	114	96	5	13	0,013
Azinfós-Metílico	102	88	3	8	0,013
Azoxistrobina (s)	102	91	1	6	0,013
Boscalida	94	84	5	11	0,013
Bromuconazol (s)	97	87	6	15	0,013
Bupirimate	111	101	4	10	0,013
Buprofenzina (s)	94	82	2	5	0,013
Butocarboxim Sulfóxido	91	80	4	7	0,013
Cadusafós	88	78	4	8	0,013
Carbaril	101	91	2	4	0,013
Carbendazim (s)	95	81	2	6	0,013
Carbofurano	100	88	2	6	0,013
Ciazofamida	95	108	4	5	0,014
Cimoxanil	101	89	7	7	0,013
Ciproconazol (s)	112	93	6	12	0,013

Continua

Cont. Tabela 3

Substância	Exatidão - Recuperação (%)		Precisão Repetibilidade CV (%)		Limite de Quantificação mg.kg ⁻¹
	1º Nível	2º Nível	1º Nível	2º Nível	
Ciprodinil	86	84	6	4	0,013
Ciromazina	79	70	2	6	0,014
Clofentezina	100	88	18	16	0,013
Clorbromuron	103	84	7	12	0,013
Clorpirifós (s)	88	76	9	12	0,013
Clotianidina (s)	100	93	4	5	0,013
Coumafós	84	84	5	11	0,013
Demeton-S-Metilico	91	83	3	5	0,012
Desmedifam	100	96	2	6	0,013
Diazinona	89	75	2	8	0,018
Difenoconazol (s)	102	84	2	3	0,013
Dimetoato	92	112	1	7	0,013
Dimetomorfe	104	81	4	8	0,013
Diniconazol	96	83	8	4	0,015
Etiofencarbe-Sulfona	102	87	2	7	0,013
Etiofencarbe-Sulfoxido	96	84	2	9	0,010
Etiona	99	81	2	4	0,013
Etiprole	105	82	6	5	0,013
Etoprofós	92	88	10	11	0,013
Etrinifós	75	80	4	7	0,012
Fenamidona	100	93	2	7	0,013
Fenamifós	102	89	2	5	0,013
Fenazaquina	91	92	4	7	0,013
Fenbuconazole	109	116	2	8	0,013
Fenhexamide	106	80	6	7	0,013
Fenoxicarbe	102	91	6	6	0,013
Fenpropimorfe	97	86	3	6	0,013
Fentiona Sulfoxido	104	98	1	3	0,013
Fluazifope-P-Butílico (s)	98	92	2	5	0,013
Flufenacete	89	90	3	8	0,013
Fluquinconazol (s)	95	71	15	9	0,013
Flusilazole	116	94	7	8	0,014
Flutriafol (s)	99	93	2	6	0,013
Fosalona	103	99	4	7	0,013
Fostiazato	100	89	3	5	0,013
Furatiocarbe	97	84	4	5	0,013
Hexitiazoxi	96	81	8	4	0,013
Imidacloprido (s)	95	95	3	10	0,013
Indoxacarbe	112	88	9	11	0,013
Iprovalicarbe	103	91	2	5	0,013

Continua

Cont. Tabela 3

Substância	Exatidão - Recuperação (%)		Precisão Repetibilidade CV (%)		Limite de Quantificação mg.kg ⁻¹
	1º Nível	2º Nível	1º Nível	2º Nível	
Isoxationa	92	80	10	4	0,014
Linuron (s)	100	92	11	13	0,013
Malationa	102	99	4	6	0,013
Mefenacete	99	90	3	10	0,013
Mefosfolan	100	85	2	6	0,014
Mepronil	108	96	7	3	0,014
Metalaxil	103	90	2	8	0,013
Metamidofós (s)	70	70	3	5	0,015
Metconazol (s)	103	78	3	2	0,013
Metidationa	102	93	2	10	0,013
Metiocarbe	103	89	2	5	0,013
Metiocarbe Sulfona	95	93	2	6	0,010
Metiocarbe Sulfóxido	97	82	3	7	0,013
Metobromuron	106	100	2	5	0,013
Metomil (s)	100	87	2	7	0,013
Metoxifenoazida (s)	104	97	2	6	0,013
Mevinfós	81	82	6	7	0,013
Miclobutanil (s)	88	109	3	6	0,013
Monocrotofos	96	87	4	8	0,013
Ometoato	95	81	2	7	0,013
Oxadixil	99	86	2	6	0,013
Oxamil-Oxima	95	90	2	8	0,013
Paclobutrazol	108	85	1	7	0,015
Pencicuirom	97	87	2	4	0,013
Pimetrozina	89	82	1	6	0,014
Butóxido de Piperonila	98	82	2	2	0,014
Piraclostrobina (s)	101	81	2	5	0,013
Pirazofós	94	94	4	2	0,013
Piridabem	90	82	6	5	0,013
Piridafentiona	80	94	11	3	0,013
Pirimetanil	97	84	1	1	0,006
Pirimicarbe	97	92	3	6	0,013
Pirimifós-Metilico	108	81	3	5	0,013
Piriproxifem (s)	94	76	2	3	0,013
Procloraz	107	82	11	8	0,013
Profenofós (s)	97	78	5	5	0,013
Propargito	96	81	2	10	0,012
Propiconazol (s)	95	91	4	4	0,013
Propizamida	114	87	9	12	0,013
Propoxur	98	91	3	8	0,014

Continua

Cont. Tabela 3

Substância	Exatidão - Recuperação (%)		Precisão Repetibilidade CV (%)		Limite de Quantificação mg.kg ⁻¹
	1º Nível	2º Nível	1º Nível	2º Nível	
Tebuconazol (s)	93	97	13	9	0,013
Tebufenozide (s)	104	94	8	5	0,013
Tebufenpirade	99	76	3	5	0,014
Tetraconazol (s)	96	94	2	2	0,006
Tiabendazol (s)	99	90	1	5	0,013
Tiacloprido (s)	100	89	2	7	0,013
Tiametoxam (s)	102	93	3	8	0,007
Tiodicarbe (s)	99	92	1	8	0,013
Tiofanox-Sulfona	101	83	2	7	0,013
Triazofós (s)	88	94	3	10	0,013
Triclorfom	95	115	3	8	0,014
Trifloxistrobina (s)	95	90	8	7	0,013
Triflumizol	86	93	4	2	0,014
Vamidotiona	97	87	2	7	0,026
Zoxamida	112	84	7	7	0,012

utilizando os valores encontrados no apenas no 2º nível de fortificação destas substâncias. A letra “s” ao lado do nome das substâncias indica o uso permitido para a cultura da soja. Três substâncias (2,1 % do total) apresentaram resultados satisfatórios no 2º nível de

fortificação para as duas matrizes estudadas. Para a matriz soja apenas trinta e nove substâncias (27 % do total) apresentaram esse comportamento e duas (1,4 % do total) apenas para a matriz extrato solúvel de soja.

Tabela 4. Resultados da avaliação da exatidão, precisão e limite de detecção e quantificação avaliados no 2º nível de fortificação para a matriz soja

Substância	Exatidão - Recuperação (%)	Precisão - Repetibilidade CV (%)	Limite de Quantificação
	2º Nível	2º Nível	mg.kg ⁻¹
3-Hidroxi-Carbofurano	90	6	0,182
Acefato (s)	77	3	0,199
Acetamiprido (s)	92	7	0,188
Azametifós	87	3	0,184
Azinfós-Etílico	94	15	0,189
Bromuconazol (s)	83	1	0,190
Bupirimate	93	2	0,187
Clofentezina	90	18	0,187
Clorbromuron	103	11	0,187
Coumafós	91	8	0,188
Cresoxim-Metilico (s)	88	10	0,187
Demeton-S-Metilico	87	4	0,180
Desmedifam	92	3	0,187
Difenoconazol (s)	85	5	0,190

Continua

Cont. Tabela 4

Substância	Exatidão – Recuperação (%)	Precisão – Repetitividade CV (%)	Limite de Quantificação
	2º Nível	2º Nível	mg.kg ⁻¹
Dimetoato	98	3	0,187
Epoxiconazol (s)	85	2	0,190
Etirimol	78	11	0,189
Etoprofós	83	8	0,190
Etrinfós	82	9	0,178
Famoxadona	88	2	0,187
Fenamifós	99	5	0,188
Fenarimol (s)	83	11	0,188
Fenbuconazole	97	8	0,188
Fenoxicarbe	90	3	0,190
Fluazifope-P-Butílico (s)	90	4	0,187
Indoxacarbe	99	14	0,187
Metidationa	97	7	0,190
Metiocarbe Sulfona	86	4	0,140
Metiocarbe Sulfóxido	93	3	0,189
Metoxifenzida (s)	90	3	0,187
Mevinfós	90	9	0,192
Miclobutanil (s)	104	4	0,189
Monocrotofos	92	4	0,191
Paclobutrazol	89	3	0,215
Picoxistrobina (s)	93	8	0,204
Pimetrozina	76	4	0,202
Propizamida	91	11	0,191
Tebuconazol (s)	85	6	0,194
Tebufenozide (s)	99	12	0,187
Tiametoxam (s)	96	5	0,104
Triclorfom	89	6	0,203
Zoxamida	95	5	0,182

Tabela 5. Resultados da avaliação da exatidão, precisão e limite de detecção e quantificação avaliados no 2º nível de fortificação para a matriz extrato solúvel de soja

Substância	Exatidão – Recuperação (%)	Precisão – Repetitividade CV (%)	Limite de Quantificação
	2º Nível	2º Nível	mg.kg ⁻¹
Carbossulfano (s)	89	4	0,182
Clorfenvinfós	82	14	0,027
Cresoxim-Metílico (s)	77	8	0,026
Fenarimol (s)	81	18	0,026
Picoxistrobina (s)	90	7	0,028

Os resultados das recuperações obtidas encontraram-se dentro dos limites de 70 a 120 % definidos pelo SANCO¹⁸. E a precisão medida sob condições de repetitividade avaliada pelo coeficiente de variação (CV(%)) e/ou estimativa do desvio padrão relativo (DPR(%)) também encontraram-se dentro do limite de 20 %¹⁸. O limite de quantificação foi adequado para as substâncias estudadas, pois seus valores definidos estão abaixo dos LMR destas substâncias permitidas para a cultura da soja e dentro do limite de sensibilidade do equipamento.

O método estudado, para cento e quarenta e quatro substâncias, foi considerado adequado, contemplando todos os critérios estabelecidos (estudo de linearidade, avaliação da precisão e exatidão) para cento e vinte e duas substâncias (85 % do total) estudadas na matriz soja e cento e vinte e quatro (86 % do total) na matriz extrato solúvel de soja.

Dentro dos critérios estabelecidos a validação do método QuEChERS-acetato foi adequada, visto que contemplou mais de 80 % das substâncias selecionadas para o estudo. Em relação aos parâmetros de exatidão e precisão, a presença da matriz soja prejudicou a avaliação de um maior número de substâncias que na matriz extrato solúvel de soja. Também no parâmetro efeito matriz este foi observado em um maior número de substâncias na matriz soja em relação à matriz extrato solúvel de soja. Para as substâncias com resultados insatisfatórios nos parâmetros estudados modificações deverão ser feitas para adequação do método à análise destas substâncias.

O processo de validação da análise multirresíduo de agrotóxicos na matriz soja e extrato solúvel de soja é uma ferramenta a ser utilizada para atender aos limites definidos na legislação nacional e podendo ser aplicável a um maior número possível de substâncias em laboratórios que visam o monitoramento desses tipos de produtos alimentícios. Este processo proporciona subsídios aos órgãos regulatórios para verificar o uso dessas substâncias na prática agrícola e definir ações para controle e prevenção de possíveis danos à saúde da população consumidora dos alimentos produzidos.

CONCLUSÃO

No presente contexto, o desenvolvimento e otimização dos parâmetros da técnica analítica selecionada para o presente estudo demonstraram ser adequados para o método proposto dentro dos padrões

internacionais de qualidade. Os requisitos mínimos de validação analítica foram alcançados nas duas matrizes avaliadas. A aplicação do método QuEChERS-acetato nas matrizes soja e extrato solúvel de soja representam um avanço das análises multirresiduais aplicado no laboratório para cerca de cento e vinte e duas substâncias validadas na matriz soja e cento e vinte e quatro na matriz extrato solúvel de soja.

O presente trabalho possibilitou a validação deste método para aplicação nas matrizes soja e extrato solúvel de soja com a associação da técnica de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial permitindo o aumento do número de substâncias monitoradas em apenas uma análise.

REFERÊNCIAS

1. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento - MAPA. Soja. Disponível em: [<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/soja>].
2. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Soja - EMBRAPA SOJA. Dados Econômicos da Soja. Disponível em: [http://www.cnpso.embrapa.br/index.php?op_page=294&cod_pai=17].
3. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE. Levantamento Sistemático da Produção Agrícola. Disponível em: [http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa_201205_7.shtm].
4. Berno LI, Guimarães-Lopes TG, Canniatti-Brazaca SG. Avaliação da composição centesimal, digestibilidade e atividade inibitória de tripsina em produtos derivados de soja (glycine max). *Alim Nutr*.2007;18(3):277-82.
5. Anderson JW, Smith BM, Washnock CS. Cardiovascular and renal benefits of dry bean and soybean intake. *Am J Clin Nutr*.1999;70(supl):464S-74S.
6. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Monografias Autorizadas. Disponível em: [<http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/home/agrotoxicotoxicologia>].
7. Sobreira AEG, Adissi PJ. Agrotóxicos: falsas premissas e debates. *Ciênc Saúde Coletiva*.2003;8(4):985-90.
8. Pizzutti IR, De KoK A, Zanella R, Adaime MB, Hiemstra M, Wickert C et al. Method validation for the analysis of 169 pesticides in soya grain, without clean up, by liquid chromatography-tandem mass spectrometry using positive and negative electrospray ionization. *J Chromatogr A*.2007;1142:123-36.
9. Anastassiades M., Lehotay SL, Stajnbaher D, Schenck FJ. Fast and Easy ultiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "Dispersive Solid-Phase Extraction" for the determination of pesticide residues in produce. *J AOAC Int*.2003;86(2): 412-31.
10. Prestes OD, Friggi CA, Adaime MB, Zanella R. QUECHERS - Um método moderno de preparo de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas. *Quim Nova*.2009;32(6):1620-34.

11. Pizzutti IR, De KoK A, Hiemstra M, Wickert C, Prestes OD. Method validation and comparison of acetonitrile extraction for the analysis of 169 pesticides in soya grain by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*.2009;1216:4539-52.
12. Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia – INMETRO (Rio de Janeiro – Brasil). Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos: DOQ-CGCRE-008, rev. 01. Rio de Janeiro, 2003.
13. Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia – INMETRO (Rio de Janeiro – Brasil). Orientação sobre Validação de Métodos Analíticos: DOQ-CGCRE-008, rev. 04. Rio de Janeiro, 2011.
14. Bazilio FS, Bonfim MVJ, Almeida RJ, Abrantes SMP. Uso de planilha eletrônica na verificação da adequação de curva analítica ao modelo linear. *Analytica*.2012;59:60-7.
15. Ribani M, Bottoli, CBG, Collins CH, Jardim ICSF. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Quim Nova*.2004;27(5):771-80.
16. Souza SVC, Junqueira RG. A procedure to assess linearity by ordinary least squares method. *Anal Chim Acta*.2005;552(1-2):25-35.
17. Thompson M, Ellison SLR, Wood R. Harmonized guidelines for a single-laboratory validation of methods of analysis. *Pure Appl Chem*.2002;74:835-55.
18. Dg-Sanco. Method Validation and Quality Control Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed. Document No. SANCO/12495/2011 Disponível em: [http://ec.europa.eu/food/plant/protection/resources/qualcontrol_en.pdf].
19. Souza SVC. Procedimento para validação intralaboratorial de métodos de ensaio: delineamento e aplicabilidade em análises de alimentos [tese de doutorado]. Belo Horizonte (MG): Universidade Federal de Minas Gerais, 2007.
20. Cardoso MHW, Gouvêa AV, Nóbrega AW, Abrantes SMP. Validação de método para determinação de resíduos de agrotóxicos em tomate: uma experiência laboratorial. *Ciênc Tecnol Aliment*.2010;30(supl.1):63-72.
21. Prestes OD, Adaime MB, Zanella R. QuEChERS: possibilidades e tendências no preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos. *Scient Chromatogr*.2011;3(1):51-64.
22. Hiemstra M, De Kok A. Comprehensive multi-residue method for the target analysis of pesticides in crops using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*.2007;1154:3-25.
23. Pizzutti IR, Vreuls RJJ, De Kok A, Roehrs R, Martel S, Friggi CA et al. Design of a compressed air modulator to be used in comprehensive multidimensional gas chromatography and its application in the determination of pesticide residues in grapes. *J Chromatogr A*.2009;1216:3305-11.
24. Kovalczuk T, Lacina O, Jech M, Poustka J, Hajslova J. Novel approach to fast determination of multiple pesticide residues using ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). *Food Addit Contam*.2008;25(4):444-57.
25. Banerjee K, Oulkar DP, Dasgupta S, Patil SB, Patil SH, Savant R et al. Validation and uncertainty analysis of a multi-residue method for pesticides in grapes using ethyl acetate extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*.2007;1173:98-109.
26. Leandro CC, Hancock P, Fussell RJ, Keely BJ. Comparison of ultra-performance liquid chromatography and high-performance liquid chromatography for the determination of priority pesticides in baby foods by tandem quadrupole mass spectrometry. *J Chromatogr A*.2006;1103:94-101.
27. Pareja L, Cesio V, Heinzen H, Fernandez-Alba AR. Evaluation of various QuEChERS based methods for the analysis of herbicides and other commonly used pesticides in polished rice by LC-MS/MS. *Talanta*.2011;83(5):1613-22.
28. Mastovska K, Dorweiler KJ, Lehotay SJ, Wegscheid JS, Szpylka KA. Pesticide multiresidue analysis in cereal grains using modified QuEChers method combined with automated direct sample introduction GC-TOFMS and UPLC-MS/MS techniques. *J Agric Food Chem*.2010;58(10):5959-72.
29. Romero-Gonzalez R, Frenich AG, Vidal JM. Multiresidue method for fast determination of pesticides in fruit juices by ultraperformance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Talanta*.2008;76:211-25.
30. Mol HGJ, Plaza-Bolanos P, Zomer P, Rijk TC, Stolker AAM, Mulder PPJ. Toward a generic extraction method for simultaneous determination of pesticides, mycotoxins, plant toxins, and veterinary drugs in feed and food matrices. *Anal Chem*.2008;80:9450-9.
31. Durden DA. Positive and negative electrospray LC-MS-MS methods for quantitation of the antiparasitic endectocide drugs, abamectin, doramectin, emamectin, eprinomectin, ivermectin, moxidectin and selamectin in milk. *J Chromatogr B*.2007;850:134-46.
32. Agilent Technologies (Santa Clara - EUA). Multiresidue Analysis of 301 Pesticides in Food Samples by LC/Triple Quadrupole Mass Spectrometry: 5989-8614EN. Santa Clara, 2008.
33. Pang G, Cao Y, Zhang J, Fan C, Liu Y, Li X et al. Validation study on 660 pesticide residues in animal tissues by gel permeation chromatography cleanup/gas chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*.2006;1125(1):1-3
34. Waters (Milford – EUA). A rapid method for the screening and confirmation of over 400 pesticide residues in food: 720002628EN. Milford, 2012.
35. Fillâtre Y, Rondeau D, Jadas-Hécart A, Communal PY. Advantages of the scheduled selected reaction monitoring algorithm in liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry multi-residue analysis of 242 pesticides: a comparative approach with classical selected reaction monitoring mode. *Rapid Commun Mass Spectrom*.2010;24:2453-61.
36. Sack C, Smoker M, Chamkasem N, Thompson R, Satterfield G, Masse C et al. Collaborative Validation of the QuEChERS Procedure for the Determination of Pesticides in Food by LC-MS/MS. *J Agric Food Chem*.2011;59:6383-411.
37. Alder L. Residue analysis of 500 high priority pesticides: better by GC-MS or LC-MS/MS. *Mass Spectrom Rev*.2006;25:838-65.
38. Agilent Technologies (Santa Clara - EUA). Multiresidue Analysis of 301 Pesticides in Food Samples by LC/Triple Quadrupole Mass Spectrometry: 5991-1183EN. Santa Clara, 2012.
39. Chen G, Cao P, Liu R. A multi-residue method for fast determination of pesticides in tea by ultra performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry combined with modified QuEChERS sample preparation procedure. *Food Chem*.2011;125:1406-11.

Development and validation of analytical method for determining the artificial dyes in breakfast cereals by means of high performance liquid chromatography

Desenvolvimento e validação de método analítico para determinação de corantes artificiais em cereais matinais utilizando cromatografia líquida de alta eficiência

RIALA6/1589

Luana Limoeiro FERRÃO^{1*}, Shirley de Mello Pereira ABRANTES²

* Correspondence address: ¹Federal Rural University of Rio de Janeiro, Rod. BR 465, km 7, Seropédica, RJ, 23.890-000, Phone number: (21) 2682-1023, Fax: (21) 3787-3742, e-mail: lu.limoeiro@ig.com.br

²Department of Chemistry, National Institute of Quality Control in Health, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, RJ.

Recebido: 15.08.2013 - Aceito para publicação: 13.02.2014

ABSTRACT

Validation of analytical methodology is an important tool to ensure the applicability and scope of a technique for laboratory routine, establishing the limits of the quality parameters of instrumental measurements and the statistical reliability by estimating the procedure performance. There are several normative documents for establishing the figures of merit, namely, limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ), linearity, selectivity, repetitivity, intermediate precision and recovery. This work aimed at developing and validating an analytical methodology for quantifying the artificial dyes in cereal by means of high performance liquid chromatography (HPLC). All of the validation process of this study was performed according to the recommendations by Thompson et al, and following the guidance stated in the document INMETRO DOQ-CGCRE-08 and the harmonized Guidelines IUPAC. After completing all of the validation steps, the methodology showed to be precise, exact, linear over a wide concentration range and its analysis has not being influenced by the food matrix for HPLC determination. Moreover, the methodology has shown as an important contribution since no official methodologies have been available for determining artificial dyes in breakfast cereals.

Keyword. breakfast cereals, validation, artificial dyes.

RESUMO

A validação de metodologia analítica é uma importante ferramenta para assegurar a aplicabilidade e a abrangência de uma técnica na rotina laboratorial, estabelecendo-se os limites dos parâmetros de qualidade das medidas instrumentais e da confiabilidade estatística, por meio de estimativa das figuras de mérito. Existem vários documentos normativos que estabelecem essas figuras de mérito, sendo: limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), linearidade, efeito matriz, repetitividade, precisão intermediária e recuperação. Neste trabalho foi feita a elaboração e validação de um método analítico para quantificar corantes artificiais em cereal matinal por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Todo o processo de validação desta pesquisa foi realizado de acordo com o preconizado por Thompson et al utilizando-se as recomendações contidas no documento do INMETRO DOQ-CGCRE-08 e no Guia harmonizado IUPAC. Após o cumprimento de todas as etapas, o método mostrou ser preciso, exato, linear em ampla faixa de concentração, e sua análise não foi influenciada pela matriz alimentar na determinação por CLAE. Além disso, o método mostrou-se como contribuição importante em vista de não existirem metodologias oficiais para realizar a determinação de corantes artificiais em cereais matinais.

Palavras-chave. cereal matinal, validação, corantes artificiais.

INTRODUCTION

The consumption of breakfast cereals is growing 15-20 % a year, as the population is seeking healthier foods, rich in fiber and nutrients. The breakfast cereals are excellent sources of carbohydrates and also have vitamins, fiber and minerals such as iron, associated with low fat, being recommended to people of all ages³. As it is an industrialized food, it is not free from the presence of artificial colors. In a recent study, Mattos et al⁴, by applying the nutrition survey in relation to food consumption by children and adolescents, found that 13 % of respondents consume breakfast cereal / cereal bar once or more per day.

According to RDC Resolution No. 263 of September 22nd, 2005, the National Agency of Sanitary Surveillance (ANVISA)⁵, which approves technical standards for products of cereals, starches, flours and bran, these are processed cereals products obtained from grain laminates, cylindered, rolled, puffed, flocced, extruded, pre-cooked and/or other technological processes considered safe for food production, and may contain other ingredients as far as they do not mischaracterize the products. They can also present diverse coverage, shape and texture.

Another component that is allowed to the production of breakfast cereals are artificial colors, which provide wide range of colors, offering all shades of colors in the visible spectrum. Moreover, most of this type of colors has high stability, uniformity in color conferred, high tinctorial power, exemption from microbiological contamination and relatively low production cost⁶.

It is known that the use of chemical additives, including the artificial dyes, is one of the most controversial advances in food industry, due to all the toxicological aspects relating to these substances. With the increasing of the use of additives, countries began to establish laws to control their use, establishing specifications and criteria of use⁷.

In 1977, the use of artificial dyes was regulated by the Health Surveillance Secretariat of the Ministry of Health (SVS / MS), that it issued Resolution CNNPA No. 44, which established the general conditions of preparation, classification, presentation, description, composition and essential factors of quality of the colors used in food and beverages⁸. Brazil internalized national legislation on the basis of harmonized instruments in Mercosur related to food additives, of which we can

mention the GMC Resolution No. 19/93 (General List Harmonized Additives - Mercosur), GMC Resolution No. 14/93 (General List Harmonized Dye - Mercosur), GMC Resolution No. 101/94 (List of Food Additives with their Functional Class) and GMC Resolution No. 38/01 (Incorporation of Additives in Schedules Harmonized)⁹⁻¹².

The SVS / MS approved in 1997 and Ordinance No. 540, which establishes Technical Regulations for food additives, with appropriate definitions, classification and employment¹³. Additives authorized for human use are divided into 23 groups, among them, the artificial colors. This ordinance allows the use of the following colors: Sunset Yellow (INS 110), Quinoline Yellow (INS 104); Carmoisine (INS 122), Brilliant Blue (INS 133), Patent Blue V (INS 131), Amaranth (INS 123); Erythrosine B (INS 127), Indigo Carmine (INS 132), Brown HT (INS 155); Bright Black (INS 151), New Coccine (INS 124), Tartrazine (INS 102), Allura Red (INS 129), Fast Green FCF (INS 143). The International Numbering System (INS) for Food Additives was developed by the Codex Committee on Food Additives and Contaminants in Foods to establish an international system of numerical identification of food additives in ingredient lists as an alternative to the statement of the specific name of the additive.

On August 5th, 1999, ANVISA, current agency of the Ministry of Health which operates in regulation, approved the use of food additives by establishing its functions and maximum limits for the different food groups, in this including the resolution No. 60 of 2007 (Cereals and products of or based on cereals), where it is allowed to use the following colors: Sunset Yellow, Allura Red and Brilliant Blue.¹⁴

The increasing of the food trade leads to a growing need to develop methods of analysis that are increasingly reliable, efficient and fast. For artificial color is not enough simply to detect the color, but each color, or mixture of these, must be detected and quantified individually, which has been hampered mainly by the lack of appropriate analytical methodologies¹⁵. Various separation techniques such as High performance liquid chromatography (HPLC), Gas Chromatography (GC) and Capillary Electrophoresis (CE) are being used to determine qualitatively and quantitatively the artificial color¹⁶. In Brazil, much still needs to be done to develop new analytical methods for the determination of artificial colors in food.

To ensure reliability of the analytical method, it must undergo an assessment also known as validation. According to ISO/IEC 17025¹⁷ validation: “is the confirmation by means of tests and presentation of objective evidences that certain requirements are met for a given intended use.”

The validation ensures applicability and scope of an analytical method for routine monitoring, establishing the limits of the quality parameters of instrumental measurements and statistical reliability by estimating the method performance¹⁸. A well defined and documented validation provides the regulatory agencies substantial evidence that the method and the systems fit the desired use¹⁹.

In order to standardize these procedures, the regulatory agencies of the United States, Japan and the European Union began to organize, since the 90s, the International Conference on Harmonization (ICH), establishing standards in research procedures and drug development. Also in the 90's the International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) published a guide validation in analytical chemistry²⁰. In this context ICH draws up a guide on method validation^{21, 22}. Among the international bodies that also have technical documents that define guidelines for validation of analytical methods we can cite the IUPAC, AOAC (Association of Official Analytical Chemists), ISO (International Standard Organization), and US-FDA (United States Food and Drug Administration)^{23, 24}.

For laboratories to have technical capability to perform an analytical test they must get an accreditation from accrediting agencies, which can be either national or international bodies. In Brazil today, the National Institute of Metrology, Quality and Technology (INMETRO) is the institution responsible for this accreditation, which uses as a tool the guidance on validation of analytical methods DOQ-CGCRE-0082. ANVISA also has the Resolution No 899 of May 29th 2003 as a guide for the procedure of the validation of analytical methods²⁵.

The validation of analytical methodology can occur in two distinctive ways: the intralaboratory validation and the interlaboratory one. The intralaboratory validation is indicated for the purpose of validation of new methods have been developed in the laboratory or to verify the application of the analytical method adopted by other sources. In this type of validation all figures of merit are measured, except reproducibility. On the other hand, interlaboratory validation evaluates all analytical performance parameters, obtained by collaborative

study, which involves several laboratories²⁶.

The validation of an analytical method is a constant and dynamic process. The entire validation process must be well defined and documented, resulting in documents that provide objective and overwhelming evidence that the measurement methodology developed or adapted is appropriate for the intended use. Thus, the validation should be well planned in order to have a satisfactory performance. In this context, Feinberg²⁷ proposes the following scheme for what he calls the life cycle of an analytical method, according to Figure 1.

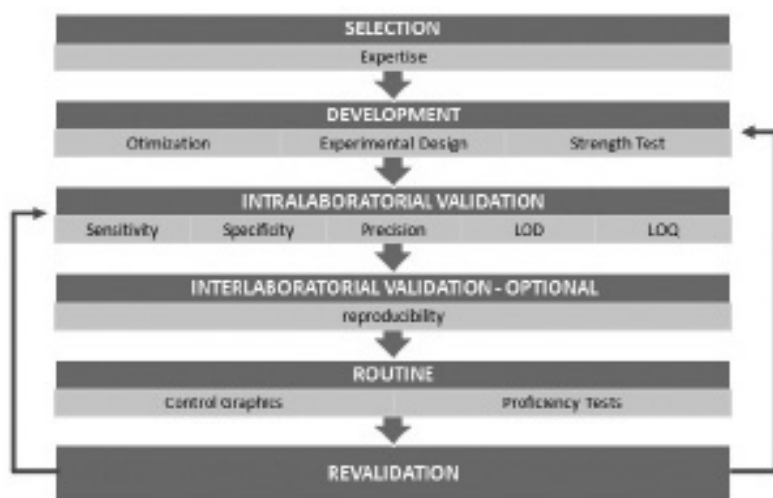


Figure 1. Life cycle of an analytical method

According to the document INMETRO DOQ-CGCRE-082, the parameters that must be determined in the validation process vary with the type of assay. For a quantitative analysis of minor elements and traces, it is necessary to calculate precision, selectivity, recovery, robustness, linearity, working range, the limit of detection (LOD) and the limit of quantification (LOQ).

This work aimed at the formulation and validation of an analytical method for quantification of artificial colors in cereal by High performance liquid chromatography (HPLC).

MATERIAL AND METHODS

All the validation process of this research was performed according to the recommendations by Thompson et al¹. The following validation parameters were evaluated: detection limit,

quantification limit, linearity, selectivity (matrix effect), repeatability, intermediate precision and recovery.

Materials

The patterns of the artificial colors Sunset Yellow, Allura Red and Brilliant Blue were purchased from Sigma provider, and the purity of each dye is respectively, 90 %, 80 % and 65 %. The chromatographic grade methanol which was employed was purchased from Tedia and other reagents (acetic acid PA, ammonium acetate PA, isopropyl alcohol PA, ammonium hydroxide PA and ethanol 96 %) from Merck.

The equipment used was a liquid of high efficiency chromatograph with gradient mode of operation, brand Waters, detector coupled with UV/vis WATERS-2487 (variable and dual wavelength) and reverse phase column Symmetry® C18 column (dimensions: 150 mm X 3.9 mm - 4 µmDI). The chromatographic data were analyzed using Empower 2 software.

Analytical Method

Chromatographic parameters

The mobile phase consisted of a solution of water / methanol 70:30 (v/v) and the conditioning phase consisted of a solution of aqueous 0.08 M ammonium acetate/ methanol 70:30 (v/v). Both were filtered on hydrophilic membrane of 0.45 µm and degassed before use. Analyses were performed at a temperature of 25 °C with a flow of 0.5 mL/min and injection volume of 20 µL. The duration of the analyzes were fixed in 20 minutes, using UV detection at 475 and 600 nm.

Preparation of Standard Stock Solutions

For each colors used in the experiment three stock solutions were prepared. In preparing the stock solutions of the color Sunset Yellow mass between 134.59 and 134.60 milligrams of standard were weighed. For the Allura Red color masses between 124.10 and 124.20 milligrams of the color pattern were weighed and for the Brilliant Blue masses between 166.17 and 166.19 milligrams were weighed. All solutions had their volume heightened in a 100 mL calibrated volumetric flask.

Sample Preparation

The determination of artificial colors was performed by the extraction of the color present in the food with an alcoholic solution of ammonia 10 % (v/v) to boiling repeatedly, then centrifuging this color

solution obtained by subsequent filtration in hydrophilic membrane and insulation through elution of aqueous isopropyl alcohol 60 % (v/v) in cartridges C18 SEP-PACK®. After complete evaporation of the isopropyl alcohol and the eluate dilution in water the sample is analyzed by HPLC, as follows:

Extraction of the colors contained in the sample

Weigh 30 g of sample, equivalent to a portion of cereal, separated by color, grinding to a thin powder. Weigh 5 g of the homogenized sample, add 20 mL of deionized water and mix with the aid of a glass rod. Add 40 mL of alcoholic solution of ammonium hydroxide 10 % and lead to a water bath at boiling point for 10 minutes. Remove from water bath and let stand until separating the precipitate, the supernatant is passed slowly to another beaker. Wash the precipitate several times in a water bath, in order to complete the volume to 90 mL or until filtrate leaves no more color in the supernatant. Centrifuge supernatant at 5,000 rpm for 20 minutes to separate the phases and filter the liquid portion in to hydrophilic membrane filter 0.45 µm. Complete the filtrate to 100 mL with deionized water in a volumetric flask calibrated. Take 20 mL in volumetric calibrated pipette, and put into the graduated test tube and evaporate to dryness, completing to 5 mL with deionized water. Bring to ultrasound for 10 minutes at 27 °C to ensure complete solubilization of the dye in water.

Treatment of the cartridge SEP-PAK® C18

Treat the cartridge SEP-PAK® C18 with 2 mL of isopropyl alcohol PA and then with 5 mL of aqueous solution of 1% acetic acid (v/v).

Isolation of color

Pass 5 mL of the solution of the extraction of the color sample in the cartridge SEP-PACK® C18 treated and subsequently extract the color that was retained with 10 mL of aqueous isopropyl alcohol 60 %. Evaporate all the alcohol and make up to volume of 10 mL with deionized water and bring to ultrasound for 10 minutes at 27 °C to ensure complete solubilization of the color in water. Finally, filter in a cartridge containing hydrophilic membrane filter of 0.45 µm (Millex®) and analyze in the chromatograph.

Validation of Analytical Method

Assays for the validation of the proposed method were performed according to the recommendations

contained in the document INMETRO DOQ-CGCRE-08² and the Guidelines harmonized IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry)¹.

The premises of validation are that the method should be applicable to specific analyte, the specific matrix in the maximum or minimum specific levels. Thus, the applicable range of the method depends on the minimum specified level (LM) to be evaluated, and may be expressed in terms of standard deviation for reproducibility (SR) calculated by the equation Horwitz²⁸ and Thompson et al¹ or in terms of limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ)²⁹. For the validation of the analytical method in question the minimum applicable range was calculated, from the LM of each color in analytical aliquot, following the recommendation of ANVISA described in Resolution 60/07¹⁴, from 0.03 g/100 g product to Sunset Yellow and 0.02 g/100 g product to Allura Red color and Brilliant Blue, taking into consideration the proposed analytical procedure and rate of analysis in question. Thus, the applicable minimum range was determined by the following formula:

$$LM \pm 0,06LMx(LM)^{-0,1505}$$

Where: LM = minimum specific level

The choice of this formula occurred because the final concentration of the analyte in question is above 0.1 mg/kg.

The next stage of the experimental design was to determine the LOD and LOQ. It is understood by LOD the lowest concentration of analyte present in a sample being analyzed which can be detected, but not necessarily quantified under the experimental conditions established². But the limit of LOQ is the smallest amount of analyte in a sample that can be determined with precision and trueness under the experimental conditions established. To determine these two values were used the following equations:

$$LOD \leq \frac{1}{10} xLM$$

$$LOQ \leq \frac{1}{5} xLM$$

Where: LOD = limit of detection
LOQ = limit of quantification
LM = minimum specific level

The linearity is the ability of the analytical method, within a given range, to obtain results which are proportional to the concentration of analyte in the sample, either directly or through mathematical calculations³⁰. Thus, the linearity of the analytical method developed was checked from the drafting of three curves, with seven levels of concentration for each color, according to the methodology proposed by Souza and Junqueira³¹. From the values found for the applicable minimum track and taking into account LOQ and LOD were established the seven concentration points of the analytical curve, so that they were equispaced. Thus, each stock solution was diluted in deionized water to give concentrations of approximately 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 mg/L for Sunset Yellow color and approximate concentrations of 5, 10, 15, , 20, 25, 30 and 35 mg/L for the colors Allura Red and Brilliant Blue. All the final solutions were filtered through 0.45 µm hydrophilic membrane before injection. The results were statistically analyzed by linear regression by the least squares method³¹.

According to Bratinova, Raffael and Simoneau⁴⁰, the selectivity of analytical method is its capacity of quantifying the analyte of interest in presence of other analytes, matrixes and other interferents. In a validation study of a chromatographic method, the selectivity is evaluated through blank sample analyses, following defined analytical procedures. The determination of the analyte would be guaranteed in the final solution of the essay even in the presence of possible interferents in the sample matrix. The absence of chromatographic peak in the same retention time of the colors indicates the suitable selectivity of method.

The selectivity evaluation of method three blank samples were analysed and the chrogratogram was visually inspected referring to the presence of chromatographic peak in the retention time corresponding to colors.

The validation, in general, is accomplished in simple solutions of the analyte. However, the sample is subject to possible interference from substances present in the matrix of the sample material. Due to this reason, a very useful tool for the validation to test these interferences is to determine the matrix effect. To verify the occurrence or not of the matrix effect, it is necessary to prepare standard curves in the array at the same concentrations used in determining the analytical curve prepared in the solvent in an extraction rate from the food treating a sample with composition equal or much like the object of study and that has no artificial colors in their composition³². After this procedure an analytical

curve is prepared on the same matrix and it is compared with the analytical curve obtained in aqueous solution by means of t Student Test to verify the equivalence of curves and finally determine whether the matrix interferes with the determination of the analyte³³.

The precision of an analytical method assesses the degree of agreement among individual results, when the method is applied repeatedly to multiple samplings of a homogeneous product in analytical conditions established^{21, 25}. In this study, the precision was evaluated based on two method performances: the repeatability through six determinations genuine and the intermediate precision with the variation of the analyst. The repeatability was calculated according to what it is recommended by Albert and Horwitz³⁴, which evaluates the ratio Horwitz (HorRat), which can be seen in the following equation:

$$HorRat_r = \frac{CV\%_r \leq 2}{\frac{1}{2} CV\%_{HR}}$$

Where: CV%r = coefficient of variation of repeatability
CV%HR = coefficient of variation of Horwitz

In the case of this experimental drawing, the CV% HR was obtained by the value $2C^{(-0,1505)28}$, where C is the concentration found or added, expressed as a mass fraction.

Intermediary precision (was calculated by what is determined by inmetro², according to the following equation:

$$Si_{(j,k)} = \sqrt{\frac{1}{2t} \times \sum_{j=1}^t (y_{j1} - y_{j2})^2}$$

Where: $Si_{(j,k)}$ = intermediate precision;
t= total number of samples tested;
 y_{j1} =first result obtained for the sample j;
 y_{j2} =second result obtained for the sample j.

Percentage recovery was estimated by analysis of samples fortified with a known concentration of artificial color. Samples were fortified at three different concentration levels related to the linear range studied:

the lowest, the center and the highest. The values found were compared by the recovery established by FAO/ WHO in accordance with the LM analyte in question, which in this experimental design should be 80 to 110 % recovery²⁹. Data for validation of the analytical methodology proposed were analyzed following the proposal advocated by Thompson et al¹, and for determining the linearity and limits of detection and quantification spread sheet developed by Bazilio et al³⁵ was used.

RESULTS AND DISCUSSION

The use of HPLC methodology is widely used in the determination of various substances in food including artificial colors. We used a validated methodology for determining intralaboratorial and artificial colors in candy by Pinheiro and Abrantes³⁶ as an initial guide, especially for the chromatographic conditions. But successive tests were conducted for the extraction of colors in the food matrix, which in this case was the breakfast cereal, as the aqueous extraction was inefficient due to the complex composition of the food.

Thus, based on research done in specific bibliography, we started with the principle of extraction in alcoholic solution of ammonia to artificial colors, showing that this extraction was more effective when subjected to heating³⁷. Following the experimental tests, it was possible to extract in ethanol with 10 % ammonium hydroxide in heating at 100 °C for 20 minutes, with successive washes as described in the methodology.

As the use of three artificial colors in breakfast cereal is allowed in Brazil, methodology has been validated for each of these colors. The calibration curve for each color was constructed from seven concentration points, prepared on the same day the analyzes were performed. In Table 1 it is possible to observe the straight line equation obtained by the least squares method and correlation coefficient of each color studied.

Table 1. Information about the line equation and correlation coefficient for each dye analyzed

Artificial Dye	Line Equation	Correlation Coefficient
Sunset Yellow	Y = 2,65E+06 + 1,16E+05X	R2 = 0,9950
Allura Red	Y = 1,60E+06 + 1,05E+05X	R2 = 0,9982
Brilliant Blue	Y = 2,36E+04 + 1,33E+05X	R2 = 0,9482

The values of LOD and LOQ obtained are shown in

Table 2. These results demonstrate that the method is enough to detect and quantify the concentration levels of the three colors present in samples of cereal.

Table 2. LOD and LOQ of artificial colors analyzed

Artificial Dye	LOD (mg/L)	LOQ (mg/L)
Sunset Yellow	3	6
Allura Red	2	4
Brilliant Blue	2	4

The recovery efficiency of the method shows the insulation ability of the analyte of interest expressed as the percentage of known quantity of this analyte³⁸. The recovery percentage was obtained by the ratio value between the concentration determined experimentally and the corresponding theoretical concentration after addition of the colors, at extreme levels (low and high) and central multiplied by 100. In the analytical method in question, the range was found to recover 82 to 97 % for Sunset Yellow color, 82 to 87 % for Allura Red and 81 to 86 % for Brilliant Blue color, with all three within the expected specifications for complex matrices^{29,39}.

In the essay of blank samples chromatographic peaks of interferences have not been observed in the same retention time referring to colors, showing adequate selectivity of the method.

The effect of matrix was determined and calculated from the data on the analytical curve of the solvent and analytical curve obtained with the matrix, calculating the effect matrix, from the F-Test Snedecor and t Student test with $\alpha = 0.05$, where t critical value of 2.02 was found and t_b and t_a value, respectively, of 0.62 and 0.50 for Sunset Yellow; t_b and t_a value, respectively, of 1.62 and 1.67, for Allura Red; and t_b and t_a value, respectively, of 0.06 and 0.33 for Brilliant Blue. According to these statistical results it is permitted to say that the method in question has no matrix effect, since statistically the analytical curves of the three colors in solvent and matrix are equivalent.

The precision of the method is also known as the extent of random error and represents the closeness of the results obtained from independent measurements of multiple samplings of a homogeneous sample³⁸ and it was evaluated considering the method performances repeatability and intermediate precision. To determine the repeatable extractions were performed six genuine under the same chromatographic conditions and by the same analyst. The results were evaluated according to the criterion of Albert and Horwitz³⁴.

The intermediate precision was calculated from the variation of the results obtained by two different analysts, being performed in triplicate. The results were also evaluated against acceptance criteria Horwitz and Albert³⁴ and can be seen in Table 3, together with the values of repeatability.

Table 3. Precision values of analytical method

Artificial Dye	Repetitivity (mg/L)	Intermediate Precision (mg/L)	Acceptance Criteria of Horwitz
Sunset Yellow	0,455	0,393	$\leq 2,0$
Allura Red	0,375	0,090	
Brilliant Blue	0,542	0,040	

CONCLUSION

The analysis method of artificial colors in breakfast cereals proposed constitutes an important tool in archiving the sanitary surveillance, as it contemplates all method performance proposed for the validation of analytical methods. The method showed to be precise, accurate, linear in wide concentration range and also showed that its determination is not influenced by the food matrix for determination by HPLC. Moreover, the methodology is useful since there are no official methods for the determination of artificial colors in breakfast cereals.

Yet, it is important to emphasize that validation is an ongoing process that seeks above all reliability and quality of results, thus being indicated to undergo constant reviews and if deemed necessary, revalidate the proposed method.

REFERENCE

1. Thompson M, Ellison SLR, Wood R. International Union of Pure and Applied Chemistry (UIPAC). Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. *Pure Appl Chem*.2002;74(5): 835-55.
2. INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos, DOQ-CGCRE-008, 2011.
3. Monteiro CA, Mondini L, Souza ALM, Popkin BM. The nutrition transition in Brazil. *Eur J Clin Nutr*.2010;49:13-5.
4. Mattos MC, Nascimento PCBD, Almeida SS, Costa TMB. Influência de propagandas de alimentos nas escolhas alimentares de crianças e adolescentes. *Psicol: Teoria Prat*,2010;12(3):34-51.
5. Brasil, Resolução nº 263, 22 de Setembro de 2005. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Agência de Vigilância Sanitária. Brasília, DF. 2005. Disponível em <http://anvisa.gov.br>. Acesso em: 05 nov. 2011.

6. Aditivos & Ingredientes. Corantes. In: <http://www.insumos.com.br/> HYPERLINK "<http://www.insumos.com.br/%20aditivoseingredientes/materias/119.pdf>" aditivoseingredientes. Acesso em: 26 julho de 2011.
7. Netto RCM. Dossiê corantes. *Food Ingrid Braz*.2009;9:40-59.
8. Brasil, Resolução CNNPA nº 44, 25 de Novembro de 1977. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Agência de Vigilância Sanitária. Brasília, DF. Seção1. Disponível em <http://anvisa.gov.br>. Acesso em: 21 mai. 2011.
9. MERCOSUL/GMC. Resolução Nº 19/93 - Lista geral harmonizada de aditivos Mercosul. X GMC - Assunção, 30 de junho de 1993.
10. MERCOSUL/GMC. Resolução Nº 14/93 - Lista geral harmonizada de colorantes de calibração. X GMC - Assunção, 30 de junho de 1993.
11. MERCOSUL/GMC. Resolução Nº 101/94 - Lista de aditivos alimentários com suas classes funcionais. XV GMC – Cartagena de Indias, 24 de junho de 1994.
12. MERCOSUL/GMC. Resolução Nº 38/01 - Regulamento técnico Mercosul sobre incorporação de aditivos na lista geral harmonizada de aditivos, na lista geral harmonizada de corantes e na lista de aditivos alimentares com suas classes funcionais. XLIII GMC – Montevideú, 10 de Outubro de 2001.
13. Brasil, Portaria nº 540, 27 de Outubro de 1997. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Agência de Vigilância Sanitária. Brasília, DF. 1997. Disponível em <http://anvisa.gov.br>. Acesso em: 21 fev. 2012.
14. Brasil, Resolução nº 60, 05 de Setembro de 2007. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Agência de Vigilância Sanitária. Brasília, DF. 2007. Seção1. Disponível em <http://anvisa.gov.br>. Acesso em: 21 mai. 2011.
15. Prado MA, Godoy HT. Corantes artificiais em alimentos. *Alim Nutr*.2003;14(2):237-50.
16. Prado MA, Godoy HT Teores de corantes artificiais em alimentos determinados por cromatografia líquida de alta eficiência. *Quím Nova*.2007;30(2):268-73.
17. International Standard Organization. ISO/IEC 17025: General requirements for the competence of testing and calibration laboratories, 2005.
18. Ribeiro FAL, Ferreira MMC, Morano SC, Silva LR, Schneider RP. Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. *Quím Nova*.2008;31(1):164-71.
19. Prestes OD, Presta MA, Kolberg DIS, Zanella R, Rossato SB, Penna NG, et al. Desenvolvimento e validação de um método analítico para a determinação de histamina em vinho utilizando cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência. *Quím Nova*.2007;30(1):18-21.
20. Danzer K, Currie LA. Guidelines for calibration in analytical chemistry. *Pure Appl Chem*.1998;70:993-1002.
21. International Conference on Harmonisation (ICH).Validation of Analytical Procedures: Definitions and Terminology, Q2A (CPMP/ICH/381/95), 1995a.
22. International Conference on Harmonisation (ICH).Validation of Analytical Procedures: Methodology, Q2B (CPMP/ICH/281/95), 1995b.
23. Antignac J, Bizec BL, Monteau F, Andre F. Validation of analytical methods based on mass spectrometric detection according to the “2002/657/EC” European decision: guideline and application. *Anal Chim Acta*.2003;483:325-34.
24. Ribani M, Bottoli CBG, Collins CH, Jardim ICSE, Melo LFC. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Quím Nova*.2004;27(5):771-80.
25. Brasil, Resolução RE nº 899, 29 de Maio de 2003. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília, DF. 2003. Disponível em <http://anvisa.gov.br>. Acesso em: 10 de Fevereiro de 2012.
26. Soares LMV. Como obter resultados confiáveis em cromatografia. *Rev Inst Adolfo Lutz*.2001;60(1):79-84.
27. Feinberg M. Validation of analytical methods based on accuracy profiles. *J Chromatog A*.2007;1158:174-83.
28. Horwitz W. Protocol for the design, conduct and interpretation of method performance studies. *Pure App Chem*.1995;67:331-43.
29. AOAC. Peer verified methods program manual on policies and procedure, Arlington, VA, Nov. 1993
30. USPC – United States Pharmacopeia Convention. Validation of Compendial Methods <1225>, Rockville, p.2149-2163, 1999.
31. Souza SVC de, Junqueira RG. A procedure to assess linearity by ordinary least squares method. *Anal Chim Acta*.2005;552:25-35.
32. González AG, Herrador AA. A practical guide to analytical method validation, including measurement uncertainty and accuracy profiles. *Trends Anal Chem*.2007;26(3):227-37.
33. Bomfim MVJ, Abrantes SMP. Validação de método analítico para determinação da migração de ϵ -caprolactama das embalagens para alimentos gordurosos. *Quím Nova*.2010;33(5):1114-18.
34. Horwitz W, Albert R. The Horwitz Ratio (HorRat): a useful index of method performance with respect to precision. *J AOAC Int*.2006;89(4):1095-109.
35. Bazilio FS, et al. Uso de planilha eletrônica na verificação da adequação de curva analítica ao modelo linear. *Analytica*, v.59, p.60-67, 2012. Disponível em: http://revistaanalytica.com.br/ed_antiores/59/analytica.pdf. Acesso em: 02 out. de 2012.
36. Pinheiro MC de O. Avaliação da exposição aos corantes artificiais por crianças entre 3 e 9 anos em relação ao consumo de balas, 2012, 97f. Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária), Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2012.
37. Acosta EO. III curso International“Aspectos normativos y metodologicos del registro y control de Alimentos”, Rio de Janeiro, 1998.
38. Lemos G da S, Santos JS dos, Santos MLP dos. Validação de método para a determinação de 5-hidroximetilfurfural em mel por cromatografia líquida e sua influência na qualidade do produto. *Quím Nova*.2010;33(8):1682-5.
39. Celeghini RMS, Souza IMO, Silva AP, Rodrigues RAF, Foglio MA. Desenvolvimento e validação de metodologia analítica por CLAE-IR para determinação de artemisinina em *Artemisia annua* L. *Quím Nova*.2009;32:875-8.
40. Bratinova S, Raffael B, Simoneau C (2009) Guidelines for performance criteria and validation procedures of analytical methods used in control of food contact materials: EUR 24105 EM.1. Ed. Publications Office of the European Union, Luxembourg.

Good Manufacturing Practice in Brazilian wheat mills with particular reference to the flour fortification

Boas Práticas de Fabricação em moinhos de trigo com particular referência à fortificação de farinhas

RIALA6/1590

William Cesar LATORRE^{1,2}, Célia COLLI^{1,3*}

*Correspondence address: ³Department of Foods and Experimental Nutrition, Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes 580, 05508-000, São Paulo, SP, Brazil. E-mail: cecolli@usp.br

¹Program of Applied Human Nutrition (PRONUT) – FSP/FCF/FEA, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

²Granotec do Brasil, Curitiba, PR, Brazil

Recebido: 27.08.2013 - Aceito para publicação: 25.02.2014

ABSTRACT

Iron deficiency anemia (IDA) is a widespread nutritional disorder that affects a significant proportion of the Brazilian population. The obligatory fortification of wheat flour with iron and folic acid represents a strategy of the Brazilian Ministry of Health for combating IDA. However, several studies have reported the occurrence of iron in excessive concentrations and insufficient contents of folic acid in commercial flour samples. In the light of these information, a participatory observational study on the wheat flour production processes was undertaken in 11 major flour mills located in the São Paulo state, Brazil. This study aimed at writing a detailed good manufacturing practice (GMP) guidelines for the industrial sectors, including directives for standardized operational procedures (SOPs) on the flour fortification. The outcomes of this study are a GMP checklist and the recommended SOPs, which help to standardize the production processes in flour fortification, which currently is incongruous one, and also to facilitate the work of the government health inspectors.

Keyword. good manufacturing practice, standardized operational procedures, wheat flour fortification, iron deficiency.

RESUMO

Anemia por deficiência de ferro (ADF) é um distúrbio nutricional generalizado que afeta uma parcela significativa da população brasileira. A fortificação obrigatória das farinhas de trigo com ferro e ácido fólico representa uma estratégia do Ministério da Saúde para o combate à ADF. No entanto, há relatos que indicam a ocorrência de concentrações excessivas de ferro e quantidades insuficientes de ácido fólico em amostras comerciais de farinha de trigo. À luz destas informações, foi realizado este estudo observacional participativo nos processos de produção de farinha de trigo em 11 moinhos, localizados no estado de São Paulo, Brasil, para criar para este setor industrial, uma lista de verificação das Boas Práticas de Fabricação (BPF), incluindo-se diretrizes para os procedimentos operacionais padronizados (POPs) na fortificação de farinha. A implementação dessas ferramentas ajudam a padronizar os processos de produção, atualmente incongruentes na fortificação das farinhas, bem como facilitam o trabalho dos inspetores de saúde do governo.

Palavras-chave. boas práticas de fabricação, procedimentos operacionais padronizados, fortificação da farinha de trigo, deficiência de ferro.

INTRODUCTION

Iron deficiency anemia (IDA) is one of the most important nutritional problems in Brazil since it affects a significant proportion of the population irrespective of economic class. Among the various measures introduced by the Brazilian Ministry of Health with the purpose of combating IDA has been the fortification of wheat and corn flour with iron and folic acid. In 2002, the National Sanitary Surveillance Agency (*Agência Nacional de Vigilância Sanitária*; ANVISA), published a resolution determining the compulsory fortification of flour with iron (4.2 mg/100 g) and folic acid (150 µg/100 g)¹.

In 2005, Latorre surveyed the opinions and perceptions of managers in the wheat milling industry regarding the obligatory fortification of flour. The collective discourse revealed that the policy had received general approbation and was being implemented by the flour mills. However, according to this author, the legislation was considered authoritarian and had been applied without consultation with the industrial sector. Of particular concern were: (i) the tendency to overdose micronutrients in order to avoid technological issues, and (ii) the lack of availability of rapid analyses from laboratories². Additionally, a report from the Sanitary Surveillance Center of the State of São Paulo, Brazil, has revealed that commercial samples of flour are often overdosed with iron and underdosed with folic acid³.

In the light of this information, a participatory observational study of wheat flour production processes in 11 mills across the state of São Paulo was undertaken employing ethnographic method to observe the flour milling daily practices with the aim of verifying if this method is appropriate to elaborate good manufacturing practice (GMP) guidelines for the industrial sector including directives for standardized operational procedures (SOPs) in flour fortification and to investigate variations among protocols and controls used by different mills.

The Centers for Disease Control and Prevention⁴ and the World Health Organization (WHO)⁵, along with other acknowledged experts⁶, consider the flour fortification strategy to be a centralized and managed public health program that includes the monitoring of industrial operations in order to guarantee the quality of the final product. Industrial practices in all flour-producing mills should comply fully with GMP guidelines, and such operations must be monitored if the health program is to be successful.

Nestel et al⁶ proposed a GMP checklist for fortified flour based on the Codex Alimentarius⁷ and the Food and Drug Administration (FDA) of the USA Health Department norms⁸. These authors emphasized that the FDA carries out routine inspections by specialist staff for each type of product. It is suggested that the Brazilian government should establish a similar procedure in order to monitor compliance with GMP by the flour milling industry, with particular reference to flour fortification.

In 1963, the World Health Organization and the Food and Health Organization (WHO/FAO) of the United Nations established the Codex Alimentarius Commission with the aim of coordinating international food standards, guidelines and codes of practice in order to protect the health of consumers and to ensure fair practices in international food trade⁷. Such codes are adopted by the World Trade Organization as references for all international trade in food products. Within these norms, the Hazard Analysis and Critical Control Point (HACCP) directives have been references for international food safety requirements since 1991.

In 1969, the Codex Alimentarius Commission published a manual entitled "*International Code of Recommended Practices – General Principles of Food Hygiene*" with the objective of providing guidance for the elaboration of codes needed in specific sectors of the food chain, processes or commodities in order to amplify the hygiene requirements that are fundamental to those areas⁹. This manual served as a benchmark for the creation of GMP norms and gave rise to a further publication entitled "*Current Good Manufacturing Practice in Manufacturing, Packaging or Holding Human Food*"¹⁰. Both documents had international impact and influenced the development of generic and specific GMP norms.

In 1993, the Brazilian Ministry of Health published decree number 1428/MS¹¹ containing directives for the establishment of GMP in the food sector. This decree conferred practical and wide-ranging powers to food inspectors, and these were consolidated by further regulations including: (i) Decree SVS/MS no. 326, which approves the technical regulation of GMP to be implemented by food-producing companies¹², and (ii) Resolution RDC n° 275, which approves a GMP checklist for food-producing companies¹³.

In addition to these fundamental regulations, particular categories of foods were regulated by specific GMPs and are subject to: (i) Resolution RDC n° 28,

which describes basic GMP procedures and routine health inspections of companies that produce salt for human consumption¹⁴, (ii) Law n° 6150, which regulates the obligatory supplementation of salt with iodine with the purpose of eradicating endemic goiter¹⁵, (iii) Resolution RDC n° 23/2013, which specifies the minimum and maximum levels of iodine in salt destined for human consumption¹⁶, (iv) Decree no. 2.362/GM, which restructures the National Program for Prevention and Control of Iodine Deficiency Illnesses¹⁷, and (v) Decree no. 520/GM, which creates the Inter-institutional Commission for Prevention and Control of Iodine Deficiency Illnesses¹⁸.

For the purpose of ensuring the quality of fortified flour according to the norms of the Brazilian authorities, it would be reasonable to adopt HACCP as a work tool and to employ SOP in the control of quality and dosage of micronutrients. In this case, it is essential to elaborate a GMP checklist including the SOP for the flour fortification with iron so that mills can construct their own detailed HACCP plans. Since the methods of production and control of fortified flour vary among the mills, it is clearly of the utmost importance to standardize these procedures in order to ensure quality and safety, as well as to facilitate the routine mill inspections by ANVISA. On this basis, the aims of the present study were: (i) to write a detailed GMP checklist to be used by the flour industry during the production of flour fortified with iron and folic acid, and (ii) to suggest SOP for all of the steps in the production process.

MATERIAL AND METHODS

Details of the project were submitted to and approved by the Ethical Research Committee of the Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo (CEP n° 03/12022009). All procedures were performed in accordance with the Declaration of Helsinki and written permissions for carrying out interviews, discussions, observations and training of staff were obtained from the managers of the participating wheat milling industries and from the Centro de Vigilância Sanitária de São Paulo (CVS; Secretaria de Estado da Saúde, São Paulo, SP, Brazil). The anonymity of all mills involved and of individual participants was maintained rigorously throughout the study.

The participatory observational study described herein was conducted during 2007 and 2008, and involved

11 major wheat flour mills located across the state of São Paulo. In 2008, these mills were responsible for one third of all of the flour produced in Brazil.

The ethnographic study was executed in three stages. Firstly, a literature survey of scientific articles and government publications was carried out in order to draft a preliminary GMP checklist for the production of fortified flour. Prior to the inspection stage, 20 CVS health inspectors responsible for policing the selected mills were invited to participate in the planning of the project and to oversee the final GMP checklist. With the support and approval of CVS, the research coordinator organized and offered to the CVS inspectors' theoretical and practical training in the technology of wheat flour production and aspects of health legislation relating to GMP. At the inspection stage, the health inspectors were charged with visiting the 11 wheat mills three times according to a schedule arranged by the project coordinator. During the first inspection, which occurred prior to training, the health inspectors used the GMP checklist published in the annex to Resolution RDC n° 275 issued by ANVISA¹³. At the second visit, the health inspectors tested and modified (where necessary) the preliminary GMP checklist. Further checkpoints relating to the production and fortification of flour were then added to the preliminary GMP checklist, and this new draft was employed during the third visit of the inspectors. All stages of the study were closely supervised by the research coordinator.

The model GMP checklist¹³ employed by the health inspectors during the first visits to the mills contained general items relating to food production, such as industrial buildings and installations, aspects of hygiene associated with equipment, furniture and utensils, health status of the workers, hygienic conditions in the production line and transport of food materials, and legal documentation of the industrial procedures. A meeting, chaired by the research coordinator, was held during the first inspection of each mill at which the health inspectors and the managers and staff in charge of flour production/quality were present. The research coordinator attempted to reassure the mill personnel about the presence of the health inspectors by emphasizing the importance of IDA in Brazil and the value of the fortification strategy implemented by the government. The coordinator presented the hypothesis and objectives of the research project, and extensive discussions of the subject area were permitted before the actual inspection of the production

line commenced. In this manner, considerable effort was devoted into making sure that an agreeable climate existed among the participating mill personnel in order to avoid distorted observations and results. At the request of the coordinator, the mill staff demonstrated the flour production line and explained each of the steps of the fortification process comprising the selection and control of the micronutrients, the technology of dosing and the quality control of the final product (Figure 1).

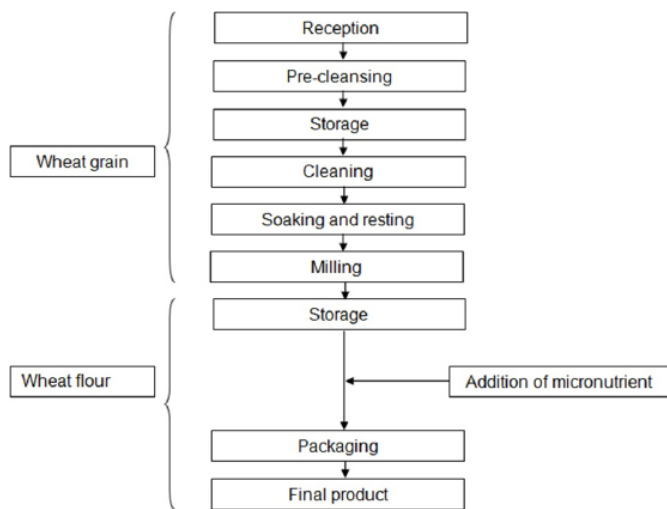


Figure 1. Simplified flow chart of the production of fortified wheat flour

The collected observations by the health inspectors gathered during the first and second visits to the mills were incorporated into the preliminary GMP checklist giving rise to a final checklist, which was presented in a tabulated form similar to that used by ANVISA to inspect other food areas. At the end of the project, the health inspectors produced a report on the final GMP checklist based on their experience in the field.

RESULTS AND DISCUSSION

All of the GMP checkpoints of flour production in wheat mills were observed, from the reception of the raw material to the packaging of the final product. In this article, only GMP topics relevant to the production of fortified flour are presented and discussed. Table 1, represents the final version of the GMP checklist and the recommended SOPs only for the fortification of flour with iron and folic acid operation, constructed during the present study. Most of the CVS health inspectors considered that the final GMP checklist was appropriate since it contained a wide range of control items that allowed its application in mills with different characteristics.

Ethnography is defined as “the descriptive

Table 1. GMP checklist and SOP for the fortification of wheat flour with iron and folic acid

Identity of Mill	
Function:	
CNPJ:	Phone: Fax:
E-mail:	
Address:	
Town:	State:
Post code:	
Brands of flour produced:	Destination:
Mean monthly flour milled (ton/ month):	() Small scale mill (up to 300 ton/day)
	() Medium scale mill (between 300 and 1000 ton/day)
	() Large scale mill (more than 1000 ton/day)
Mean monthly flour milled for bread making (ton/month):	
Mean monthly flour milled for domestic use (ton/month):	
Mean monthly flour milled for pasta making (ton/month):	

Continue

Table 1. (Continued)

Items Associated with Flour Fortification	Yes	No	N/A
Dosing equipment is readily accessible:			
Automatic linkage system stops the micronutrient feeders should the flour line stop, and vice versa:			
Micronutrient bins on the feeders are marked with minimum and maximum levels of the mix:			
Feeders are fitted with sensors or alarms to detect when the micronutrient mix is outside the required levels and requires correction or refilling:			
Load of micronutrient mix is within the minimum and maximum volumes of the feeders:			
Load of micronutrient mix exhibits arching-flow or funnel-flow patterns in the hopper:			
() Screw-feeders	Brand name and address of the feeder manufacturer(s):		
() Other (specify):			
Volume added by feeder is recorded:			
Frequency of measurement of volumes of flour and micronutrients is satisfactory (i.e. every 2 h or 4 times per shift):			
After analysis of micronutrient outflow, the volumes are corrected manually:			
After analysis of micronutrient outflow, the volumes added are adjusted automatically and electronically:			
Calibration curves exist for each micronutrient mix and their respective feeders in order to assist with the correction of volume errors:			
Producers of micronutrients have provided evidence of their compliance with GMP and appropriate validation of homogeneity of the formulation:			
After changes in the formulation of the micronutrient mix, the feeders are recalibrated to allow for alterations in the physicochemical characteristics (density, fluidity, concentration) of the new mix:			
Monitoring of the volumes of micronutrients and flour added is carried out by workers of proven competence:			
A record exists of the use of the mix, comparing the quantities of micronutrients used with those of flour produced in a determined time:			
Cleaning and removal of incrustations from the feeders is carried out periodically and each operation is recorded:			
Type of iron used:	Type of flour:	Name of micronutrient provider:	
[] dehydrated (dry) ferrous sulfate	() bread-making		
[] ferrous fumarate	() domestic use		
[] reduced iron	() pasta / biscuits		
[] electrolytic iron	() other industrial uses		
[] sodium iron EDTA			
[] iron bis-glycine chelate			
The micronutrient dosing points are currently located at:			
The micronutrient dosing points are situated sufficiently far from the packaging module to allow good homogenization:			
Tests have been conducted using different micronutrient dosing points and the results have been recorded:			
The stock of micronutrient is adequate and located close to the dosing point:			
The micronutrients are stored appropriately in the raw materials depository:			

Continue

Table 1. (Continued)

Quality Control of the Final Product	Yes	No	N/A
Semi-quantitative measurements (color tests) of iron in the final fortified product are performed and recorded:			
All actions to correct iron concentration in the final product are recorded:			
Reports are available of all analyses carried out in recent months by a validated laboratory showing iron and folic acid concentrations in all lines, especially those destined for bread-making flour:			
Labels	Yes	No	N/A
Show the name of the vendor and information relating to fortification:			
Show essential nutritional information – e.g. 1/2 cup = household measure = 50 g flour provides 2,1 g iron (15% daily value) and 75 µg folic acid (31% daily value):			
Documentation	Yes	No	N/A
GMP manual available for reference:			
Operations are carried out in accordance with the GMP manual:			
Official receipts of purchase of micronutrients are available and relevant reports from a validated laboratory are provided by the producer verifying the levels of iron and folic acid for each lot:			
Reports available from a validated laboratory verifying the levels of iron and folic acid:			
Reports available from a validated laboratory verifying granulometry (Tyler mesh 325) of reduced, electrolytic or carbonyl iron in the micronutrient mix:			
Laboratory report available verifying humidity of the stored micronutrient mix:			
Reports available from a validated laboratory verifying the levels of iron and folic acid in the flour or final products (mixtures for bread making):			
Existence, compliance and record of SOP for flour fortification with iron and folic acid:			

N/A – not applicable

Table 1. (continued)

SOP for Wheat Flour Fortification

The wheat milling industry should describe how the fortification technology functions (volumetrically or gravimetrically) and should make available standard procedures for:

- the maintenance of dosing equipment, with details explaining how to deal with the problems most frequently encountered;
- the measurement of outflows of flour and micronutrients during production, and the recording of this information;
- the calculation of micronutrient dose employing spreadsheets that are easily interpreted by the workers;
- refilling feeders with micronutrients and recording the time intervals;
- the provision by the micronutrient producer of reports of analyses of iron and folic acid levels carried out by validated laboratory;
- the provision of reports of analyses of iron and folic acid levels in the micronutrient mix carried out using validated methods in a qualified laboratory chosen by the mill;
- the provision of reports of analyses of iron and folic acid levels in flour and mixtures for bread making carried by a validated laboratory at the time intervals specified in the following section.

Sampling, qualification of analytical laboratories, presentation of analytical reports, and frequency of analysis of iron and folic acid levels in flours and bread-making mixes

The sample should be composed of the production lots from one day and should be collected in the packaging area from a determined production line. Mills should elaborate specific sampling plans for their production lines. The health authority may establish a different sampling routine according to the GMP in place at the mill.

Analytical reports should identify the lots of flour or fortified products, the date of production, the name of the micronutrient mix and the lots used in that sample.

The analytical laboratories must apply appropriate Good Practice and employ trained analysts, validated analytical methods and proficiency tests for iron and folic acid analysis.

Small scale mill (up to 300 ton/day):

Analyze 1 flour sample per month and alternate the various production lines (if more than one exists) each month.

Medium scale mill (between 300 and 1000 ton/day) and large scale mill (more than 1000 ton/day):

Analyze 1 flour sample per month for each 300 ton milled/day and alternate the various production lines each month.

CONCLUSIONS

Place, date and signature of auditors.

term for the cultural material of a particular people¹⁹ and is based on a few key informers selected for their competence and logical views regarding the study culture, rather than on a representative sample group²⁰. The method of participative observation for the accession of field data is critical in ethnological research since it involves the establishment of relationships with a particular community. The researcher collects data by participating in the daily life of the group or organization under study, and by observing people and situations and interpreting the behavior observed. This technique brings the researcher closer to the native language of the social group under study and allows him/her to understand their culture intuitively and to speak with confidence about the significance of the observed data. Occasionally, field circumstances may allow a number of similar events to be observed or similar questions to be put to a number of people in a systematic approach, thereby yielding data with a quasi-statistical foundation and providing conclusions regarding frequency or distribution²¹.

The present study revealed that the participating mills had already implemented some form of GMP and employed many of the controls reported in the literature and outlined in the present paper. Furthermore, the managerial staff demonstrated significant involvement in the elaboration of the GMP checklist and interest in the results obtained.

The GMP checklist for flour fortification developed by our research team includes items extracted from the scientific literature and governmental health legislation documents, as well as from the reports on the observations performed in the milling industries. Information concerning critical control points and the use of inspection checklists for the flour fortification process were available in the literature and included aspects such as the quality and storage of micronutrients, the frequency (once per shift) of verification of feeder dosages, the frequency (daily) of product sampling for micronutrient analysis, and the maintenance of records of all procedures, problems encountered and proposed corrective actions⁶. Some authors have suggested GMP inspections by health authorities every three to six months⁵.

In agreement with MI²², and Brasil²³, Buzzo et al²⁴ one of the key items included in the GMP checklist related to the dosage and control of micronutrients. Considerable variation was observed between the mills regarding the micronutrient dosing systems employed,

and this reflected the concern of the company with respect to flour quality and the level of investment made. A few companies had installed automatic dosing systems with electronically adjusted rates, although the majority relied on mechanical and less precise systems that generally lacked warnings about potential faults and procedures for troubleshooting.

Perhaps unsurprisingly, inspection of company records revealed a wide variation in the concentration of micronutrients in the flour samples analyzed. Such discrepancies may be attributed to the lack of adequate maintenance of equipment, particularly of non-automated dosing systems, which is essential for system reliability and safety. The point at which micronutrients were added to the flour within the production line was also found to constitute an important checkpoint. For example, a mechanical dosing device could be incorrectly positioned such that the mix of micronutrients and flour was uneven, giving rise to a product that was non-homogenous in terms of hygroscopicity, fluidity and particle size. With automated dosing systems, micronutrients and flour were typically homogenized effectively with only small variations being detected between four consecutive samples. Automated systems were of the continuous, gravimetric and electronic type, or of the batch type with a gravimetric feeder and a Y-shaped mixer that provided good homogenization. In some of the mills inspected, the feeders were difficult to reach since they were located at the top of a long or difficult stairway.

Concerning the variability in the level of investment in modern process systems for flour fortification, it is worthwhile emphasizing a key characteristic of the Brazilian wheat industry. Until 1990, the buying and selling wheat was under the government control (subsidized by the government). Thus, the industry has had only two decades to adjust to the free competitive global market. Moreover, Brazil depends to a large extent on imported wheat since national production is insufficient to meet the qualitative and quantitative needs of the country. Therefore, the price of wheat flour in Brazil is very much dependent on the fluctuations of the international commodity market.

The origin of the micronutrients employed in flour fortification exerts a considerable influence on the quality of the final product. Numerous factors must be taken into account when appointing a micronutrient supplier, amongst which are: the type and granulometric characteristics of the iron, the quality of the formulation,

the quality and hygroscopicity of the iron carriers and the quality of the laboratory analysis to ensure appropriate iron formulations. Low quality formulations of micronutrients were encountered during the inspections, especially with respect to the granulometry of the iron particles, the fluidity and balance of the formulation, and the questionable quality of some analytical reports, which appeared to contain non-reproducible results.

The frequency of product sampling and the techniques employed in collecting samples differed from one company to another. Since laboratory analyses increase the costs of the milling operation, the number of analytical procedures performed is often insignificant in terms of the total volume of flour produced. The final GMP checklist proposes a standardized sampling procedure based on the daily production of flour, and requires the mill to provide monthly reports containing the results of iron and folic acid analyses for each 300 ton lot of flour produced each day. The classification of the scale of the mill, which determines the sampling routine, was observed during the field project and the frequency of sampling suggested takes into account the analytical costs. Improving GMP would remove the necessity for excessive product analyses.

In this context, the GMP checklist for the salt industry published in the annex to Resolution RDC no. 28 issued by¹⁴ includes the minimum obligatory controls for salt iodination, such as the quality and storage of the micronutrient, preparation and addition of the iodine solution, control of the solutions and feeder addition rates, the point of application of iodine during the salt production process, the responsibilities of the workers, salt sampling for analysis of iodine in the final product and the complete records of the whole process (log book).

However, information relating to the flour fortification with iron and folic acid, as presented in the present study, is scarce. Lopes, Franco²⁵ monitored GMP in three wheat mills at the grain milling stage, and noted the effects on the microbiological quality of the final product. Frequent cleaning of equipment and the use of bleach with 100 ppm of free chlorine improved the quality of the process and of the product. In the present study, controls to improve the quality of flour fortification were incorporated.

Additionally, Tavolaro et al²⁶, used Resolution RDC n° 275 issued by ANVISA¹³ to evaluate hygienic practices in the milking of goats in three farms located in the State of São Paulo. The authors interviewed the dairy

workers before and after they had received instruction on operational hygiene and subsequently analyzed the collective discourses. In this case, however, training in hygienic practices did not give rise to changes in the routine procedures carried out by the workers.

CONCLUSION

Quality control of fortified flour is fundamental if the governmental strategy is to produce a positive and permanent impact on the prevalence of IDA in the Brazilian population. The ethnographic method employed in observing the daily practices of flour milling was appropriate since it allowed the collection of a considerable amount of information regarding the routine work in the mills, including the performance, protocols, conduct, language and technology employed by the personnel. Furthermore, it was possible to confirm that the protocols and controls employed in the industry varied considerably from one mill to another. The investigation resulted in a GMP checklist and a recommended SOP that is specific for the flour fortification industry. This GMP checklist will not only help to standardize the currently incongruent production processes but will also facilitate the work of government health inspectors. Since the GMP checklist developed by our research team derived from observations at dissimilar settings, it will be readily adaptable for use in the majority of flour mills in Brazil. However, it is important that the GMP checklist be submitted to critical analysis by ANVISA in order to validate its extensive application. Finally, the results and the experience accumulated in the National Program for Prevention and Control of Iodine Deficiency Illnesses should inspire the creation of a similar program for the prevention of IDA, since the GMP checklist for flour fortification presented herein is similar to that issued by ANVISA¹⁴ for salt fortification.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank the inspectors of the Health Surveillance Center of the Health State Department of São Paulo, the managers of the wheat mills who allowed the development of this research and other collaborators who assisted with the study and Fabiana da Silva Lima for technical revision of the text.

REFERENCES

1. Brasil. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 344, de 13 de dezembro de 2002. Aprova o regulamento técnico para a fortificação das farinhas de trigo e das farinhas de milho com ferro e ácido fólico, constante do anexo desta resolução. Diário Oficial [da] União. Brasília, DF, 18 dez. 2002.
2. Latorre WC. A percepção coletiva, pelo setor regulado, da resolução brasileira que determina a fortificação de farinhas de trigo com ferro e ácido fólico [dissertação de mestrado]. São Paulo (SP): Universidade de São Paulo; 2005. 144 p.
3. Centro de Vigilância Sanitária de São Paulo. Produtos de interesse à Saúde /Alimentos. Relatório final do programa paulista 2005-2006. São Paulo: Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo [acesso fev 2013]. Disponível em: [http://10.8.1.70/sitenovo/up/PP0506_rel_final.pdf].
4. Pena-Rosas JP, Parvanta I, Van der Haar F, Chapel TJ. Monitoring and evaluation in flour fortification programs: design and implementation considerations. *Nutr Rev*.2008;66(3):148-62.
5. World Health Organization - WHO. Guidelines on food fortification with micronutrients. Geneva; 2006.
6. Nestel P, Nalubola R, Mayfield E. Quality assurance as applied to micronutrient fortification: guidelines for technicians, supervisors and workers, concerned with nutrition. Washington, DC, International Life Sciences Institute Press, 2002.
7. Codex Alimentarius International. Food Standards. Safe good food for everyone. [access 2013 Jan). Available in: [http://www.codexalimentarius.org/].
8. Electronic code of federal regulations. Title 21: Food and drugs. Part 110 – Current good manufacturing practice in manufacturing, packing, or holding human food. [access jan 2013] Available in [http://www.ecfr.gov/cgi-bin/text-idx?c=ecfr;sid=03c0f0ea8b688b533744ae63a89f6aa4;rgn=div5;view=ext;node=21%3A2.0.1.1.10;idno=21;cc=ecfr].
9. Codex Alimentarius Commission. Recommended international code of practice - General principles of food hygiene. CAC/RCP 1-1969, Rev. 4-2003. Geneva; 2003.
10. Office of the Federal Registrar. Electronic code of federal regulations. Title 21: Food and drugs. Part 110 – Current good manufacturing practice in manufacturing, packing, or holding human food. [access jan. 2013]. Available in [http://www.ecfr.gov/cgi-bin/text-idx?c=ecfr;sid=03c0f0ea8b688b533744ae63a89f6aa4;rgn=div5;view=text;node=21%3A2.0.1.1.10;idno=21;cc=ecfr].
11. Brasil. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Portaria nº 1.428/MS, de 26 de novembro de 1993. Aprova o “Regulamento técnico para Inspeção sanitária de alimentos” - COD-100 a 001.0001, as “Diretrizes para o estabelecimento de boas práticas de produção e de prestação de serviços na área de alimentos” - COD- 100 a 002.0001, e o “Regulamento técnico para o estabelecimento de padrão de identidade e qualidade (PIQs) para serviços e produtos na área de alimentos”- COD-100 a 003.0001 e COD- 100 a 004.0001. Diário Oficial [da] União. Brasília, DF, 2 dez 1993.
12. Brasil. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Portaria SVS/MS nº 326, de 30 de julho de 1997. Aprova o regulamento técnico; “condições higiênicos-sanitárias e de boas práticas de fabricação para estabelecimentos produtores/ industrializadores de alimentos”, conforme anexo 1. Diário Oficial [da] União. Brasília, DF, 01 ago. 1997.
13. Brasil. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Resolução RDC nº 275, 21 October 2002. Aprova o regulamento técnico de procedimentos operacionais padronizados aplicados aos estabelecimentos produtores/industrializadores de alimentos e a lista de verificação das boas práticas de fabricação em estabelecimentos produtores/industrializadores de alimentos. Diário Oficial [da] União. Brasília, DF, 23 out. 2002.
14. Brasil. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Resolução RDC nº 28, 28 March 2000. Dispõe sobre os procedimentos básicos de boas práticas de fabricação em estabelecimentos beneficiadores de sal destinado ao consumo humano e o roteiro de inspeção sanitária em indústrias beneficiadoras de sal. Diário Oficial [da] União. Brasília, DF, 30 mar. 2000.
15. Brasil. Presidência da República do Brasil. Lei Nº 6.150, de 3 de Dezembro de 1974. Dispõe sobre a obrigatoriedade da iodação do sal, destinado ao consumo humano, seu controle pelos órgãos sanitários e dá outras providências. Diário Oficial [da] União. Brasília, DF, 4 dez. 1974.
16. Brasil. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Resolução - RDC nº 23, de 24 de abril de 2013. Somente será considerado próprio para consumo humano o sal que contiver teor igual ou superior a 15 (quinze) miligramas até o limite máximo de 45 (quarenta e cinco) miligramas de iodo por quilograma de produto. Diário Oficial [da] União. Brasília, DF, 25 de abril de 2013.
17. Brasil. Ministério da Saúde do Brasil. Portaria Nº 2.362/GM de 1º de dezembro de 2005. Reestrutura o programa nacional de prevenção e controle dos distúrbios por deficiência de iodo - DDI, designado por Pró-Iodo. Diário Oficial [da] União. Brasília, DF, 2 dez. 2005.
18. Brasil. Ministério da Saúde do Brasil. Portaria Nº 520/GM de 6 de abril de 2005. Institui a Comissão Interinstitucional para a prevenção e o controle dos distúrbios por deficiência de iodo e dá outras providências. Diário Oficial [da] União. Brasília, DF, 8 abr. 2005.
19. Instituto Antônio Houaiss. Dicionário Houaiss eletrônico da língua portuguesa [CD-ROM], Version for Windows®. Rio de Janeiro: Editora Objetiva.
20. Bernard, H.R. Research methods in anthropology. 4th ed. Newbury Park: Sage Publications, 2006.
21. Becker, H.S. Métodos de pesquisa em ciências sociais. 2 ed. São Paulo: Editora Hucitec, 1994.
22. The Micronutrient Initiative. Fortification handbook: Vitamin and mineral fortification of wheat flour and maize meal. Ottawa: The Micronutrient Initiative, 2004. Available in: [http://www.micronutrient.org/resources/publications/Fort_handbook.pdf].
23. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Manual de fortificação de farinha de trigo com ferro. Rio de Janeiro (RJ): Embrapa Agroindústria de Alimentos, 2001. Disponível em: [http://189.28.128.100/nutricao/docs/ferro/manual_fortificacao_farinha_ferro.pdf].
24. Buzzo ML, Carvalho MFH, Tiglia P, Arauz EEK, Matsuzaki R. Monitoramento de farinha de trigo e de milho fortificadas com ferro. *Rev Inst Adolfo Lutz*.2012;71(4):645-9.
25. Lopes EA, Franco BDGM. Influência do controle da etapa de molhagem dos grãos na qualidade microbiológica da farinha de trigo. *Alim Nutr*.2006;17(2):209-18.
26. Tavolaro P, Oliveira CAF, Lefèvre F. Avaliação do conhecimento em práticas de higiene: uma abordagem qualitativa. *Interface*.2006;10(19):243-54.

Caracterização, teor de polifenóis totais e atividade antioxidante em diferentes tipos de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill.) para chimarrão

Characterization and determination of the total polyphenols contents and the antioxidant activity in four types of yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill.) for preparing *chimarrão*

RIALA6/1591

Clarissa Obem dos SANTOS^{1*}, Simone César TRINDADE¹, Márcia Liliane Rippel SILVEIRA¹, Roberta Oliveira SANTOS¹, Cláudia Kaehler SAUTTER²

*Endereço para correspondência: ¹Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brasil. E-mail: clazinha.obem@gmail.com

²Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brasil. Recebido: 06.09.2013 - Aceito para publicação: 18.03.2014

RESUMO

Considerando-se a ampla utilização das folhas da erva-mate, bem como os benefícios advindos de seu emprego, neste estudo foi avaliada a qualidade de quatro tipos de ervas-mate nativas de espécime chimarrão: tradicional, com adição de 5 % e 10 % de açúcar, e a moída grossa, bem como a homogeneidade em três lotes dos produtos, correspondentes a diferentes semanas de processamento. Foram avaliadas as propriedades físico-químicas, o teor de polifenóis totais e a atividade antioxidante. Os extratos aquosos de erva-mate foram elaborados a 85 °C, mantidos em decocção em sistema fechado durante 10 e 30 minutos. As ervas-mate com adição de açúcar apresentaram menores teores de material mineral e de fibra bruta quando comparadas aos tipos tradicional e moída grossa. A erva-mate moída grossa acondicionada em embalagem laminada apresentou os menores valores de atividade de água em relação aos outros tipos de ervas acondicionados em embalagem de papel. A embalagem laminada também contribuiu para a menor absorção de oxigênio, que retarda a oxidação da clorofila e mantém a coloração verde do produto. Os extratos elaborados a partir da erva-mate moída grossa e os que permaneceram por maior tempo em decocção apresentaram maiores teores de polifenóis totais.

Palavras-chave. *Ilex paraguariensis* St Hill, caracterização, extratos aquosos, polifenóis totais, atividade antioxidante.

ABSTRACT

Considering the wide use of the yerba mate leaves, and the benefits derived from them, the present study aimed at evaluating the quality of four kinds of native yerba-mate of chimarrão-type: traditional; specimens with addition of 5 % and 10 % of sugar; and thick ground sample. The homogeneity aspect was analyzed in three batches of products, corresponding to different weeks of processing. Also, the physicochemical properties, the total polyphenols contents and the antioxidant activity were evaluated. The aqueous extracts of yerba mate were prepared at 85 °C kept in decoction in a closed system, for 10 and 30 minutes. The yerba mate with sugar addition showed lower levels of mineral material and crude fiber, when compared with the traditional and the thick ground types. The thick ground kind of yerba mate wrapped in laminated package showed the lowest values of water activity in relation to other types of herbs wrapped in paper package. The laminated package also contributed to the low oxygen absorption delaying the oxidation of chlorophyll, maintaining the green coloration of the product. The extracts prepared from the thick ground kind of yerba mate, and those exposed to the longer decoction showed higher levels of total polyphenols.

Keywords. *Ilex paraguariensis* St Hill, characterization, aqueous extracts, total polyphenols, antioxidant activity.

INTRODUÇÃO

A erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill.) pertence à família Aquifoliaceae¹ e ocorre naturalmente em países da América do Sul, como Argentina, Paraguai e Brasil. A produção nacional de erva-mate está concentrada principalmente nos estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, e em menor proporção, nos estados de Mato Grosso do Sul, São Paulo, Minas Gerais e Rio de Janeiro². O estado do Rio Grande do Sul foi o maior produtor nacional de folha verde de erva-mate, entre os anos de 2009 a 2011, com produção média de 263.928 toneladas/ano o que corresponde a 60 % da produção nacional, seguido do Paraná, Santa Catarina e Mato Grosso do Sul³. Os municípios de Ilópolis, Arvorezinha, Palmeira das Missões, Venâncio Aires e Fontoura Xavier são os maiores produtores de folha verde de erva-mate do Rio Grande do Sul³.

De acordo com a legislação brasileira⁴, a erva-mate é definida como o produto constituído exclusivamente pelas folhas e ramos de *Ilex paraguariensis* St. Hill., obtido por processo de secagem e fragmentação destinado ao preparo de “chimarrão” ou “tererê” podendo ser adicionado de açúcar. A colheita da erva-mate pode ser do tipo nativa ou cultivada, segundo Borges et al⁵. O erval nativo caracteriza-se pela presença de árvores de erva-mate que ocorrem naturalmente consorciadas com outras árvores em remanescentes de mata nativa. Outra característica do erval nativo é o sombreamento parcial que ocorre devido à cobertura proporcionada por outras espécies arbóreas.

O processamento da erva-mate destinada ao chimarrão pode ser caracterizado por duas fases, a produção e a indústria. A primeira fase também denominada transformação primária abrange as seguintes etapas: colheita, a alimentação e o sapeco, a desidratação e a fragmentação. Na indústria, que corresponde à segunda fase são realizadas as operações de classificação, armazenamento, moagem, homogeneização e empacotamento⁶.

A erva-mate possui inúmeras aplicações, sendo o chimarrão e a fabricação de chás os produtos que consomem a maior quantidade de folhas². Além disso, é ingrediente para outros tipos de bebidas como, por exemplo, chá-mate e tererê, consumidos sob a forma de infusão quente ou fria, enquanto que o extrato de folhas diluído é utilizado na elaboração de refrigerantes, sucos, cerveja e vinho. A erva-mate pode ser utilizada

ainda em insumos de alimentos como corante natural e conservante de alimentos e em sorvetes, balas, bombons, caramelos, chicletes e gomas. Nestes produtos, são utilizados o pigmento clorofila e o óleo essencial⁷. As folhas de erva-mate constituem-se também em matéria-prima para antioxidante, cosméticos e medicamentos⁸.

No beneficiamento da erva-mate destinada ao preparo de chimarrão, a indústria pode adicionar açúcar, especiarias e outras espécies vegetais, como camomila, funcho, erva-doce, cidreira, entre outros, podendo ser adicionado ainda, aroma. Porém, esse produto, de acordo com o Regulamento Técnico⁴, passa a ser definido como composto de erva-mate. A erva-mate disponível para comercialização, cuja finalidade é o chimarrão, é comumente armazenada em embalagem de papel ou laminada, mas pode também ser embalada a vácuo garantindo assim as propriedades sensoriais de cor e odor características do produto e apreciadas pelos consumidores.

A Europa, Estados Unidos, Síria e Japão importam folhas de erva-mate e as transformam em extrato vegetal, para utilização em formulações fitoterápicas em função do teor de vitaminas e minerais, bem como pelo conteúdo de cafeína e teobromina presentes nessa matéria-prima^{9,10}. As bebidas à base de erva-mate, como chimarrão e chá-mate, apresentam propriedades antioxidantes devido aos ácidos fenólicos, presentes em altas concentrações nessas bebidas¹⁰. Segundo Filip et al¹¹, no chimarrão, 500 mL da infusão a 75 °C apresenta efeitos fisiológicos relacionados à presença de cafeína e polifenóis, além de seu sabor e aroma típicos. De acordo com Cabral-Malheiros¹², diversos estudos comprovam os benefícios à saúde proporcionados pelo consumo de bebidas à base de erva-mate. Conforme Schinella et al¹³, a ingestão de um extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* poderia ser um meio efetivo e econômico de suprir quantidades significativas de antioxidantes, aumentando as defesas do organismo humano contra o ataque de radicais livres.

Neste contexto, considerando a ampla utilização das folhas de erva-mate, bem como os benefícios advindos da sua utilização, é importante realizar a caracterização deste material visando a obtenção de informações técnico-científicas que contribuam para o seu uso em produtos alimentícios. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar as características de quatro tipos de erva-mate nativa tipo chimarrão e a homogeneidade em blocos de três lotes de cada produto, correspondentes a

diferentes semanas de processamento. Adicionalmente, avaliou-se o teor de polifenóis totais e a atividade antioxidante a partir da elaboração de extratos aquosos de erva-mate.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostra

As amostras foram cedidas pela Indústria e Comércio de Erva-mate Santiago Ltda (Santiago, RS). A matéria-prima para a produção de erva-mate nativa tipo chimarrão foi proveniente do município de Cruz Machado, PR, localizado ao Sul do estado e que possui características eminentemente agrícolas tendo a erva-mate como parte da sua base econômica.

O produto cedido estava acondicionado em embalagens utilizadas comercialmente, com capacidade de 500 g cada. Para a erva-mate tradicional e com adição de 5 % e 10 % de açúcar, a embalagem, era de papel de dupla camada (papel opaline e papel monolúcido) e para erva-mate moída grossa era do tipo filme laminado (polipropileno biorientado metalizado/polipropileno de baixa densidade).

Delineamento experimental e análise estatística dos dados

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com quatro tipos de erva-mate: erva-mate tradicional (controle), erva-mate com adição de 5 % e 10 % de açúcar e erva-mate moída grossa (adição de 30 % de material foliar com maior granulometria); e com blocos de três lotes de cada produto, correspondentes ao intervalo de tempo de duas semanas de processamento, onde o lote 3 corresponde a data do empacotamento, o lote 2 a duas semanas e o lote 1 a quatro semanas de armazenamento. Todas as análises foram realizadas em triplicata e os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), seguido do teste de Tukey ($p < 0,05$), com auxílio do programa Statistic versão 9.0.

Análises físico-químicas

A caracterização físico-química dos diferentes tipos de erva-mate foi realizada por meio de análises do teor de umidade, matéria mineral, proteína bruta, fibra bruta, extrato etéreo e carboidrato. Para as análises da caracterização, as amostras foram previamente trituradas em micromoinho e classificadas quanto à granulometria. Realizou-se ainda, a determinação de cor

e atividade de água em alíquotas das amostras retiradas diretamente da embalagem. As amostras de ervas-mate permaneceram nas embalagens originais, armazenadas a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Os resultados das determinações foram expressos em % da amostra integral (AI).

Umidade

O método empregado para determinar a umidade foi realizado de acordo com as Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz¹⁴, onde 3 g de amostra foram mantidas em estufa a 105 °C até peso constante.

Matéria mineral

O teor de cinzas foi determinado a partir da incineração de 3g de amostra em mufla regulada a 500-550 °C, por aproximadamente 8 horas¹⁴.

Proteína bruta

A proteína bruta foi obtida pela determinação da porcentagem de nitrogênio total da amostra, realizada pelo método micro Kjeldahl e o resultado foi multiplicado pelo fator de conversão 6,25¹⁴.

Fibra bruta

Para a determinação do teor de fibra bruta utilizou-se o digestor de fibras *Ankom 220 Fiber Analyzer* conforme as recomendações do fabricante. Pesou-se 1 g de amostra previamente desengordurada em *Filter Bag Technique* da *Ankom*[®], que foi selado e depositado no digestor de fibras (*Ankom 220 Fiber Analyzer*). Para a digestão, adicionou-se aproximadamente 2000 mL de ácido sulfúrico 1,25 % e manteve-se em ebulição por 40 minutos. Após efetuou-se duas lavagens com água destilada a temperatura entre 50-90 °C; então, adicionou-se 2000 mL de hidróxido de sódio 1,25 % mantendo-se em fervura por 40 minutos. Ao fim desta etapa efetuaram-se três lavagens com água quente. Os *Filter Bag* foram retirados do aparelho, lavados com acetona e dessecados em estufa a 105 °C por uma hora, resfriados em dessecador e pesados. Por fim, os *Filter Bag* foram levados à mufla a 500-550 °C até obtenção de peso constante, para correção do teor de minerais.

Extrato etéreo

A determinação do extrato etéreo foi realizada a partir da extração direta em Soxhlet empregando-se

aproximadamente 3 g de material foliar e éter de petróleo como solvente de extração¹⁴.

Carboidrato

A fração de carboidratos foi estimada por diferença:

% CNF = 100-(% umidade + % cinzas + % extrato etéreo + proteína bruta + fibra bruta).

Atividade de água

A atividade de água foi medida diretamente, por meio de um analisador de atividade de água da marca AquaLab, modelo 4TEV, à temperatura constante (25 °C), conforme recomendações do fabricante. Seu princípio baseia-se na condensação da água em superfície espelhada e fria, e detecção por sensor infravermelho. As amostras são colocadas em cubetas plásticas apropriadas e inseridas no aparelho, a determinação da umidade relativa de equilíbrio é identificada quando transcorrido o tempo necessário para o equilíbrio da mesma.

Cor

A cor foi determinada por reflectância no espaço de cor CIELAB, usando colorímetro Konica Minolta® CR-300, com iluminante padrão D65 e ângulo de observação de 2°. Os parâmetros de cor indicam a luminosidade (L^*), que varia do preto (0) ao branco (100) e a cromaticidade da amostra ($+a^*$ direção para o vermelho, $-a^*$ direção para o verde, $+b^*$ direção para o amarelo e $-b^*$ direção para o azul). O croma (C^*) expressa a saturação ou intensidade da cor, enquanto o ângulo de matiz (H) indica a cor observável e é definido como iniciando no eixo $+a^*$, em graus, em que 0° é $+a^*$ (vermelho), 90° é $+b^*$ (amarelo), 180° é $-a^*$ (verde), e 270° é $-b^*$ (azul). As amostras utilizadas para as leituras de cor foram retiradas diretamente das embalagens, colocadas em placas de Petri de 40 mL (01 cm de espessura) sob um fundo branco padrão, onde foram efetuadas três leituras sequenciais com homogeneização manual da amostra entre as leituras.

Elaboração dos extratos aquosos

Foram elaborados dois extratos aquosos de erva-mate diferenciando-se por dois tempos de maceração utilizados: 10 e 30 minutos. Posteriormente, avaliou-se o teor de polifenóis totais e a atividade antioxidante nesses extratos.

O primeiro extrato foi elaborado de acordo com o método descrito por Burgardt¹⁵, onde se utilizou erva-mate e água na proporção de 10:100 (p/v), mantendo em decocção com sistema fechado, a uma temperatura de 85 °C durante 30 minutos.

O segundo extrato foi elaborado da mesma forma que o primeiro, porém foi mantido em decocção por 10 minutos. Após o período de decocção, os extratos foram filtrados e acondicionados em vidros âmbar de 50 mL e armazenados em temperatura de refrigeração (4 °C) até o momento das análises.

Polifenóis totais

A determinação da concentração de polifenóis totais nos extratos aquosos de erva-mate elaborados foi realizada por meio da reação de oxirredução com reagente de Folin Ciocalteu o qual reage com as hidroxilas presentes nos polifenóis. As leituras em triplicata da absorbância foram realizadas em espectrofotômetro (FEMTO 600 plus®) em comprimento de onda de 765 nm, conforme o método de Singleton e Rossi¹⁶. Utilizou-se como padrão o ácido gálico, nas concentrações de 0; 10; 20; 30; 40 e 50 mg.L⁻¹ para construir a curva de calibração e os resultados obtidos foram expressos em equivalentes de ácido gálico (g.L⁻¹ EAG).

Atividade antioxidante

Para avaliar o potencial antioxidante dos extratos de erva-mate foi utilizado o método DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila), segundo Brand-Williams et al¹⁷.

O método DPPH baseia-se na desativação do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) por antioxidantes produzindo um decréscimo da absorbância a 517 nm que pode ser detectado por espectrofotometria.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1 estão apresentados os resultados médios obtidos nas análises de matéria mineral, proteína bruta, fibra bruta, extrato etéreo e carboidratos dos quatro tipos de erva-mate analisados, com os seus respectivos lotes.

As ervas-mate com adição de 5 % e 10 % de açúcar apresentaram menor teor de material mineral quando comparadas com as ervas-mate tradicional e moída grossa para todos os lotes analisados. Diferenças significativas no teor de proteína bruta foram observadas

Tabela 1. Caracterização físico-química de quatro tipos e três lotes de erva-mate, armazenados à temperatura ambiente e em embalagens comerciais

Tipo de erva-mate	LOTES		
	1	2	3
MATÉRIA MINERAL (% AI*)			
Tradicional	5,99±0,02 ^{ab}	6,31±0,03 ^{aA}	5,92±0,17 ^{aB}
5 % de açúcar	5,36±0,18 ^{bA}	5,52±0,03 ^{bA}	5,59±0,04 ^{bA}
10 % de açúcar	5,43±0,05 ^{bb}	5,74±0,01 ^{bA}	5,58±0,09 ^{bb}
Moída Grossa	6,22±0,09 ^{aB}	6,49±0,04 ^{aA}	5,83±0,03 ^{abC}
PROTEÍNA BRUTA (% AI*)			
Tradicional	11,83±0,04 ^{abA}	12,10±0,37 ^{aA}	12,36±0,14 ^{aA}
5 % de açúcar	11,90±0,72 ^{abA}	11,44±0,19 ^{aA}	11,27±0,37 ^{aA}
10 % de açúcar	11,45±0,75 ^{ba}	11,69±0,62 ^{aA}	11,66±0,40 ^{aA}
Moída Grossa	12,98±0,42 ^{aA}	11,97±0,22 ^{aA}	12,41±0,22 ^{aA}
FIBRA BRUTA (% AI*)			
Tradicional	21,15±0,11 ^{aA}	20,05±0,11 ^{abA}	20,98±0,34 ^{aA}
5 % de açúcar	19,91±0,47 ^{aA}	17,78±0,13 ^{ba}	19,11±0,97 ^{abA}
10 % de açúcar	19,84±0,20 ^{aA}	18,59±0,04 ^{ba}	17,83±0,56 ^{ba}
Moída Grossa	21,57±0,15 ^{aA}	22,77±2,98 ^{aA}	21,80±0,27 ^{aA}
EXTRATO ETÉREO (% AI*)			
Tradicional	5,32±0,38 ^{aA}	5,56±0,69 ^{aA}	5,31±0,39 ^{aA}
5 % de açúcar	5,02±0,34 ^{aA}	5,35±0,28 ^{aA}	5,23±0,54 ^{aA}
10 % de açúcar	4,92±0,03 ^{aA}	5,67±0,04 ^{aA}	5,43±0,26 ^{aA}
Moída Grossa	6,10±0,14 ^{aA}	5,83±1,29 ^{aA}	5,61±0,22 ^{aA}
CARBOIDRATOS (% AI*)			
Tradicional	45,85±0,51 ^{ba}	47,03±0,78 ^{ba}	47,52±0,84 ^{ba}
5 % de açúcar	51,66±0,80 ^{aA}	52,08±0,38 ^{aA}	51,68±1,07 ^{aA}
10 % de açúcar	52,37±1,12 ^{aAB}	49,91±0,62 ^{ab}	52,93±0,18 ^{aA}
Moída Grossa	45,67±0,63 ^{ba}	45,46±1,54 ^{ba}	47,47±0,25 ^{ba}

*% AI: amostra integral. Lote 1: corresponde a quatro semanas de armazenamento; lote 2: a duas semanas e o lote 3: a data do empacotamento. Letras minúsculas diferentes na mesma coluna correspondem a diferenças significativas entre os quatro tipos de erva-mate e letras maiúsculas diferentes na mesma linha apresentam diferenças significativas entre os lotes analisados, pelo teste de Tukey (p<0,05) n. = 3

apenas no primeiro lote. Os maiores teores de proteína foram observados na erva-mate moída grossa (lotes 1 e 3) e erva-mate tradicional (lote 2), e os menores na erva-mate com adição de 5 % de açúcar (lotes 2 e 3) e com adição de 10 % de açúcar (lote 1). Em relação ao conteúdo de fibra bruta, as erva-mate do lote 1 não apresentaram diferença significativa, porém as com adição de açúcar apresentaram os menores teores de fibra (lotes 2 e 3). Os maiores teores de carboidratos, entre os tipos de ervas analisadas foram encontrados para as que são adicionadas

de açúcar. Quanto ao teor de extrato etéreo não houve diferença significativa entre os tipos de erva-mate e os lotes analisados.

Burgstaller (apud Esmelindro)¹⁸ observou teores máximos e mínimos de cinzas, proteína, fibra bruta e gordura na erva-mate processada pronta para consumo, no entanto não foi especificado o tipo de processamento da erva-mate utilizada. Nesse trabalho foram observados teores de cinzas entre 5,07-6,60 %_{base seca}, proteína 8,30-13,45 %_{base seca}, fibra bruta 14,96-19,95 %_{base seca} e gordura

5,57-9,10 %_{base seca}. Esmelindro¹⁸ avaliou a composição físico-química da erva-mate em função de duas etapas de processamento industrial quanto ao tipo de secador utilizado, rotativo ou esteira. Para o secador rotativo, mesmo equipamento empregado na elaboração da erva-mate utilizada neste experimento, a média do teor de cinzas ficou entre 5,58 e 6,08 %, o teor de proteínas apresentou média de 12,04 a 14,49 %, a fibra bruta de 18,70 a 24,32 % e o de gordura entre 5,50 e 7,01 %.

Comparando-se os resultados obtidos no presente trabalho com a literatura, pode-se verificar que os teores de cinzas e proteínas ficaram dentro das faixas apresentadas por Burgstaller (apud Esmelindro)¹⁸, porém, os teores de gordura verificados nas ervas-mate com adição de 5 % e 10 % de açúcar (com exceção do lote 2) e a tradicional ficaram abaixo das médias apresentadas pelo autor. A diferença no decréscimo de gordura pode estar relacionada justamente à substituição de 5 % e 10 % de açúcar na formulação, sendo este desengordurado. No entanto, os teores de gordura do presente trabalho são semelhantes aos obtidos por Esmelindro¹⁸. Valores superiores aos obtidos por Burgstaller (apud Esmelindro)¹⁸ para fibra bruta foram encontrados para as ervas-mate do tipo tradicional e moída grossa.

Os teores médios de cinzas obtidos nos lotes 1 e 2 da erva-mate com 5 % de açúcar e no lote 1 da erva-mate com 10 % de açúcar ficaram abaixo das médias apresentadas por Esmelindro¹⁸. Porém, os

tipos tradicional no lote 2 e moída grossa nos lotes 1 e 2 apresentam maiores concentrações de minerais. Os principais minerais presentes em plantas são o potássio, fósforo e manganês. O potássio é necessário para retenção hídrica, o fósforo está relacionado ao metabolismo primário e secundário e o manganês à estabilização do anel porfirínico da clorofila¹⁹. Portanto, a variabilidade no teor desses minerais, especialmente o potássio, pode estar relacionada às condições edafoclimáticas.

Em relação aos teores de proteína obtidos, as ervas-mate dos tipos tradicional nos lotes 2 e 3 e moída grossa nos lotes 1 e 3 ficaram dentro das faixas apresentadas por Esmelindro¹⁸, mas o conteúdo de proteína nos demais tipos de ervas investigadas ficaram abaixo do valor apresentado por este autor.

Apenas as ervas-mate com 5 % e 10 % de açúcar do lote 2 e com 10 % de açúcar do lote 3 apresentaram valores de fibra bruta inferiores ao encontrado por Esmelindro¹⁸.

A variação média da atividade de água e do teor de umidade, nos quatro tipos e nos três lotes de amostras de erva-mate armazenadas à temperatura ambiente em embalagens comerciais é apresentada na Tabela 2.

A erva-mate moída grossa acondicionada em embalagem laminada apresentou a menor atividade de água entre as ervas analisadas. Este resultado comprova que o material utilizado na embalagem laminada protege melhor o produto quanto à absorção de umidade

Tabela 2. A atividade de água e o teor de umidade em quatro tipos e três lotes de amostras de erva-mate armazenados à temperatura ambiente em embalagens comerciais

Tipo de erva-mate	LOTES		
	1	2	3
ATIVIDADE DE ÁGUA**			
Tradicional	0,59 ^{bA}	0,56 ^{aB}	0,56 ^{aB}
5 % de açúcar	0,60 ^{aA}	0,56 ^{aB}	0,55 ^{bC}
10 % de açúcar	0,61 ^{aA}	0,55 ^{bB}	0,53 ^{cC}
Moída Grossa	0,40 ^{cA}	0,36 ^{cC}	0,37 ^{dB}
UMIDADE (%AI*)			
Tradicional	9,69±0,20 ^{aA}	8,95±0,17 ^{aB}	7,90±0,12 ^{aC}
5 % de açúcar	6,14±0,21 ^{cC}	7,93±0,11 ^{cA}	7,12±0,07 ^{bB}
10 % de açúcar	6,08±0,18 ^{cC}	8,50±0,14 ^{bA}	6,58±0,12 ^{cB}
Moída Grossa	7,46±0,22 ^{bB}	8,83±0,05 ^{aA}	6,88±0,04 ^{bC}

*% AI: amostra integral. **desvio padrão inferior a 0,0041. Lote 1: corresponde a quatro semanas de armazenamento; lote 2: a duas semanas e o lote 3 a data do empacotamento. Letras minúsculas diferentes na mesma coluna correspondem a diferenças significativas entre os quatro tipos de erva-mate e letras maiúsculas diferentes na mesma linha apresentam diferenças significativas entre os lotes analisados, pelo teste de Tukey (p<0,05), n = 3

do ambiente. De acordo com Valduga et al²⁰, com o aumento da atividade de água (Aa) há a probabilidade de crescimento de bolores e leveduras. Este autor constatou que teores de Aa inferiores a 0,62 não apresentaram um aumento considerável na contagem de bolores e leveduras (UFC/g). No presente trabalho, os valores de atividade de água encontrados foram inferiores ao descrito por Valduga et al²⁰, garantindo assim a qualidade do produto.

Cabral-Malheiros et al²¹ avaliaram o teor de umidade e de atividade de água em ervas-mate armazenadas à temperatura ambiente durante 12 semanas, acondicionadas em dois diferentes tipos de embalagens, laminada e de papel; os autores verificaram que no produto acondicionado em embalagem laminada não houve variação significativa de umidade e a atividade de água manteve-se estável, enquanto que para a embalagem de papel houve variação nas primeiras quatro semanas de armazenamento, mantendo-se estável após este período. Os valores médios de umidade e atividade de água registrados antes do empacotamento, na segunda e quarta semana, foram respectivamente de 4,82; 7,48; 10,31 para umidade e 0,41; 0,62; 0,71 para a

atividade de água na embalagem de papel e 4,84; 4,90; 4,95 de umidade e 0,39; 0,41; 0,40 de atividade água na embalagem laminada. No presente trabalho, os valores médios de umidade verificados nas ervas-mate acondicionadas em embalagem de papel são similares às faixas apresentadas por Cabral-Malheiros et al²¹ para o mesmo tipo de embalagem.

Os resultados apresentados na Tabela 2 demonstram que a erva-mate do tipo tradicional apresentou os maiores valores de umidade em todos os lotes analisados, quando comparada com as outras duas ervas (adição de 5 e 10 % de açúcar) que também estavam armazenadas em embalagem de papel. Em relação à embalagem laminada, os teores médios de umidade observados para a erva-mate moída grossa foram superiores aos verificados por Cabral-Malheiros et al²¹ para esta mesma embalagem. A diferença entre os dois trabalhos para os resultados obtidos na embalagem de papel laminado pode estar relacionada ao tipo de processamento, pois a erva-mate moída grossa apresenta adição de material foliar de maior granulometria e conseqüentemente, maior teor de umidade.

Tabela 3. Parâmetros de cor em quatro tipos e três lotes de amostras de erva-mate armazenados à temperatura ambiente em embalagens comerciais

Tipo de erva-mate	LOTES		
	1	2	3
	Luminosidade (L*)		
Tradicional	44,20±1,23 ^{ba}	44,24±0,79 ^{aA}	45,53±1,63 ^{aA}
5 % de açúcar	47,65±1,25 ^{aA}	45,72±0,70 ^{aA}	46,05±1,10 ^{aA}
10 % de açúcar	46,28±0,42 ^{abA}	44,68±1,18 ^{aA}	45,54±0,75 ^{aA}
Moída Grossa	41,44±0,58 ^{ca}	44,17±1,33 ^{aA}	43,39±0,88 ^{aA}
	Parâmetro de cor a*		
Tradicional	-9,63±0,20 ^{bb}	-12,19±0,10 ^{aA}	-11,67±0,36 ^{bA}
5 % de açúcar	-9,80±0,31 ^{bc}	-10,76±0,14 ^{bb}	-13,84±0,28 ^{aA}
10 % de açúcar	-9,65±0,21 ^{bc}	-10,95±0,19 ^{bb}	-13,68±0,18 ^{aA}
Moída Grossa	-10,53±0,09 ^{ab}	-11,87±0,06 ^{aA}	-12,39±0,35 ^{ba}
	Parâmetro de cor b*		
Tradicional	24,30±0,48 ^{abA}	25,07±0,31 ^{aA}	25,49±0,77 ^{abA}
5 % de açúcar	25,17±0,81 ^{aAB}	23,98±0,33 ^{aB}	26,42±0,54 ^{aA}
10 % de açúcar	24,39±0,33 ^{abB}	24,22±0,51 ^{aB}	26,22±0,36 ^{abA}
Moída Grossa	22,36±0,40 ^{bb}	24,00±0,30 ^{aA}	24,12±0,33 ^{ba}

Lote 1: corresponde a quatro semanas de armazenamento; lote 2 a duas semanas e o lote 3: a data do empacotamento. Letras minúsculas diferentes na mesma coluna correspondem a diferenças significativas entre os quatro tipos de erva-mate e letras maiúsculas diferentes na mesma linha apresentam diferenças significativas entre os lotes analisados, pelo teste de Tukey (p<0,05) n = 3

Valduga et al²⁰ relatam que estão disponíveis no mercado inúmeras opções de embalagens de papel, plásticas flexíveis, laminadas e/ou cartonadas, com diferentes características de barreiras a gases, vapor de água e à luz, bem como a possibilidade de incorporar métodos que controlem e/ou modifiquem a atmosfera interna do produto, como vácuo e/ou adição de gases (N₂, CO₂, entre outros), permitindo dessa forma a implantação de novas técnicas de preservação do produto, facilitando a distribuição e a comercialização. Entretanto, na literatura são escassas as informações referentes às aplicações dessas técnicas e seus impactos nas características de qualidade da erva-mate tipo chimarrão.

Os valores de L*, a* e b* obtidos pela análise instrumental de cor são mostrados na Tabela 3. Observa-se que os valores encontrados para o parâmetro a* foram negativos, correspondendo à cor verde, e do parâmetro b* positivos (amarelo) em todas as análises realizadas.

Durante o armazenamento pode-se observar que não houve diferença significativa entre os lotes analisados de erva-mate quanto à luminosidade. Porém, as ervas-mate com adição de açúcar do lote 1, referente a quatro semanas de armazenamento, apresentaram tendência ao aumento da luminosidade quando comparado com a data do empacotamento (lote 3). Possivelmente, esta tendência seja devido a presença do açúcar refinado que reflete em maior intensidade do que os tecidos vegetais.

Quanto ao parâmetro de cor a*, os maiores valores predominaram nas ervas-mate moída grossa e tradicional, nos lotes 1 e 2. O parâmetro b* corresponde à coloração amarela, isto sugere a degradação da clorofila no tecido vegetal. Observa-se na Tabela 3, que a erva moída grossa apresentou, nos lotes 1 e 3, o menor valor de b* entre as ervas analisadas, possivelmente devido à proteção desta erva pela embalagem de papel laminado utilizada, que impediu a absorção do oxigênio e posterior oxidação da clorofila.

Cabral-Malheiros et al²¹ também analisaram os parâmetros de cor e os valores médios de L* registrados antes do empacotamento, na segunda e quarta semana, foram, respectivamente, de 49,26; 48,09 e 47,60 na embalagem de papel e 49,28; 48,72 e 49,01 na embalagem

laminada. Para o parâmetro de cor a*, os valores obtidos foram de -13,20; -11,98 e -10,51 na embalagem de papel e -13,27; -12,50 e -11,06 na embalagem laminada, e para o parâmetro de cor b* foram de 29,33; 28,69; 28,86 na embalagem de papel e 29,54; 28,86 e 28,20 na embalagem laminada.

No presente trabalho, em todas as ervas-mate, a luminosidade e o parâmetro de cor b* ficaram abaixo dos valores descritos por Cabral-Malheiros et al²¹. Isto significa que as ervas-mate analisadas são mais escuras e apresentaram uma menor degradação da clorofila.

Os resultados encontrados para os polifenóis totais e a atividade antioxidante nos diferentes extratos aquosos de erva-mate elaborados podem ser observados na Tabela 4. Na maceração por 10 minutos, os extratos preparados com a erva-mate moída grossa apresentaram os maiores teores de polifenóis totais. A maior atividade antioxidante entre os tipos de ervas analisadas foi observada naquelas com adição de açúcar, este ingrediente pode ter interferido no método, apresentando resultados superestimados, pois o DPPH tem como princípio o mecanismo de desativação baseado na transferência de elétrons. Os açúcares possuem hidroxilas que podem doar prótons desativando o DPPH, portanto nas altas concentrações apresentadas (5 e 10 %) tal ingrediente é um grande interferente neste método. O maior conteúdo de polifenóis para a erva-mate moída grossa também foi observado entre os extratos com 30 minutos de maceração, porém sem apresentar maior poder antioxidante. Este resultado pode ser decorrente da adição de material foliar de maior granulometria, assim como pedúnculos que possuem alto teor de fenólicos nos vasos. Um segundo fator que pode contribuir para o elevado teor fenólico é a embalagem que diminui a permeabilidade de oxigênio, reduzindo, portanto a oxidação fenólica durante o armazenamento.

Verificou-se também que os extratos aquosos que permaneceram em decocção por pouco tempo apresentaram um menor teor de polifenóis totais quando comparados com os extratos com tempo de decocção de 30 minutos. Isto sugere que, quanto maior o tempo de exposição dos extratos aquosos de erva-mate a 85 °C, maior será o teor de polifenóis totais. No entanto, essa

Tabela 4. Teores de polifenóis totais e da atividade antioxidante nos extratos aquosos de erva-mate

Tempo de maceração e tipo de erva-mate	Polifenóis totais (g L ⁻¹ EAG)			DPPH* (EC50 mL _{extrato})		
	LOTE 1	LOTE 2	LOTE 3	LOTE 1	LOTE 2	LOTE 3
10 minutos						
Tradicional	6,83±0,35 ^{abB}	7,84±0,47 ^{aA}	7,09±0,28 ^{bAB}	1,87±0,30 ^{aA}	2,18±0,45 ^{aA}	1,66±0,14 ^{aA}
5 % de açúcar	5,92±0,37 ^{ba}	6,95±1,47 ^{aA}	8,03±1,98 ^{abA}	1,60±0,41 ^{aA}	1,74±0,33 ^{aA}	1,07±0,11 ^{aA}
10 % de açúcar	5,65±0,44 ^{ba}	7,37±0,69 ^{aA}	7,30±1,48 ^{ba}	1,41±0,06 ^{aA}	1,72±0,04 ^{aA}	1,72±0,19 ^{aA}
Moída Grossa	8,89±0,09 ^{ab}	8,84±0,98 ^{ab}	10,69±0,17 ^{aA}	1,73±0,35 ^{aA}	3,48±3,22 ^{aA}	2,05±0,51 ^{aA}
30 minutos						
Tradicional	11,15±1,44 ^{ba}	10,70±1,22 ^{aA}	11,41±1,54 ^{aA}	2,00±0,28 ^{aA}	1,36±0,30 ^{aA}	2,07±0,31 ^{aA}
5 % de açúcar	14,59±2,38 ^{aBA}	8,31±0,66 ^{ab}	12,39±1,73 ^{aAB}	2,16±0,72 ^{aA}	1,69±0,34 ^{aA}	2,28±1,49 ^{aA}
10 % de açúcar	10,84±1,22 ^{ba}	10,23±1,19 ^{aA}	11,55±1,37 ^{aA}	2,06±0,30 ^{aA}	1,56±0,24 ^{aA}	2,09±0,39 ^{aA}
Moída Grossa	16,29±1,73 ^{aA}	12,8±0,83 ^{ab}	15,05±0,72 ^{aAB}	2,78±0,36 ^{aA}	2,56±0,66 ^{aA}	2,33±0,23 ^{aA}

Lote 1: correspondente a quatro semanas de armazenamento; Lote 2: a duas semanas e lote 3: a data do empacotamento. *2,2-difenil-1-picrilhidrazila. Letras minúsculas diferentes na mesma coluna correspondem a diferenças significativas entre os quatro tipos de erva-mate e letras maiúsculas diferentes na mesma linha apresentam diferenças significativas entre os lotes analisados, pelo teste de Tukey (p<0,05) n = 3

maior extração não é correlacionável com aumento do poder antioxidante pelo tempo de decocção. Apesar de não haver diferenças significativas entre o tempo de maceração e entre os lotes, o poder antioxidante é extremamente elevado, pois apenas 1,07 a 3,48 mL de extrato já são suficientes para inibir 50% do agente oxidante 2,2- difenil-1-picrilhidrazila.

Donaduzzi et al²² analisaram a variação na concentração de polifenóis totais em dezesseis progênies de erva-mate cultivadas em condições controladas nos municípios de Ivaí, Rio Azul e Guarapuava no estado do Paraná, sendo estas selecionadas entre as mais produtivas, originadas de quatro procedências distintas: Ivaí/PR, Barão do Cotegipe/RS, Quedas do Iguaçu/PR e Cascavel/PR. A média do teor de polifenóis totais das dezesseis progênies cultivadas no município de Ivaí foi de 7,91 g%_{massa seca}, enquanto que no município de Rio Azul foi de 8,74 g%_{massa seca} e em Guarapuava de 9,59 g%_{massa seca}. Os autores observaram diferenças significativas na produção de polifenóis entre as três localidades, as progênies oriundas da região de Ivaí/PR quando cultivadas na mesma localidade apresentaram diferenças estatísticas nos valores de média no teor de polifenóis totais, se comparadas com as outras três procedências. No presente trabalho, os teores de polifenóis totais, quando extraídos por 10 minutos, apresentam-se similares aos observados por Donaduzzi et al²², dependendo da região produtora.

A erva-mate ingerida na forma de chimarrão possui ótimo efeito antioxidante em sistemas vivos e em sistemas químicos²³. A infusão das folhas de *Ilex paraguariensis* possui conteúdo de polifenóis comparável ao chá preto e ao suco de laranja, e quando submetido à normalização para o conteúdo de polifenóis totais da bebida, apresenta atividade antioxidante ligeiramente maior que vinhos, suco de laranja e chá preto²⁴.

Conforme Barboza²⁵, os polifenóis constituem 20 % a 30 % da composição da erva-mate, são solúveis em água, incolores e conferem o sabor adstringente ao chimarrão. A qualidade da erva-mate beneficiada é positivamente correlacionada com a concentração de flavonoides. A alta concentração de flavonoides confere excelentes características químicas à erva-mate. Os tempos de decocção apresentados na Tabela 4 demonstram que a concentração de fenólicos pode ser otimizada, aumentando em até duas vezes com o aumento do tempo.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho permitem concluir que diferentes tipos e lotes de ervas-mate apresentaram diferença significativa em relação à matéria mineral, carboidratos e umidade, resultantes da adição de açúcar, material foliar de maior granulometria e tempo

de estocagem. Estes fatores também contribuíram para a alteração dos parâmetros de cor avaliados, principalmente para o parâmetro a*, onde se observou redução da cor verde.

A embalagem laminada utilizada no acondicionamento do produto o protegeu da umidade, pois nesta embalagem foram verificados os menores teores de atividade de água. Em relação ao tempo de decocção dos extratos aquosos elaborados, verificou-se que a decocção por um período de 30 minutos favoreceu a extração de polifenóis totais.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Indústria e Comércio de Erva-mate Santiago LTDA pelo apoio recebido.

REFERÊNCIAS

1. Santos KA. Estabilidade da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill.) em embalagens plásticas [dissertação de mestrado]. Curitiba (PR): Universidade Federal do Paraná; 2004.
2. Embrapa Florestas: Sistemas de produção, 1 – 2ª edição. INSS1678-8281 – Versão eletrônica. Ago/2010. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Erva-mate/CultivodaErvaMate_2ed/index.htm>. Acesso em: 04 jul. 2013.
3. SEPLAG. Atlas socioeconômico do Rio Grande do Sul. Secretaria da Coordenação e Planejamento. Porto Alegre: SCP, 2ª edição, 2002. Disponível em: <http://www.scp.rs.gov.br/atlas/conteudo.asp?cod_menu_filho=819&cod_menu=817&tipo_menu=ECONOMIA&cod_conteudo=1598>. Acesso em 04 jul. 2013.
4. Brasil. Resolução de Diretoria Colegiada – RDC nº. 277, de 22 de setembro de 2005. Aprova o “Regulamento Técnico de Espécies Vegetais para o Preparo de Chás”. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/bc36fe0047457e348a3fde3fbc4c6735/RDC_277_2005.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 06 jul. 2013.
5. Borges LR, Lazzari SMN, Lazzari FA. Comparação dos sistemas de cultivo nativo e adensado de erva-mate, *Ilex paraguariensis* St. Hil., quanto a ocorrência e flutuação populacional de insetos. *Rev Bras Entomol*.2003;47(4):563-8.
6. Omar D. Erva-mate: sistema de produção e processamento industrial. Dourados (MS): UFGD; 2009. 288p.
7. Corrêa S, Kist BB, Quintana A. Anuário brasileiro da erva-mate. Santa Cruz do Sul, RS: Grupo de Comunicações Gazeta; p.53-5. 1999.
8. Pasinato R. Aspectos etnoentomológicos, socioeconômicos e ecológicos relacionados à cultura da erva-mate (*Ilex paraguariensis*) no município de Salto da Lontra, Paraná, Brasil [dissertação de mestrado]. Piracicaba (SP): Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz; 2003.
9. Filip R, Lopez P, Coussio J, Ferraro G. Mate substitutes or adulterants: Study of xanthine content. *Phytother Res*.1998;12(54):129-31.
10. Ril FT, Valduga AT, Macedo SMD, Cichoski AJ. Perfil bioquímico de ratos alimentados com iogurte contendo extrato de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil). *Braz J Food Technol*.2011;14(4):332-7.
11. Filip R, Lolito SB, Ferraro G, Fraga CG. Antioxidant activity of *Ilex paraguariensis* and related species. *Nutr Res*.2000;20(10):1437-46.
12. Cabral-Malheiros G. Estudo da alteração da cor e degradação da clorofila durante armazenagem de erva-mate tipo chimarrão [dissertação de mestrado]. Santa Maria (RS): Universidade Federal de Santa Maria; 2007.
13. Schinella GR, Troiani G, Dávila V, Buschiazzi PM, Tournier HA. Antioxidant effects of an aqueous extract of *Illex paraguariensis*. *Biochem Biophys Res Commun*.2000;269(2):357-60.
14. IAL - Instituto Adolfo Lutz. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. 4. ed. São Paulo: IAL, 2008. 1020 p. Versão eletrônica. Disponível em:http://www.ial.sp.gov.br/index.php?option=com_remository&Itemid=20. Acesso em: 06 mar. 2012.
15. Burgardt AC. Desenvolvimento de uma bebida, utilizando extrato de erva-mate verde (*Ilex paraguariensis*) [dissertação de mestrado]. Paraná (PR): Universidade Federal do Paraná; 2000.
16. Singleton VL, Rossi JA. Colorimetry of phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Vitic*.1965;16(3):144-58.
17. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Sci Technol*.1995;28(1):25-30.
18. Esmelindro MC, Toniazzo G, Waczuk A, Dariva C, Oliveira D. Caracterização físico-química da erva mate: influência das etapas do processamento industrial. *Ciênc Tecnol Aliment*.2002;22(2):199-204.
19. Taiz, L, Zeiger, E. *Fisiologia Vegetal*. 5. ed. Porto Alegre (RS): Editora Art Med; 2013.
20. Valduga E, Javornik G, Sordi M, Rezende DF. Avaliação das características de qualidade da erva-mate (chimarrão) acondicionada em diferentes embalagens. *Braz J Food Technol*.2005;8(2):99-105.
21. Cabral-Malheiros G, Hecktheuer LHR, Canto MW, Balsamo GM. O tempo e o tipo de embalagem sobre a erva-mate tipo chimarrão durante armazenagem em condições ambientais. *Ciênc Rural*.2010;40(3):654-60.
22. Donaduzzi CM, Cardozo JREL, Donaduzzi EM, Silva MM, Sturion JA, Correa G. Variação nos teores de polifenóis totais e taninos em dezesseis progênies de erva mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) cultivadas em três municípios do Paraná. *Arq Ciênc Saúde Unipar*.2003;7(2):129-33.
23. Canterle LP. Erva-mate e atividade antioxidante [dissertação de mestrado]. Santa Maria (RS): Universidade Federal de Santa Maria; 2005.
24. Brum EB. Antioxidante natural de marcela (*Achyrocline satureioides*) e de erva mate (*Ilex paraguariensis*) na elaboração de linguiça toscana [dissertação de mestrado]. Santa Maria (RS): Universidade Federal de Santa Maria; 2009.
25. Barboza LMV. Desenvolvimento de bebida à base de erva-mate (*Ilex paraguariensis* Saint Hilaire) adicionada de fibra alimentar [tese de doutorado]. Curitiba (PR): Universidade Federal do Paraná; 2006.

Avaliação da rotulagem e dos teores de gordura de leite e produtos lácteos inspecionados nos Programas de Vigilância Sanitária

Assessment of the labeling and the fat content in milk and lactic products inspected in the Health Surveillance Programs

RIALA6/1592

Janice Ramos de SOUSA

Endereço para correspondência: CCSW 1, lote 5, apartamento 116, edifício Ferrara, Sudoeste, Brasília- Distrito Federal, Cep: 70680-150, telefone fixo: 61-3341-1549, celular: 61.8622-8618. Email: janice.rs@hotmail.com

Laboratório de Leites e Derivados. Núcleo de Química dos Alimentos. Gerencia de Controle de Qualidade de Produtos e Alimentos. Laboratório Central de Saúde Pública. Secretaria de Estado de Saúde do Distrito Federal.

Recebido: 19.12.2012 - Aceito para publicação: 10.03.2014

RESUMO

Neste estudo, foi avaliada a rotulagem de amostras de leite de diversas espécies de animais e dos produtos lácteos inspecionados no Distrito Federal no ano de 2011 e investigada se os teores de gordura dosados estavam de acordo com os estabelecidos na legislação brasileira, específica para cada produto. Foram analisadas 63 amostras de leite de vaca, uma de leite de cabra, 19 de queijos, duas de bebida láctea fermentada e três de composto lácteo de 36 marcas diferentes. Do total analisado, nove apresentaram inconformidades na rotulagem, como a falta de indicação do lote, a sobreposição de etiquetas sobre os rótulos, a indução ao erro e o tamanho da letra. Apenas o queijo Prato apresentou média de conteúdo lipídico inferior ao limite mínimo estabelecido pela legislação específica. O teor de gordura dos queijos Minas Frescal apresentou grande variação, mas apenas uma amostra ultrapassou o limite de teor de gordura determinado na legislação. Os resultados desta pesquisa reforçam a necessidade de maior controle pelos órgãos competentes, pois o *marketing* das indústrias alimentares é excessivamente persuasivo e agressivo, que justifica a necessidade de constante reformulação das leis e de regulamentação de muitos itens ainda não existentes na atual legislação brasileira.

Palavras-chave. laticínios, rotulagem de alimentos, lipídeos.

ABSTRACT

This study evaluated the labeling of milk samples from diverse animals species and of milk products inspected at the Federal District in 2011. Also, it was investigated whether the found fat contents in these samples were in compliance with those established by the specific Brazilian legislations for each product. Sixty-three samples of cow milk, one powdered goat milk, 19 cheeses, two fermented dairy drink and three dairy compound of 36 different brands were analyzed. Of 36 brands, nine showed non-complying labeling, and the most common irregularities were lack of lot identification, overlapping labels, induction to error, and printed letter font size. Of the analyzed products, only the Prato cheese showed lower mean of lipid contents than those recommended by the specific legislation. The fat contents of the *Frescal Minas* cheese showed large variations, but only one sample exceeded the limit recommended by the specific legislation. These results reinforce the need for greater control by the competent government bodies, because the advertisements strategies from the food industries are exceedingly persuasive and aggressive, which justify the need for constant reformulation of the laws and regulations of many items not yet available in the current Brazilian legislation.

Keywords. dairy products, food labeling, lipids.

INTRODUÇÃO

A segurança alimentar tem sido, há várias décadas, a grande preocupação da sociedade brasileira. Devido a este fato, a promoção da alimentação saudável está presente em várias ações governamentais que visam reduzir a ocorrência de doenças e a melhoria da qualidade de vida.

Os avanços das ciências tecnológicas no setor alimentício têm evoluído proporcionalmente aos novos reclames da sociedade contemporânea. No decorrer dos anos, e atendendo as novas necessidades do mundo moderno e da “falta de tempo”, a indústria alimentícia tem lançado no mercado inúmeros produtos alimentícios. Este processo de evolução faz urgir a necessidade de regulamentação, monitoramento e avaliação dos produtos oferecidos ao consumidor. Diante da modernidade e da chamada globalização, a alimentação segura em todos os aspectos tem sido um desafio.

As discussões sobre os paradigmas da alimentação refletem em diferentes áreas de conhecimento. Pesquisas sobre a qualidade dos alimentos, das refeições, das condições ambientais para a produção, desenvolvimento sustentável, considerando ainda, a qualidade de vida da população, contexto socioeconômico e cultural das populações são relevantes na relação homem e alimento¹.

O controle de qualidade do leite, do leite de outras espécies de animais e dos produtos lácteos é de fundamental importância para a garantia da saúde da população. A qualidade pode ser avaliada por meio de determinações físicas, químicas, microbiológicas, sensoriais e provas de higiene².

No Brasil, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) por meio de suas instruções adota a definição de leite como sendo, “*o produto obtido da ordenha completa e ininterrupta, em condições de higiene, de vacas leiteiras sadias, bem alimentadas e descansadas. O leite de outras espécies de animais deve conter o nome da espécie de que procede*”, sendo que tal definição também é normatizada para o Mercosul. Produtos lácteos são os “*produtos obtidos mediante qualquer elaboração do leite que pode conter aditivos alimentícios e ingredientes funcionalmente necessários para a sua elaboração*”³.

Diversos estudos⁴⁻⁶ realizados com leite pasteurizado em diferentes regiões do país têm enfatizado o elevado percentual de amostras em desacordo com os padrões microbiológicos e físico-químicos estabelecidos pela legislação em vigor^{7,8}. É fundamental o controle higiênico-sanitário, desde a obtenção de leite cru nas fazendas até

a embalagem do produto final, pois a sua produção sob condições inadequadas de higiene torna-o veículo de transmissão de doenças à população consumidora⁴.

As maiores preocupações quanto à qualidade físico-química do leite estão associadas ao estado de conservação, à eficiência do seu tratamento térmico e integridade físico-química, principalmente aquela relacionada à adição ou remoção de substâncias químicas próprias ou estranhas à sua composição⁴. Por esse motivo, a composição química deve ser sempre avaliada nos laticínios e nas indústrias em razão dos padrões mínimos exigidos nas normas editadas² pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA)^{7,8}.

O leite, o leite de outras espécies de animais e os produtos lácteos contêm ácidos graxos saturados, que além de serem altamente calóricos, contribuem com o aumento de colesterol no plasma sanguíneo. Devido a estas características, o consumo de gordura está diretamente relacionado com o aumento da incidência de doenças crônicas não transmissíveis, tais como a obesidade e coronariopatias^{9,10}.

Com a globalização, a oferta de produtos no mercado cresceu de forma acentuada e o consumidor brasileiro tornou-se mais exigente em relação à qualidade dos produtos oferecidos. Neste contexto, os cuidados com a rotulagem dos alimentos constituem uma tendência que evidencia o aumento das exigências do consumidor, no sentido da valorização das diversas opções de certificação dos alimentos, buscando assegurar questões relativas, por exemplo, ao processo, à conformidade, à qualidade, à origem e à composição nutricional¹¹.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a adequação da rotulagem¹² de leite, de leite de outras espécies de animais e dos produtos lácteos inspecionados pela Vigilância Sanitária do Distrito Federal no ano de 2011 e investigar se os teores de gordura verificados por meio de ensaios químicos laboratoriais estão de acordo com os teores estabelecidos na legislação brasileira para cada produto^{7,8,13-19}.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras

As amostras foram colhidas via procedimento padrão de fiscalização da Vigilância Sanitária, de acordo com a legislação vigente, e em atendimento ao Programa de Vigilância Sanitária (PVS) da Subsecretaria de Vigilância à Saúde (SVS) do Distrito Federal (DF).

O referido programa tem como objetivo, monitorar a qualidade dos alimentos no âmbito do DF, de forma a abranger toda a sua área geográfica.

Para o estudo em pauta, o plano amostral foi baseado nas coletas de amostras de leite, leite de cabra e produtos lácteos, provenientes das inspeções programadas para o PVS e analisadas no Laboratório de Leite e Derivados (LLD) do Laboratório Central de Saúde Pública do Distrito Federal (LACEN-DF), durante o ano de 2011.

Parte experimental

Foram analisados 88 produtos, sendo 63 amostras de leite (71,6 %), 1 amostra de leite de cabra (1,1 %) e 24 amostras de produtos lácteos (27,3 %), distribuídos entre 36 diferentes marcas.

As amostras das variadas marcas dos produtos inspecionados e analisados receberam as seguintes letras como codificação: A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K.

A análise da rotulagem geral dos produtos eleitos para o presente estudo contemplou os seguintes itens: denominação de venda do alimento, registro do produto no MAPA, lista de ingredientes e aditivos, prazo de validade, identificação do lote, nome e endereço completo da empresa, presença do número de registro de identificação da empresa junto ao órgão competente (Cadastro Nacional de Pessoa Jurídica - CNPJ), presença de informações que possam induzir a erro, presença de instruções para o preparo do alimento, indicação do modo de conservação e armazenamento antes e depois de aberto e a presença indevida de informação de propriedades medicinais ou terapêuticas, tamanho da letra (RDC nº 259/2002-ANVISA)¹², expressão do conteúdo líquido (RDC nº 259/2002-ANVISA¹² e Portaria INMETRO nº 157/2002²⁰), presença de rotulagem nutricional de acordo com a RDC nº 259/2002-ANVISA¹² e RDC nº 360/2003-ANVISA¹⁴; apresentação da expressão "Contém Glúten" (Lei nº 10.674/2003²¹); descrição da função do aditivo e carimbo oficial da inspeção federal ou estadual (Instrução Normativa nº 22/2005- MAPA²²); indicação da idade recomendada para uso, no caso dos alimentos para lactentes e crianças de 1ª infância (RDC nº 222/2002-ANVISA²³).

Outro parâmetro de avaliação foi criado para contabilizar inconformidades de rotulagem para produtos fracionados, pois no comércio varejista ocorre o fracionamento de embalagens de grandes volumes em embalagens menores, como geralmente acontecem com os queijos. Tal variável de análise foi denominada

de "etiqueta complementar". Foi criado também, um parâmetro de avaliação de rótulos denominado de "indução de marca", para os casos em que foi detectada alguma forma de indução de consumo pelo fabricante que não fere a legislação existente, mas que claramente é fator de confusão para o consumidor.

Os rótulos classificados como não conformes foram aqueles que estavam em desacordo com, no mínimo, um item analisado. Embora as resoluções referentes à rotulagem de alimentos sejam bastante amplas, não permitindo nenhum tipo de indução na compra de produtos alimentícios, percebe-se que ainda ocorrem estratégias realizadas pelas indústrias alimentícias que levam os consumidores a adquirir determinados produtos por estarem embalados em vasilhames extremamente semelhantes a outros de consumo já consagrado entre os consumidores.

Para proceder às análises físico-químicas, foram coletadas amostras em duplicata, a temperatura ambiente e encaminhadas, imediatamente, ao laboratório.

Para a análise da gordura total, foi utilizado o método analítico descrito nos Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos do Instituto Adolfo Lutz - IAL²⁴ e Instrução Normativa nº 68/2006 - MAPA²⁵. A técnica utilizada foi a de extração de gordura pelo método de Gerber, que é baseado na propriedade que tem o ácido sulfúrico de dissolver a caseína do leite, sem atacar a matéria gorda; o álcool isoamílico facilita a separação da fase de gordura da fase não gordurosa formando uma coluna límpida.

Os resultados foram expressos em g/100 mL de alimento líquido e g/100 g de alimento sólido, conforme consta na Instrução Normativa nº 51/2002- MAPA⁷.

Para averiguação da fidedignidade das informações encontradas nos rótulos, as amostras foram aprovadas ou condenadas confrontando-se os valores obtidos experimentalmente com os teores do nutriente declarado no rótulo, calculando-se para cada amostra analisada, a porção em gramas inscrita na embalagem e considerando a variabilidade de 20 % de tolerância conforme estabelecido na RDC 360/2003-ANVISA¹⁴.

Para as amostras que tem teor de gordura estabelecido por normas específicas, como são os casos dos queijos, foi aplicado os 20 % de tolerância conforme estabelecido na RDC 360/2003-ANVISA¹⁴, além da verificação da conformidade com os teores padronizados por regulamentos específicos.

Considerando que as características sensoriais também são indicativas para o estado de conservação

e de composição do alimento foram realizadas análises segundo os parâmetros cor, odor, sabor e aspecto, de acordo com o descrito nos Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos do Instituto Adolfo Lutz – IAL²⁴.

RESULTADOS

Foram analisados 88 produtos de 36 marcas diferentes, sendo que algumas marcas tiveram mais de um produto analisado.

Com os dados apresentados na Tabela 1 é possível avaliar as marcas que apresentaram algum tipo de inconformidade na rotulagem, permitindo visualizar o rigor que os fabricantes de tais marcas possuem em atender as prescrições contidas na legislação vigente^{14,21,22}.

Tabela 1. Distribuição por tipo de inconformidades da rotulagem por marca de produto

Marcas n=36	Etiqueta Complementar	Lote	Indução de marca	Tamanho da letra
A		X		
D		X	XX	
G				
H		X		
I	X			
J	X	X		
K				X
L				
Total	2	4	2	1
%	5,5	11,1	5,5	2,7

Na Tabela 2 estão expostos os teores médios de gordura de todos os produtos analisados. Para compreensão desta tabela é importante considerar que para alguns produtos não existem valores de referência para gordura, previsto na legislação. Assim, o valor de referência é o declarado no rótulo pelo fabricante, como no caso de bebida láctea³, composto lácteo²⁶ e leite de cabra em pó²⁷.

A Portaria nº 146 – MAPA, de 07 de março de 1996¹⁶, estabelece que, de acordo com o conteúdo em percentual de matéria gorda no extrato seco, os queijos são classificados em: a) extragordo, quando apresentam o mínimo de 60 % de matéria gorda; b) gordo, quando têm entre 45,0 e 59,9 % de gordura; c) semigordo, que contém entre 25,0 e 44,9 % de matéria gorda; d) magros,

que contêm entre 10,0 e 24,9 % de matéria gorda, e, e) desnatados, quando têm menos de 10,0 % de gordura.

Interessante situação é a dos queijos, que pela legislação é permitido uma mesma variedade transitar em teores de gordura diferentes entre os denominados semigordo, gordo e extragordo. O queijo Mussarela, por exemplo, é definido segundo as normas editadas pelo MAPA como um queijo de média, alta ou muito alta umidade e extragordo, gordo e semigordo segundo a classificação estabelecida no “Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijos”¹⁷.

Entre os produtos analisados, apenas o queijo Prato apresentou média de conteúdo lipídico menor que o limite legal mínimo para queijos desta variedade.

Quanto à análise sensorial, duas amostras de bebida láctea fermentada foram condenadas no parâmetro aspecto por apresentarem grumos indissolúveis, embora não apresentassem alteração do sabor.

DISCUSSÃO

A respeito da rotulagem, estudos²⁸⁻³⁰ têm demonstrado deficiências nas informações de rótulos de alimentos no que se referem à composição química, valores nutricionais, denominação de origem, acessibilidade a serviços de atendimento ao consumidor, ausência de rótulo em alimentos clandestinos, falta do número de registro e uso de mensagens confusas que podem levar o consumidor a erros ou riscos à saúde.

Os principais produtos inspecionados pela Vigilância Sanitária do Distrito Federal, no ano de 2011, foram: o leite Ultra High Temperature (UHT) integral (19,3 %), leite em pó desnatado (14,8 %), leite em pó integral (12,5 %), leite pasteurizado padronizado (11,4 %) e queijo Minas Frescal (11,4 %). A Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), vinculada ao Ministério da Agricultura, disponibilizou relatório (2007) sobre o percentual de industrialização do leite brasileiro, cujos dados foram: 34 % para os queijos, 26 % para o leite longa vida, 18 % para o leite em pó e de 7 % para o leite pasteurizado³¹, demonstrando que as ações da vigilância sanitária do Distrito Federal estão em consonância com a realidade produtiva do setor leiteiro. Os produtos mais inspecionados são de fato os produtos mais produzidos para disponibilização ao consumidor brasileiro.

A análise do percentual de inconformidades na rotulagem das marcas demonstrou que dos 17 itens analisados a marca com o código D apresentou três

Tabela 2. Distribuição das médias dos teores de gordura total dos produtos inspecionados no Distrito Federal, 2011

Produto	n	Gorduras totais (g) (código da marca)	Teor de gordura (g)		Referência
			Declarado no Rótulo	Estabelecido em Regulamento específico	
Bebida láctea fermentada	2	2,5 ± 2,41	2,5		*RDC nº 360/03-ANVISA ¹⁴
Composto lácteo	3	16,5 ± 0,0 (L) 0 (D) 16,5 ± 0,0 (D)	17 0 13,8		*RDC nº 360/03-ANVISA ¹⁴
Leite de cabra em pó integral	1	30,0 ± 0,0	32,3		*RDC nº 360/03-ANVISA ¹⁴
Leite em pó desnatado	13	0,0 ± 0,0		<1,5	Portaria nº 369/97 MAPA ¹³
Leite em pó integral	11	27,5 ± 1,51		mínimo 26,0	Portaria nº 369/97 MAPA ¹³
Leite em pó semidesnatado	2	2,7 ± 0,35		entre 1,5 e 25,9	Portaria nº 369/97 MAPA ¹³
Leite pasteurizado padronizado	10	3,0 ± 0,6		mínimo 3,0	IN** nº 51/02- MAPA ⁷ IN** nº 62/11- MAPA ⁸
Leite UHT desnatado	8	0,3 ± 0,21		máximo 0,5	Portaria nº 146/96 MAPA ¹⁶
Leite UHT integral	15	3,1 ± 0,24		mínimo 3,0	Portaria nº 146/96 MAPA ¹⁶
Leite UHT semidesnatado	1	1,2 ± 0,0		de 0,6 a 2,9	Portaria nº 146/96 MAPA ¹⁶
Leite UHT semidesnatado sem lactose	1	0,9 ± 0,0		de 0,6 a 2,9	Portaria nº 146/96 MAPA ¹⁶
Queijo Minas frescal semigordo	10	28,0 ± 7,91		de 25,0 a 44,9	Portaria nº 352/97 MAPA ¹⁹
Queijo mussarela extragordo, gordo e semigordo	5	29,1 ± 5,53		mínimo 25,0	Portaria nº 364/97 MAPA ¹⁷
Queijo parmesão semigordo a gordo	1	35,0 ± 0,0		de 25,0 a 59,9	Portaria nº 353/97 MAPA ¹⁵
Queijo prato <i>gordo</i>	3	36,9 ± 17,09		de 45,0 a 59,9	Portaria nº 358/97 MAPA ¹⁸

- Em 02 amostras de leite UHT (Ultra High Temperature) integral, o teor de gordura total não foi analisado por questões técnicas laboratoriais
- *Resolução de Diretoria Colegiada, **Instrução Normativa

inconformidades (17,6 %). Sendo esta marca consagrada no mercado mundial, e supostamente conhecedora da legislação alimentar, questiona-se o motivo de tais irregularidades, se não for o interesse unicamente lucrativo por meio de *marketing* de cunho pernicioso.

O tipo de inconformidade na rotulagem por marca de produto mais comum foi a falta de informação do lote, nas marcas codificadas com as letras A, D, H e J (11,1 %), problemas com sobreposição de etiquetas (etiqueta complementar) nos queijos das marcas com códigos I e J (5,5%), e o de “indução de marca” na marca com o código D (5,5 %).

Os compostos lácteos da marca codificada D apresentaram uma interessante inconformidade de rotulagem, a saber: no painel principal do rótulo da marca percebe-se uma clara estratégia de indução para maior consumo, pois expõe a denominação de venda e o *design* de rótulo de uma marca de leite em pó tradicional do mercado e acrescenta no rodapé em letras menores à utilizada no corpo principal do rótulo, a expressão “composto lácteo”, conforme exige a legislação (Instrução Normativa nº 28/2007- MAPA²⁶). Ou seja, tal situação induz o consumidor à confusão e indução de erro, pois adquire supostamente o leite em pó sendo que este corresponde a um composto lácteo.

A inconformidade de indução de marca encontrada na marca codificada D fere ao prescrito na RDC nº 259/2002- ANVISA¹² que cita em seus princípios gerais que os alimentos embalados não devem apresentar rótulos que “*utilizem vocábulos, sinais, denominações, símbolos, emblemas, ilustrações ou outras representações gráficas que possam tornar a informação falsa, incorreta, insuficiente, ou que possa induzir o consumidor a equívoco, erro, confusão ou engano, em relação à verdadeira natureza, e composição do alimento*”.

Em relação ao consumidor, Santos³² realizou um interessante estudo que pesquisou o comportamento de consumo utilizando o paradigma comportamental. Estudos como este consideram o modelo de pesquisa denominado cognitivo-comportamental, que se baseia na teoria da existência de um duplo processamento de informações mentais, chamado modelo reflexivo-impulsivo. Este modelo tem como premissa que os comportamentos humanos para o consumo são uma combinação de mecanismos cuja dinâmica varia segundo o indivíduo e o contexto³².

Para Franzen citado por Kelday³³ a identificação de uma marca pode ser alcançada utilizando-se uma

imagem do produto, logotipo ou nome de uma marca. Estes e outros fatores compõem a programação visual. A similaridade destes aspectos em produtos substitutos ou de produtos que imite o outro pode prejudicar a identificação e o reconhecimento do produto.

São nestas prerrogativas do consumo reflexivo-impulsivo e na possibilidade de confusão da programação visual associadas a fatores individuais e ambientais, é que, possivelmente, as estratégias de propaganda das indústrias se apoiam para promover alguns produtos de segunda linha ou de pouca saída no mercado consumidor. Analisando todo este processo avalia-se que este não é um procedimento ético, e que deveria ser detectado e analisado pelos órgãos reguladores de alimentos.

Dados relativos à produção leiteira, no Brasil, demonstram que parte desta é direcionada aos laticínios para a fabricação de queijos. Em 2008, por exemplo, foram produzidos 668 mil toneladas de queijos. Do consumo *per capita* de queijos, de aproximadamente três quilos por ano, 32,04 % é de mussarela, 9,61 % de prato, 7,96% de Minas e 5,64 % de parmesão³². Nos últimos dez anos, houve um aumento gradual de consumo, uma diversificação expressiva da oferta de produtos e uma diversificação das bacias queijeiras³⁵.

Uma das formas mais comum de consumo e de comercialização de queijos é a fracionada, e nesta condição, estão legalmente dispensados da rotulagem nutricional obrigatória. Porém, a RDC nº 259/2002-ANVISA¹², a RDC nº 360/2003- ANVISA¹⁴ e o Código de Defesa do Consumidor³⁶ determinam que todo tipo de alimento deve conter as informações referentes à denominação de origem, conteúdo líquido, composição, aditivos, nome e endereço do fabricante e outras informações.

Alguns queijos industrializados são comercializados em peças grandes (aproximadamente entre 4 e 5 kg) com rótulos desprovidos da informação de peso e com o dizer “deve ser pesado na presença de consumidor”. Este tipo de embalagem destina-se à venda no comércio atacadista para, posteriormente, ser fracionado na presença do consumidor e então, comercializado em embalagens menores, no varejo. Porém, o que se observa na prática é que os queijos são fracionados e pesados no comércio varejista, quase sempre na ausência do consumidor, apesar das embalagens receberem etiqueta de papel contendo: peso líquido, nome da variedade do queijo, preço e código de barras.

Outros queijos industrializados são comercializados da fábrica em peças menores

(aproximadamente entre 400 e 500 g) com rótulos em conformidade com a legislação, mas quando no comércio varejista, recebem etiqueta de papel contendo informações complementares que são, com frequência, afixados sobre o rotulo original de fábrica, obstruindo a leitura e impedindo a compreensão das informações de composição, valor nutricional e outras.

Após a exposição supracitada, observou-se que alguns problemas de rotulagem ocorreram supostamente no comércio varejista e não no fabricante, como no caso de superposição de etiquetas sobre as informações do rótulo de queijos fracionados. Uma busca na legislação sobre o assunto constatou que no parágrafo único do artigo 794 do Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal – RIISPOA³⁷ estabelece que “*os produtos de origem animal fracionados no comércio varejista devem conservar a rotulagem sempre que possível ou manter identificação do estabelecimento de origem*”.

O Código de Defesa do Consumidor³⁶ determina, no art.6º que o consumidor tem direito à informação adequada e clara sobre os diferentes produtos e serviços com especificação correta de quantidade, característica, composição e qualidade. Possivelmente, não existiu fiscalização no comércio varejista observando a superposição de etiquetas nos rótulos dos produtos. No caso desta pesquisa 5,5 % das marcas tiveram etiquetas extras obstruindo as informações do rótulo.

Em relação aos resultados das análises da gordura total das amostras de leite, leite de cabra e dos produtos lácteos comercializados no ano de 2011 no Distrito Federal (Tabela 2), alguns fatos merecem ser comentados. Primeiro, e como já citado anteriormente, a legislação vigente não define limite para teor lipídico para as bebidas lácteas, compostos lácteos e leite de cabra em pó integral, ficando a critério de o fabricante definir o teor lipídico, desde que seja fielmente declarado no rótulo. Todos os leites analisados, independentemente do tipo, tiveram o conteúdo lipídico em conformidade com a legislação atual.

Na análise do teor lipídico dos queijos observou-se que só o queijo Prato apresentou valor inferior ao limite mínimo estabelecido pela legislação específica¹⁸, porém não ultrapassou a variação de 20 % conforme a RDC nº 360/2003- ANVISA¹⁴ quanto ao declarado no rótulo. Segundo a Portaria nº 352/1997- MAPA¹⁹ o queijo Minas Frescal é classificado como semigordo e pode apresentar teor de gordura entre 25,0 e 44,9 % segundo o estabelecido na Portaria nº 146/2006 – MAPA¹⁶. Na presente pesquisa uma amostra de queijo Minas

Frescal ultrapassou a tolerância de 20% permitida em legislação¹⁴, apresentando um teor de gordura de 24 % a menos do que informou o rótulo do fabricante, sendo esta considerada como condenada.

A Lei nº 8078 de 11 de setembro de 1990, que instituiu o Código de Defesa do Consumidor³⁶ prevê, no Art.19º, que o fabricante do produto e o ponto de venda podem ser processados, solidariamente, caso o produto comercializado apresente teor nutritivo significativamente inferior ao informado na embalagem.

É interessante comentar que, embora o percentual de gordura da maioria dos queijos analisados estivesse em concordância com os limites estabelecidos na legislação vigente¹⁶, a variação do conteúdo lipídico foi da ordem de 19 a 56 %. O queijo Minas Frescal, por exemplo, apresentou o percentual de gordura variando de 19 a 47 %. Presume-se que, sendo o teor de lipídios no leite importante para o sabor e o aroma do queijo³⁴, este seja um artifício utilizado pela indústria para agradar o gosto do consumidor. Por outro lado, este resultado apresentou implicação nutricional pelo fato de que muitos consumidores, geralmente, adquirem queijo Minas Frescal visando reduzir a ingestão de gordura. Desta forma, a prescrição de queijos em dietas de controle lipídico passa a ser uma recomendação abstrata, tendo em vista a grande variação de gordura entre eles.

O consumo regular destes produtos pode contribuir para o descontrole dietético de indivíduos com ingestão controlada de gordura e, ou sódio. Cruz e Gomes citados por Silva e Ferreira²⁸ avaliaram o teor de lipídios de 12 marcas de queijos Minas Frescal industrializados, 9 de queijos artesanais e 10 de ricotas comercializadas em Botucatu, SP. Todas as 12 marcas de queijo Minas Frescal apresentaram teor de lipídios superior à quantidade declarada nos rótulos das embalagens. Em relação às ricotas, todas as 10 marcas analisadas apresentaram teor de lipídios em desacordo com o padrão médio estabelecido.

Segundo a Associação Brasileira das Indústrias de Queijos³⁵, o queijo de maior consumo no Brasil é o Mussarela por sua variada aplicação como ingrediente em diversos pratos. Para Ribeiro e Ferreira³⁸, o queijo Minas Frescal é um dos queijos mais populares no Brasil, sendo o terceiro queijo mais produzido no país³⁹. A última pesquisa realizada pelos técnicos da Embrapa Gado de Leite do Ministério da Agricultura, referente à produção brasileira dos diversos tipos de queijo em 2004, concluiu que o queijo Prato é o segundo tipo de queijo mais produzido, com 102.480 toneladas/ano, sendo

o queijo Mussarela o primeiro mais produzido com 144.690 toneladas/ano⁴⁰.

Os tipos de queijos inspecionados pela vigilância sanitária e analisados no laboratório correspondem estrategicamente às variedades de queijos mais consumidos pela população brasileira. Das 19 amostras de queijos inspecionadas e analisadas, 18 (94,7 %) são as destes referidos queijos.

Em relação aos compostos lácteos, é importante comentar que a legislação específica²⁶ descreve como requisito físico-químico a cumprir, só o teor de proteínas de origem láctea, não fazendo referência aos outros nutrientes e principalmente ao teor lipídico, nutriente de grande influência no desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis. Os compostos lácteos analisados apresentaram teores de gordura total que variaram de 0 a 16,51 %, entre as diferentes marcas.

CONCLUSÃO

A presente pesquisa demonstrou que ainda existem irregularidades importantes nas informações e no modo de rotular os alimentos colocados à venda ao consumidor. Os teores lipídicos dos produtos analisados encontraram-se, em quase todos os casos, de acordo com a legislação prevista para cada tipo de produto.

A legislação em torno da rotulagem de alimentos tem evoluído consideravelmente, mas igualmente são crescentes as estratégias de propagandas das indústrias alimentícias, que são quase sempre inteligentes e agressivas, conseguindo muitas vezes superar a legislação vigente.

Todo este processo atual reforça a necessidade de maior controle pelos órgãos competentes e o compromisso por parte da indústria alimentícia em oferecer qualidade às informações declaradas. Há necessidade de constante reformulação das leis e de regulamentações de muitos itens ainda não existentes na legislação atual.

O consumo de alimentos, processados ou não, necessita ser regulamentado por leis que assegurem parâmetros estritamente benéficos à saúde humana, com a intervenção positiva do Governo na elaboração de políticas públicas, juntamente com a participação garantida da sociedade.

REFERENCIAS

1. Freitas MCS, Pena PGL. Segurança alimentar e nutricional: a produção do conhecimento com ênfase nos aspectos da cultura. *Rev Nutr*.2007;20(1):69-81.
2. Venturoso RC, Almeida KE, Rodrigues AM, Damin MR, Oliveira MN. Determinação da composição físico-química de produtos lácteos: estudo exploratório de comparação dos resultados obtidos por metodologia oficial e por ultra-som. *Rev Bras Ciênc Farm*.2007;43(4).
3. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 16, de 23 de agosto de 2005. Aprova o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Bebida Láctea. Diário Oficial [da] Republica Federativa do Brasil. Brasília, DF, 24 ago. 2005. Seção 1, nº163, p.7-10.
4. Silva MCD, Silva JVL, Ramos ACS, Melo RO, Oliveira JO. Caracterização microbiológica e físico-química de leite pasteurizado destinado ao programa do leite no Estado de Alagoas. *Ciênc Tecnol Aliment*.2008;28(1):226-30.
5. Moraes CMQJ, Duraes TS, Nobrega AW, Jacob SC. Presença de resíduos de antibióticos em leite bovino pasteurizado. *Ciênc Tecnol Aliment*.2010;30(suppl.1):33-5.
6. Padilha MRF, Fernandes ZF, Leal TCA, Leal NC, Almeida AMP. Pesquisa de bactérias patogênicas em leite pasteurizado tipo C comercializado na cidade do Recife, Pernambuco, Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop*.2001;34(2):167-71.
7. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 51, de 20 de setembro de 2002. Aprova o Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade de Leite Tipo A, Tipo B, Tipo C e Cru Refrigerado. Diário Oficial [da] Republica Federativa do Brasil. Brasília, DF, 21 set. 2002. Seção 1, p.13-21.
8. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62, de 29 de dezembro de 2011. Aprova o Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Cru Refrigerado, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Pasteurizado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel. Diário Oficial [da] Republica Federativa do Brasil. Brasília, DF, 30 dez. 2011. Seção 1, p.6.
9. Elwood PC, Pickering JE, Givens DI, Gallacher JE. The Consumption of Milk and Dairy Foods and the Incidence of Vascular Disease and Diabetes: An Overview of the Evidence. *Lipids*.2010;45:925-39.
10. Scherr C, Ribeiro JP. Composição química de alimentos: implicações na prevenção da aterosclerose. *Rev Assoc Med Bras*.2011;57(2):153-7.
11. Proença RPC. Alimentação e globalização: algumas reflexões. *Ciênc Cult*.2010;62(4):43-7.
12. Brasil. Ministério da Saúde. Agencia de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 259, de 20 de setembro de 2002. Aprova o Regulamento Técnico para Rotulagem de Alimentos Embalados. Diário Oficial [da] Republica Federativa do Brasil. Brasília, DF, 23 set. 2002. Seção 1, nº 184. p.33.
13. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 369, de 4 de setembro de 1997. Aprova o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do leite em pó. Diário Oficial da União. 08 set 1997; Seção 1:19699.
14. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. ANVISA. Resolução RDC nº 360 de 23 de Dezembro de 2003. Dispõe sobre o Regulamento Técnico sobre Rotulagem Nutricional de Alimentos Embalados. Diário Oficial [da] Republica Federativa do Brasil, Brasília, DF, 26 dez. 2003. Seção 1, p. 33-4.

15. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 353, de 4 de setembro de 1997. Aprova o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijo Parmesão. Diário Oficial [da] União. 08 set 1997; Seção 1:19684.
16. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 146, de 7 de março de 1996. Aprova os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade dos Produtos Lácteos. Diário Oficial [da] União. 11 mar 1996; Seção 1:3977.
17. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 364, de 4 de setembro de 1997. Aprova o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijo Mussarela. Diário Oficial [da] União. 08 set 1997; Seção 1:19694.
18. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 358, de 4 de setembro de 1997. Aprova o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijo Prato. Diário Oficial [da] União. 08 set 1997; Seção 1:19690.
19. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 352, de 4 de setembro de 1997. Aprova o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijo Minas Frescal. Diário Oficial [da] União. 08 set 1997; Seção 1:19684.
20. Brasil. Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. INMETRO. Portaria nº 157, 19 de agosto de 2002. Aprovar o Regulamento Técnico Metroológico, em anexo, estabelecendo a forma de expressar o conteúdo líquido a ser utilizado nos produtos pré-medidos. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 20 ago. 2002. Seção 1, nº160-E. p.41-2.
21. Brasil. Ministério da Saúde. Lei nº 10.674 de 16 de maio de 2003. Obriga a que os produtos alimentícios comercializados informem sobre a presença de glúten. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 19 mai. 2003. Seção I, p.94.
22. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 22, de 24 de novembro de 2005. Aprova o Regulamento Técnico para Rotulagem de Produto de Origem Animal Embalado. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 25 nov. 2005. Seção 1, p.15.
23. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 222, de 5 de agosto de 2002. Aprova o Regulamento Técnico para Promoção Comercial dos Alimentos para Lactentes e Crianças de Primeira Infância. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 06 ago. 2002. Seção 1, p.558.
24. Instituto Adolfo Lutz (São Paulo – Brasil). Métodos físico-químicos para análise de alimentos: normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. 4ª ed. Brasília (DF): ANVISA; 2005.
25. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 68, de 12 de dezembro de 2006. Aprova os Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos para Controle de Leite e Produtos Lácteos. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 14 dez. 2006. Seção 1, p.8.
26. Brasil. Ministério da Agricultura e Abastecimento. Instrução normativa nº 28, de 12 de junho de 2007. Aprova o Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Composto Lácteo. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 14 de jun. 2007. Seção 1, p. 8.
27. Brasil. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Secretaria Nacional de Agricultura. Instrução Normativa nº 37, de 31 de outubro de 2000. Aprova o Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite de Cabra. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 8 de nov. 2000. Seção 1, p.23.
28. Silva LFM, Ferreira KS. Avaliação de rotulagem nutricional, composição química e valor energético de queijo minas frescal, queijo minas frescal “light” e ricota. *Aliment Nutr*.2010;21(3):437-41.
29. Lobanco CM, Vedovato GM, Cano CB, Bastos DHM. Fidedignidade de rótulos de alimentos comercializados no município de São Paulo, SP. *Rev Saude Pública*.2009;43(3):499-505.
30. Smith ACL. Rotulagem de alimentos: avaliação da conformidade frente à legislação e propostas para sua melhoria [dissertação de mestrado]. Faculdades de Ciências Farmacêuticas. São Paulo (SP):Universidade de São Paulo. São Paulo; 2010.
31. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA Gado de Leite. Industrialização do leite brasileiro em 2007. [acesso 2012 Jul 20]. Disponível em <http://www.cnpqgl.embrapa.br/nova/informacoes/estatisticas/industria/tabela0406.php>
32. Santos RA. Valores associados a marcas de café: um estudo sobre a congruência valor-símbolo [dissertação de mestrado]. Departamento de Psicologia Social, do Trabalho e das organizações. Brasília (DF): Universidade de Brasília; 2010.
33. Kelday N. Reconhecimento de marcas: experimento com exposição de embalagem, força da marca e impulsividade do consumidor [Monografia de graduação em Administração]. Brasília (DF): Universidade de Brasília; 2011.
34. Barros JJC, Azevedo AC, Faleiros Júnior LR, Taboga SR, Penna ALB. Queijo Parmesão: caracterização físico-química, microbiológica e microestrutura. *Ciênc Tecnol Aliment*.2011;31(2):285-94.
35. Associação Brasileira das Indústrias de Queijo- ABIQ. Mercado total brasileiro de queijos em 2010. [acesso 2012 Jul 20]. Disponível em: http://www.abiq.com.br/imprensa_ler.asp?codigo=1003&codigo_categoria=2&codigo_subcategoria=17
36. Brasil. Ministério da Justiça. Lei nº 8 078/90, de 11 de setembro de 1990. Aprova o Código de Defesa do Consumidor (CDC). Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 12 set. 1990. Suplemento, p.1.
37. Brasil. Ministério da Agricultura. Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem- R.I.I.S.P.O.A., de 29 de março de 1952. Aprova o Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (Aprovado pelo decreto nº 30690, de 20.03.52, alterado pelo decreto nº 1255, de 25.06.52). Brasília, DF, 1952.
38. Ribeiro EP, Simões LG, Jurkiewicz CH. Desenvolvimento de queijo minas frescal adicionado de *Lactobacillus acidophilus* produzido a partir de retentados de ultrafiltração. *Ciênc Tecnol Aliment*.2009;29(1):19-23.
39. Martins SCSG, Rocha Júnior VP, Caldeira LA, Reis ST, Barros IC, Oliveira JA, Santos JF et al. Rendimento, composição e análise sensorial do queijo minas frescal fabricado com leite de vacas mestiças alimentadas com diferentes volumosos. *Rev Bras Zootec*.2012;41(4):993-1003.
40. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA - Gado de Leite (Brasília – Brasil). Produção brasileira de queijos em 2004. [acesso 2012 Jul 27]. Disponível em: <http://www.cnpqgl.embrapa.br/nova/informacoes/estatisticas/industria/tabela0424.php>

Development of a HPLC/MS/MS methodology for determining 3-O-methyldopa in human plasma and its application in a bioequivalence study

Desenvolvimento de metodologia baseada em HPLC/MS/MS para a determinação de 3-O-metildopa em plasma humano e sua aplicação a estudos de bioequivalência

RIALA6/1593

Heliana Figueiredo MARTINS¹, Douglas Pereira PINTO¹, Viviane de Assis NASCIMENTO¹, Marlice Aparecida Sipoli MARQUES², Fábio Coelho AMENDOEIRA^{3*}

*Correspondence Address: ³Laboratório de Farmacologia, Departamento de Fisiologia e Farmacodinâmica, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz. Av. Brasil 4365, Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ, Brazil, CEP 21040-900. eE-mail: fabio.amendoeira@incqs.fiocruz.br

¹Laboratório de Farmacocinética, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

²Departamento de Química Analítica, Instituto de Química (IQ), Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, RJ, Brazil

Recebido: 10.09.2013 - Aceito para publicação: 31.03.2014

ABSTRACT

A simple, sensitive and specific HPLC/MS/MS methodology was developed and it was validated for determining 3-O-methyldopa, the major metabolite of dopamine, in human plasma. The separation was achieved on Atlantis T3 C18 analytical column (5 μ m; 150 x 4.6 mm i.d.) using a mobile phase consisted of a solution of water and methanol (85:15, v/v) and containing formic acid 0.05 %. The extraction from the analyte and the internal standard sample was performed using a simple protein plasma precipitation with perchloric acid. The detection was conducted on a triple quadrupole tandem mass spectrometer with a positive multiple reaction monitoring mode (MRM). The monitored fragmentation transitions were m/z 212.0 \rightarrow m/z 166.0 for 3-O-methyldopa and m/z 227.10 \rightarrow m/z 181.0 for carbidopa (internal standard). The calibration curves were linear in the range of 50–4000 ng/mL for 3-O-methyldopa. The methodology presented a good precision and accuracy in accordance to the criteria for biomedical analysis. And it was successfully applied to the bioequivalence study of two formulations levodopa + benserazide (200 + 50 mg) in plasma samples from healthy human volunteers, following the ANVISA guidelines.

Keywords. 3-O-methyldopa, HPLC-ESI-MS/MS, bioequivalence, plasma, pharmacokinetics.

RESUMO

Uma metodologia específica, simples e sensível baseado em HPLC/MS/MS foi desenvolvida e validada para realizar a determinação de 3-o-metildopa, o principal metabolito da dopamina, em plasma humano. A separação foi realizada em coluna analítica Atlantis T3 C18 (5 μ m; 150 x 4,6 mm i.d.), utilizando-se uma fase móvel composta por uma solução de água e metanol (85:15, v/v), e contendo 0,05 % de ácido fórmico. A extração do analito e da amostra padrão interno foi executada utilizando-se uma simples precipitação proteica no plasma com ácido perclórico. A detecção foi realizada por meio de espectrômetro de massa triplo quadrupolo, em modo de monitoramento de reações múltiplas (MRM) positivo. A transição monitorizada foi m/z 212,0 \rightarrow m/z 166,0 para 3-O-metildopa e m/z 227,1 \rightarrow m/z 181,0 para carbidopa (padrão interno). As curvas de calibração foram lineares na faixa de 50 a 4000 ng/mL para 3-O-metildopa. A metodologia apresentou boa precisão e exatidão de acordo com os critérios para análises biomédicas e esta foi aplicada com sucesso no estudo de bioequivalência de duas formulações contendo levodopa + benserazida (200 + 50 mg) em amostras de plasmas humanos.

Palavras-chave. 3-O-metildopa, HPLC-ESI-MS/MS, bioequivalência, plasma, farmacocinética.

INTRODUCTION

Parkinson's disease is a neurodegenerative disorder characterized by progressive loss of dopaminergic neurons in the *substantia nigra*. It affects the mobility and control of the skeletal muscular system and is characterized by tremor, rigidity, bradykinesia and postural instability that affects 0.3% of the general population and 1 % to 2 % of people > 60 years¹⁻³.

Nowdays Levodopa still remains the most effective drug in the treatment of Parkinson's disease, however, most of administered levodopa is converted by aromatic L-amino acid decarboxylase to dopamine before it can enter the central nervous system^{1,3,4}.

Therefore, L-dopa is routinely given in association with peripheral aromatic-L-amino acid decarboxylase inhibitors, such as benserazide, that inhibit conversion of L-dopa peripherally, but do not easily cross the blood brain barrier to affect its conversion to dopamine centrally^{4,5}.

In the central nervous system as well as in several other tissues L-dopa can be directly metabolized by catechol-O-methyl transferase (COMT) to 3-O-methyldopa (3-OMD). When L-dopa is administered with dopa decarboxylase inhibitors (DDI), such as benserazide, the availability of L-dopa in the brain increases dramatically, resulting in the accumulation of 3-OMD in this site^{6,7}.

There is growing evidence that accumulation 3-OMD might be involved in the side effects of chronic treatment of L-dopa^{6,8}.

There with measurements of levodopa and its metabolites in blood have been crucial for pharmacokinetic and bioequivalence studies of antiparkinson drugs containing levodopa associated with benserazide^{9,10}.

Recently, several bioanalytical methods based on mass spectrometry for plasma quantification of Levodopa and its metabolites have been developed¹¹⁻¹⁵ as well methods based on fluorimetric, ultraviolet or electrochemical detection^{3,10,12,15-18}. Several studies performed using high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) for the determination of drugs in biological fluids was recently developed¹⁹⁻²¹, however a few methods to determine 3-OMD in human plasma using HPLC-MS/MS were developed and validated⁹. Therefore, further studies are necessary for development of new rapid and accurate quantitation

techniques to the measurement of low concentrations of 3-OMD in human plasma with high selectivity and sensitivity.

The aim of this work was to develop and validate an efficient bioanalytical method based on HPLC-ESI-MS/MS for rapid and accurate quantification of 3-OMD in human plasma and apply it to a bioequivalence study.

MATERIAL AND METHODS

Materials

3-OMD (Batch No. 1106062A3) was obtained from PGS (Carborro, USA) with 98.8 of purity and Carbidopa (CBDP, internal standard, I.S.) was purchased from the United States Pharmacopeia (Rockville, MD, USA) with 92.6 % of purity. Analytical grade Methanol and Formic acid 96 % was obtained from Tedia (Fairfield, OH, United States). Double distilled water was purified by Millipore system (Bedford, MA, USA) and was used for all the experiments. All other chemicals and solvents were of the highest analytical grade available.

Instrumentation and detection

The HPLC Varian System (Walnut Creek, California, USA), equipped with two analytical pumps Varian 212-LC was employed. A HTS-CTC Analytics auto-injector was used. A triple-quadrupole tandem mass spectrometer (VARIAN 320 MS, Walnut Creek, California, USA) equipped with an electrospray ion source and operated in the positive ionization mode was used in this analysis. The ion spray voltage and source temperature were 5500 V and 400 °C, respectively. The others parameters for the gas source were set as follow: drying gas 30 psi, nebulizer gas 55 psi, collision induced dissociation (CID) 2.00 mTorr. The collision energy for the 3-OMD and CBP were 10.5 and 10.0 V, respectively. The voltage capillary applied was 30 V for analyte and internal standard. The parameters were optimized for best response by directly infusing standard solutions of 3-OMD and CBDP at flow rate of 20 µL/min through syringe pump. Quantification was performed using multiple reaction monitoring (MRM) of the fragmentation transitions m/z 227.10 → 181.0 for carbidopa (Figure 1A) and m/z 212.0 → 166.0 for 3-OMD (Figure 1 B). Data acquisition and analysis were achieved using the Varian MS Workstation software (Version 6.6, Walnut Creek, USA).

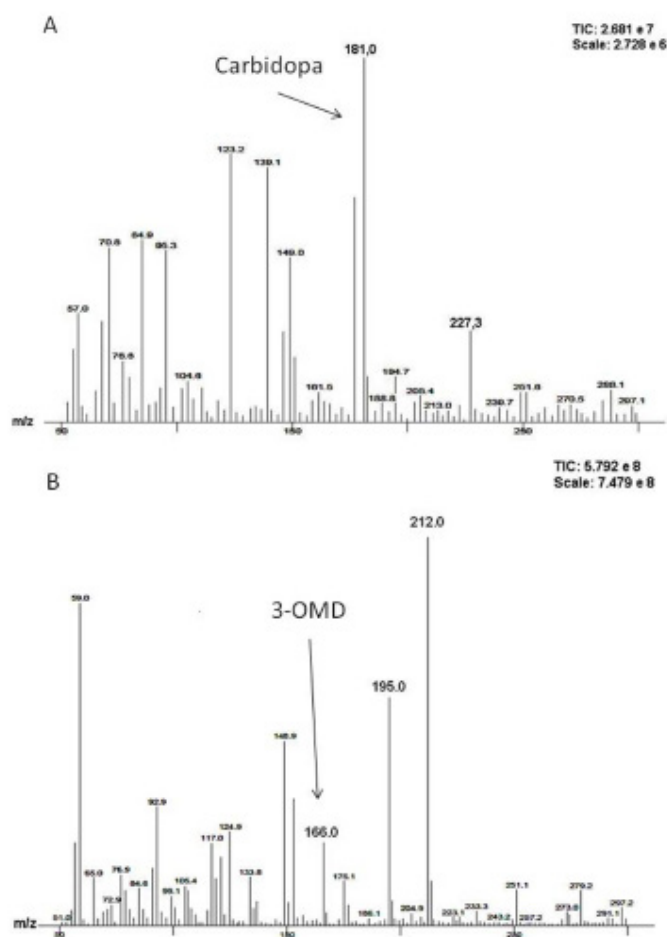


Figure 1. The ion product spectrum of (A) Carbidopa (m/z 181.0) and (B) 3-OMD (m/z 166.0) obtained by electrospray ionization in positive ion mode

Chromatographic conditions

Atlantis T3 C18 (5μ , 150×4.6 mm i.d.) was selected as the reversed-phase analytical column. The mobile phase consisting of water and methanol (85:15, v/v) containing formic acid 0.05 % was pumped at a flow rate of 1 mL/min with flow divider split 1:1. The run time was 5.0 min and the injection volume was 20 μ L into HPLC-MS/MS system.

Preparation of stock and working solutions

Stock standard solutions of 3-OMD and CBDP (IS) were prepared by dissolving accurately weighed reference substances in methanol containing 0.04 % of perchloric acid at a concentration of 1 mg/mL. Either solutions were treated in an ultrasonic bath (Branson 2210 ultrasonic cleaner, Branson Ultrasonic Corporation, Danbury, CO, USA) for 5 min. The standard working

solutions of 3-OMD in the concentrations of 1000, 2000, 5000, 10000, 15000, 30000, 60000 and 80000 ng/mL, were obtained by dilution of the stock solution with methanol/water (1:1 v/v). Quality control (QC) working solutions with concentrations of 1000, 2000, 30000 and 60000 ng/mL was prepared as the standard working solution. The working internal standard solution containing 4000 ng/mL of CBDP was also prepared in methanol and water (1:1 v/v) by dilution of the stock solution. All solutions were stored at -70°C in amber glass bottle when not used.

Sample preparation

A 200 μ L sample of human plasma were added to 2.0 mL polypropylene tubes. To each tube 50 μ L of IS solution (4000 ng/mL of CBDP in methanol/water (1:1 v/v) and 240 μ L and 0.4 M of perchloric acid were added to the protein precipitation. The tubes were stirred with the vortex for approximately 1 min followed by centrifugation at 20093 g for 15 min, at -5°C . The extract of sample plasma was transferred to an autosampler vial containing 300 μ L of water / formic acid 0.05 % and was vortexed for 20 s. Aliquots (20 μ L) from the final extract were injected into the HPLC-MS/MS system for analysis.

Method validation and quantification

The validation process was carried out according to the Guidance given to the Industry – Bioanalytical Method Validation, recommended by US Food Drug Administration and according Resolution n. 899 of May 23, 2003 by Anvisa, Brazil²², the legislations in force at the time of the study. Currently studies of this nature should follow the Resolution RDC n. 27 of May 17, 2012²³.

Recovery

The recovery from human plasma was determined at three different concentrations ($n=3$ each) for 3-OMD and CBDP (IS) by comparing the peak areas obtained from analysis of eight replicates of plasma samples prepared according to the method of analysis versus absolute recovery solutions without plasma deriving from standard solutions with subsequent dilution to identical target concentrations of 100, 1500 and 3000 ng/mL. The recovery of IS was determined in a similar way, at the working concentration (1000 ng/mL of CBDP)²².

Limit of quantification (LOQ)

Peak response (peak area) was determined in blank plasma samples (six replicates from different plasma) and in spiked LOQ sample prepared from the same plasma. The peak area of blank samples should be no greater than 20 % of the mean peak area of LOQ of 3-OMD, and no greater than 5 % of CBDP. The precision and mean accuracy of the back calculated LOQ replicate concentrations must be ≤ 20 and ± 20 %, respectively. The LLOQ was defined and established in 50 ng/mL. To accept the LLOQ value, the peak of the analyte at this concentration should be at least 5 times the baseline noise. In addition, each LLOQ sample should be obtained with an acceptable accuracy as relative error (RE) within ± 20 % and a precision (RSD) not exceeding 20 %.

Limit of detection (LOD)

According to Resolution n. 899/2003 Anvisa, the limit of detection should be established through the analysis of solutions of known and decreasing drug concentrations to the lowest detectable level. It is recommended that the LOD is 2 to 3 times the baseline noise. In the analytical method of the baseline noise was determined in a range of 5 absolute counts, which set limits in terms of detection a value corresponding to 15 ng/mL.

Analytical curves, regression model

The analytical curves were constructed using values ranging from 50 to 4000 ng/mL of 3-OMD in human plasma. Calibration curves were obtained by the weighted linear model. The ratio of 3-OMD peak area to CBDP peak area was plotted against 3-OMD concentration in ng/mL. The suitability of the calibration curve was confirmed by back-calculating the concentrations of the calibration standards.

$$y = a(x_2) + b(x)$$

y = peak area ratio (PAR) of 3-OMD to CBDP

x = concentration (ng/mL) of 3-OMD in plasma.

Coefficients a, b, the coefficient of determination (r_2) and x was calculated using weighted 1 linear model with regression analysis.

Calibration curve standards and quality control samples

The linearity of the method was assessed by analyzing calibration standard plasma samples containing levodopa at 8 different concentrations in duplicate. The concentration range evaluated to 3-OMD, was 50, 100,

250, 500, 750, 1500, 3000 and 4000 ng/mL by using a weighted $[1/x^2]$ least-squares linear regression analysis method. The calibration standards were prepared by spiking 950 μ L drug-free human plasma with 50 μ L of 3-OMD standard work solutions. Then 200 μ L of spiked plasma were transferred to a 2.0 mL polypropylene tube and processed as described above.

The QC samples were prepared according to the same procedure described for the calibration standards using blank plasma, fortified at 50, 100, 1500 and 3000 ng/mL of 3-OMD and 1000 ng/mL of CBDP (IS). The calibration curves and QC samples were freshly prepared and analyzed with each batch of human plasma.

Precision and accuracy

The precision and accuracy intra and inter-batch were assessed by using human plasma spiked with three different concentrations (100, 1500 and 3000 ng/mL) with replicate analysis (n = 8) on three consecutive days. The concentration of each sample was determined using freshly prepared calibration standards. The precision was expressed as the relative standard deviation (RSD) and the accuracy as relative error (RE) with an acceptable accuracy and precision within ± 15 %²².

Stability

The stability of 3-OMD were evaluated by analysis of QC samples at two concentrations of 100 and 3000 ng/mL in eight replicates. The autosampler's stability was also determined by analyzing extracted QC samples kept under autosampler conditions (+7° C) for 48 h. Room temperature stability and long-term stability were assessed using untreated QC samples kept at room temperature for 6 h and stored at -70 °C for 683 days, respectively. After eight freezing/thaw cycles (-70 °C / room temperature) on consecutive days, QC samples were processed and analyzed to determine the freeze-thaw stability. Samples were considered to be stable if their assay values were within the range of 15 % of the nominal values²².

Standard stock solution stability at room temperature in white light under laboratory conditions and refrigerated conditions for 3-OMD and CBDP was performed as part of the method development process.

Specificity and carry-over

The specificity was assessed by comparing chromatograms of six different batches of blank plasma,

including one lipemic, one hemolysate and four normal plasmas from different sources. The chromatograms were compared with those obtained from the analysis of the mobile phase fortified with 3-OMD (50 ng/mL) and carbidopa (1000 ng/mL) to ensure no interference in the analyte analysis. The carryover was measured by comparing the peak areas of drug-free plasma injected after the sampling of 3-OMD (4000 ng/mL) by three consecutive times. The endogenous interference of the anticoagulant (heparin) in plasma samples was evaluated.

Pharmacokinetics study

The pharmacokinetics study was conducted in 60 healthy volunteers after a single-dose, randomized with 2-periods, crossover, of two formulations test and reference of levodopa + benserazide (200 + 50 mg). The clinical study was conducted by a collaborative laboratory and its clinic protocol was approved by the Ethics Committee (license: 892/2008, Unicamp, Campinas - São Paulo, Brazil). All subjects gave written informed consent. The washout time between two periods was 9 days (216 hours). The blood samples were collected into amber tubes, using heparin as anticoagulant at pre-dose, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.25, 1.5, 1.75, 2, 2.33, 2.66, 3, 3.5, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 16, 24, 48, 72, 96 and 120 h post-dosing. Samples were centrifuged at 4884 g for 10 min in 4 °C and the plasma was separated and stored at -70 °C until analysis.

Pharmacokinetics parameters for the human plasma samples were calculated by a non-compartmental statistics model using WinNonlin™ program (Version 5.3, Microsoft excel, 2003). Plasma samples were taken for a period of 3 to 5 times under the concentration time curve (AUC) ratio higher than 80 %, as per FDA guidelines. Plasma 3-OMD concentration-time profiles were visually inspected, and C_{max} and T_{max} values were determined.

The AUC_{0-t} was obtained by the trapezoidal method. $AUC_{0-\infty}$ was calculated up to the last measureable concentration and extrapolations were obtained using the last measureable concentration, and the terminal elimination rate constant (K_e). K_e was estimated from the slope of the terminal exponential phase of the plasma of the 3-OMD concentration-time curve by the linear regression method. The terminal elimination half-life $t_{1/2}$, was then calculated as $0.693/K_e$. Regarding AUC_{0-t} , $AUC_{0-\infty}$ and C_{max} bioequivalence was assessed by analysis of variance (ANOVA) and by calculating the

standard 90 % confidence intervals (90 % CIs) of the ratio's test/reference (logarithmically transformed data). The bioequivalence was considered when the ratio of averages of log transformed data was within 80 – 125 % for AUC_{0-t} , $AUC_{0-\infty}$ and C_{max} .

RESULTS AND DISCUSSION

Method development

The MS spectra of 3-OMD and CDBP were recorded in positive ion mode. The best analysis conditions were achieved using a mixture of water/methanol/formic acid at ratio of 85:15:0.0 5% (v/v/v).

Different types of columns (Atlantis T3, Pursuit C18, OmniSpher C18, monoChrom 5 u MS) were evaluated and the Atlantis T3 column was selected due to the best chromatographic separation from endogenous compounds under our experimental conditions and contributed to significant reduction of matrix effect due to its high performance with low proportion of solvents in our experiments. The choice of the column also was based in the possibility of use high proportions of aqueous phase with water, which allows the best chromatographic peak shape. Other factor that also contributed for choice of analytical column was the pH of the plasma samples treated with perchloric acid in step of extraction.

In this study, neither additive was used to pH adjustment (neutralization) after precipitation of perchlorate in the extraction process, different from what the literature describes to similar procedures^{13,14}.

The retention time and good peak shape of the analyte and internal standard on our analytical conditions, demonstrate the advantage of present high-throughput method when compared to similar extraction methods in recent literature^{9,10,13,18,24}.

The literature shows that as methyldopa much as CDBP could be used as internal standards due to their chemical similarities to 3-OMD and levodopa⁵. In our study, methyldopa could not be used as internal standard because your mass fragment are equal to monitored by 3-OMD.

Under the selected chromatographic conditions, CDBP was chosen as I.S. due to its high sensitivity, similar chromatographic and mass spectrometric behavior in relation to analyte. 3-OMD and CDBP was eluted and well resolved chromatographic at retention times of 4.06 min and 4.04 min, respectively (Figure 2E and 2F).

Selectivity

The analysis of the six different human blank plasma samples (one hemolysate, one lipemic and four normal) was evaluated by analyzing the specificity.

No interference peaks from endogenous compounds were observed at the retention time of the analyte and I.S. (Figures 2A and 2B). The total run time was 5 min, corresponding to an shorter analysis time than most of the analytical methods in the literature^{5,10,11,13,14}.

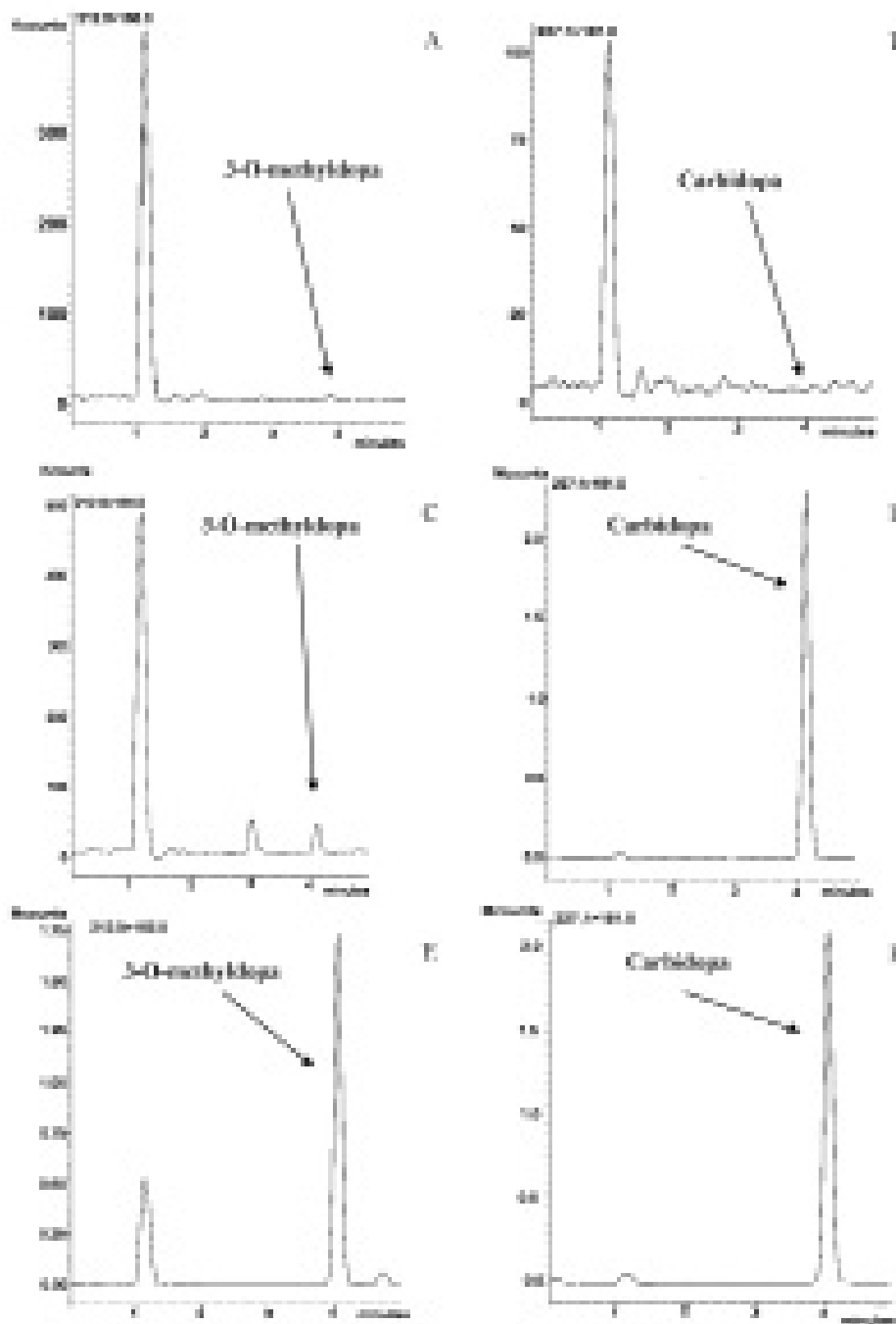


Figure 2. SRM chromatograms of (A and B) blank plasma samples, (C and D) plasma samples spiked with 3-OMD and Carbidopa or (E and F) plasma collected from volunteers 6h after oral administration of Levodopa

Linearity and limit of quantification

A calibration curve was tested during the method validation and has shown to be linear over the concentration range of 50 – 4000 ng/mL with a weight factor $1/x^2$, which could cover all clinical concentrations of 3-OMD used in this study (Table 1). The linear equations of the calibration curves showed $r = 0.998484$.

The lower limit of quantification (LLOQ) to 3-OMD in human plasma under our experimental

conditions was 50 ng/mL (Figures 2C and 2D), one of the lowest LLOQ reported in literature of which four of these were carried out by mass spectrometry (5). The mean precision and accuracy at LLOQ were 6.12 % and 99.04 %, respectively. With this LLOQ (50 ng/mL), the present method was very sensitive to detect 3-OMD in human plasma even 120 h after a single oral administration of levodopa + benserazide (200 + 50 mg) in this bioequivalence study.

Table 1. Precision and accuracy data of back calculated concentrations of calibration samples for 3-O-methyl dopa in plasma (two replicates per batch)

Analyte	Nominal concentration (ng/mL)	Observed concentration (ng/mL, mean ± S.D.)	Precision (% R.S.D.)	Accuracy (%)
3-O-methyl dopa	50	52.17 ± 4.70	9.01	104.33
	100	91.54 ± 6.68	7.29	91.54
	250	245.03 ± 9.37	3.83	98.01
	500	491.06 ± 16.71	3.40	98.21
	750	793.24 ± 35.42	4.59	105.77
	1500	1546.68 ± 22.32	1.44	103.11
	3000	3088.94 ± 98.09	3.18	102.96
	4000	3845.21 ± 91.60	2.38	96.13

S.D. = standard deviation; R.S.D. = relative standard deviation

Precision and accuracy of quality control Standards

Intra-batch, inter-batch precision and accuracy were evaluated by analyzing eight replicate quality control samples at four different concentration levels of 50, 100, 1500 and 3000 ng/mL over three validation days. Full results are shown in Table 2, where it could be seen that the intra-batch precision measured by coefficient of variation, CV, was 6.12 %, 3.04 %, 3.28 % and 3.55 %, respectively. The precision and accuracy were according to the acceptable criteria recommended by Anvisa²². The precision at each concentration level did not exceed a CV of 15 % and its accuracy is within the range established (i.e. 85 - 115 %) for each concentration level tested.

Recovery

The mean extraction recoveries of 3-OMD (n=8) was 85.57 %, 88.57 %, 88.17 % at concentrations of 50,

1500 and 3000 ng/mL, respectively and was 92.40 %, 87.11 %, 87.82 % for CBDP (I.S) (Table 2).

Table 2. Precision, accuracy and recovery data for the assay of 3-O-methyl dopa by LC-MS/MS

Validation parameters	3-O-methyl dopa quality control concentration (ng/mL)			
Precision (R.S.D. %)	50	100	1500	3000
Intra-run (n = 8)	6.12	3.04	3.28	3.55
Inter-run (n = 24)	-----	5.31	2.28	0.55
Accuracy (%)				
Intra-run (n = 8)	99.04	94.80	101.96	100.85
Inter-run (n = 24)	-----	90.59	100.52	100.76
Recovery (%) (n = 8)	-----	85.57	88.57	88.17

Stability (Freeze-thaw, Auto sampler, Room temperature, Long term, standard solutions)

The stability of 3-OMD was evaluated after 8 freeze-thaw (-70° C to room temperature) cycles. No significant degradation of 3-OMD was observed even after a 48 h of storage period in the autosampler tray (+7 °C), and the final concentrations of 3-OMD ranged from 1.04 to 3.95 %. In addition, the long-term stability of 3-OMD in QC samples after 683 days of storage at -70° C

was also evaluated. The concentrations ranged from -6.46 % to 7.73 % (Table 3). These results confirmed the stability of 3-OMD in human plasma for at least 683 days at -70 °C. The stability of standard working solutions of 3-OMD and CBDP (IS) were evaluated for periods of 6 hours under the temperature of + 22 °C and under refrigeration at -70 °C. In these two studies no significant degradation were observed for both, the analyte or internal standard (Table 4).

Table 3. Stability of human plasma samples of 3-O-methyldopa under various storage conditions (n = 8)

Stability	Measured concentration (ng.mL ⁻¹)	Mean Fresh samples	R.S.D.(%)	Mean Stability samples	R.S.D.(%)	Assay values (%)
Post-preparative stability (48 h, +7° C)	100	85.34	8.77	88.71 ^a	6.09	3.95
	3000	2945.89	3.98	2976.43 ^a	5.39	1.04
Long-term stability (683 days, -70° C)	100	99.84	7.97	107.55 ^c	5.74	7.73
	3000	3280.34	11.92	3068.29 ^c	3.87	-6.46
Freeze-thaw stability (eight cycles – 192 h, -70° C)	100	103.34	7.08	97.99 ^b	8.04	-5.18
	3000	3042.27	4.60	2941.82 ^b	4.41	-3.30
Short-term stability (6 h, room temperature)	100	99.95	5.72	98.81 ^c	8.97	-1.15
	3000	3091.24	3.79	3037.44 ^c	2.40	-1.74

^a After 48 hours. ^b after 192 hours. ^c after 6 hours, ^aMean of eight replicates, ^bRSD = Relative standard deviation

Table 4. Stability of standard solutions of 3-O-methyldopa and carbidopa (IS) under various storage conditions (n = 8)

Stability	Measured concentration (ng.mL ⁻¹)	Mean Fresh samples	R.S.D.(%)	Mean Stability samples	R.S.D.(%)	Assay values (%)
Short-term stability (6 h, +22° C)	100	386980	7.83	402360 ^a	7.27	3.97
	3000	15951875	3.56	15914073 ^a	4.78	0.24
Long-term stability (504 h, -70° C)	100	462974	4.20	528130 ^b	4.41	14.07
	3000	14920971	4.02	14252217 ^b	3.93	-4.48
Short-term stability - IS (6 h, +22° C)	1000	19518767	7.06	21757856 ^c	3.03	11.47
	1000	20447741	2.67	22277215 ^c	4.56	8.95
Long-term stability - IS (1436 h, -70° C)	1000	14913181	3.96	15881694 ^d	4.83	6.49
	1000	16429345	6.59	16187390 ^d	4.61	-1.47

^{a,c} After 6 hours. ^b after 504 hours. ^c after 6 hours, ^aMean of eight replicates, ^d after 1436 hours, ^bRSD = Relative standard deviation

Application to a bioequivalence study in healthy subjects

The analytical method was validated and used in the bioequivalence study of two formulations of levodopa + benserazide. The curves showing the mean of 3-OMD plasma concentrations of 60 healthy volunteers versus time, after administration of reference and test preparations, are shown in Figure 3. The final results confirmed that the two preparations are bioequivalent according to their rate of absorption and elimination.

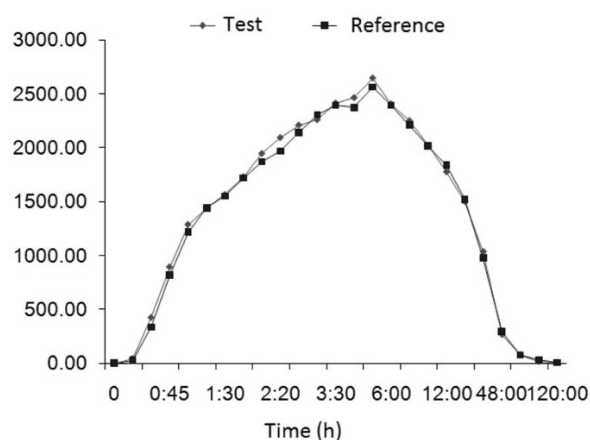


Figure 3. Plasma concentration–time curve of 3-OMD after the oral administration of a single dose of reference and test formulations. (levodopa 200 mg + benserazide 50 mg) in 60 healthy volunteers

CONCLUSION

A HPLC-MS/MS method for the quantification of metabolite 3-OMD in human plasma was developed and validated and also was successfully applied to a bioequivalence study of two levodopa+benserazide formulations. The described method showed good specificity, precision, accuracy and linearity over the range of 50 – 4000 ng/mL. This method provided a simple sample preparation using protein precipitation with perchloric acid. The established LLOQ of 50 ng/mL was adequate to determine the 3-OMD concentrations in human plasma until 120 h after oral administration of levodopa + benserazide (200 + 50 mg) formulations.

No significant interferences caused by endogenous compounds were observed. The method was successfully applied to demonstrate the bioequivalence of test and reference formulation in a pharmacokinetic study and resents a small run time and high selectivity and sensitivity.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors gratefully acknowledge all volunteers, analysts, and technicians of laboratory with participated in this study. Thanks are due to Fiocruz and CNPq for financial support (407563/2012-1/CNPq).

REFERENCES

1. Bugamelli F, Marcheselli C, Barba E, Raggi MA. Determination of L-dopa, carbidopa, 3-O-methyldopa and entacapone in human plasma by HPLC-ED. *J Pharm Biomed Anal.*2011;54(3):562-7.
2. Galvan A, Wichmann T. Pathophysiology of parkinsonism. *Clin Neurophysiol.*2008;119(7):1459-74.
3. Keller GA, Czerniuk P, Bertuola R, Spatz JG, Assefi AR, Di Girolamo G. Comparative bioavailability of 2 tablet formulations of levodopa/benserazide in healthy, fasting volunteers: a single-dose, randomized-sequence, open-label crossover study. *Clin Ther.*2011;33(4):500-10.
4. Ensafi A-A, Arabzadeh A, Karimi-Maleh H. Sequential determination of benserazide and levodopa by voltammetric method using chloranil as a mediator. *J Braz Chem Soc.*2010;21(8):1572-80.
5. Cesar IC, Bastos LF, Godin AM, Coelho M de M, Araujo DP, de Fatima A, et al. Simultaneous quantitation of nicorandil and its denitrated metabolite in plasma by LC-MS/MS: application for a pharmacokinetic study. *J Mass Spectrom.*2011;46(11):1125-30.
6. Lee ES, Chen H, King J, Charlton C. The role of 3-O-methyldopa in the side effects of L-dopa. *Neurochem Res.*2008;33(3):401-11.
7. Miller JW, Shukitt-Hale B, Villalobos-Molina R, Nadeau MR, Selhub J, Joseph JA. Effect of L-Dopa and the catechol-O-methyltransferase inhibitor Ro 41-0960 on sulfur amino acid metabolites in rats. *Clin Neuropharmacol.*1997;20(1):55-66.
8. Longhi JG, Perez E, Lima Jd, Cândido LMB. In vitro evaluation of *Mucuna pruriens* (L.) DC. antioxidant activity. *Braz J Pharm Sci.*2011;47(3):535-44.
9. César IC, Byrro RMD, Cardoso FFdSeS, Mundim IM, Teixeira LdS, Gomes SA, et al. Development and validation of a high-performance liquid chromatography– electrospray ionization– MS/MS method for the simultaneous quantitation of levodopa and carbidopa in human plasma. *J Mass Spectrom.*2011;46:943-8.
10. Lv L, Jiang W, Zhou S, Huang X, Shi X, Lv C, et al. LC-MS-MS Simultaneous Determination of L-Dopa and Its Prodrug L-Dopa n-Pentyl Ester Hydrochloride in Rat Plasma. *Chromatographia.*2010;72(3):239-43.
11. Jiang W, Lv L, Zhou S, Huang X, Shi X, Lv C, et al. Simultaneous determination of L-dopa and its prodrug (S)-4-(2-acetamido-3-ethoxy-3-oxopropyl)-1,2-phenylene diacetate in rat plasma by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry and its application in a pharmacokinetic study. *J Pharm Biomed Anal.*2010;53(3):751-4.
12. Jonkers N, Sarre S, Ebinger G, Michotte Y. Benserazide decreases central AADC activity, extracellular dopamine levels and levodopa decarboxylation in striatum of the rat. *J Neural Transm.*2001;108:559-70.

13. Karimi M, Carl JL, Loftin S, Perlmutter JS. Modified high-performance liquid chromatography with electrochemical detection method for plasma measurement of levodopa, 3-O-methyldopa, dopamine, carbidopa and 3,4-dihydroxyphenyl acetic acid. *J Chromatogr B: Anal Technol Biomed Life Sci.*2006;836(1-2):120-3.
14. Muzzi C, Bertocci E, Terzuoli L, Porcelli B, Ciari I, Pagani R, et al. Simultaneous determination of serum concentrations of levodopa, dopamine, 3-O-methyldopa and alpha-methyldopa by HPLC. *Biomed Pharmacother.*2008;62(4):253-8.
15. Tolokan A, Klebovich I, Balogh-Nemes K, Horvai G. Automated determination of levodopa and carbidopa in plasma by high-performance liquid chromatography-electrochemical detection using an on-line flow injection analysis sample pretreatment unit. *J Chromatogr B: Biomed Sci Appl.*1997;698(1-2):201-7.
16. Kim TH, Cho KH, Jung WS, Lee MS. Herbal Medicines for Parkinson's Disease: A Systematic Review of Randomized Controlled Trials. *PLoS ONE.*2012;7(5):e35695.
17. Massano J, Garrett C. Deep brain stimulation and cognitive decline in Parkinson's disease: a clinical review. *Front Neurol.*2012;3(66):1-13.
18. Pan L, Guo Y, Li Z, Chen J, Jiang T, Yu Y. Simultaneous Determination of Levodopa, Benserazide and 3-O-Methyldopa in Human Serum by LC-MS-MS. *Chromatographia.*2010;72(7):627-33.
19. Bedor DCG, Filho JHdS, Ramos VLS, Gonçalves TM, Sousa CEMd, Santana DPd. A sensitive and robust LC-MS/MS method with monolithic column and electrospray ionization for the quantitation of efavirenz in human plasma: application to a bioequivalence study. *Quím Nova* 2011;34(6):950-5 .
20. Dalmora SL, Sangoi MdS, Nogueira DR, D'Avila FB, Moreno RA, Sverdlhoff CE, et al. Determination of phenobarbital in human plasma by a specific liquid chromatography method: application to a bioequivalence study. *Quím Nova.* 2010;33(1):124-9.
21. Igarashi K, Hotta K, Kasuya F, Abe K, Sakoda S. Determination of cabergoline and L-dopa in human plasma using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B.*2003;792:55-61.
22. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Aprova o Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. *Diário Oficial da União Brasília (DF)*; 2 jun 2003; Seção 1
23. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC nº 27, de 17 de maio de 2012. Dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos. *Diário Oficial da União, Brasília (DF)*; 22 mai 2012; seção 1
24. Saxer C, Niina M, Nakashima A, Nagae Y, Masuda N. Simultaneous determination of levodopa and 3-O-methyldopa in human plasma by liquid chromatography with electrochemical detection. *J Chromatogr B: Analyt Technol Biomed Life Sci.*2004;802(2):299-305.

Epidemiologia da coinfeção por HIV/HCV em um hospital escola de Catanduva, São Paulo – Brasil

Epidemiology of HIV/HCV co-infection in patients attended at an university hospital school at in Catanduva, São Paulo – Brazil

RIALA6/1594

Adriana Antonia da Cruz FURINI^{1,2*}, Daniela da Costa PRATES², Ana Paula PEZZINI², Luiz Carlos RABECIN JUNIOR², Beatriz Botacin REGINO², Arlindo SCHIESARI JUNIOR², Ricardo Luiz Dantas MACHADO⁴

*Endereço para correspondência: ¹Centro de Investigação de Microrganismos (CIM), Departamento de Doenças Dermatológicas, Infecciosas e Parasitárias, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP). Av. Brigadeiro Faria Lima, 5416, Vila São Pedro, São José do Rio Preto, SP, Brasil, CEP: 15090-000. Tel: (17) 3201-5736, e-mail: adriana.cruz.furini@gmail.com

²Centro Universitário de Rio Preto (UNIRP), São José do Rio Preto, SP, Brasil.

³Faculdades Integradas Padre Albino, Catanduva, SP, Brasil.

⁴Laboratório de Saúde Pública do Instituto Evandro Chagas, Belém, PA, Brasil.

Recebido: 18.12.2012 - Aceito para publicação: 07.03.2014

RESUMO

Determinou-se a prevalência do vírus da hepatite C (HCV) em pacientes soropositivos para o vírus da imunodeficiência humana (HIV). O estudo foi realizado no Hospital Emilio Carlos, Catanduva, Estado de São Paulo, Brasil. Foi efetuado estudo retrospectivo de dados clínico-laboratoriais, epidemiológicos e sociodemográficos de 600 pacientes atendidos em um hospital escola de nível terciário, no período de janeiro de 2004 a dezembro de 2007. A prevalência de a coinfeção HIV/HCV foi de 11,6 % (n = 70), com predomínio no sexo masculino (71,4 %) e média de idade de 43,2 anos, sendo 57,1 % da etnia caucasóide e 44,3 % de baixo nível de escolaridade. A transmissão do HIV/HCV pela via parenteral nos homens e via sexual nas mulheres foi estatisticamente significativa (p = 0,0005). O uso de drogas ilícitas injetáveis foi também significativa para o sexo masculino (p = 0,0208). A prevalência do HCV foi de 14,3 % do subtipo 1a e 11,4 % do 3a. Apesar de a prevalência da coinfeção no município de Catanduva ser inferior à média nacional, esta situação é ainda um problema importante nesta população, mesmo com a disponibilidade da TARV, necessitando-se de estratégias de controle e prevenção pelas autoridades públicas de saúde.

Palavras-chave. co-infecção, genótipos, hepatite C, HIV.

ABSTRACT

The prevalence of Hepatitis C Virus (HCV) among HIV-positive was determined in this investigation. The study was conducted at Emilio Carlos Hospital, Catanduva, São Paulo, Brazil. A retrospective study on clinical-laboratory, epidemiological and socio-demographic data of 600 patients treated at a teaching hospital of tertiary level was performed from January 2004 to December 2007. The prevalence of co-infection with HIV/HCV was 11.6 % (n = 70), predominantly in male patients (71.4 %) and mean age of 43.2 years, and 57.1 % of Caucasian ethnicity and low educational level (44.3 %). The transmission of HIV/HCV by parenteral route in men, and by sexual contact in women was statistically significant (p = 0.0005). The use of injectable illicit drugs was also significant for males (p = 0.0208). The prevalence of HCV was 14.3 % for subtype 1a and 11.4 % for 3a subtype. Despite the prevalence of co-infection in the city of Catanduva be lower than the national average, this situation is still a major problem in this population, even with the availability of TARV, requiring strategies for its control and prevention by public health authorities.

Keywords. co-infection, genotypes, hepatitis C, HIV.

INTRODUÇÃO

Mais de 40 milhões de pessoas estão infectadas pelo HIV¹ e destes são estimados cerca de 630.000 indivíduos no Brasil². A cidade de Catanduva, região Noroeste paulista, faz parte dos 100 municípios com maior prevalência de AIDS no país, sendo que entre 1980 e 2009 foram notificados 932 casos³. Os dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) apontam que mais de 180 milhões de pessoas estão infectadas cronicamente com o HCV e 7 milhões de indivíduos coinfectados com HIV^{1,4-6}. No Brasil, a variação percentual nas taxas de coinfeção do HIV/HCV é decorrente de distribuição geográfica e de fatores de risco para aquisição das doenças, como a idade, o sexo e o tipo de exposição, com índices que variam de 17 % a 53 %^{1,7,8}.

A similaridade nas vias de transmissão, tais como a sexual, a vertical e a parenteral (incluindo-se o uso de drogas injetáveis), interliga o HIV a várias formas de hepatites, com destaque àquela causada pelo HCV^{3,9-12}. Assim, a hepatite é uma importante causa de morbidade e mortalidade entre os indivíduos soropositivos para o HIV (HIV+)¹³.

A ocorrência de mau prognóstico dos pacientes HIV+ coinfectados com os vírus causadores de hepatites é mais acentuada quando se trata de HCV em virtude de permanente estado de ativação imune com a diminuição da resposta celular do tipo Th1^{14,15}. Este evento parece reduzir o tempo para progressão à AIDS¹⁶, além do alto risco de hepatotoxicidade e cirrose que podem ser causadas pelas drogas antirretrovirais^{1,17,18}. A imunodeficiência ocasionada pelo HIV acarreta comprometimento hepático, que induz a cirrose e hepatocarcinoma e que podem causar óbito em pacientes coinfectados¹³. Desta maneira, atenção especial deve ser dada ao diagnóstico precoce e prevenção de outras comorbidades, bem como as estratégias terapêuticas⁵.

Apesar dos dados disponíveis sobre a caracterização clínica e epidemiológica dos indivíduos com co-infecção HIV/HCV no município de Catanduva serem restritos, este estudo poderá fornecer subsídios para implantação de políticas públicas de saúde em demais regiões do país. Portanto, o objetivo deste trabalho foi determinar a prevalência do HCV entre pacientes soropositivos para o HIV, assim como analisar os dados laboratoriais e epidemiológicos em um Hospital Escola do noroeste do Estado de São Paulo, Brasil. Além disso, o presente trabalho vem complementar os estudos anteriores realizados pelo grupo de trabalho do Centro de Referência de AIDS do Hospital Escola Emílio Carlos da cidade de Catanduva, SP^{3,19}.

MATERIAL E MÉTODOS

Por meio de análise retrospectiva, *cross-sectional* e descritiva de 600 prontuários médicos de pacientes com HIV/AIDS, atendidos no período de janeiro de 2004 a dezembro de 2007, foram selecionados 70 prontuários por conterem dados referentes à coinfeção por HCV. Estes pacientes foram atendidos no Hospital Escola Emílio Carlos, localizado na cidade de Catanduva, Estado de São Paulo. O referido Hospital é Centro de Nível Terciário de caráter filantrópico. Esta unidade oferece tratamento de pacientes com várias condições patológicas, incluindo-se as doenças infectocontagiosas e outras enfermidades de base, além da atuação no Programa Municipal de Doenças Sexualmente Transmissíveis (DST) e AIDS de Catanduva. Dos prontuários selecionados foram obtidas as informações clínico-epidemiológicas e laboratoriais relacionadas à transmissão e à evolução do quadro de hepatite C. O diagnóstico da hepatite C foi realizado por meio de ELISA (kit de reagente ETI-AB-HCVK) e confirmado pela técnica de RT-PCR qualitativa com o kit comercial “Amplicor HCV” da Roche Diagnostics Systems, versão 2.0, com limite inferior de detecção de 50 UI/mL. A genotipagem do HCV foi executada analisando-se a região ultraconservada 5’UTR com o kit de reagente LiPA (Line Probe Assay – Versant HCV Genotype – Bayer TM).

Para efetuar a coleta de dados dos prontuários médicos, utilizou-se o protocolo padronizado contendo os seguintes itens: idade, gênero, estado civil, grau de escolaridade, óbitos, genótipos do HCV e uso de tratamento antirretroviral (TARV). Os seguintes critérios de exclusão foram utilizados: prontuários médicos que apresentaram informações conflitantes e pacientes com idade inferior aos 18 anos. Foram inclusos, no estudo, todos os pacientes soropositivos para o HIV que apresentaram coinfeção com HCV.

Aspectos Éticos

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade Integrada Padre Albino – FIPA, sob o número 44/10, em 29/06/2010.

Análise estatística

Foi utilizado o programa estatístico EPIINFO versão 6.0 (CDC, Atlanta, EUA) para armazenagem dos dados e para realizar a análise estatística. O teste do Qui-quadrado (χ^2), com correção de Yates foi empregado para categorizar os dados, determinar a significância das

variáveis e a independência entre as proporções. O nível de significância adotado foi de 5 %.

RESULTADOS

A partir da análise dos 600 prontuários, foram selecionados 70 (11,6 %) pacientes com a coinfeção HIV/HCV. Destes 70 indivíduos, 71,4 % eram do sexo

masculino e 28,5 % do sexo feminino. A média de idade foi de 43,23 anos ($dp \pm 7,15$). Quanto à etnia, destacaram-se os caucasóides (57,1 %). Nesta análise foram predominantes os indivíduos com ensino fundamental incompleto (44,2 %), de estado civil casado/amasiado (32,9 %). Na análise predominaram os pacientes naturais de Catanduva (54,2%). A taxa de mortalidade foi de 8,6 % (Tabela 1).

Tabela 1. Dados sociodemográficos de 70 pacientes coinfectados HIV/HCV, atendidos no Hospital Escola Emílio Carlos, Catanduva – SP, no período de 2004 a 2007

Características sócio-demográficas	N=70	%
<i>Média de idade (anos)</i>	43,23	-
Sexo		
Feminino	20	28,5
Masculino	50	71,4
Etnia		
Caucasóide	40	57,1
Negróide	21	30,0
Ignorado	9	12,8
Escolaridade		
Analfabeto	1	1,4
Ensino fundamental incompleto	31	44,3
Ensino fundamental completo	8	11,4
Ensino médio incompleto	8	11,4
Ensino médio completo	2	2,8
Ensino superior	-	-
Ignorado	20	28,6
Estado civil		
Solteiro	10	14,3
Casado/amasiado	23	32,8
Divorciado/separado	5	7,1
Viúvo	5	7,1
Ignorado	27	38,5
Naturalidade		
Catanduva	38	54,2
Outras	19	27,1
Ignorado	13	18,5
Óbitos	6	8,5

–: dado numérico igual a zero não resultante de arredondamento

Tabela 2. Fatores de risco para coinfeção HIV/HCV em 70 pacientes atendidos no Hospital Escola Emílio Carlos, Catanduva – SP, no período de 2004 a 2007

Fatores	Feminino (n = 20)	%	Masculino (n = 50)	%
Etilismo				
Sim	8	40,0	23	46,0
Não	7	35,0	19	38,0
Ignorado	5	25,0	8	16,0
Presença de Tatuagem				
Sim	2	10,0	12	24,0
Não	13	65,0	25	50,0
Ignorado	5	25,0	13	26,0
Usuários de drogas injetáveis				
Sim	4	20,0	30*	60,0
Não	11	55,0	16	32,0
Ignorado	5	25,0	4	8,0
Transfusão sanguínea				
Sim	5	25,0	14	28,0
Não	11	55,0	25	50,0
Ignorado	4	20,0	11	22,0
Três ou mais parceiros sexuais				
Sim	9	45,0	14	28,0
Não	11	55,0	36	72,0

* Qui-quadrado $p < 0,05$

Quanto à provável via de transmissão do HCV, foi observado que a maioria ocorreu por via parenteral (64,3 %). Foi demonstrada significância estatística para transmissão parenteral do HIV/HCV nos indivíduos do sexo masculino ($p = 0,0050$) e pela via sexual nas mulheres ($p = 0,0050$). Houve predomínio dos genótipos 1a (14,0 %) e 3a (14,0 %) do HCV nos homens, e nas mulheres, o genótipo 1a (15 %). Contudo, vale salientar que este dado não estava especificado na maioria dos prontuários (73,0 %). Não houve disponibilidade de informações sobre tratamento para hepatite C, em 90 % dos prontuários de pacientes do sexo feminino e em 74 % do sexo masculino. Noventa por cento dos pacientes do sexo feminino e 96 % do sexo masculino estavam em uso da TARV.

O consumo de bebida alcoólica foi relatado nos prontuários de 40,0 % das mulheres e 46,0 % dos homens. Cinquenta por cento dos homens e 65 % das mulheres não apresentavam tatuagens. O uso de drogas

ilícitas injetáveis foi mencionado em 60,0 % dos homens e em 20,0 % das mulheres. Cinquenta por cento das mulheres e 50 % dos homens não receberam transfusão sanguínea. Das 20 mulheres e dos 50 homens analisados, 11 (55,0 %) e 36 (72,0 %) pacientes, respectivamente, não tiveram três ou mais parceiros sexuais. Valores estatisticamente significativos foram detectados apenas para o uso de drogas ilícitas injetáveis nos indivíduos do sexo masculino ($p = 0,0208$) (Tabela 2).

DISCUSSÃO

A prevalência da coinfeção por HIV/HCV encontrada nos prontuários analisados foi de 11,6 %, todavia em nível inferior àquele descrito para a média mundial (30 %), mas dentro da faixa de valores nacionais, cujas taxas variaram de 4,1 % a 53,8 %^{7,11,20}. Neste contexto, os estudos realizados nas regiões sul⁸ e sudeste²¹ do Brasil, mostraram índices, respectivamente, de 31,2 % e 16,7 %, que foram superiores aos descritos em Catanduva. Por outro lado, os dados relatados pela Fundação de Medicina Tropical do Amazonas (4,4 %), referentes ao período de 2000 a 2007, foram inferiores aos valores observados no presente estudo¹. É sabido que a taxa de prevalência do HCV varia de acordo com área geográfica, comportamento de risco e métodos laboratoriais de detecção viral^{1,17}.

A coinfeção por HIV/HCV foi predominante nos pacientes do sexo masculino (71,4 %) e a média de idade dos infectados foi de 43,23 anos ($dp \pm 7,15$). Dados semelhantes foram observados em Belém do Pará, onde 80,6 % eram homens na faixa etária acima de 40 anos²², no Hospital São Paulo, localizado na cidade de São Paulo, em que 60 % eram homens na mesma faixa etária²² e também, no Amazonas¹. Outros investigadores têm mostrado que os homens de idade superior aos 25 anos tornam-se mais expostos a esse vírus, em função de seus comportamentos de risco, como sexo inseguro e múltiplos parceiros sexuais^{22,24}.

Mais de 50,0 % dos indivíduos eram caucasoides e 44,3 % eram de baixo nível de escolaridade. Estes dados corroboram com os observados em Porto Alegre¹⁵ e São Paulo^{9,11,12}. A baixa escolaridade pode representar o acesso mais restrito aos serviços de saúde e condições de prevenção, diagnóstico e tratamento^{1,11}. Com relação à etnia, verificou-se o que era esperado, visto que os caucasoides são predominantes na região Noroeste do Estado de São Paulo³.

Os estudos de coinfeção HIV/HCV, realizados no Pará²² e Rio Grande do Sul²⁵, relataram o predomínio em indivíduos solteiros, cujas taxas foram, respectivamente, 71,0 % e 80,0 %. Os resultados do presente estudo discordam dos achados dos trabalhos acima referidos, pois apenas 14,0 % de indivíduos não casados apresentaram infecções por ambos os vírus. Acredita-se que este fato possa ter ocorrido em virtude de esta informação ter sido omitida em 38,6 % dos prontuários analisados e, ainda, considerando-se que os indivíduos solteiros estão mais predispostos ao sexo inseguro com múltiplos parceiros e com tendência ao aumento de infecção pelo HIV²².

Os grupos de maior risco para adquirirem o HCV e HIV têm sido os usuários de drogas ilícitas injetáveis, múltiplos parceiros sexuais, transfusão de sangue anterior a 1993, tatuagens no corpo e os profissionais da área da saúde^{11,17,20,22,26}. No entanto, o uso de drogas ilícitas injetáveis representa maior risco¹, como já observado no Norte, no Nordeste e no Sul do país^{17,22,24}. Os resultados do presente trabalho corroboram esses dados, uma vez que a citada característica foi evidenciada nos pacientes do sexo masculino ($p = 0,0208$). Esse achado talvez possa ser justificado, pelo fato de o Brasil ser o segundo país com maior prevalência de infecção pelo HIV em usuários de drogas ilícitas injetáveis na América Latina¹.

Por outro lado, a transmissão de vírus por via sexual foi significativa em mulheres ($p = 0,005$). Embora os estudos nacionais descrevam a contaminação pela via sexual como pouco frequente no sexo feminino⁷, um considerável aumento de pacientes neste grupo tem sido observado nos últimos anos no Brasil. Destaca-se portanto, a importância de efetuar a implantação e implementação de estratégias de prevenção para mulheres na região.

O HCV apresenta vários genótipos e subtipos, com predomínio do genótipo 1 na América do Norte e do Sul, Ásia e Europa^{16,27}. No Brasil tem ocorrido maior prevalência dos genótipos 1, com taxas de 24,1 % a 55 %, e do genótipo 3, com índices que variam de 20 % a 30 %^{16,17,28}. O presente estudo mostrou a prevalência de ambos os genótipos, sendo 14,3 % do subtipo 1a e 11,4% do subtipo 3a. No estudo realizado em Londrina, este mesmo perfil foi descrito em 183 amostras analisadas, com 42,6 % do subtipo 1a, 24,6 % do subtipo 1b e 19,7 % do subtipo 3a²⁷. No entanto, nenhuma inferência quanto à clínica e ao tratamento pode ser avaliada, dado que 66 % dos prontuários não continham estas informações.

Todavia, é importante frisar que o conhecimento do genótipo do HCV infectante é de grande relevância para melhor orientar a potencial resposta ao tratamento específico e sua duração^{5, 28,29}. Ademais, o genótipo do tipo 1 em pacientes coinfectados por HIV/HCV está associado ao pior prognóstico da doença, bem como ao tratamento mais prolongado e à pior resposta terapêutica^{5,16}.

O consumo de drogas ilícitas injetáveis, a dependência a bebidas alcoólicas, a contagem de linfócitos TCD4⁺ abaixo de 200 células/mm³ e a presença de infecções oportunistas nos últimos seis meses, são critérios que excluem o tratamento do HCV^{20,29}. Desta maneira, há estudos que demonstram que somente 30 % dos coinfectados são elegíveis para terapêutica com interferon⁸. Apesar de a maioria dos prontuários analisados não conter informações terapêuticas para a infecção pelo HCV, foi evidente o consumo de drogas injetáveis e o etilismo nesta população, cujas taxas foram, respectivamente, de 40,0 % e 43,0 %. Estes fatos podem auxiliar na decisão para que os pacientes não recebam o tratamento específico para o HCV. Ademais, o HCV parece acelerar a progressão da infecção pelo HIV, induzindo aumento da carga viral e reduzindo a contagem de TCD4⁺¹⁵. Certamente, a co-infecção HIV/HCV constitui um dos fatores de risco associados à morte do paciente com HIV/AIDS¹⁹.

CONCLUSÃO

Os trabalhos anteriores realizados pelo Grupo de Estudo sobre pacientes soropositivos para o HIV do município de Catanduva (Furini et al¹⁹ e Schiesari et al³) apontaram a necessidade de realizar maior investigação das particularidades da coinfeção por HIV/HCV. No presente estudo foi observado que a prevalência da coinfeção no município de Catanduva é inferior à média detectada no Brasil, todavia essa situação é um problema importante na população, mesmo com a disponibilidade da TARV. Infelizmente, pela falta de algumas informações nos prontuários analisados, especialmente em relação à genotipagem e ao tratamento do HCV, houve restrição em efetuar análise mais aprofundada do tema em questão, uma vez que o tratamento para hepatite C nos pacientes coinfectados representava um dos principais objetivos desta investigação, a de avaliar a infecção pelo HCV em pacientes soropositivos para HIV. O levantamento e o conhecimentos da situação da coinfeção por HIV/

HCV são fundamentais para as autoridades públicas da saúde possam traçar as estratégias de ações de controle e de prevenção de infecções por HIV e HCV. Além disso, o reconhecimento de fatores associados à interação do hospedeiro com o vírus, quanto ao aspecto molecular, é importante para o tratamento do HCV. O surgimento de novas estratégias para alcançar o tratamento mais eficaz, assim como o acompanhamento de pacientes com infecção crônica pelo HCV e coinfeção com o HIV nos próximos anos poderão contribuir para reduzir o número de pacientes infectados.

AGRADECIMENTOS

A todos os pacientes incluídos neste estudo.

REFERÊNCIAS

1. Victoria MB, Victoria FS, Torres KL, Kashima S, Covas DT, Malheiro A. Epidemiology of HIV/HCV coinfection in patients cared for at the Tropical Medicine Foundation of Amazonas. *Braz J Infect Dis*.2010;14(2):135-40.
2. Brasil Ministério da Saúde. [citado 2009]. Disponível em: http://www.aids.gov.br/data/documents/storedDocuments/%7BB8EF5DAF-23AE-4891-AD36-1903553A3174%7D/%7B31A56BC6-307D-4C88-922D-6F52338D0BF4%7D/Boletim2008_vers%E3o1_6.pdf.
3. Schiesari Júnior A, Galisteu KJ, Cardoso LV, Schiesari VMB, Furini AAC, Rossit ARB, et al. Epidemiological Patterns of AIDS in a Reference Center from Catanduva, São Paulo State, Brazil. *Open J Med Microbiol*.2012;2:47-53.
4. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim epidemiológico. AIDST. CRT- DST/AIDS.CVE. ANO XXVI. Nº 1: 2009. Disponível em: <http://www.crt.saude.sp.gov.br/content/drerulith.mm>.
5. Fernández-Montero JV, Soriano V. Management of hepatitis C in HIV and/or HBV co-infected patients. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2012;26(4):517-30.
6. Centro de Vigilância Epidemiológica "Prof. Alexandre Vranjac" – CVE. Nº de casos de hepatite C por GVE de residência e ano de notificação, Estado de São Paulo - 2002 a 2009*. Disponível em : http://www.cve.saude.sp.gov.br/hm/hepatite/hepac_gve.htm.
7. Ministério da Saúde. Secretaria da Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Hepatites virais: O Brasil está atento. 3ª ed. Brasília: Ministério da Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica, 2008.
8. Mendes-Corrêa MC, Martins LG, Tenore S, Leite OH, Leite AG, Cavalcante AJW, et al. Barriers to treatment of hepatitis C in HIV/HCV coinfectad adults in Brazil. *Braz J Infect Dis*.2010;14(3):237-41.
9. Marchesini AM, Prá-Baldi ZP, Mesquita F, Bueno R, Buchalla CM. Hepatites B e C em usuários de drogas injetáveis vivendo com HIV em São Paulo, Brasil. *Rev Saude Publica*.2007;41(2):57-63.
10. Mohammadi M, Talei G, Sheikhan A, Ebrahimzade F, Pournia Y, Ghasemi E, et al. Survey of both hepatitis B virus (HBsAg) and hepatitis C virus (HCV-Ab) coinfection among HIV positive patients. *Virology*.2009;18(6):202.
11. Navarro RMC, Mendes-Corrêa MCJ, Cavalheiro NP, Barone AA. Clinical laboratory assessment of hepatitis C and HIV coinfectad patients according to the antiretroviral therapy received. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*.2005;47(1):13-7.
12. Silva ACM, Barone AA. Fatores de risco para infecção pelo HIV em pacientes com o vírus da hepatite C. *Rev Saude Publica*.2006;40(3):482-8.
13. Amaral ISA, Souza RCM, Mória LJMP, Barbosa MSB, Miranda ESBM, Conde SRSC, et al. Coinfeção provocada pelos vírus da imunodeficiência humana e hepatite C (HIV-1/HCV): uma casuística da Amazônia brasileira. *Rev Pan-Amaz Saude [online]*. 2010;1(2):137-42 .
14. Singal AK, Anand BS. Management of hepatitis C virus infection in HIV/HCV co-infected patients: Clinical review. *World J Gastroenterol*.2009;15(30):3713–24.
15. Tovo CV, Santos DE, Mattos AZ, Mattos AA, Santos BR, Galperim B. Avaliação da imunidade celular nos pacientes Co-Infectados pelo vírus da hepatite C e vírus da imunodeficiência humana. *Arq Gastroenterol*.2007;44(2):113-7.
16. Corvino SM, Henriques RMS, Grotto RMT, Pardini MIMC. Coinfeção HIV/HCV em pacientes de Botucatu e região. *Rev Bras Epidemiol*.2007;10(4):537-43.
17. Carvalho FHP, Coêlho MRCD, Vilella TAS, Silva JLA, Melo HRL. Coinfeção por HIV/HCV em hospital universitário de Recife, Brasil. *Rev Saude Publica*.2009;43(1):133-9.
18. Pépin J, Lavoie M, Pybus OG, Pouillot R, Foupouapouognigni Y, Rousset D, et al. Risk Factors for Hepatitis C Virus Transmission in Colonial Cameroon. *Clin Infect Dis*.2010;51(7):768–76.
19. Santos KF, Vieira TB, Beck ST, Leal DBR. Alterações laboratoriais encontradas em indivíduos co-infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) e pelo vírus da hepatite C (HCV). *Rev Bras Anal Clin*.2010;42(1):214.
20. Amaral ISA, Almeida ML, Alves FT, Mória LJMP, Conde SRSS. Epidemiologia de pacientes co-infectados HIV/HCV atendidos na Fundação Santa Casa de Misericórdia do Pará. *Rev Para Med*.2007;21(1):15-20.
21. Barbosa AJ, Baggio-Zappia GL, Dobo C, Alves-Sousa VK, Lanzara GA, Silva IDCG, et al. Analysis of GB virus C infection among HIV-HCV coinfectad patients. *Rev Soc Bras Med Trop*.2009;42(5):591-3.
22. Gabe C, Lara GM. Prevalência de anti-HCV, anti-HIV e coinfeção HCV/HIV em um presídio feminino do Estado do Rio Grande do Sul. *Rev Bras Anal Clin*.2008;40(2):87-9.
23. Pegoraro C. Prevalência de coinfeção entre HIV e HCV em doadores de sangue do hemocentro regional de Passo Fundo, RS. *Rev Soc Bras Med Trop*.2008;[serial on the Internet]. Disponível em: <http://www.ulbracarazinho.edu.br/novo/grades/tcc%202008%202%20biomedicina/Chana%20Pegoraro.pdf>.

24. Strazza L, Massad E, Azevedo RS, Carvalho HB. Estudo de comportamento associado à infecção pelo HIV e HCV em detentas de um presídio de São Paulo, Brasil. *Cad Saude Publica*.2007;23(1):197-205.
25. Vogler IH, Nishiya A, Morimoto HK, Reiche EMV, Bortoliero AL, Matsuo T. Serological, epidemiological and molecular aspects of hepatitis C virus infection in a population from Londrina, PR, Brazil 2001-2002. *Rev Inst Med Trop S Paulo*.2004; 46(6):303-8.
26. Braga EL, Lyra AC, Ney-Oliveira F, Nascimento L, Silva A, Brites C, et al. Clinical and epidemiological features of patients with chronic hepatitis C co-infected with HIV. *Braz J Infect Dis*.2006;10(1):17-21.
27. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de DST e Aids. Recomendações para Terapia Antirretroviral em Adultos Infectados pelo HIV: 2008. Disponível em: <http://www.aids.gov.br/data/documents/storedDocuments>
28. Gomides M, Berbert A, Mantese S, Rocha A, Ferreira M, Borges A. Dermatoses em pacientes com AIDS: estudo de 55 casos. *Rev Assoc Med Bras*.2002;48(1):36-41.
29. Furini AAC, Schiesari-Junior A, Souza MSR, Helena CC, Rossit ARB, Machado RLD. Perfil das coinfeções em indivíduos soropositivos para o HIV-1 atendidos em um Hospital Escola do Noroeste Paulista, Brasil: dados preliminares. *Rev Panam Infectol* .2010;12(3):39-42.

Serviços de alimentação comercial: fator de risco para a saúde pública?

Commercial food services: risk factor for public health?

RIALA6/1595

Maria Regina Sarkis Peixoto JOELE¹, Consuelo Lima SOUSA^{2*}, Lúcia de Fátima Henriques LOURENÇO²

*Endereço para correspondência: ²Laboratório de Microbiologia de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Instituto de Tecnologia, Universidade Federal do Pará, Avenida Perimetral s/n, Guamá, Belém, PA, Brasil. CEP 6075-110, Caixa postal 479. Telefone: 91 3201-1293, Fax: 91 3201-7456. E-mail: sousa@ufpa.br

¹Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Pará, campus Castanhal. Castanhal, Pará, Brasil.

Recebido: 06.06.2013 - Aceito para publicação: 17.03.2014

RESUMO

Neste trabalho foram avaliadas as condições higiênico-sanitárias de restaurantes comerciais com serviços do tipo *self-service* localizados na cidade de Belém/PA. No primeiro semestre de 2012, foram avaliados os procedimentos adotados quanto às Boas Práticas de Fabricação em 10 estabelecimentos tipo *self-service*. A investigação foi efetuada com auxílio da lista de verificação proposta na Resolução RDC nº 216/2004 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) do Ministério da Saúde, que classifica os serviços de alimentação de acordo com o percentual de atendimento dos itens em: Grupo 1 - BOM (76 a 100 % de atendimento dos itens), Grupo 2 - REGULAR (51 a 75 % de atendimento dos itens) e Grupo 3 - RUIM (0 a 50 % de atendimento dos itens). Dos restaurantes avaliados, 20 % foram classificados no grupo 3 (RUIM), 30 % no grupo 2 (REGULAR) e 50 % no grupo 1 (BOM). De modo geral, os restaurantes avaliados já estavam em processo de implantação das Boas Práticas, porém com aspectos a serem corrigidos. Entre os principais problemas dos estabelecimentos avaliados destacam-se o fluxo cruzado em função de estrutura física do local, a higienização inadequada de utensílios e de equipamentos, e a falta de monitoramento por parte do responsável pelas atividades do local.

Palavras-chave. restaurantes, higiene dos alimentos, manipulação de alimentos.

ABSTRACT

This investigation aimed at evaluating the hygienic and sanitary conditions in self-service type restaurants located in Belém, PA. The procedures related to the Good Manufacturing Practices were evaluated in 10 self-service restaurants, during the first semester of 2012. For conducting the study, the checklist proposed in the Resolution RDC no. 216/2004 of the National Sanitary Surveillance Agency - Ministry of Health. This RDC classifies the food services according to the percentage of attendance of the items in: group 1 - GOOD (76 to 100 % of items attendance), group 2 - REGULAR (51 to 75 % of items attendance) and group 3 - BAD (0 to 50 % of items attendance). Of the evaluated restaurants, 20 % were classified into group 3 (BAD), 30 % into group 2 (REGULAR) and 50 % into group 1 (GOOD). In general, the restaurants were already in the process of the Good Practices implementation, but being in a stage for correcting some issues. Among the main problems detected in the evaluated restaurants, the following questions were evidenced: the cross-flow due to the place physical structure, the inadequate cleaning of utensils and equipment, and the lack of monitoring by the manager in charge of the place activities.

Keywords. restaurants, food hygiene, food manipulation.

INTRODUÇÃO

As mudanças socioeconômicas ocorridas nos últimos anos, como urbanização, industrialização, a distância entre o domicílio e o local de trabalho, entre outros fatores, contribuíram para o número cada vez maior de pessoas que se alimentam fora de casa¹. Os Serviços de Alimentação têm por objetivo oferecer uma alimentação de qualidade fora de domicílio e que seja adequada às necessidades do consumidor levando em consideração seus hábitos e preferências².

Nos últimos anos, houve aumento significativo no número de restaurantes no Brasil, onde em 2013, o setor de alimentação coletiva forneceu 11,7 milhões de refeições/dia com faturamento 16,6 bilhões de reais, com tendência de crescimento nos próximos anos³. Entretanto, observa-se que, paralelamente ao crescimento deste segmento, há aumento da ocorrência de Doenças Veiculadas por Alimentos (DVAs) decorrente da ausência de controle rigoroso no processamento, no armazenamento e na distribuição dos alimentos⁴.

Dentre os fatores de prevenção de doenças, destaca-se a qualidade da matéria prima, higiene dos manipuladores e dos utensílios utilizados, assim como o monitoramento do tempo e temperatura das preparações alimentares. Portanto, a detecção e rápida correção das falhas no processamento, bem como a adoção de medidas preventivas, são as principais estratégias para o controle de qualidade⁵.

Para garantir a qualidade do produto e a saúde do consumidor é necessário que todos os estabelecimentos que produzem e comercializam alimentos adotem ferramentas de gestão de qualidade como as Boas Práticas de Fabricação (BPF), que correspondem a conjunto de princípios e regras para o correto manuseio de alimentos e que tem como meta principal a redução dos riscos, além de ser um sistema de baixo custo, eficaz e de fácil execução⁶.

Os Serviços de Alimentação que são devidamente organizados e ordenados dentro dos princípios estabelecidos pelas BPF, permitem a identificação de falhas operacionais ou administrativas que possam ocorrer durante o processo produtivo, garantindo também a melhoria na qualidade e minimizando os riscos de surtos de origem alimentar⁷.

Devido à importância do controle na elaboração de alimentos que atendam às características e integridade do produto, bem como a saúde dos consumidores, o objetivo do presente trabalho foi avaliar as condições higiênico-sanitárias de restaurantes comerciais com

serviços do tipo *self-service* localizados na cidade de Belém/PA.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram avaliados, no período compreendido entre janeiro a julho de 2012, 40 % dos restaurantes (n = 10) tipo *self-service*, com produção média de 200 refeições diárias, localizados no centro da cidade de Belém/Pará e que aceitaram participar da presente pesquisa. Os restaurantes foram identificados por letras de A a J.

Para avaliação das BPF, foi utilizada a lista de verificação proposta na Resolução RDC nº 216/2004⁸, constituída por 129 itens de verificação agrupados em 12 blocos por assunto, sendo: Bloco 1 - "Edificações, Instalações, Equipamentos, Móveis e Utensílios"; Bloco 2 - "Higienização de Instalações, Equipamentos, Móveis e Utensílios"; Bloco 3 - "Controle Integrado de Vetores e Pragas Urbanas"; Bloco 4 - "Abastecimento de Água"; Bloco 5 - "Manejo de Resíduos"; Bloco 6 - "Manipuladores"; Bloco 7 - "Matérias-primas, Ingredientes e Embalagens"; Bloco 8 - "Preparação do Alimento"; Bloco 9 - "Armazenamento e Transporte do Alimento Preparado"; Bloco 10 - "Exposição ao Consumo do Alimento Preparado"; Bloco 11 - "Documentação e Registro e Bloco"; 12 - "Responsabilidade", permitindo sua classificação em grupos, de acordo com o atendimento a esses itens.

Os itens foram classificados de acordo com os critérios: Conforme (C) quando estavam em conformidade com a legislação sanitária vigente; Não Conforme (NC) quando não estavam em conformidade e Não se Aplica (NA) para os itens que não tinham relevância. Cada bloco da ficha de avaliação obteve um valor, em porcentagem, em função da conformidade ou não conformidade dos itens. Todos os itens atendidos foram somados para obter a porcentagem geral do estabelecimento. A classificação geral do estabelecimento foi feita de acordo com o estabelecido na Resolução RDC nº 216/2004⁸: Grupo 1 - BOM (76 a 100 % de atendimento dos itens), Grupo 2 - REGULAR (51 a 75 % de atendimento dos itens) e Grupo 3 - RUIM (0 a 50 % de atendimento dos itens).

Nas vistorias para o preenchimento da lista, foi acompanhada a rotina de trabalho de cada restaurante durante três dias consecutivos através de observação visual, verificação de documentação e informações fornecidas por funcionários e proprietários. Após cada vistoria foi realizada uma reunião com o responsável técnico

e ajudantes onde foi repassado o plano de ações corretivas, onde estavam descritas todas as não conformidades detectadas e as correções que deveriam ser feitas, também especificando o responsável e o prazo de execução.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com o percentual de conformidades geral dos restaurantes (Figura 1), verificou-se que 20 % foram classificados no grupo 3 (RUIM), 30 % no grupo 2 (REGULAR) e 50 % no grupo 1 (BOM). É recomendado para os serviços de alimentação que os atributos avaliados tenham percentagens de conformidades maiores que 70 % para garantir a produção de alimentos seguros⁹.

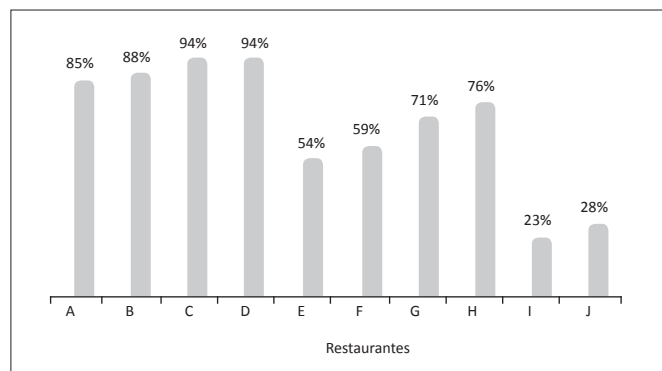


Figura 1. Percentagem geral de atendimento aos atributos da lista de verificação das Boas Práticas de cada restaurante avaliado.

Tabela 1. Percentual de conformidade de cada Bloco da lista de verificação das BPF por restaurante avaliado, localizados na cidade do Belém – PA, no período de Janeiro a Julho de 2012

Blocos	Restaurantes (% de conformidades)									
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
Bloco 1	52	59	86	90	44	59	75	62	19	30
Bloco 2	77	100	100	100	54	85	85	92	38	34
Bloco 3	80	100	100	100	60	60	80	60	0	0
Bloco 4	72	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Bloco 5	67	100	100	100	67	100	67	67	67	42
Bloco 6	67	92	86	86	73	82	82	82	23	44
Bloco 7	70	95	75	95	91	55	91	91	54	21
Bloco 8	35	95	95	90	57	54	71	64	21	28
Bloco 9	50	67	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	37
Bloco 10	67	91	92	92	60	60	80	80	40	43
Bloco 11	50	50	100	50	0	0	0	50	0	0
Bloco 12	100	100	100	100	100	100	100	100	100	0

Bloco 1. Edificação, instalação, equipamentos moveis e utensílios; Bloco 2. Higienização de Instalações, equipamentos, móveis e utensílios; Bloco 3. Controle Integrado de Vetores e Pragas urbanas; Bloco 4. Abastecimento de água; Bloco 5. Manejo de Resíduos; Bloco 6. Manipuladores; Bloco 7. Matérias primas, ingredientes e embalagens; Bloco 8. Preparação do Alimento; Bloco 9. Armazenamento e transporte do alimento preparado; Bloco 10. Exposição ao consumo do alimento preparado; Bloco 11. Documentação e registro; Bloco 12. Responsabilidade. NA = Não se aplica

Saccol et al⁶ verificaram, por meio de uma lista de verificação das BPF, que 83 % dos estabelecimentos (restaurantes, padarias e confeitarias) apresentaram classificação RUIM na primeira aplicação da lista, entretanto após a utilização do plano de ação corretiva proposto, houve um decréscimo considerável dos estabelecimentos classificados no grupo 3.

Os percentuais de conformidade de cada Bloco da lista de verificação das BPF dos 10 restaurantes avaliados encontram-se na Tabela 1.

Alguns dos problemas encontrados durante a avaliação nos restaurantes estavam relacionados com as edificações e instalações (Bloco 1), que não foram projetadas de forma a possibilitar um fluxo ordenado e sem cruzamentos entre as etapas de preparação do alimento, não havia separação física entre as atividades e na maioria dos estabelecimentos, o dimensionamento das instalações não era adequado ao número de refeições produzidas. A adequação da edificação e instalações constitui uma condição para a implementação das BPF².

Em 70 % dos estabelecimentos, as instalações e os equipamentos não estavam mantidos em condições higiênico-sanitárias apropriadas (Bloco 2), devido principalmente à frequência inadequada das operações de higienização, realizadas somente no final do expediente, que ocasionavam acúmulo de resíduos. Na maioria dos estabelecimentos, não havia local adequado para armazenar os utensílios utilizados na higienização, não sendo encontrado também registro destas operações. Equipamentos e utensílios com higienização deficiente têm sido responsáveis, isoladamente ou associados a outros fatores, por surtos de doenças de origem alimentar ou por alterações de alimentos processados¹⁰.

Entre os restaurantes avaliados, dois não apresentavam qualquer tipo de controle de pragas (Bloco 3) e em três, apesar da aplicação de controle químico foi detectada a presença de insetos (moscas e baratas) na área de produção, o que segundo Cruz et al¹¹ pode acarretar prejuízos para a segurança microbiológica dos alimentos. Quanto à qualidade da água (Bloco 4), verificou-se que todos os restaurantes utilizavam água potável, proveniente da rede pública de abastecimento, na preparação dos alimentos.

Em relação ao acondicionamento dos resíduos (Bloco 5), 60 % dos restaurantes não possuíam recipientes adequados, em número e capacidade suficientes. Em um dos restaurantes, foi observada a deposição de resíduos em área aberta até a coleta urbana. Segundo Miranda

et al¹², recipientes sem acionamento automático podem contribuir para o aumento do risco de contaminação de alimentos, sendo que na maioria das vezes a não aquisição das mesmas está relacionada a falta de conhecimento dos responsáveis sobre a importância da exigência legal.

Foi constatado que, nos restaurantes avaliados, os manipuladores (Bloco 6) não higienizavam as mãos corretamente, devido principalmente à ausência de produtos adequados e também não foram observados cartazes com orientação aos manipuladores sobre a correta higienização das mãos, em locais de fácil visualização. Em relação à capacitação dos manipuladores, somente 60 % dos estabelecimentos apresentaram registro de realização do curso de capacitação e/ou entrega de certificados de manipulador de alimentos emitidos pelo órgão competente. Na maioria dos restaurantes (70 %), os manipuladores utilizavam uniformes completos, limpos e conservados, com unhas curtas e sem esmaltes, sem adornos pessoais e maquiagem. Em 20 % dos restaurantes, funcionários com lesões cutâneas principalmente nas mãos, sem devida proteção, não eram afastados da atividade de preparação de alimentos. Estudos realizados em diversos estados do Brasil constataram que a frequência da higienização das mãos dos manipuladores de alimento era inadequada e, além disso, foi observado o uso de adornos (especialmente anéis, relógios e pulseiras) e esmalte nas unhas por esses profissionais durante o trabalho¹³.

O recebimento de matérias-primas e ingredientes (Bloco 7) é a primeira etapa de controle higiênico-sanitário no estabelecimento e deve compreender atividades de conferência da qualidade dos produtos recebidos¹². Entre os estabelecimentos avaliados, 30 % não faziam seleção de fornecedores e, em apenas um desses foi detectada a presença de alimentos sem procedência (sem identificação do fornecedor, data de fabricação e prazo de validade). Nenhum dos restaurantes avaliados realizava controle de temperatura das matérias-primas no recebimento e armazenamento, assim como identificação nos alimentos a serem congelados. O descaso com a temperatura das matérias-primas perecíveis é uma das principais inadequações relatadas durante avaliações em serviços de alimentação, que pode levar ao desperdício e principalmente, causar risco à saúde do consumidor². No restaurante J foi observado que os equipamentos utilizados para armazenar os alimentos encontravam-se em mal estado de conservação e higiene com a utilização de *palets* e prateleiras de madeira, o que também contribuiu para a

baixo índice de conformidade obtido e que vai contra ao preconizado na legislação vigente brasileira.

Na etapa de preparo dos alimentos (Bloco 8), verificou-se que não estavam sendo adotadas medidas para minimizar o risco de contaminação cruzada em 70 % das unidades, em decorrência da ausência de separação física entre as atividades, possibilitando o contato direto entre alimentos crus e cozidos. Em 100 % das unidades, o acondicionamento de matérias-primas e ingredientes, que não foram totalmente utilizados, estava inadequado, sem identificação ou mantido na embalagem original, o que não é recomendado pela legislação⁸. Outro item encontrado totalmente não conforme foi o controle da temperatura, pois nenhum dos estabelecimentos avaliados realizava este controle durante o preparo (tratamento térmico) e nas preparações alimentares expostas ao consumo. Um dos pontos críticos relevante nas BPF corresponde ao binômio tempo e temperatura, uma vez que a permanência de alimentos nas temperaturas consideradas como zona de perigo (10 °C a 60 °C) promove a multiplicação rápida de micro-organismos, os quais poderão ocasionar danos à saúde do consumidor¹⁴. Constatou-se também que 50 % dos restaurantes realizavam o descongelamento dos alimentos de forma inadequada, sempre em temperatura ambiente com o produto fora da embalagem.

Dos dez restaurantes avaliados apenas três armazenavam e transportavam alimentos preparados (Bloco 9), entretanto de maneira inadequada, pois os mesmos estavam sem identificação (data de preparo e prazo de validade) e enquanto aguardavam o transporte, eram acondicionados juntamente com matérias-primas nas câmaras de refrigeração ou em temperatura ambiente. Os veículos utilizados para o transporte de refeições prontas para o consumo não eram exclusivos para este fim, algumas vezes utilizados também para transportar outras cargas (material de limpeza). O transporte do alimento preparado deve ocorrer em condições adequadas de tempo e temperatura e em veículos dotados de cobertura para proteção da carga, não devendo transportar outras cargas que comprometam a qualidade higiênico-sanitária do alimento preparado⁷.

Dentre os restaurantes avaliados, dois não possuíam balcões expositores (E e J) e em somente dois (C e D) os balcões tinham barreira de proteção contra a contaminação do alimento em decorrência da proximidade ou da ação do consumidor. O principal objetivo dos balcões térmicos é fornecer produtos em

temperatura sensorialmente agradável e mantê-los em condição de tempo e temperatura seguros ($t > 60$ °C por no máximo 6 horas) sob o ponto de vista microbiológico^{7,13}. Nenhum dos restaurantes fazia o controle de temperatura dos alimentos e equipamentos. Quanto à distribuição dos alimentos prontos que necessitavam de refrigeração, verificou-se que apenas 50 % dos estabelecimentos possuíam balcão refrigerado, sendo que nos demais, os alimentos estavam expostos à temperatura ambiente, não sendo tomada nenhuma medida de controle a fim de evitar crescimento microbiano. Em relação ao acondicionamento dos utensílios, constatou-se que, em um dos restaurantes, estes estavam sendo acondicionados em local inadequado e sem proteção.

Quanto aos registros e documentação dos restaurantes (Bloco 11), apenas 50 % tinham Manual de Boas Práticas (MBP) e somente um apresentou os Procedimentos Operacionais Padronizados (POP) com seus respectivos registros. A falta de documentação é uma das irregularidades mais comuns, relatadas em auditorias de BPF em serviços de alimentação^{1,5}. Em relação à responsabilidade técnica (Bloco 12), verificou-se que 90 % dos restaurantes tinham em seu quadro de pessoal um profissional da área de alimentos (nutricionista).

Ebone et al¹⁵, ao analisarem estratégias utilizadas para a gestão da qualidade higiênico-sanitária em unidades produtoras de refeições comerciais de Florianópolis (SC), detectaram que as unidades necessitavam de melhorias para oferecer alimentos mais seguros, sendo imprescindível a conscientização dos proprietários e dos gerentes sobre a importância de servir alimentos de qualidade que não causem danos à saúde do comensal.

Ferreira et al¹⁶, ao avaliarem Unidades de Alimentação e Nutrição (UAN) de pequeno e médio portes localizadas na região metropolitana de Belo Horizonte, concluíram que apesar da boa classificação geral das UAN, foram detectadas falhas nos blocos “edificação e instalações” e “equipamentos, móveis e utensílios”.

CONCLUSÃO

Entre os principais problemas dos estabelecimentos avaliados destacaram-se o fluxo cruzado durante o processo produtivo devido às falhas estruturais nas edificações, a higienização inadequada de utensílios e equipamentos e a falta de monitoramento por parte do responsável pelas atividades do local, fatores importantes para a definição da qualidade do ambiente

em que são produzidos alimentos para o consumo. Na maioria dos restaurantes avaliados (60 %), foi observado que, mesmo que parcialmente, já estavam sendo aplicados procedimentos de Boas Práticas, porém ainda com deficiências, que podem ser minimizadas com adoção de treinamentos e supervisão contínuos. A adoção efetiva das Boas Práticas deve ser o desafio de todo o pessoal envolvido na manipulação de alimentos, visando à produção de alimentos seguros e com qualidade aos consumidores, sendo, portanto necessário que todas as não conformidades apontadas sejam corrigidas e que procedimentos de manipulação e higiene sejam adotados de acordo com o Plano de Ação encaminhado aos restaurantes.

REFERÊNCIAS

1. Mello AG, Back FS, Colares LGT. Condições higiênico-sanitárias de restaurantes self-services localizados no estado do Rio de Janeiro. *Hig Alim*.2011;25(2):64-9.
2. Medeiros L, Dall'Agnoli LP, Botton AS, Smaniotto H, Potter R, Campos MMA, et al. Qualidade higiênico-sanitária dos restaurantes cadastrados na Vigilância Sanitária de Santa Maria, RS, Brasil, no período de 2006 a 2010. *Ciênc Rural*.2013;43(1):81-6. doi.org/10.1590/S0103-84782012005000146
3. ABERC - Associação Brasileira das Empresas de Refeições Coletivas. Mercado real. Estimativa 2014. [acesso 2014 Jan 24]. Disponível em: [http://www.aberc.com.br/mercadoreal.asp]
4. Organização Mundial de Saúde. Food borne disease: a focus for health education. 695 Geneva: World Health Organization. 2000;198p.
5. Seixas FRF, Seixas JRF, Reis JA, Hoffmann FL. Check-list para diagnóstico inicial das Boas Práticas de Fabricação (BPF) em estabelecimentos produtores de alimentos da cidade de São José do Rio Preto (SP). *Rev Analytica*.2008;33:12-7.
6. Saccol ALF, Stangarlin L, Richards NS, Hecktheuer LH. Avaliação das boas práticas em duas visões: técnica e da empresa. *Braz J Food Technol*.2009; 1:19-23.
7. Fonseca MP, Manfridini LA, José JFBO, Tomazini APB, Martini HSD, Ribeiro RCL, et al. Avaliação das condições físico-funcionais de restaurantes comerciais para implementação das boas práticas. *Alim Nutr*.2010;21(2):251-7.
8. BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RDC nº. 216, de 15 de setembro de 2004. Dispõe sobre Regulamento Técnico de Boas Práticas para Serviços de Alimentação. Diário Oficial [da] União. Brasília, 2004. [acesso 2014 Jan 20]. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br].
9. Sousa CL, Neves ECA, Lourenço LFH, Costa EB, Monteiro RRC. Microbiological and hygienic-sanitary conditions diagnostic in light frozen food industry in Belém/PA. *Alim Nutr*.2009;20(3):375-81.
10. Mezzari MF, Ribeiro AB. Avaliação das condições higiênico-sanitárias da cozinha de uma escola municipal de Campo Mourão - Paraná. *SaBios Rev Saúde Biol*.2012;7(3):60-6.
11. Cruz AG, Cenci AS, Maia MCA. Pré-requisitos para implementação do sistema APPCC em uma linha de alface minimamente processada. *Ciênc Tecnol Aliment*.2006;26(1):104-9. doi.org/10.1590/S0101-20612006000100018
12. Miranda ACB, Baião RCL. Avaliação das boas práticas na fabricação de preparações à base de pescados crus em restaurante japonês. *C&D Rev Eletr Fainor*.2011;4(1):52-61.
13. Cardoso RCV, Souza EVA, Santos PQ. Unidades de alimentação e nutrição nos campi da Universidade Federal da Bahia: um estudo sob a perspectiva do alimento seguro. *Rev Nutr*.2005;18(5):669-80. doi.org/10.1590/S1415-52732005000500010
14. Storck CR, Dias MAMF. Monitoramento da temperatura de preparações quentes e frias em restaurantes *self-services* na zona urbana de Santa Maria. *Nutr Pauta*.2003;11(59):31- 5.
15. Ebone MV, Cavalli SB, Lopes SJ. Segurança e qualidade higiênico-sanitária em unidades produtoras de refeições comerciais. *Rev Nutr*.2011;24(5):725-34. doi.org/10.1590/S1415-52732011000500006.
16. Ferreira MA, São José JFB, Tomazini APB, Martini HSD, Milagres RCM, Pinheiro-Sant'Ana HM. Avaliação da adequação às boas práticas em unidades de alimentação e nutrição. *Rev Inst Adolfo Lutz*.2011;70(2): 230-5.

Raiva animal na cidade do Rio de Janeiro: emergência da doença em morcegos e novos desafios para o controle

Animal rabies in the city of Rio de Janeiro: emergency of the disease in bats and the new challenges for its control

RIALA6/1596

Priscilla Gomes de SOUZA¹, Barbara Maria Padão Montes do AMARAL^{2*}, Clayton Bernardinelli GITTI³

*Endereço para correspondência: ²Unidade de Vigilância e Fiscalização Sanitária em Zoonoses Paulo Dacorso Filho-UPDF, Largo do Bodegão 150, Santa Cruz, Rio de Janeiro CEP: 23050-550. E-mail: ccz@rio.rj.gov.br

¹Unidade de Vigilância e Fiscalização Sanitária em Zoonoses Paulo Dacorso Filho, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro,

³Laboratório de Doenças Infecciosas, Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

Recebido: 09.07.2013 - Aceito para publicação: 24.03.2014

RESUMO

Enfermidade infecciosa aguda de etiologia viral, a raiva, atinge mamíferos, inclusive o homem, sendo caracterizada por sintomatologia nervosa resultante de encefalopatia e letalidade de aproximadamente 100 %. Por ser uma zoonose com diferentes espécies animais como reservatório, seu controle exige medidas de redução da circulação viral na espécie de maior relevância na cadeia de transmissão da raiva. Na cidade do Rio de Janeiro a doença está sob controle epidemiológico em sua forma urbana, onde o cão é a principal fonte de infecção. Ultimamente, tem sido constatada a ocorrência da doença em animais domésticos como equinos, bovinos e suínos, transmitida por morcegos hematófagos, e em morcegos não hematófagos, alertando para a importância do ciclo silvestre e a necessidade de maior conhecimento sobre este perfil epidemiológico da doença. Este trabalho relata a ocorrência de 14 casos de raiva em animais na cidade do Rio de Janeiro em 2011 e 2012. Destaca-se a importância do morcego hematófago *Desmodus rotundus* na transmissão da doença, caracterizando a circulação viral em território municipal e o potencial risco de reintrodução da raiva na cidade, a partir do ambiente silvestre, com a imposição de novos desafios aos profissionais de saúde pública que atuam nesta área.

Palavras-chave. raiva, ciclo silvestre, *Desmodus rotundus*, Rio de Janeiro.

ABSTRACT

Acute infectious disease of viral etiology, the rabies, affects mammals including man, and it is characterized by neurological symptoms resulting from encephalopathy and it causes lethality of nearly 100 %. Being a zoonosis with different animal species serving as a reservoir, its control requires measures aimed at reducing the virus in species of greatest epidemiological relevance. In the city of Rio de Janeiro, the rabies is under epidemiological control at its urban form, where dogs are the main source of infection. However, recently this disease has been found in domestic animals such as horses, cattle and pigs, transmitted by haematophagous bats, and non-haematophagous bats, which is pointing to the importance of the wild cycle of rabies and the need for a better understanding of the epidemiological profile of this disease. This paper reports the occurrence of 14 cases of rabies in animals in the city of Rio de Janeiro in 2011 and 2012. It highlights the importance of the haematophagous bat *Desmodus rotundus* in disease transmission, describing the viral spreading in the municipal territory and the potential reintroduction of rabies in the city from the wild environment, which pose new challenges to public health professionals who work in this area.

Keywords. rabies, wild cycle, *Desmodus rotundus*, Rio de Janeiro.

INTRODUÇÃO

A raiva é uma doença infecciosa de etiologia viral transmitida ao homem por mamíferos domésticos e silvestres caracterizada por sintomatologia nervosa resultante da ocorrência de encefalite aguda. Tais manifestações resultam da ação do vírus rábico, gênero *Lyssavirus*, família *Rhabdoviridae*, que tem como principal forma de penetração no organismo as soluções de continuidade, originadas através de mordeduras de animais infectados, multiplicando-se no ponto de inoculação onde segue para o sistema nervoso periférico e posteriormente o sistema nervoso central. A partir daí dissemina-se para vários órgãos e glândulas salivares, onde se replica, sendo eliminado pela saliva dos animais ou pessoas enfermas. Outros mecanismos de transmissão menos frequentes são as arranhaduras e lambeduras de mucosas¹. Reveste-se de importância pela gravidade de sua sintomatologia e letalidade, bem como pelos prejuízos econômicos e sociais relacionados a agricultura².

Diversas espécies de mamíferos estão envolvidas em todo o mundo, na manutenção e transmissão da raiva tanto em áreas urbanas quanto silvestres ou rurais. A predominância de um ou de outro ciclo está diretamente relacionada às espécies envolvidas e às condições socioeconômicas do país ou região. No ciclo urbano cães e gatos estão envolvidos, sendo o cão o principal transmissor. Este ciclo tem importância epidemiológica nos países em desenvolvimento. O ciclo silvestre ocorre dentro de um determinado ecossistema em variadas espécies de mamíferos, tais como lobos, raposas, coiotes, guaxinins e macacos, além de morcegos hematófagos e não hematófagos promovendo uma variação geográfica das espécies animais envolvidas. Países desenvolvidos conseguiram controlar o ciclo urbano da raiva e apresentam o ciclo silvestre da doença como maior entrave³.

No Brasil, principalmente em áreas rurais muitas espécies são suscetíveis, tais como bovinos, equinos e outros herbívoros, que são considerados hospedeiros terminais da doença e raramente a transmitem ao homem ou a outros animais, entretanto, suas mortes pela doença representam importantes perdas econômicas⁴.

O problema da raiva em morcegos não se restringe somente ao morcego hematófago. Várias espécies de morcegos podem ser infectadas em função de seus hábitos individuais e sociais dentro da colônia⁵. É amplamente registrada nos países em desenvolvimento

e desenvolvidos, e representa um problema emergente em saúde pública, pela expansão das áreas de ocorrência, incluindo áreas urbanas. Ocorre, principalmente, em países da América Latina, parte da África, Estados Unidos e em alguns países da Europa⁶. No Brasil, em um levantamento feito entre 1996 e 2009, foram registrados casos de raiva em 41 espécies de morcegos⁷.

A Organização Mundial de Saúde⁸ informa que, a cada ano, são notificados no mundo cerca de 55.000 óbitos causados pela raiva e mais de 15 milhões de pessoas necessitam de tratamento pós-exposição, onde a enfermidade se encontra presente no seu reservatório principal, o cão. A maioria das mortes ocorre particularmente em algumas partes da África e da Ásia, sendo a maioria das vítimas crianças que não são tratadas ou não recebem tratamento pós-exposição adequados. Estima-se que mais de 50 milhões de cães são vacinados anualmente contra a raiva em práticas privadas ou durante campanhas nacionais organizadas por governos através de ministérios da saúde ou da agricultura. Em muitas partes da Ásia e África a vacinação não atinge números suficientes para bloquear o ciclo da doença.

Por sua evolução letal, pelo elevado número de casos humanos e de pessoas submetidas a tratamento profilático antirrábico, continua representando um importante problema de saúde pública em todo o mundo. O tratamento pós-exposição, o diagnóstico, a vigilância epidemiológica, a imunização dos animais domésticos e silvestres e o controle das populações de animais domésticos, representam altos custos econômicos e sociais tanto para países em desenvolvimento, quanto para os desenvolvidos⁸.

Os morcegos hematófagos, são encontrados desde o norte do México até o norte da Argentina e em algumas ilhas do Caribe e em regiões com altitudes abaixo de 2.000 m. No mundo, apenas três espécies de morcegos possuem hábito da hematofagia: *Desmodus rotundus*, *Dyphilla ecaudata* e o *Diaemus youngi*. Dentre as espécies de morcegos hematófagos, o *D. rotundus* é o mais abundante nas Américas, e tem sido considerado o principal responsável pela transmissão da raiva aos herbívoros⁹.

Em áreas urbanas, as medidas de controle e prevenção são perfeitamente conhecidas e muito se evoluiu no desenvolvimento e aplicação dessas medidas no Brasil. Nas últimas décadas o país alcançou o controle da raiva urbana através do Programa Nacional de Profilaxia da Raiva, implantado pelo Ministério da Saúde.

Tabela 1. Distribuição temporal, por espécie e localidade dos casos confirmados de raiva no município do Rio de Janeiro nos anos de 2011 e 2012

Casos	Espécie animal	Local	Bairro / RA
Ano de 2011			
1	Morcego	Largo do Coelho	Barros Filho/25
1	Bovino	Estrada dos Bandeirantes	Vargem Grande/24
1	Equino	Estrada do Sinimbu	Paciência/19
1	Equino	Rua Passuaré	Paciência/19
1	Bovino	Estrada do Carapiá	Campo Grande/18
4	Bovino	Estrada do Cantagalo	Campo Grande/18
1	Equino	Estrada do Cantagalo	Campo Grande/18
1	Suíno	Estrada do Cantagalo	Campo Grande/18
Total			11
Ano de 2012			
2	Equino	Colonia Juliano Moreira	Jacarepaguá/16
1	Equino	Av. Emb. Abelardo Bueno	Jacarepaguá/16
Total			3

RA= Região Administrativa

Em 2012, foram atendidas 03 solicitações de casos suspeitos de raiva em equinos no bairro de Jacarepaguá, onde todos os casos foram submetidos a coleta de material e confirmação laboratorial.

A confirmação dos casos positivos gerou ações de investigação epidemiológica e de bloqueio de foco efetuadas pela UPDF, com encaminhamento para o tratamento profilático humano de todas as pessoas expostas ao risco de infecção, vacinação antirrábica perifocal de caninos, felinos, equinos e bovinos, totalizando 1420 animais vacinados, além de busca de colônias de morcegos hematófagos e seu controle com uso de produtos vampiricida além de ações de educação em saúde junto à população.

O único morcego positivo para raiva foi encontrado em uma residência, no bairro de Barros Filho, em local urbanizado. Este foi identificado como *Artibeus lituratus*, espécie de morcego frugívoro comum na cidade. As amostras para o diagnóstico laboratorial da raiva dos herbívoros foram coletadas no bairro de Campo Grande, Paciência e Jacarepaguá, em áreas com características rurais, onde existem criações de

bovinos e de equinos para a subsistência familiar. A maioria dos herbívoros positivos apresentava histórico de mordeduras ou cicatrizes causadas por morcegos hematófagos. Os animais não tinham acompanhamento médico veterinário e não eram vacinados contra raiva frequentemente.

O envolvimento de morcegos não hematófagos diagnosticados como positivos para a raiva não é raro. A primeira descrição de raiva confirmada em morcegos não-hematófagos foi feita em 1931. Desde então, na América Latina esta doença foi diagnosticada em mais de 50 espécies de morcegos não-hematófagos e, no Brasil, em cerca de 41 espécies⁷. Deus et. al¹¹ realizou em Campo Grande - MS, Brasil, no período de fevereiro a dezembro de 2001, um estudo com 526 morcegos não hematófagos. De todas as amostras examinadas, seis apresentaram positividade para o vírus da raiva (1,13 %), sendo três de morcegos frugívoros e três de insetívoros. No Município do Rio de Janeiro, entre os anos de 2001 e 2010, o laboratório da Unidade Jorge Vaitsman (UJV) recebeu 135 morcegos não hematófagos para o diagnóstico da raiva, onde 11 (8,14 %) resultaram positivos para a doença¹².

A importância crescente destes morcegos como fator de risco para a transmissão da raiva aos animais de companhia deve ser alvo de maiores estudos, pois na maioria das vezes estes animais, quando doentes, são encontrados em locais não habituais, como por exemplo, no chão virando alvo fácil para o contato com cães, gatos e até mesmo para as pessoas.

Os principais fatores que contribuem para que a raiva se dissemine de forma preocupante nos herbívoros domésticos são o aumento da oferta de alimento representado pelo significativo aumento do rebanho, modificações ambientais causadas por desmatamentos e ocupações desordenadas, e oferta de abrigos artificiais como túneis, cisternas, construções abandonadas e outros fatores encontrados com frequência também na cidade do Rio de Janeiro.

Os herbívoros são hospedeiros acidentais do vírus da raiva, apesar de participar da cadeia epidemiológica da raiva no ambiente rural, somente contribuem como sentinelas à existência do vírus. Sua participação neste processo restringe-se ao óbito do animal, não havendo envolvimento no processo natural de transmissão às outras espécies, salvo quando de forma acidental. Esta afirmação é devido ao fato de que a raiva nos herbívoros tem baixa ou nula probabilidade de transmissão a outros animais¹³. Foi observado, nos casos de raiva ocorridos no município do Rio de Janeiro que não houve transmissão a outros animais ou pessoas¹³.

A forma parálitica da doença comumente associada à transmissão por morcegos, está associada com lesões na medula espinhal, tronco encefálico e cerebelo¹⁴. Os animais observados neste estudo apresentaram os sinais clássicos da doença, como incoordenação, paresia dos membros pélvicos e torácicos, decúbito esternal evoluindo para lateral e morte¹⁴. A intensa salivação também foi evidenciada na maioria dos casos, comprovando a afirmação deste achado ser o mais constante¹⁵.

A raiva, embora muito relatada em bovinos e equinos, tem apresentado baixa frequência nos diagnósticos laboratoriais em suínos⁴. No ano de 2011, um suíno teve resultado laboratorial confirmado positivo na Estrada do Cantagalo no bairro de Campo Grande, área de características rurais com sítios e criações de animais de produção. Este fato raro, acrescentado às outras ocorrências em equinos e bovinos, pode sugerir a ação de uma colônia de morcegos hematófagos no local. Através de relatos de moradores e antigos criadores de animais,

a ocorrência de casos de raiva em animais de produção nunca havia sido verificada no local. Esta ocorrência de vários casos de raiva em equinos, além do suíno, coincidiu com o início das obras para a construção de um grande shopping no local, o que ocasionou mudanças ambientais importantes.

A cidade do Rio de Janeiro é uma cidade bastante arborizada, sendo comum a utilização de árvores de espécies frutíferas em seu paisagismo, possuindo em seu território significativa área de florestas e montanhas. Além disso, é comum em áreas urbanas que ainda possuem características rurais, a utilização de animais de produção para a subsistência familiar, como equinos, bovinos e suínos. Este conjunto de fatores propicia refúgio e alimentação aos animais silvestres, entre estes os morcegos hematófagos e não hematófagos, favorecendo o aumento das densidades populacionais destas espécies. O contato entre população humana e morcegos, principalmente o *Artibeus lituratus*, tem sido frequente nas áreas urbana e peri-urbana, e agressões a animais domésticos, como equinos, bovinos e inclusive cães, por morcegos hematófagos vem sendo notificadas, caracterizando a adaptação de diferentes espécies de morcegos às modificações ambientais.

CONCLUSÃO

Com a ocorrência de casos positivos de raiva em herbívoros e em morcegos não hematófagos, há o aumento da preocupação quanto à possibilidade de transmissão da raiva para humanos e espécies domésticas, como o cão e o gato, a partir do ambiente silvestre. A intensificação de medidas de vigilância epidemiológica da raiva em populações de herbívoros na cidade, através da implantação de um programa interdisciplinar e intersetorial, é determinante para a manutenção do controle da raiva na cidade do Rio de Janeiro e se apresenta como um novo desafio a ser enfrentado pelos profissionais de saúde pública que atuam no controle desta doença.

Para o aperfeiçoamento das ações de Vigilância Epidemiológica da Raiva e a atuação mais completa frente a este novo perfil epidemiológico da doença no município do Rio de Janeiro, este trabalho sugere:

1. Maior integração entre os serviços médico e médico veterinário, para que se avalie o risco de infecção rábica frente às condições epidemiológicas do local de origem do animal e as circunstâncias da agressão, auxiliando a decisão médica quanto a real necessidade

- do tratamento preventivo antirrábico; e a notificação imediata dos casos de agressões a humanos por animais silvestres, como morcegos ou saguis;
2. Maior integração com a Secretaria Estadual de Agricultura, principalmente no que se refere à divulgação entre criadores de animais de produção da ocorrência da doença e sobre a necessidade da vacinação antirrábica dos animais em áreas de risco de transmissão da raiva por morcegos hematófagos - Zona Oeste da cidade;
 3. Integração com Secretarias de Meio Ambiente para uma atuação conjunta na avaliação de fatores que favorecem o crescimento das populações de morcegos e de outros animais silvestres em área urbana, com implantação de programas para o conhecimento e monitoramento destas populações;
 4. Integração com Programa de Saúde da Família para uma atuação conjunta visando ampliar o conhecimento sobre a doença e formas de prevenção, principalmente em áreas com grande concentração de animais como cães e gatos mantidos sem a devida responsabilidade por seus proprietários, e de criação de animais de produção, principalmente na Zona Oeste da cidade. Além disso, ampliar o conhecimento para atuação rápida em casos de agressões por morcegos a animais ou pessoas.
2. Secretaria de Vigilância em Saúde (Ministério da Saúde – Brasil) Raiva Humana Transmitida por Morcegos no Estado do Maranhão: Boletim Eletrônico Epidemiológico. Brasília, 2005. Disponível em: [http://bvsm.sau.gov.br/bvs/periodicos/boletim_eletronico_epi_ano04_n06.pdf].
 3. Secretaria de Vigilância em Saúde (Ministério da Saúde – Brasil). Raiva. *In*: Guia de Vigilância Epidemiológica. Brasília: Ministério da Saúde; 2005. p.603-632.
 4. Secretaria de Defesa Agropecuária (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - Brasil). Controle da Raiva dos herbívoros: manual técnico 2009. Brasília: MAPA; 2009. 124 p.
 5. Schneider, MC. Estudo de avaliação sobre área de risco para a Raiva no Brasil [dissertação de mestrado]. Rio de Janeiro (RJ): Escola Nacional de Saúde Pública da Fundação Oswaldo Cruz; 1990.
 6. Belotto AJ. Situação da Raiva no Mundo e Perspectivas de Eliminação da Raiva Transmitida pelo Cão na América Latina. OPAS-Washington, D.C., EUA, 2009.
 7. Sodre, MM, da Gama, AR, de Almeida MF. Lista atualizada das espécies de morcegos positivas para Raiva no Brasil. *Rev Inst Med Trop São Paulo*.2010;52(2):75-81.
 8. World Health Organization - WHO. Animal Rabies. [acesso 2013 Mar 15]. Disponível em [http://www.who.int/rabies/human/en/].
 9. OPAN (Organizacion Panamericana de la Salud). Plan de Acción para la Consolidación de la Fase de Ataque Final para la Eliminación de la rabia em las Américas Hasta el Año 2000. Documento de Trabajo. Washington,DC.: 1992.
 10. Geografia do Rio de Janeiro. *In*: WIKIPÉDIA, a enciclopédia livre. Flórida: Wikimedia Foundation, 2014. [acesso em: 2014 apr 13] Disponível em: [http://pt.wikipedia.org/w/index.php?title=Geografia_do_Rio_de_Janeiro&oldid=38509327].
 11. Deus GT, Becer M, Navarro IT. Diagnosis of rabies in nonhematophagous bats in Campo Grande City, Mato Grosso do Sul Centro Oeste do Brazil: report cases. *Semin Cienc Agrarias*.2003;24(1):171-6.
 12. Cabral CC, Moraes CAN, Dias AVAB, Araújo MG, Moreira CM, Mattos GLM. Circulation of the rabies virus in non-hematophagous bats in the City of Rio de Janeiro, Brazil, during 2001-2010. *Rev Soc Bras Med Trop*.2012;45(2):180-3.
 13. Novais BAF, Zappa V. Raiva em Bovinos – Revisão de Literatura. *Rev Elet Med Vet*.2008;10(6):1-7.
 14. Fernandes CG, Riet-Correa F. Raiva, *In*: Riet-Correa, F, Schild, A.L., Lemos, R.A.A. & Borges, J.R.J. (Eds), Doenças de Ruminantes e Equídeos. Vol.1. 3rd ed. Pallotti, Santa Maria. 2007.
 15. Radostits OM, Gay CC, H Inchcliff KW. Clínica Veterinária. 9ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2002.

AGRADECIMENTO

Ao Dr. Fernando da Costa Ferreira, Diretor da Unidade de Vigilância e Fiscalização Sanitária Paulo Dacorso Filho pela autorização para a utilização dos dados da Unidade e apoio durante a elaboração deste trabalho.

REFERÊNCIAS

1. Acha PN, Szyfres B. Zoonosis y enfermedades transmissibles comunes al hombre y a los animales. Publicación Científica y Técnica No. 580. 3ª ed. Washington, DC: OPAS, 2001.

Zoological techniques parameters of *Proechimys guyannensis* (Rodentia, Echimydae) bred in captivity

Parâmetros zootécnicos de *Proechimys guyannensis* (Rodentia, Echimydae) criados em cativeiro

RIALA6/1597

Ana Paula MADUREIRA¹, Stela Rechinelli PASSOS², Daniela Regina RESENDE¹, Nazaré Fonseca de SOUZA³, Antonio-Carlos Guimarães de ALMEIDA¹, Marcos Santos ZANINI^{4*}

*Endereço para correspondência: ⁴Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Espírito Santo. Alto Universitário, s/n- P.O. Box 16, CEP -29.500-000, Alegre, ES, Brazil. Tel: +55 (28)3552-8916. E-mail: marcos.zanini@ufes.br

¹Departamento de Engenharia de Biosistemas da Universidade Federal de São João del-Rei, MG, Brasil

²Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil

³Departamento de Patologia e Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, PA, Brasil
Recebido: 30.10.2013 - Aceito para publicação: 15.03.2014

ABSTRACT

The rodents *Proechimys guyannensis* have led a great interest because they are considered as hosts to several pathogens causing zoological diseases. Therefore, it is important to know their biological and physiological parameters. The age at first cubs delivery and the average of birth interval per female were evaluated. The estimated age at puberty was 83 days. The number of pups born per delivery did not differ significantly when associated with the female mating age. However, an increase in the average mortality rate correlated with the increase in delivery number per female was detected. There is no statistical difference neither in the litter size in different seasons of the year, nor in the body weight between sexes for all ages. Differences were found in the daily water consumption and in the feed intake in animals with approximately 100 days of age, perhaps owing to the increased need for energy intake due to sexual activity or even because they had not reached adult weight yet. The parameters assessed in the present study are of relevance for maintaining this species in captivity as a laboratory animal.

Keywords. *Proechimys guyannensis*, rodents, spiny rat, reproductive performance, physiological parameters.

RESUMO

Roedores da espécie *Proechimys guyannensis* têm motivado grande interesse por serem frequentemente considerados como hospedeiros de diversos agentes patogênicos causadores de doenças. É importante estabelecer seus parâmetros biológicos e fisiológicos; neste contexto, foram avaliadas a idade ao primeiro parto e a média de intervalo de natalidade por fêmea. A idade à puberdade foi estimada em 83 dias. O número de filhotes nascidos por parto não diferiu significativamente com a idade das fêmeas ao acasalarem. Observou-se aumento da taxa média de mortalidade de acordo com o aumento do número de partos por fêmea. Não houve diferença estatística no tamanho da ninhada em diferentes estações do ano; tampouco houve diferença de peso entre os sexos. Foram detectadas diferenças no consumo diário de água e no consumo de ração em animais com menos e mais de 100 dias de idade, talvez em função de aumento da necessidade de consumo de energia pela atividade sexual ou mesmo por ainda não terem alcançado o peso corporal de adulto. Os parâmetros apresentados são relevantes para a futura manutenção desta espécie em cativeiro como animal de laboratório.

Palavras-chave. *Proechimys guyannensis*, refinamento, roedores, rato sóia, desempenho reprodutivo, parâmetros fisiológicos.

INTRODUCTION

Classically, the rodents of the genus *Proechimys* (Rodentia-Echimyidae) have a great diversity of species and wide geographical distribution in the Neotropics. These rodents have attracted great interest in the area of biology, and epidemiology of viral and tropical zoonotic diseases because they are often found as hosts to protozoa of the genus *Trypanosoma* and viruses¹⁻³. It is also known that they are reservoir hosts for *Leishmania*^{4,5}. In studies of epilepsy⁶⁻⁸, the *Proechimys* species were found to be resistant to this disease. There is a discussion about the karyotype of rodents of the specimen *Proechimys guyannensis* 2n=40 or 2n=46 (Ribeiro et al⁹, Silva et al¹⁰).

For experiments involving animals as mentioned above, it is necessary that their physiology is kept unchanged, with strict control of variation limits. This makes it important to know the values of different health, biological and physiological parameters used to measure homeostasis and modifications induced by pathological processes, as well as to evaluate the results obtained in the experimental procedures, which can be influenced by ambient conditions or infectious agents there by interfering with the sensitivity of the results.

It is known that the biological and physiological parameters may vary according to sex, and be influenced by age, diet, management and environment, among other factors.

This work was carried out to survey the reproductive performance and physiological parameters (water and feed consumption, body weight, onset of puberty, calving interval and gestation length) of the *P. guyannensis* species. The objective was to standardize this biological species for further study of their biology and behavior as host and/or reservoir and animal model of infectious diseases affecting humans; since no work specifically with this species has been published so far in the literature (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>).

The development of an animal model such as that proposed in this study can be considered as a measure of refinement. If the knowledge of the biology of the same is taken into account it may result in a decrease in the number of animals of other species used in some researches that die because of their high sensitivity and in which the *Proechimys* are not so sensitive.

MATERIAL AND METHODS

Animals

The animals were obtained from the municipality of Cachoeira do Arari in the state of Pará, latitude 01° 00' 36.00" S, longitude 048° 57' 36.00" W. Permission to use these animals for scientific purposes came from the Ministry of Environment through the Chico Mendes Institute for Biodiversity Conservation - ICMBio and Authorization System and Information on Biodiversity - SISBIO (Number:24065-1) as well as approval by the Ethics Committee of the Federal University of São João del Rei, MG, Brazil. They were kept in quarantine for a period of 90 days and not having any clinical symptoms, were therefore considered healthy. The specimens were identified, according to Silva et al¹⁰.

These animals from *P. guyannensis* species were used to establish a foundation colony at the Federal University of São João del Rei to survey performance biology and behavior parameters. All animals used in this article were considered genetically wild since they were taken directly from the Amazon forest. Since there was no way of knowing the age of the animals, they were mated and their offspring, male and female, were followed to record the information presented in this article. They remained in an experimental laboratory of which the microbiological status was conventional (microbiological status not specified).

They are not nervous animals but in the beginning they did jump or scramble away if given a chance, also their claws are very sharp and even with an experienced handler the tail may autotomize. As a result the daily working procedure was to handle the animals using a tube constructed from a transparent plastic bottle whose bottom was closed with transparent cellophane. This worked so well and produced so little stress in the animals that some of them even adapted sufficiently so that today they transfer from one cage to another without it being necessary to touch them.

Zootechnical control was performed with daily notes in individual performance records of dates of birth, weaning, mating, calving, number and sex of pups per litter in order to permit calculation of the onset of puberty, the interval among births, the duration of pregnancy, and periods of reproductive cycles. Unlike the conditions suggested by Weir¹¹, the test animals reproduced in monogamous pairs, because it was realized in the beginning that when

the male was with more than one female, some of the females delayed their delivery, probably for fear of losing their young.

Recordings were performed from August 2010 to August 2012.

Earlier, in August 2010, there were 5 pairs of adult wild-caught animals that in the beginning were randomly mated and at the end of the first year there were already a total of 20 pairs in reproduction with their records being kept for evaluation at a later date. Results were expressed as means with ranges of measurements performed on each of the 20 pairs and their offspring during these two years.

Unlike the conditions cited by Weir¹¹, the test animals were raised in special boxes (cages for rats produced from polypropylene and measuring 41 x 34 x 16 cm), with wood shavings. Each box contained a mating pair and their offspring or at most a group of four animals of the same sex when they were not mated. They were maintained in a controlled environment and each box was exchanged and cleaned at intervals of one week. This interval was determined because the animals kept their environment organized in the sense that their excreta was made on only one side of the box.

Throughout the experiment, animals were kept and monitored under standard laboratory conditions: light-dark cycle of 12 hours with fluorescent lighting c. 300 Lux at ceiling height from 06:00 h to 18:00 h, temperature regulated at 20 ± 2 °C, relative humidity 55 ± 15 % not regulated, 20 ± 5 air changes per hour.

The animals were kept on standard animal bedding (softwood), with access to food (laboratory animal diet for mice and rats Nuvital®, Nuvilab CR-1 Autoclavable, Colombo, Paraná, Brazil) and drinking water (mains water, untreated) *ad libitum*. Pups were separated from their parents at the age of 40 days and were housed with same sex littermates, with a maximum of four animals per box.

Daily food and water intake was recorded for each animal. The feed intake was estimated by the difference between feed and left overs in feeders during the experimental period. Individual feeders and feed pellets were used, being weighed on digital scales. Water intake was recorded daily, using individual drinkers volumetrically graduated. This experimental phase was performed using individual cages for the animals.

Measures to protect the microbiological status of

the animals were primary barriers (personal protective equipment) and secondary barriers (building closed, air conditioning, exhaust air) that were regarded as vital elements of microbiological containment measures. Therefore the animals were free from ecto and endoparasites (coprological analysis), and changing parameters of hemogram (leukocytes, neutrophils and eosinophils) (Kaminsky et al¹²).

There was no period of conditioning since the records were taken during husbandry conditions.

Statistical procedures

Descriptive statistics for the reproductive and productive variables were made.

The calving interval was evaluated by the Mann-Whitney test because this characteristic did not show a normal distribution for its sampling errors (D'Agostino K² test - $p < 0.05$). On the other hand, the age at first calving was evaluated by an unpaired "t test" because this characteristic did show a normal distribution for its sampling errors (D'Agostino K² test - $p > 0.05$).

The age of puberty was estimated according to a mathematical model. The mortality rate from birth to weaning in accordance with the birth order was evaluated by linear regression. Litter size was evaluated to check the reproductive potential of the captive animal model. These variables were evaluated using analysis of variance in the Kruskal-Wallis test followed by Dunn's *posthoc* pairwise comparison for further analysis, since these variables did not show normal distribution for their sampling errors (D'Agostino K² test - $p < 0.05$).

The weight of the animals, separated by sex, was evaluated by nonlinear regression.

Feed intake and water was evaluated according to the unpaired "t test" since the sample error showed not normal distribution (D'Agostino K² test - $p > 0.05$).

RESULTS AND DISCUSSION

The *P. guyannensis*, like the casiragua used in the study of Weir¹¹, resemble the laboratory rat at first sight (Figure 1a and b). However, the pelage is spiny, they have anagouti coloring from a yellowish-brown to red, the ears are prominent but small, the incisor teeth are slightly orange (Figure 1c); just like those of the casiragua. The eyes are large and it was observed that they stay protuberant when the animals are afraid. The naked, scaly tail readily autotomizes at the base or between the

5th and 6th caudal vertebrae and does not regenerate. When disturbed they release a moaning which rises like before an attack by another animal. These characteristics were also seen by Weir¹¹ as well as Silva et al¹⁰.

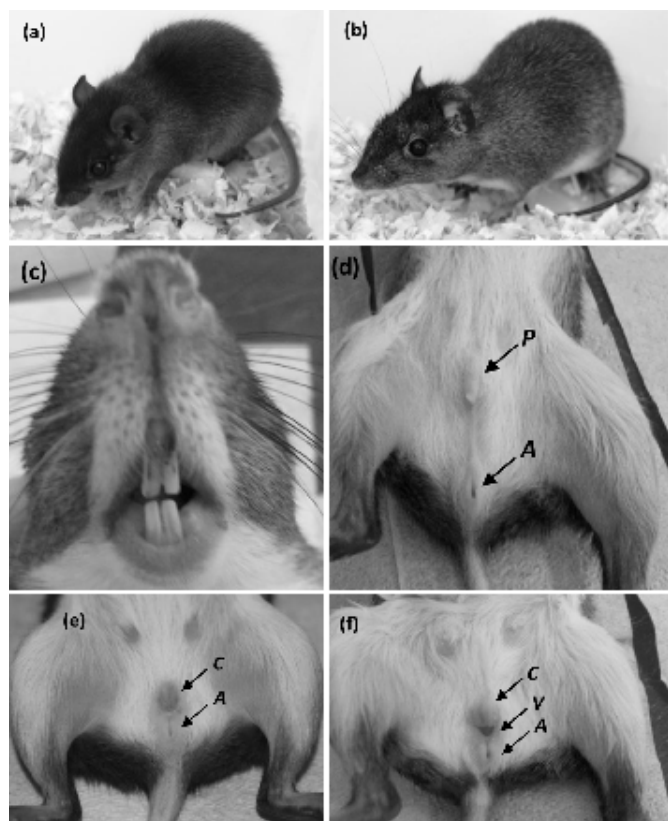


Figure 1. (a) female with approximately two month old, (b) adult female, (c) the teeth from adult *P. guyanensis*. The external genitalia of *Proechimys guyanensis*: (d) male; note the separation of the urinary system (P) and anal apertures (A); (e) female; during dioestrus and pregnancy there is no opening between the clitoris (C) and the anus (A); (f) Female; the vaginal membrane (V) is perforate at oestrus and parturition

Reproductive characteristics

The vaginal closure membrane and its features are found in other hystricomorphs so far examined, as related by Weir¹¹. Females of *P. guyanensis* have a vaginal closure membrane which is perforated only at oestrus and parturition as can be seen in Figure 1 (e and f) while the male has a greater distance between the urinary system and the anal region (Figure 1d).

Descriptive statistics (mean ± standard error) were conducted to evaluate the characteristics of age at first calving and calving interval for females mated at more (233.7 ± 22.63; 65.73 ± 2.88; respectively) or less (208.92 ± 20.19; 66.45 ± 3.85, respectively) than 70

days old and did not differ statistically by the unpaired t test and Mann-Whitney test, respectively. The calving interval was very close to that presented by Weir¹¹ of 62.6 days for the *Proechimys guairae*.

An estimate was made forage at puberty using the following formula:

$$PA = AFC_{min} - ABI_{min}$$

Where PA= puberty age; AFC_{min} = minimum age at first calving (131 days old); ABI_{min} = minimum average calving interval (48 days). By this formula a possible puberty age of 83 days was determined.

The average number of pups born (2.0, 3.0, 3.0, 3.0, 2.0, 3.0, 3.0, 3.5, 3.0, 4.0) per birth order (from 1 to 10, respectively) in a total of 102 calvings, did not differ significantly between birth orders (Kruskal-Wallis's anova followed by post hoc Dunn's test, $p > 0.05$) and this result was independent of whether the females were mated at more or less than 70 days old. However, as can be seen in Figure 2a, there is an increase in the average mortality rate with the increase of birth order. From these data it can be concluded that, despite there being no change in average number of pups born per birth, it is inappropriate to stay in a bioterium with animals above the 6th delivery since the pup mortality rate approaches 50 % above this birth order. Furthermore, Figure 2a shows a linear regression analysis where it can be observed that there is a moderate correlation between birth order and the average mortality rate from birth to weaning, with Spearman correlation coefficients, $r = 0.378$ and $p = 0.00009$, between the two variables.

As previously performed, a nonparametric analysis of variance (Kruskal-Wallis) followed by Dunn's posthoc pairwise comparison of the litter size according to season of calving was made, and it was found that in the captive state there is no significant difference in the litter size in each season although no trend in a greater number of births between the spring and summer was seen (Figure 2b).

Growth characteristics

Concerning the evaluation of growth, after applying the test of normality ($p > 0.05$) a non linear regression analysis was performed as shown in Figure 2c. Through regression analysis it can be estimated that at 83 days, puberty beginning, the females are around 143.79 g and the males 169.74 g.

As for growth evaluation (weight) no statistical difference between sexes for all ages was found (Figure 2c).

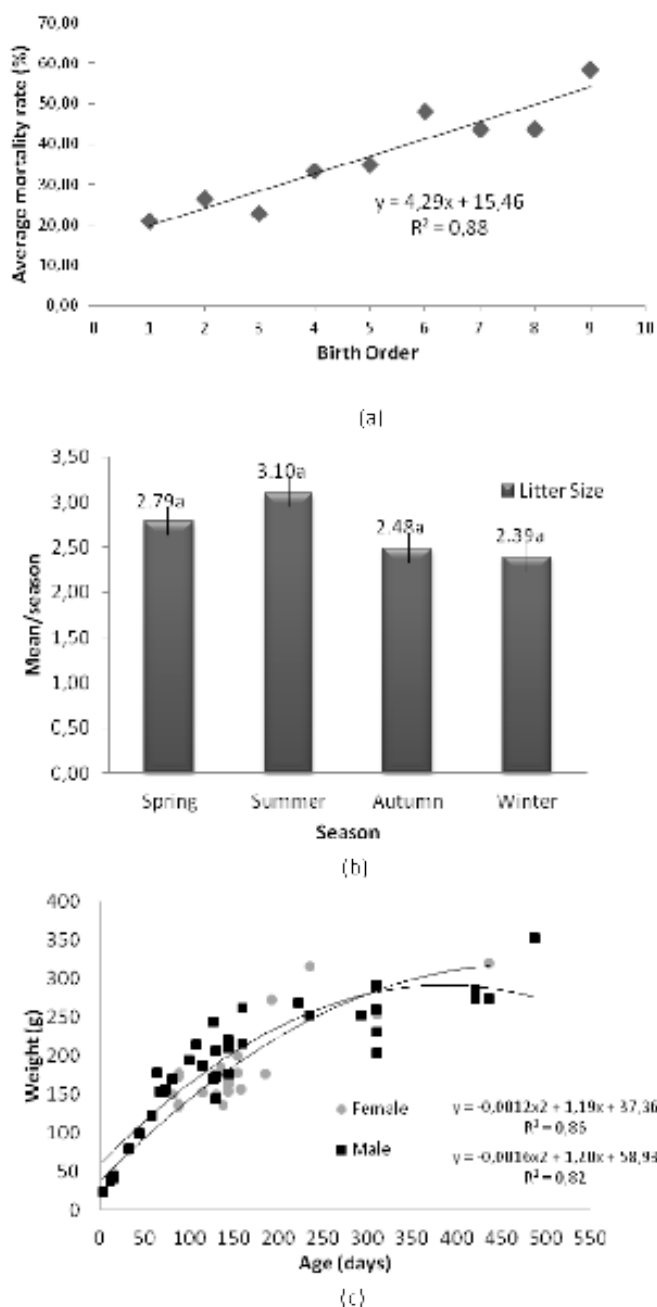


Figure 2. (a) Linear regression of average mortality rate, from birth to weaning, by birth order. (b) Litter size. Means that do share a common superscript letter do not differ significantly ($P > 0,05$) in the Kruskal-Wallis's anova and post hoc Dunn's test. (c) Nonlinear regression of weight by age of the specie *Proechimys guyannensis*

Eating habits

The evaluation of eating habits was made by water consumption and feed intake. The characteristics were tested by normality ($p > 0,05$) and a parametric

analysis of variance followed by an unpaired "t test". The average daily water consumption and feed intake from the animals showed a significant difference ($p = 0,0084$ and $p = 0,0037$, respectively) in consumption when animals with ($28,07 \pm 1,08^a$; $15,15 \pm 0,79^a$) and more ($33,98 \pm 1,43^b$; $19,03 \pm 0,81^b$) than 100 days age are compared by the unpaired t test, this is probably due to the need for increased fluid and energy intake due to growth and sexual activity.

Although the weights of the species *P. guyannensis* apparently are smaller than the *P. guairae*, species studied by Weir¹¹, they present the same pattern with respect to males presenting higher weights than females. In their article they found at 100 days of age, males (302 ± 7 g) were significantly ($p < 0,001$) heavier than females (237 ± 6 g).

Finally with the constant increase of human pressure on the natural environment, wild animals like *P. guyannensis* have adapted to anthropic activity, sharing space with man when searching for food and shelter. Thus, it is essential that the natural conditions of these species are known in terms of their physiological parameters and reproductive conditions, in order to promote a balance between these species and their environment.

CONCLUSION

There was great success in the breeding colony maintained in captivity with a good response in reproduction, growth and behavior aspects, with very low mortality rates in adult animals, showing that the animals were in healthy conditions for breeding in captivity.

Since there is little knowledge about this species, the parameters presented are relevant to future creations as a laboratory animal.

With the recorded data it was determined that the nursing period should not exceed 50 days, so there is no overlap of births and the mother can have a rest interval between one birth and the next.

Knowing the puberty age and the average number of pups per litter is of vital importance when planning the number of matings to meet the demands of the animals when being used for research purposes.

The information on weight and consumption of adult animals will be valid when planning future requirements for creation or use in research.

ACKNOWLEDGEMENTS

Rede Mineira de Bioterismo– FAPEMIG Fundação de Amparo à Pesquisa do Espírito Santo - FAPES. Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório - SBCAL. Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade– SISBIO

REFERENCES

1. Pinto CM, Ocaña-Mayorga S, Lascano MS, Grijalva MJ. Infection by trypanosomes in marsupials and rodents associated with human dwellings in Ecuador. *J Parasitol*.2006;92(6):1251-5.
2. Rosa ES, Mills JN, Padula PJ, Elkhoury MR, Ksiazek TG, Mendes WS, et al. Newly recognized hantaviruses associated with hantavirus pulmonary syndrome in northern Brazil: partial genetic characterization of viruses and serologic implication of likely reservoirs. *Vector Borne Zoon Dis*.2005;5(1):11-9.
3. Carrara AS, Gonzales G, Ferro C, Tamayo M, Aronson J, Paessler S, et al. Venezuelan equine encephalitis virus infection of spiny rats. *Emerg Infect Dis*.2005;11(5):663-9.
4. Dedet JP, Gay F, Chatenay G. Isolation of *Leishmania* species from wild mammals in French Guiana. *Trans R Soc Trop Med Hyg*.1989;83:613-5.
5. Lainson R, Ishikawa EA, Silveira FT. American visceral leishmaniasis: wild animal hosts. *Trans R Soc Trop Med Hyg*.2002;96:630-41.
6. Carvalho RA, Arida RM, Cavalheiro EA. Amygdala kindling in *Proechimys guyannensis* rat: an animal model of resistance to epilepsy. *Epilepsia*.2003;44:165-70.
7. Arida RM, Scorza FA, Carvalho RA, Cavalheiro EA. Long-term consequences of intra hippocampal kainate injection in the *Proechimys guyannensis* rodent. *Epilepsy Res*.2005;65:201-10.
8. Andrioli A, Fabene PF, Spreafico R, Cavalheiro EA, Bentivoglio M. Different patterns of neuronal activation and neurodegeneration in the thalamus and cortex of epilepsy-resistant *Proechimys* rats versus Wistar rats after pilocarpine-induced protracted seizures. *Epilepsia*.2009;50:832-48.
9. Ribeiro NAB, Soares MCP, Pieczarka JC, Nagamachi CY. Identification of a long-stading colony of *Proechimys* at Instituto Evandro Chagas, Pará, Brazil, based on cytogenetic information. *Rev Pan-Amaz Saúde*.2011;2(1): 59-66.
10. Silva CEF, Eler ES, Silva MNF, Feldberg E. Karyological analysis of *Proechimys cuvieri* and *Proechimys guyannensis* (Rodentia, Echimyidae) from central Amazon. *Genet Mol Biol*. 2012;35(1):88-94. <http://dx.doi.org/10.1590/S1415-47572012005000007>.
11. Weir BJ. Another hystricomorph rodent: keeping casiragua (*Proechimys guairae*) in captivity. *Lab Anim*.1973;7:125-34.
12. Kaminsky P, Deibener J, Lesesve JF, Humbert JC. Changes in hemogram parameters in infections. *Rev Med Int*.2002; 23(2): 132-6.

Detecção de anticorpos *anti-Toxoplasma gondii* em felinos domésticos

Detection of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in domestic felines

RIALA6/1598

Caroline Sobotyck de OLIVEIRA¹, Giovana CAMILLO¹, Gustavo Cauduro CADORE¹, Cássia BAGOLIN², Sonia Terezinha Lopes dos ANJOS², Luis Antônio SANGIONI¹, Fernanda Silveira Flores VOGEL¹

*Endereço para correspondência: ¹Departamento de Medicina Veterinária Preventiva (DMVP), Centro de Ciências Rurais (CCR), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Av. Roraima, 1000, Prédio 44, Sala 5149, Bairro Camobi, Santa Maria, RS, Brasil. CEP 97105-900. E-mail: carolsobotyck@gmail.com

²Laboratório de Análises Clínicas Veterinária (LACVet), Centro de Ciências Rurais (CCR), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM)

Recebido: 15.03.2013 - Aceito para publicação: 12.03.2014

RESUMO

A toxoplasmose é uma protozoonose que acomete uma variedade de animais de sangue quente e tem como agente etológico o protozoário *Toxoplasma gondii*, parasito intracelular obrigatório. Dentre a grande diversidade de animais susceptíveis, os felinos têm um importante papel na disseminação da infecção pelo *T. gondii*, pois são os únicos hospedeiros definitivos do parasito. Com o objetivo de verificar a ocorrência do *T. gondii* em gatos domésticos da microrregião de Santa Maria/RS, Brasil, foram coletadas 180 amostras de soros de felinos atendidos no Hospital Veterinário Universitário da UFSM. Estas amostras foram avaliadas no Laboratório de Doenças Parasitárias para detecção de anticorpos anti-*T. gondii* pela técnica de imunofluorescência indireta (IFI). Das 180 amostras analisadas, 39 (21,6 %) apresentaram anticorpos anti-*T. gondii* com títulos iguais ou superiores a 64. Os resultados demonstram a alta prevalência de felinos anticorpos positivos, o que sugere a participação destes animais na contaminação ambiental, indicando a importância destes na epidemiologia da doença.

Palavras-chave. toxoplasmose, técnica indireta de fluorescência para anticorpos, soroprevalência, gatos, infecção por protozoário.

ABSTRACT

Toxoplasmosis is a protozoiasis that affects a variety of warm-blooded animals and its etiologic agent is the protozoan *Toxoplasma gondii*, an obligatory intracellular parasite. Among the great diversity of susceptible animals, felines have an important role in the dissemination of *T. gondii* infection because they are the unique definitive hosts of this parasite. In order to verify the occurrence of *T. gondii* infection in domestic cats in micro-Santa Maria, RS-Brazil, 180 serum samples were collected from cats examined at the Veterinary Teaching Hospital - UFSM. These samples were tested in the Laboratory of Parasitic Diseases for detecting anti-*T. gondii* antibodies by indirect immunofluorescence assay (IIF). Of 180 samples, in 39 (21.6 %) were detected anti-*T. gondii* antibodies, reactive in titers equal or higher than 64. This study demonstrates the high prevalence of antibody-positive felines, suggesting the participation of these animals in environmental contamination, and indicates their importance in the epidemiology of the disease.

Keywords. toxoplasmosis, indirect fluorescent antibody technique, seroprevalence, cats, protozoan infection.

INTRODUÇÃO

Toxoplasma gondii é um protozoário de distribuição mundial e estudos têm demonstrado que quase um terço da população mundial tem sido exposta¹. Segundo o Ministério da Saúde, o número de óbitos no Brasil, devido a toxoplasmose, no período de 1996 a 2005, variou de 68 a 108 casos, registrando um índice de prevalência de 37 à 91 %. Este parasito tem a capacidade de infectar uma grande variedade de animais de sangue quente e, além disso, o homem. Dentre a grande diversidade de animais susceptíveis, os felinos têm um importante papel na distribuição da toxoplasmose, pois são os únicos hospedeiros definitivos do parasito e, portanto, os únicos que excretam oocistos capazes de resistir a fatores ambientais. O gato é considerado o principal reservatório do parasito, sendo capaz de liberar mais de 100 milhões de oocistos não esporulados, os quais sofrem o processo de esporulação no meio ambiente².

As principais vias de transmissão do *T. gondii* são: infecção transplacentária (taquizoítos circulantes), sendo mais freqüente no terço final da gestação, ingestão de água, ou alimentos contaminados com oocistos, oriundos das fezes do gato e, ainda, ingestão de cistos teciduais em carnes cruas e/ou mal cozidas³. Em animais domésticos, a ingestão de oocistos esporulados é a mais importante via de infecção. Apesar da toxoplasmose ser, geralmente, clinicamente assintomática, uma infecção primária durante a gestação, em mulheres e animais, pode causar aborto, anomalias fetais ou morte perinatal¹.

A sorologia é um método prático para determinar a infecção pelo *T. gondii*, pois não necessita que o agente seja isolado do animal, contudo, possui algumas limitações, como falha na detecção de imunoglobulinas G e M durante a fase aguda, já que estas imunoglobulinas não serão produzidas antes de algumas semanas de parasitemia⁴. O presente estudo teve como objetivo determinar a frequência de detecção de anticorpos contra o protozoário *T. gondii* em felinos atendidos no Hospital Veterinário Universitário (HVU) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), na cidade de Santa Maria, Estado do Rio Grande do Sul (RS), por meio da técnica de imunofluorescência indireta.

MATERIAL E MÉTODOS

Um total de 180 amostras de soro de felinos

atendidos no HVU da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) foram fornecidas pelo Laboratório de Análises Clínicas Veterinária (LACVET) para o Laboratório de Doenças Parasitárias (LADOPAR) da UFSM. Todas as amostras foram submetidas à reação de imunofluorescência indireta (RIFI), no período de 03 a 26 de maio de 2011. A RIFI foi realizada em lâminas de microscopia contendo taquizoítos da cepa RH de *T. gondii*.

Para preparação do antígeno, taquizoítos de *T. gondii* da cepa RH foram cultivados em células VERO em meio RPMI, mantidas à 37 °C com 5 % de CO₂. O meio de cultivo contendo os taquizoítos foi lavado três vezes com tampão fosfato (PBS – 0,3M e pH 7,4) por meio de centrifugação repetida à 15000 rpm, por 10 min. Após a contagem de taquizoítos empregando câmara de Neubauer, quantificou-se um total de 1,5 x 10⁹ taquizoítos e fixou-se antígenos de *T. gondii* da cepa RH em lâminas de imunofluorescência.

Para a realização da RIFI, as amostras de soro sanguíneo foram diluídas em PBS (0,3M e pH 7,2), sendo utilizadas como anticorpo primário, em uma diluição de 1:64. Posteriormente foram incubadas por 30 min, a 37 °C, em câmara úmida. Como anticorpo secundário para pesquisa de IgG foi utilizado anti-cat IgG^{ca} conjugada com fluoresceína na diluição de 1:200 (incubação por 30 min, a 37 °C, em câmara úmida). Amostras de soro sanguíneo de gatos, sabidamente positivas ou negativas, foram utilizadas como controle em cada lâmina. As lâminas foram analisadas em microscópio com emissão de luz ultravioleta.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 180 amostras analisadas, observou-se 39 (21,6 %) animais positivos com títulos iguais ou maiores a 64. Tais resultados assemelham-se aos encontrados por Langoni et al⁵, que descrevem prevalência de 27 % de *T. gondii* na população felina dos Estados de São Paulo e Paraná, utilizando a técnica de imunofluorescência, com diluição de 1:16. Pinto et al⁶, utilizando a mesma técnica, determinaram a prevalência de 37,9 % de *T. gondii* em gatos atendidos em clínicas particulares da cidade de Porto Alegre, no entanto estes mesmos autores, utilizando a técnica de hemaglutinação indireta, descreveram, na mesma população felina, uma soropositividade de 25,2 %, a qual assemelha-se aos resultados do atual trabalho. Os autores atribuem a alta soropositividade desses felinos

ao ambiente contaminado, evidenciando a importância do mesmo na epidemiologia do *T. gondii*. Araujo et al⁷, empregando a técnica de hemaglutinação indireta, detectaram positividade de 37 % para *T. gondii* em gatos atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal do Rio Grande do Sul em Porto Alegre. Já Dubey et al⁸, determinaram uma soroprevalência de 84,4 % na população felina do Estado do Paraná, utilizando a técnica de aglutinação modificada, demonstrando assim a alta concentração de oocistos no ambiente, o que destaca a importância desta protozoonose. Garcia et al⁹ avaliaram a soroprevalência da Toxoplasmose em diversos animais no município de Jaguapitã, detectando uma alta prevalência em humanos, caninos e felinos domésticos, bem como uma correlação positiva e significativa entre essas espécies, demonstrando assim a importância dos mesmos na epidemiologia deste protozoário. Essa significativa correlação sorológica entre felinos e humanos se dá através da presença desses animais, não pelo contato direto, mas pela contaminação ambiental devido à eliminação de milhões de oocistos⁹.

CONCLUSÃO

A alta prevalência de títulos de anticorpos para *T. gondii* na população felina de Santa Maria, comparado com os demais estudos, demonstra a importância dessa espécie na epidemiologia da doença e a sua contribuição para a disseminação da toxoplasmose na região, revelando contaminação ambiental e, conseqüentemente, exposição do homem e de outros animais ao agente.

FONTES DE AQUISIÇÃO

^aAnti-IgG[®] felina conjugada à fluoresceína (FITC):

Affinity Purified Antibody Fluorescein.

Sigma Chemical Co, St. Louis, Missouri – USA.

REFERÊNCIAS

1. Tenter AM, Heckerroth AR, Weiss LM. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int J Parasitol*.2000;30(2):217-20. Disponível em: [<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0020751900001247>].
2. Dubey JP, Rollor EA, Smith K, Kwok OCH, Thulliez P. Low seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in feral pigs from a remote island lacking cats. *J Parasitol*. 1997;83(5):839-41. Disponível em [<http://www.jstor.org/stable/3284277>].
3. Frenkel JK. Toxoplasmosis: parasite, life cycle, pathology and immunology. In: Hammond DM, Long PL. The Coccidia: Eimeria, Isospora, Toxoplasma and related genera. Baltimore: University Park Press; 1973.p.343-410.
4. Lin MH, Chen TC, Kuo TT, Tseng CC, Tseng CP. Real-Time PCR for Quantitative Detection of *Toxoplasma gondii*. *J Clin Microbiol*.2000;38(11):4121-5. Disponível em: [<http://jcm.asm.org/content/38/11/4121.full>].
5. Langoni H, Silva AV, Cabral KG, Cunha ELP, Cutolo AA. Prevalência de toxoplasmose em gatos dos Estados de São Paulo e Paraná. *Br J Vet Res Anim Sci*.2001;38(5):243-4 Disponível em: [<http://www.scielo.br/pdf/bjvras/v38n5/9715.pdf>].
6. Pinto LD, Araujo FAP, Stobb NS, Marques SMT. Soroepidemiologia de *Toxoplasma gondii* em gatos domiciliados atendidos em clínicas particulares de Porto Alegre, RS, Brasil. *Cienc Rural*.2009;39(8):2464-9. Disponível em: [<http://www.scielo.br/pdf/cr/v39n8/a313cr1636.pdf>].
7. Araujo FAP, Silva NRS, Olicheski AT, Beck C, Rodrigues RJD, Fialho CG. Anticorpos para *Toxoplasma gondii* em soro de gatos internados no hospital de Clínicas Veterinárias da UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil, detectados através da técnica de hemaglutinação indireta. *Act Sci Vet*.2003;31(2):89-92. Disponível em: [<http://hdl.handle.net/10183/19811>].
8. Dubey JP, Navarro IT, Sreekumar C, Dahl E, Freire RL, Kawabata HH, et al. *Toxoplasma gondii* infections in cats from Paraná, Brazil: Seroprevalence, tissue distribution, and biologic and genetic characterization of isolates. *J Parasitol*. 2004;90(4):721-26. Disponível em: [<http://www.journalofparasitology.org/doi/pdf/10.1645/GE-382R>].
9. Garcia JL, Navarro IT, Ogawa L, Oliveira RC. Soroepidemiologia da toxoplasmose em gatos e cães de propriedades rurais do município de Jaguapitã, estado do Paraná, Brasil. *Cienc Rural*.1999;29(1):99-104. Disponível em [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84781999000100018&lng=pt&nrm=iso].

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

A Revista do Instituto Adolfo Lutz (RIAL), iniciada em 1941, é uma publicação trimestral com a missão de divulgar resultados de investigações científicas relacionadas às ações de promoção à saúde, prevenção e controle de agravos e doenças de interesse em saúde pública, além de incentivar a produção de artigos científicos nas áreas de vigilância epidemiológica e sanitária e de proporcionar a atualização e aprimoramento de profissionais da área em âmbito nacional e internacional.

A RIAL é inter e multidisciplinar, arbitrada, aberta a contribuições de autores nacionais e estrangeiros. Publica prioritariamente pesquisas originais com contribuições relevantes na área laboratorial em saúde pública, realizadas com rigor científico e que possam ser replicadas e generalizadas.

POLÍTICA EDITORIAL

Editada nos formatos impresso e eletrônico, a RIAL tem interesse por trabalhos originais em todas as áreas laboratoriais em saúde pública. São também publicadas outras contribuições inéditas, desde que sobre temas atuais e importantes – revisões de literatura, comunicações breves e notas científicas – além de resumos de teses e dissertações.

Os manuscritos devem destinar-se exclusivamente à RIAL, não sendo permitida sua apresentação simultânea a outro periódico. As contribuições podem ser apresentadas em português ou inglês.

Os manuscritos submetidos são analisados inicialmente pelos editores quanto ao atendimento aos padrões da RIAL e às normas para o envio dos originais. Aqueles manuscritos selecionados são encaminhados para avaliação por pares externos de área pertinente, sempre de instituições distintas àquela da origem do manuscrito, sendo garantido o anonimato e a confidencialidade durante todo o processo de avaliação. Após receber os pareceres, o Corpo Editorial, que detém a decisão final sobre a publicação ou não do texto, avalia a aceitação do texto sem modificações, a recusa ou a devolução ao autor com as sugestões apontadas pelos relatores. Os manuscritos submetidos devem atender à política editorial da RIAL e às Instruções aos Autores, que seguem os *Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals: Writing and Editing for Biomedical Publication* (<http://www.icmje.org>), além dos critérios éticos da pesquisa humana e animal.

Os autores devem explicitar em MÉTODOS que a pesquisa foi conduzida dentro dos padrões exigidos pela Resolução 466 de 12 de dezembro de 2012 do Ministério da Saúde – Conselho Nacional da Saúde, em caso de ética humana, e pela Lei Federal 11.794 de 08 de outubro de 2008, pela Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos - DBCA de 2013 e pelas Resoluções Normativas N° 12, N° 13 e N° 14 no caso de experimentação animal. A pesquisa deverá ser aprovada por comissão de ética humana (CEP) reconhecida pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) – vinculada ao Conselho Nacional de Saúde (CNS), bem como registro dos estudos de ensaios clínicos em base de dados, conforme recomendação aos editores da Lilacs e Scielo, disponíveis em: <http://bvsmodelo.bvsalud.org/site/lilacs/homepage.htm>. No caso de experimentação animal o projeto deverá ser aprovado por Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) reconhecida pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal do Ministério de Ciência e Tecnologia e Inovação (CONCEA). O nome da base de dados, sigla e/ou número do ensaio clínico, assim como o número do processo e o nome da comissão de ética que aprovou o projeto, deverão ser colocados ao final do RESUMO. Nos casos de ensaios envolvendo animais, estes deverão atender a Lei Federal 9605 contra crimes ambientais, a Lei federal 6638/76 e a Lei 11.794/08, que normatiza a utilização de animais em pesquisa científica. Os autores deverão ter em seu poder todos os documentos referentes a este procedimento, que poderão ser solicitados em qualquer momento pelos editores.

Os autores serão responsáveis por reconhecer e revelar conflitos financeiros, de interesse comercial e/ou associativo, relacionados ao material de trabalho ou outros que possam influenciá-los, apresentando uma declaração sobre a existência ou não de tais conflitos. Os relatores também devem revelar aos editores qualquer conflito que possa influir ou impedir as suas avaliações.

Os manuscritos publicados são de propriedade da RIAL. A transferência de direitos autorais será solicitada após a aprovação do manuscrito para publicação.

Informações Gerais

Os manuscritos submetidos à publicação na RIAL devem ser apresentados de acordo com as Instruções aos Autores.

São aceitos manuscritos nos idiomas: português e inglês.

O manuscrito deve ser encaminhado em formato eletrônico (e-mail) ou impresso, aos cuidados do editor-chefe da RIAL, no seguinte endereço:

REVISTA DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ (RIAL)

Núcleo de Acervo

Av. Dr. Arnaldo, 355 - Cerqueira César - São Paulo - SP - Brasil - CEP: 01246-902

Ou por meio eletrônico em rial@saude.sp.gov.br

Pormenores sobre os itens exigidos para apresentação do manuscrito estão descritos a seguir.

1. CATEGORIA DE ARTIGOS

1.1 Artigos Originais: Incluem estudos relacionados à prevenção e controle de agravos e à promoção à saúde. Devem ser baseados em novos dados ou perspectivas relevantes para saúde pública. Cada artigo deve conter objetivos e hipóteses claras, desenho e métodos utilizados, resultados, discussão e conclusões.

Informações Complementares:

- Devem ter até 20 laudas impressas, excluindo resumos, tabelas, figuras e referências.
- As tabelas, figuras, gráficos e fotos, limitadas a 05 no conjunto, devem incluir apenas os dados imprescindíveis. As figuras não devem repetir dados já descritos em tabelas. Devem ser apresentadas em arquivo separado.
- As referências bibliográficas, limitadas a 40, devem incluir apenas aquelas estritamente pertinentes e relevantes à problemática abordada. Deve-se evitar a inclusão de número excessivo de referências numa mesma citação. Citações de documentos não publicados e não indexados na literatura científica (teses, relatórios e outros) devem ser evitadas.
- Os resumos em português e em inglês (*abstract*) devem ter até 200 palavras, com a indicação de 3 a 6 palavras-chave (*keywords*).
- A estrutura dos artigos originais de pesquisa é a convencional: Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão e Conclusão, embora outros formatos possam ser aceitos, mas respeitando a lógica da estrutura de artigos científicos.

1.2 ARTIGOS DE REVISÃO: Dedicados à apresentação e à discussão de temas de interesse científico e de relevância para a saúde pública. Devem apresentar formulação clara de um objeto científico de interesse, argumentação lógica, crítica teórico-metodológica dos trabalhos consultados e síntese conclusiva. Devem ser elaborados por pesquisadores com experiência no campo em questão ou por especialistas de reconhecido saber.

Informações complementares:

- Devem ter até 25 laudas impressas, excluindo resumos, tabelas, figuras e referências.
- As tabelas, figuras, gráficos e fotos, limitadas a 03 no conjunto, devem incluir apenas os dados imprescindíveis. As figuras não devem repetir dados já descritos em tabelas. Devem ser apresentadas em arquivo separado.
- As referências bibliográficas, limitadas a 50, devem incluir apenas aquelas estritamente pertinentes e relevantes à problemática abordada. Deve-se evitar a inclusão de número excessivo de referências numa mesma citação. Citações de documentos não publicados e não indexados na literatura científica (teses, relatórios e outros) devem ser evitadas.
- Os resumos em português e em inglês (*abstract*) devem ter até 200 palavras, com a indicação de 3 a 6 palavras-chave (*keywords*).

1.3 COMUNICAÇÕES BREVES: São relatos sucintos destinados à rápida divulgação de eventos significativos no campo da pesquisa de interesse em saúde pública e que não comportam uma análise mais abrangente.

Informações complementares:

- Devem ter até 10 laudas impressas, excluindo resumos, tabelas, figuras e referências.
- As tabelas, figuras, gráficos e fotos, limitadas a 02 no conjunto, devem incluir apenas os dados imprescindíveis. As figuras não devem repetir dados já descritos em tabelas. Devem ser apresentadas em arquivo separado.
- As referências bibliográficas, limitadas a 15, devem incluir apenas aquelas estritamente pertinentes e relevantes à problemática abordada. Deve-se evitar a inclusão de número excessivo de referências numa mesma citação. Citações de documentos não publicados e não indexados na literatura científica (teses, relatórios e outros) devem ser evitadas.
- Os resumos em português e em inglês (*abstract*) devem ter até 200 palavras e devem ter entre 3 a 6 palavras-chave (*keywords*).
- Sua apresentação deve acompanhar as mesmas normas exigidas para artigos originais.

1.4 NOTAS CIENTÍFICAS: São relatos sucintos destinados à rápida divulgação de eventos relevantes de uma pesquisa experimental que justifique a publicação de resultados parciais.

Informações complementares:

- Devem ter até 06 laudas impressas, excluindo resumos, tabelas, figuras e referências.
- As tabelas, figuras, gráficos e fotos, limitadas a 02 no conjunto, devem incluir apenas os dados imprescindíveis. As figuras não devem repetir dados já descritos em tabelas. Devem ser apresentadas em arquivo separado.
- As referências bibliográficas, limitadas a 10, devem incluir apenas aquelas estritamente pertinentes e relevantes à problemática abordada. Deve-se evitar a inclusão de número excessivo de referências numa mesma citação. Citações de documentos não publicados e não indexados na literatura científica (teses, relatórios e outros) devem ser evitadas.
- Os resumos em português e em inglês (*abstract*) devem ter até 200 palavras e devem ter entre 3 a 6 palavras-chave (*keywords*).
- Sua apresentação deve acompanhar as mesmas normas exigidas para artigos originais, porém na forma de texto único.

1.5 RELATOS DE CASO: São textos que contemplam principalmente a área médica, em que o resultado é anterior ao interesse de sua divulgação ou a ocorrência dos resultados não é planejada.

Informações complementares:

- Devem ter até 03 laudas impressas, excluindo resumos, tabelas, figuras e referências.
- As tabelas, figuras, gráficos e fotos, limitadas a 02 no conjunto, devem incluir apenas os dados imprescindíveis. As figuras não devem repetir dados já descritos em tabelas. Devem ser apresentadas em arquivo separado.
- As referências bibliográficas, limitadas a 10, devem incluir apenas aquelas estritamente pertinentes e relevantes à problemática abordada. Deve-se evitar a inclusão de número excessivo de referências numa mesma citação. Citações de documentos não publicados e não indexados na literatura científica (teses, relatórios e outros) devem ser evitadas.
- Os resumos em português e em inglês (*abstract*) devem ter até 200 palavras e devem ter entre 3 a 6 palavras-chave (*keywords*).
- Devem apresentar Introdução, Relato de caso, Discussão e Conclusão, na forma de texto único.

1.6 RESUMOS DE TESES E DISSERTAÇÕES: São aceitos resumos de teses e dissertações até um ano após a defesa.

Informações complementares:

- Devem ter até 400 palavras e devem ter entre 3 a 6 palavras-chave (*keywords*).
- Sua apresentação deve conter o nome do autor e do orientador, título do trabalho em português e em inglês, nome da instituição em que foi apresentado, área de concentração e ano da defesa.

2. APRESENTAÇÃO DO MANUSCRITO: Os textos devem ser redigidos em processador de texto Word for Windows 2003 ou compatível, no formato A4, espaço duplo, fonte Times New Roman, tamanho 12. Devem ser evitados arquivos compactados. A estrutura do manuscrito deve estar em conformidade com as normas do Sistema Vancouver – Título; Autores e Instituições; Resumo e *Abstract*; Introdução; Material e Métodos; Resultados; Discussão; Conclusão; Agradecimentos; Referências; Tabelas; Figuras e Fotografias.

2.1 PÁGINA DE IDENTIFICAÇÃO: Deve constar:

Título em português e em inglês: O título deve ser conciso, completo e conter informações. Se o manuscrito for submetido em inglês, deve ser fornecido um título em português.

Autores: De acordo com o *International Committee of Medical Journal Editors* (ICMJE), são considerados autores aqueles que contribuíram substancialmente para a concepção e planejamento, ou análise e interpretação dos dados; contribuíram significativamente na elaboração do rascunho ou na revisão crítica do conteúdo e participaram da aprovação da versão final do mesmo. Somente a aquisição de financiamento, a coleta de dados ou supervisão geral de grupos de pesquisa não justificam autoria – maiores esclarecimentos sobre autoria podem ser encontrados na página do ICMJE (<http://www.icjme.org>). Deve constar o nome completo, sem abreviações e com último sobrenome em caixa alta (exemplo: Ana Maria Camargo da SILVA) e o e-mail do autor responsável. O autor responsável para troca de correspondência deve estar assinalado com asterisco (*) e apresentar também o endereço completo.

Afiliação: Deve ser indicada a instituição à qual cada autor está afiliado, na seguinte ordem de hierarquias institucionais de afiliação: laboratório, setor, seção, serviço, divisão, departamento, instituto, faculdade e universidade.

Financiamento da pesquisa: Se a pesquisa foi subvencionada, indicar o tipo de auxílio, o nome da agência financiadora e o respectivo número do processo.

Apresentação prévia: Quando baseado em tese ou dissertação, indicar o nome do autor, título, ano, nome do programa de pós-graduação e instituição onde foi apresentada. Quando apresentado em evento científico, indicar o nome do evento, local e ano da realização.

2.2 PREPARO DO MANUSCRITO:

Resumo/Abstract: Todos os textos deverão ter resumos em português e inglês, dimensionados para ter até 200 palavras. Como regra geral, o resumo deve incluir objetivos do estudo, principais procedimentos metodológicos, principais resultados e conclusões.

Palavras-chave/keywords: Devem ser indicados entre 3 a 6 descritores do conteúdo, extraídos do vocabulário Descritores em Ciências da Saúde (DeCS) da Bireme (disponível em <http://www.bireme.br>) nos idiomas português e inglês. Em inglês, com base no Medical Subject Headings (MeSH).

Caso não sejam encontrados descritores adequados para a temática do manuscrito, poderão ser indicados termos não existentes nos conjuntos citados.

Estrutura do texto:

A) Introdução: Deve ser breve, relatando o contexto e a justificativa do estudo, apoiados em referências pertinentes ao objetivo do manuscrito, sintetizando a importância e destacando as lacunas do conhecimento abordadas. Não deve incluir dados ou conclusões do estudo em referência

B) Material e Métodos: Os procedimentos adotados devem ser descritos claramente, bem como as variáveis analisadas, com a respectiva definição, quando necessária, e a hipótese a ser testada. Devem ser descritas a população e a amostra, instrumentos de medida, com a apresentação, se possível, de medidas de validade e conter informações sobre a coleta e processamento de dados. Deve ser incluída a devida referência para os métodos e técnicas empregados, inclusive os métodos estatísticos; métodos novos ou substancialmente modificados devem ser descritos, justificando as razões para seu uso e mencionando suas limitações.

Os critérios éticos da pesquisa devem ser respeitados; os autores devem explicitar que a pesquisa foi conduzida dentro de padrões éticos e foi aprovada por comitê de ética, indicando o nome do comitê de ética, número e data do registro.

C) Resultados: Devem ser apresentados em uma sequência lógica, iniciando-se com a descrição dos dados mais importantes. Tabelas e figuras devem ser restritas àquelas necessárias para argumentação e a descrição dos dados no texto deve ser restrita aos mais importantes. Os gráficos devem ser utilizados para destacar os resultados mais relevantes e resumir relações complexas. Dados em gráficos e tabelas não devem ser duplicados nem repetidos no texto. Os resultados numéricos devem especificar os métodos estatísticos utilizados na análise.

D) Discussão: A partir dos dados obtidos e resultados alcançados, os novos e importantes aspectos observados devem ser interpretados à luz da literatura científica e das teorias existentes no campo. Argumentos e provas baseadas em comunicação de caráter pessoal ou divulgadas em documentos restritos não podem servir de apoio às argumentações do autor. Tanto as limitações do trabalho quanto suas implicações para futuras pesquisas devem ser esclarecidas. Incluir somente hipóteses e generalizações baseadas nos dados do trabalho. As conclusões podem finalizar esta parte, retomando o objetivo do trabalho ou serem apresentadas em item separado.

E) Agradecimentos: Este item é opcional e pode ser utilizado para mencionar os nomes de pessoas que, embora não preencham os requisitos de autoria, prestaram colaboração ao trabalho. Será preciso explicitar o motivo do agradecimento, por exemplo, consultoria científica, revisão crítica do manuscrito, coleta de dados etc. Deve haver permissão expressa dos nomeados e o autor responsável deve anexar a Declaração de Responsabilidade pelos Agradecimentos. Também pode constar desta parte apoio logístico de instituições.

2.3 CITAÇÃO NO TEXTO: A exatidão das referências é de responsabilidade dos autores. Devem ser indicadas pelo seu número na listagem, na forma de expoente, sem uso de parênteses, colchetes e similares. Nos casos em que há citação do nome do autor, o número da referência deve ser colocado a seguir do nome do autor. Trabalhos com dois autores devem fazer referência aos dois autores ligados por “e”. Nos outros casos apresentar apenas o primeiro autor (seguido de et al, em caso de autoria múltipla).

Exemplos: Nos Estados Unidos e Canadá, a obrigatoriedade da declaração dos nutrientes no rótulo do alimento é mais antiga e foram desenvolvidos métodos hidrolíticos, como o AOAC 996.061, de extração e determinação da GT por cálculo a partir dos AG obtidos por cromatografia gasosa com detector de ionização em chama (GC/DIC)2,3.

Segundo Chang et al³¹, o aumento do tamanho das partículas resulta numa redução da área de superfície conferindo uma melhora na retenção e estabilidade das mesmas.

2.4 REFERÊNCIAS: Listadas ao final do texto, devem respeitar a quantidade definida para cada categoria de artigos aceitos pela RIAL. As referências devem ser normalizadas de acordo com o estilo *Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals: Writing and Editing for Biomedical Publication*, numeradas consecutivamente na ordem em que foram mencionadas a primeira vez no texto.

Os títulos de periódicos devem ser referidos de forma abreviada, de acordo com o *Medline*, disponível no endereço <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=journals>. Para consultar periódicos nacionais e latino-americanos: <http://portal.revistas.bvs.br/main.php?home=true&lang=pt>.

No caso de publicações com até seis autores, citam-se todos; acima de seis, citam-se os seis primeiros, seguidos da expressão latina “et al”. Referências de um mesmo autor devem ser organizadas em ordem cronológica crescente.

Exemplos:

Artigos de periódicos:

Aued-Pimentel S, Zenebon O. Lipídios totais e ácidos graxos na informação nutricional do rótulo dos alimentos embalados: aspectos sobre legislação e quantificação. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2009;68(2):121-6.

Weihrauch JL, Posati LP, Anderson BA, Exler J. Lipid conversion factors for calculating fatty acids contents of foods. *J Am Oil Chem Soc*. 1977;54:36-40.

Hennington EA. Acolhimento como prática interdisciplinar num programa de extensão. *Cad Saude Coletiva [Internet]*. 2005;21(1):256-65. Disponível em: [\[http://www.scielo.br/pdf/csp/v21n1/28.pdf\]](http://www.scielo.br/pdf/csp/v21n1/28.pdf).

LIVROS:

Ringsven MK, Bond D. Gerontology and leadership skills for nurses. 2ª ed. Albany (NY):Delmar Publishers;1996.
 Lopez D, organizador. Estudos epidemiológicos qualitativos. São Paulo: James Martim; 2009.
 Institute of Medicine (US). Looking at the future of the Medicaid program. Washington (DC): The Institute; 1992.
 Foley KM, Gelband H, editors. Improving palliative care for cancer. Washington: National Academy Press 2001 [acesso 2003 Jul 13]. Disponível em: [http://www.nap.edu/catalog.php?record_id=10149].

Capítulos de livro:

Wirdh L. História da Epidemiologia. In: Lopez D, organizador. Estudos epidemiológicos qualitativos. São Paulo: James Martim; 2009.p.64-76.

Dissertações, teses e monografias:

Santos EP. Estabilidade química da manteiga da terra [dissertação de mestrado]. Bananeiras (PB): Universidade Federal da Paraíba;1995.
 Moreschi ECP. Desenvolvimento e validação de métodos cromatográficos e avaliação da estabilidade de vitaminas hidrossolúveis em alimentos [tese de doutorado]. São Paulo (SP): Universidade de São Paulo; 2006.

Trabalhos de congressos, simpósios, encontros, seminários e outros:

Barboza et al. Descentralização das políticas públicas em DST/AIDS no Estado de São Paulo. III Encontro do Programa de Pós-Graduação em Infecções e Saúde Pública; agosto de 2004; São Paulo: Rev Inst Adolfo Lutz. p. 34 [resumo 32-SC].

DADOS ELETRÔNICOS:

Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo – SABESP. O que fazemos/Qualidade da água. [acesso 2008 Set 17]. Disponível em: [http://www.sabesp.com.br/CalandraWeb/CalandraRedirect/?temp=4&proj=sabesp&pub=T&db=&doci].

Legislação:

Brasil. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. Diário Oficial [da] Republica Federativa do Brasil. Brasília, DF, 10 jan. 2001. Seção 1, nº7-E. p.45-53.

Autoria institucional:

Instituto Adolfo Lutz (São Paulo - Brasil). Métodos físico-químicos para análise de alimentos: normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. 4ª ed. [1ª ed. digital]. São Paulo (SP): Instituto Adolfo Lutz; 2008. Disponível em: [http://www.ial.sp.gov.br/index.php?option=com_remository&Itemid=7&func=select&orderby=1&Itemid=7].
 Organización Mundial de la Salud – OMS. Como investigar el uso de medicamentos em los servicios de salud. Indicadores seleccionados del uso de medicamentos. Ginebra; 1993. (DAP. 93.1).

Patente:

Larsen CE, Trip R, Johnson CR, inventors: Novoste Corporation, assignee. Methods for procedures related to eletrophysiology of the heart. US patent 5,529,067. 1995 Jun 25.

Casos não contemplados nesta instrução devem ser citados conforme indicação do Committee of Medical Journals Editors (Grupo Vancouver), disponível em: <http://www.cmje.org>. Referências a documentos não indexados na literatura científica mundial, em geral de divulgação circunscrita a uma instituição ou a um evento (teses, relatórios de pesquisa, comunicações em eventos, dentre outros) e informações extraídas de documentos eletrônicos, não mantidas permanentemente em sites, se relevantes, devem figurar no rodapé das páginas do texto onde foram citadas.

2.5 NÚMEROS DE FIGURAS E TABELAS: A quantidade de figuras e tabelas de cada manuscrito deve respeitar a quantidade definida para cada categoria de artigos aceitos pela RIAL. Todos os elementos gráficos ou tabulares apresentados serão identificados como figura ou tabela, e numerados sequencialmente a partir de um, e não como quadros, gráficos etc.

A) Tabelas: Devem ser redigidas em processador de texto Word for Windows 2003 ou compatível e serem apresentadas em arquivos separados, numeradas consecutivamente com algarismos arábicos, na ordem em que foram citadas no texto. A cada uma deve-se atribuir um título breve, não se utilizando traços internos horizontais ou verticais. As notas explicativas devem ser limitadas ao menor número possível e colocadas no rodapé das tabelas e não no cabeçalho ou título. Se houver tabela extraída de outro trabalho, previamente publicado, os autores devem solicitar formalmente autorização da revista que a publicou, para sua reprodução.

B) Figuras: As ilustrações (fotografias, desenhos, gráficos etc.) devem ser citadas como Figuras, apresentadas em arquivos separados e numeradas consecutivamente com algarismos arábicos na ordem em que foram citadas no texto. Devem conter título e legenda apresentados na parte inferior da figura. Só serão admitidas para publicação figuras suficientemente claras e com qualidade digital que permitam sua impressão, preferencialmente no formato vetorial. No formato JPEG,

a resolução mínima deve ser de 300 dpi. Figuras em cores serão publicadas quando for necessária à clareza da informação e os custos deverão ser cobertos pelos autores. Se houver figura extraída de outro trabalho, previamente publicado, os autores devem solicitar autorização, por escrito, para sua reprodução.

3. DECLARAÇÕES E DOCUMENTOS SOLICITADOS: Em conformidade com as diretrizes do International Committee of Medical Journal Editors, são solicitados alguns documentos e declarações do(s) autor(es) para a avaliação de seu manuscrito. Observe a relação dos documentos abaixo e, nos casos em que se aplique, anexe o documento ao processo. O momento em que tais documentos serão solicitados é variável:

Documento/declaração	Quem assina	Quando anexar
Carta de Apresentação	Todos	Submissão
Responsabilidade pelos Agradecimentos	Autor responsável	Aprovação
Responsabilidade pelos Agradecimentos	Todos	Aprovação

A carta de Apresentação do manuscrito, assinada por todos os autores, deve conter:

- Um parágrafo declarando a responsabilidade de cada autor: ter contribuído substancialmente para a concepção e planejamento ou análise e interpretação dos dados; ter contribuído significativamente na elaboração do rascunho ou na revisão crítica do conteúdo; e ter participado da aprovação da versão final do manuscrito. Para maiores informações sobre critérios de autoria, consulte a página do ICMJE (<http://www.icjme.org>).
- Um parágrafo contendo a declaração de potenciais conflitos de interesses dos autores.
- Um parágrafo contendo a declaração que o trabalho não foi publicado, parcial ou integralmente, em outro periódico. Todos os autores devem ler, assinar e enviar documento transferindo os direitos autorais. O artigo só será liberado para publicação quando esse documento estiver de posse da RIAL.

4. VERIFICAÇÃO DOS ITENS EXIGIDOS NA SUBMISSÃO:

1. Nome e instituição de afiliação de cada autor, incluindo e-mail e telefone do autor responsável.
2. Título do manuscrito, em português e inglês.
3. Texto apresentado em letras Times New Roman, corpo 12, em formato Word ou similar (doc, txt, rtf).
4. Resumos em dois idiomas, um deles obrigatoriamente em inglês.
5. Carta de Apresentação assinada por todos os autores.
6. Nome da agência financiadora e número(s) do processo(s).
7. No caso de artigo baseado em tese/dissertação, indicar o nome da instituição/Programa, grau e o ano de defesa.
8. Referências normalizadas segundo estilo Vancouver, ordenadas pela citação no texto e numeradas, e se todas estão citadas no texto.
9. Tabelas numeradas sequencialmente, com título e notas, e no máximo com 12 colunas, em formato Word ou similar (doc, txt, rtf).
10. Figura no formato vetorial ou em pdf, ou tif, ou jpeg ou bmp, com resolução mínima 300 dpi.

5. REVISÃO DA REDAÇÃO CIENTÍFICA: Para ser publicado, o manuscrito aprovado é submetido à revisão da redação científica, gramatical e de estilo. A RIAL se reserva o direito de introduzir alterações nos originais, visando a manutenção da homogeneidade e qualidade da publicação, respeitando, porém, o estilo e as opiniões dos autores. Inclusive a versão em inglês do artigo terá esta etapa de revisão.

6. PROVAS: Após sua aprovação pelos editores, o manuscrito será revisado quanto à redação científica. O autor responsável pela correspondência receberá as provas gráficas para revisão por correio eletrônico em formato pdf (portable document format). O prazo máximo para a revisão da prova é de dois dias. É importante cumprir os prazos de revisão para garantir a publicação no fascículo programado. Atrasos nesta fase poderão resultar em remanejamento do artigo para fascículos subsequentes.

7. PUBLICAÇÃO E DISTRIBUIÇÃO: Os artigos serão publicados em ordem cronológica de aprovação. As datas de recebimento e de aprovação do artigo constarão obrigatoriamente no mesmo.

É permitida a reprodução, no todo ou em parte, de artigos publicados na RIAL, desde que sejam indicados a origem e o nome do autor, de conformidade com a legislação sobre os direitos autorais.

A Revista do Instituto Adolfo Lutz é distribuída gratuitamente a entidades governamentais, culturais ou em permuta de periódicos nacionais ou estrangeiros.



CCD
COORDENADORIA DE
CONTROLE DE DOENÇAS

**GOVERNO DO ESTADO
SÃO PAULO**
Secretaria da Saúde

