

MARCUS VINICIUS JUSTO BOMFIM

**AVALIAÇÃO SANITÁRIA DE FILMES DE POLIAMIDA (NYLON 6)
EM EMBALAGENS ACONDICIONANTES DE ALIMENTOS GORDUROSOS**

PPGVS/INCQS

FIOCRUZ

2008

TÍTULO: AVALIAÇÃO SANITÁRIA DE FILMES DE POLIAMIDA (NYLON 6)
EM EMBALAGENS ACONDICIONANTES DE ALIMENTOS GORDUROSOS

MARCUS VINICIUS JUSTO BOMFIM

Programa de Pós-graduação em Vigilância Sanitária
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
Fundação Oswaldo Cruz

Orientadoras: Dra. Shirley de Mello Pereira Abrantes
Dra. Helena Pereira da Silva Zamith

Rio de Janeiro

2008

FOLHA DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Avaliação Sanitária de Filmes de Poliamida (Nylon 6) em Embalagens Acondicionantes de Alimentos Gordurosos

AUTOR: Marcus Vinicius Justo Bomfim

Dissertação de Mestrado submetida à Comissão Examinadora composta pelo corpo docente do Programa de Pós-graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz e por professores convidados de outras instituições, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre.

Aprovado:

Prof. Dr. Armi Wanderley da Nóbrega (INCQS / FIOCRUZ)

Prof. Dr. Marcos Lopes Dias (IMA / UFRJ)

Prof. Dr. Alexandre Pinto Corrado (FMRP / USP)

Prof^a. Dr^a. Eliana Rodrigues Machado - suplente (INCQS / FIOCRUZ)

Prof^a. Dr^a. Mirian Ribeiro Leite Moura - suplente (FF / UFRJ)

Orientadoras:

Dra. Shirley de Mello Pereira Abrantes (INCQS / FIOCRUZ)

Dra. Helena Pereira da Silva Zamith (INCQS / FIOCRUZ)

Rio de Janeiro

2008

FICHA CATALOGRÁFICA

Bomfim, Marcus Vinicius Justo

Avaliação sanitária de filmes de poliamida (nylon 6) em embalagens acondicionantes de alimentos gordurosos. Rio de Janeiro: INCQS / FIOCRUZ, 2008.

xiii, 80p., il., tab.

Dissertação (Mestrado) - Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Programa de Pós-graduação em Vigilância Sanitária, Rio de Janeiro, 2008.

Orientadoras: Shirley de Mello Pereira Abrantes
Helena Pereira da Silva Zamith

1. Caprolactama 2. Embalagens de alimentos 3. Ensaio de migração 4. Cromatografia a gás 5. Toxicologia 6. Filmes de poliamida 7. Nylon 6 8. Alimentos gordurosos. I. Título.

Sanitary evaluation of nylon 6 films for fatty food packagings

AGRADECIMENTOS

A Profa. Dra SHIRLEY DE MELLO PEREIRA ABRANTES, do LABORATÓRIO DE CONTAMINANTES EM ALIMENTOS DO INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, pela orientação, incentivo, apoio, compreensão, paciência, confiança durante a realização do trabalho.

A Profa. Dra. HELENA PEREIRA DA SILVA ZAMITH, do DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA E TOXICOLOGIA DO INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, pela orientação, incentivo, apoio, compreensão e paciência ao longo do desenvolvimento do trabalho.

Ao técnico e amigo FÁBIO BAZILIO SILVESTRE DO LABORATÓRIO DE CONTAMINANTES EM ALIMENTOS do INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, pelo acolhimento, apoio, colaboração, paciência e amizade no período de trabalho e em outras ocasiões.

A técnica e amiga PAULA DE ALVARENGA BASTOS e ao amigo SÉRGIO ALVES DA SILVA DO LABORATÓRIO DE SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS DE REFERÊNCIA DE AGROTÓXICOS do INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, pelo acolhimento, apoio, colaboração, paciência e amizade no período de trabalho e em outras ocasiões.

A funcionária GILVA DA SILVA BRAGA pela colaboração, apoio, amizade e acolhimento durante o desenvolvimento do projeto.

Aos estagiários e amigos ANA CARLA SIMÕES, JULIANA AMORIM e ANA CAROLINA ZAVAREZE, STEPHANY MEINEL E VINICIUS NERY pelo companheirismo, amizade, apoio e colaboração durante o desenvolvimento do trabalho e em outras ocasiões.

A HILDA DUVAL BARROS DO LABORATÓRIO DE BROMATOLOGIA DO INSTITUTO DE NUTRIÇÃO DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DO RIO DE JANEIRO por todo incentivo, apoio irrestrito, colaboração e amizade durante e anteriores ao projeto.

Ao DEPARTAMENTO DE QUÍMICA DO INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE representado por seus funcionários pelo apoio, colaboração, paciência durante o desenvolvimento de projeto.

Aos meus companheiros de Pós-graduação: ALINE PEÇANHA MUZY DIAS, LUDMILA ROSA BERGSTEN, CLARICE LIMA DO CANTO ABREU, CARLOS

ROBERTO SOBRINHO DO NASCIMENTO, PRISCILA DA NÓBREGA RITO, VIVIANE MEGA DE ANDRADE ZALFA, FLÁVIA BAPTISTA NOBREGA, THADEU ESTEVAM MOREIRA MARAMALDO COSTA, GABRIELLE SALES DE OLIVEIRA, entre outros, pelo apoio, amizade, diversão, compreensão e paciência.

A todos da COORDENAÇÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO DO INSTITUTO NACIONAL DO CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE pela colaboração, compreensão e paciência.

Aos meus amigos JORGE ALEXANDRE COUTINHO GOMES, GABRIEL BARBOSA, GUILHERME AMANTE, JOATHAS MALTA, MIRNA ABREU BALLOD, ELGA BAPTISTA, pelo apoio, amizade, diversão, compreensão e paciência.

Ao INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE pela oportunidade de direcionamento dos conhecimentos apreendidos ao longo de todos estes anos de estudo e a possibilidade de revertê-los em favor da saúde da população.

A FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ pela oportunidade e pelo apoio financeiro.

Ao meu amor ALINE DE ALVARENGA MACEDO BRAGA, por toda atenção, afeto, paciência, carinho, incentivo, amizade, companheirismo, compreensão e colaboração em todos esses anos de união o que permitiu um melhor desenvolvimento pessoal e profissional.

A meus grandes amores, meus pais, MARIA DE FÁTIMA JUSTO BOMFIM e LUIZ CARLOS FERREIRA BOMFIM, e minha irmã, PRISCILLA JUSTO BOMFIM, pelo apoio incondicional, compreensão, dedicação, pelas palavras, amor, carinho e ensinamentos ao longo dessa existência. Obrigado também pela transmissão de valores, princípios morais, éticos e humanos que nortearam suas vidas e que agora fazem parte da minha.

A todos os integrantes da família JUSTO E BOMFIM pela compreensão, apoio, colaboração, amor, carinho.

A DEUS pela paz, amor e ensinamentos, pelas amizades cultivadas e pela oportunidade de trilhar um caminho digno e honesto.

RESUMO

A embalagem é definida como o artigo que está em contato direto com os alimentos, destinado a contê-los desde a sua fabricação até sua entrega ao consumidor, com a finalidade de protegê-los de agentes externos, alterações e de contaminações, assim como adulterações. Entretanto a própria embalagem pode representar fonte de risco através da migração de substâncias de sua própria constituição para o alimento, principalmente, aqueles gordurosos. A ϵ -caprolactama (CAP) é um monômero precursor de polímeros denominados nylon 6 para embalagens de alimentos como mortadelas, *blanquet* de peru, peito de aves, patês e apresuntados. O objetivo do projeto foi avaliar a migração de resíduos de CAP presentes em embalagens de poliamida e utilizadas, em geral, no acondicionamento de alimentos gordurosos. A determinação da CAP foi realizada através de ensaio de migração preconizado pela Diretiva europeia nº 711, de 18 de outubro de 1982, no qual a embalagem permanece em contato com o etanol 95%, meio que simula as características de um alimento gorduroso. A CAP foi identificada e quantificada através de cromatografia a gás com detecção por ionização em chama. O método foi validado intralaboratorialmente e considerado adequado ao propósito. Dentre as embalagens analisadas, 35% das embalagens para mortadela suína, de frango ou chester; 33% para *blanquet* de peru e 100% para peito de aves e patês apresentaram migração superior ao limite estabelecido pelas legislações brasileira e europeia. Caso o etanol 95% fosse aceito como simulante D alternativo pela legislação brasileira (BRASIL,1999) como é pela legislação europeia (CE,1982), tais amostras seriam consideradas não conformes por ambas as legislações (BRASIL,1999; UE,2002). Somente os valores de migração específica de embalagens sem identificação e rótulos (ND) e de apresuntado não ultrapassaram o limite de migração específica de 15mg/kg. Estudos epidemiológicos indicam a possibilidade da CAP causar inflamações oculares e cutâneas, além de irritações no sistema respiratório. Podem ocorrer ainda hipotensão, taquicardia, palpitações, rinorréia, ressecamento nasal, efeitos geniturinários e reprodutivos como distúrbios nas funções menstruais, ovarianas e complicações no parto, além de problemas neurológicos e hematológicos. Estudos em animais parecem consistentes com tais relatos. Os estudos de genotoxicidade *in vitro* e *in vivo* por via oral e intraperitoneal mostram em sua grande maioria, resultados negativos, bem como ausência de efeitos carcinogênicos em ratos e camundongos e sobre o desenvolvimento e reprodução em ratos e coelhos.

ABSTRACT

Packaging is an article in direct contact with foods from manufacture up to delivery to the consumer, which provides protection against external agents, alterations, adulterations and contamination. However, packaging itself can represent risk through the migration of substances in its own constitution into the food, especially fatty foods. ϵ -Caprolactam (CAP) is a precursor monomer of nylon 6 used as food packaging for bologna sausage, turkey blanquette, fowl breast, patés and ham luncheon meat. Our objective was to evaluate the migration of CAP residues in nylon 6 packagings used generally for fatty foods. CAP evaluation was based on migration assays established by European Directive n° 711, of 18 October 1982, in which packaging material remained in contact with ethanol 95%, simulating fatty food characteristics. CAP was identified and quantified by a gas chromatograph equipped with a flame ionization detector. The method was in-house or single-laboratory validated and considered adequate for this purpose. Packaging analysis showed migration at levels higher than the limits established by Brazilian and European Union laws (15 mg/kg of food) for 35% of bologna sausage, 33% of turkey blanquette and 100% of fowl breast and paté packagings. These materials would be considered in contravention of Brazilian laws as they are of European laws, if ethanol 95% was accepted as alternative simulant D by Brazilian legislation. Only ham luncheon meat and packaging without labels did not exceed specific migration limit. Epidemiological studies indicate that CAP could cause ocular, cutaneous and respiratory irritations, as well as hypotension, palpitations, rhinorrhea, nasal dryness, neurological and blood problems and genitourinary and reproductive effects, such as alterations in ovarian-menstrual functions and pregnancy/birth complications. The majority of *in vitro* and *in vivo* genotoxicity studies by oral and intraperitoneal routes show negative results, including the absence of carcinogenicity in rats and mice or developmental and reproductive effects in rats and rabbits.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

°C - Graus Celsius
μL - Microlitro
³H-Tdr - Timidina tritiada
6Tg - 6-Tioguanina
ABRE - Associação Brasileira de Embalagens
ACGIH - *American Conference of Governmental Industrial Hygienists*
AMV - Amostra com migração estimada que sofrerá adição do analito
ANOVA - Análise de variância
ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CAP - ε-Caprolactama
CG-DIC – Cromatógrafo a gás com detecção por ionização em chama
CE - Comunidade Européia
CEH - Células embrionárias de hamster
CG - DIC - Cromatógrafo a gás acoplado a detector de ionização em chama
CHO - Células de ovário de hamster chinês
cm² - Centímetro quadrado
CV - Coeficiente de variação
dm² - Decímetro quadrado
DNA - Ácido desoxirribonucléico
EPA - *Environmental and Protection Agency*
EUA - Estados Unidos da América
FT - Faixa de trabalho
FDA - *Food and Drug Administration*
FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz
h - Hora
HPRT - Hipoxantina-guanina fosforibosil transferase
IDT - Ingestão diária tolerável
INCQS - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
kg - Quilograma
L5178Y - Células de linfoma de camundongo
LME - Limite de migração específica
LOAEL - Menor nível de dose onde é observado efeito adverso
m³ - Metro cúbico

mg - Miligrama
min - Minutos
mL - Mililitro
mM - Concentração milimolar
mm - Milímetro
MMQO - Método dos mínimos quadrados ordinários
MRC - Material de referência certificado
ND - Amostras sem identificação e rótulos
NIOSH - *National Institute of Occupational Safety and Health*
NOAEL - Nível de dose onde não é observado efeito adverso
OECD - *Organisation for Economic Cooperation and Development*
Pa - Pascal
PRSD_r - *Within-laboratory predicted relative standard deviation*
PRSD_R - *Among-laboratory predicted relative standard deviation*
pH - Potencial de Hidrogênio
POP - Procedimento Operacional Padrão
RNA - Ácido ribonucléico
RSD_r - *Within-laboratory relative standard deviation*
RSD_R - *Among-laboratory relative standard deviation*
SLRL - Teste recessivo letal ligado ao sexo em *Drosophila melanogaster*
SMART - Teste de recombinação e de mutação somática em *Drosophila melanogaster*
TAT - Tirosina aminotransferase
TFO - Triptofano oxigenase
TK - Timidina quinase
UDS - Síntese de DNA não programada
UE - União Européia
V79 - Células de pulmão de hamster chinês.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Gráfico de distribuição de consumo de embalagens no Brasil ao longo dos anos.....	3
Figura 2 - Estrutura tridimensional do polímero nylon 6	5
Figura 3 - Estrutura tridimensional da molécula da ϵ -caprolactama	5
Figura 4 - Reação de obtenção da ϵ -caprolactama.....	6
Figura 5 - Foto ilustrativa do ensaio de migração com filme contendo nylon 6	15
Figura 6 - Curva analítica da CAP em solvente (área x concentração em mg/L)	35
Figura 7 - Gráfico exploratório dos resíduos da regressão da curva analítica	36
Figura 8 - Gráfico de probabilidade normal da curva analítica	36
Figura 9 - Gráfico de Durbin-Watson da curva analítica ($e_i \times e_{i-1}$).....	37
Figura 10 - Curva analítica da CAP em matriz (área x concentração em mg/L)	38
Figura 11 - (a) Cromatograma típico de uma amostra em coluna apolar HP-1; (b) cromatograma típico de uma amostra em coluna mais polar HP-5.	40
Figura 12 - Determinação dos limites de detecção e quantificação (Statsoft, 2004) .	43
Figura 13 - Gráfico da distribuição percentual do número de amostras por tipo de alimento (n = 40).....	44
Figura 14 - Número de amostras com níveis superiores e inferiores aos limites estabelecidos pela legislação brasileira (BRASIL, 1999) e europeia (UE, 2002)	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação dos tipos de alimentos, segundo CE (1982) e Brasil (1999).....	8
Tabela 2 - Determinação dos simulantes por tipo de alimento, conforme CE (1982) e Brasil (1999).....	9
Tabela 3 - Correspondência entre simulantes e tipos de alimentos, conforme CE (1982) e Brasil (1999)	9
Tabela 4 - Análise de variância para significância da regressão e desvio de linearidade ($\alpha=0,05$).....	24
Tabela 5 - Resultados da análise de variância para significância da regressão e desvio da linearidade ($\alpha = 0,05$)	38
Tabela 6 - Testes de premissas para curva analítica em matriz ($\alpha = 0,05$).....	38
Tabela 7 - Resultados dos testes para avaliação do efeito matriz ($\alpha = 0,05$).....	39
Tabela 8 - Avaliação da repetitividade e recuperação do método para cada nível de concentração.....	41
Tabela 9 - Avaliação da precisão intermediária do método através de ensaios realizados em três dias diferentes	42
Tabela 10 - Resultados obtidos dos ensaios de migração e as respectivas incertezas (em mg/L)	46
Tabela 11 - Estudos de exposição por via inalatória à CAP em humanos.....	52
Tabela 12 - Estudos de mutagenicidade da CAP em <i>Salmonella typhimurium</i> (Teste de Ames).....	57
Tabela 13 - Estudos de mutagenicidade da CAP em células de mamífero <i>in vitro</i> ...	58
Tabela 14 - Estudos da genotoxicidade <i>in vivo</i> da CAP	63
Tabela 15 - Estudos toxicológicos <i>in vivo</i> da CAP desenvolvidos pelo <i>National Toxicology Program</i>	66

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Poliamidas	4
1.2. Migração	6
1.3. Simulantes	8
1.4. Validação do método	10
1.5. Justificativa	11
2. OBJETIVO GERAL	12
2.1. Objetivos específicos.....	12
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	13
3.1. Material	13
3.2. Equipamentos.....	14
3.3. Reagentes e padrões.....	14
3.4. Soluções	14
3.5. Amostras.....	14
3.6. Método de ensaio	15
3.6.1. Orientações para proteção individual e coletiva	16
3.6.2. Condicionamento da coluna cromatográfica, detecção e quantificação....	16
3.7. Caracterização do padrão e qualificação do equipamento	16
3.8. Validação intralaboratorial	17
3.8.1. Faixa de trabalho (FT)	17
3.8.2. Linearidade	18
3.8.3. Efeito matriz.....	25
3.8.4. Seletividade, Repetitividade, Precisão intermediária e Recuperação	27
3.8.5. Limites de detecção e quantificação	30
3.9. Incerteza de medição.....	31
3.10. Revisão bibliográfica sobre a toxicologia da CAP.....	33
4. RESULTADOS e DISCUSSÃO.....	34
4.1. Validação do método	34
4.1.1. Linearidade e curva analítica	34
4.1.2. Efeito matriz.....	38
4.1.3. Seletividade	40
4.1.4. Recuperação	41
4.1.5. Repetitividade	41
4.1.6. Precisão intermediária.....	41

4.1.7. Limites de detecção e quantificação.....	42
4.2. Resultados das amostras	43
4.3. Toxicologia da CAP	49
4.3.1. Toxicocinética	49
4.3.2. Efeitos em humanos	50
4.3.2.1. Exposição cutânea e ocular.....	50
4.3.2.2. Exposição por via inalatória	50
4.3.3. Efeitos em animais.....	55
4.3.3.1. Exposição cutânea e ocular.....	55
4.3.3.2. Exposição por via inalatória	56
4.3.4. Genotoxicidade	57
4.3.4.1. Mutagenicidade em <i>Salmonella typhimurium</i> e células de mamífero <i>in vitro</i>	57
4.3.4.2. Genotoxicidade <i>in vivo</i>	60
4.3.5. Carcinogenicidade	65
4.3.6. Efeitos sobre a reprodução e desenvolvimento de animais.....	68
5. Conclusões	69
6. Referências Bibliográficas	71

1. INTRODUÇÃO

No século XIX, com o desenvolvimento industrial e a urbanização constatou-se o aumento da concentração humana nas metrópoles e da demanda alimentar. As necessidades dos países industrializados modificaram-se, tornando a sociedade urbana mais consumista e exigente. Os hábitos alimentares também sofreram alterações. Paralelamente à mudança da demanda do consumidor, registra-se o progresso tecnológico da indústria de alimentos, bem como o aumento do comércio internacional de produtos alimentícios (GERMANO, 2001). Destaca-se, assim, uma das principais características das sociedades modernas que é o consumo sempre crescente de mercadorias, bens e serviços, inclusive de produtos de interesse sanitário, de tecnologias médicas e de serviços de saúde (ROZENFELD, 2001).

Na dinâmica complexa dos processos são gerados muitos riscos e danos à saúde do indivíduo e da coletividade, assim como ao meio ambiente e à economia do consumidor. Assim, existe a necessidade de regulação das relações de produção e consumo, se reconhece à vulnerabilidade do consumidor e se criam instrumentos para proteger a saúde da coletividade. As ações de Vigilância Sanitária se inserem no âmbito das relações sociais de produção e consumo, onde se origina a maior parte dos problemas de saúde sobre os quais é preciso interferir. Dessa forma, a Vigilância Sanitária atua sobre fatores de risco associados a produtos, insumos e serviços relacionados com a saúde, com o ambiente e o ambiente de trabalho, com a circulação internacional de transportes, cargas e pessoas (ROZENFELD, 2000).

Pode-se afirmar que a Vigilância Sanitária originou-se na Europa dos séculos XVII e XVIII e, no Brasil, nos séculos XVIII e XIX, com o surgimento do conceito de polícia sanitária, que tinha como função regulamentar o exercício da profissão, combater o charlatanismo, exercer o saneamento da cidade e fiscalizar embarcações, os cemitérios e o comércio de alimentos, com o objetivo de se evitar a propagação das doenças (EDUARDO, 1998). A Vigilância Sanitária é a forma mais complexa de exercício da Saúde Pública, pois suas ações, de natureza eminentemente preventivas, perpassam todas as práticas médico-sanitárias, tais como: promoção, proteção, recuperação e reabilitação da saúde (ROZENFELD, 2000). A Lei nº 8080, de 19 de setembro de 1990, chamada Lei Orgânica da Saúde, organiza o Sistema Único da Saúde e define a Vigilância Sanitária como “conjunto de ações capaz de eliminar, diminuir, ou prevenir riscos à saúde e intervir nos problemas sanitários decorrentes do meio ambiente, da produção e circulação de bens e da prestação de serviços de interesse da saúde”. Ou seja, a Vigilância

Sanitária tem o poder de interferir em todos os fatores determinantes do processo *saúde-doença* (EDUARDO, 1998).

A saúde é um direito inalienável de todo cidadão. Mas para que haja saúde é fundamental que os alimentos sejam produzidos em quantidade e com qualidade apropriadas ao equilíbrio orgânico (GERMANO 2001).

A qualidade dos alimentos está diretamente relacionada à segurança alimentar e, ambas, dependem de uma gama de variáveis. Os fatores mais estudados que influenciam a qualidade dos alimentos são os de natureza física, química e biológica que atuam no alimento durante o período de tempo compreendido entre sua produção até o seu consumo (PASCUET, 1996).

A conservação dos alimentos tem sido uma preocupação da humanidade de longa data. Com o passar do tempo se tornou evidente que o uso de algum tipo de embalagem poderia conservar os alimentos por um tempo maior (JENKINS e HARRINGTON, 1991).

A Resolução RDC nº 91, de 11 de maio de 2001, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), do Ministério da Saúde define a embalagem para alimentos como "... um artigo que está em contato direto com os alimentos, destinado a contê-los desde a sua fabricação até a sua entrega ao consumidor, com a finalidade de protegê-los de agentes externos, de alterações e de contaminações, assim como adulterações".

O papel da embalagem na conservação de alimentos é essencialmente protegê-los contra agentes externos e da manipulação inadequada (CROSBY, 1981). Germano et al. (2001) destacam que alimentos embalados incorretamente podem deteriorar e se contaminar, bem como incorporarem aos produtos elementos nocivos à saúde, principalmente, de natureza química. Em quaisquer destes casos, um produto de elevada qualidade pode ter sua destinação, irremediavelmente, condenada para o consumo.

Segundo Harte et al. (1985), a embalagem para exercer todas as suas funções deve apresentar duas características:

- Impedir o transporte de gases, vapores e outros compostos de baixo peso molecular para dentro dos alimentos;
- Proteger os alimentos contra danos mecânicos e contaminação microbiana.

A embalagem deve ainda permanecer íntegra durante todo o processo de distribuição e armazenamento. Dessa forma, é um elemento imprescindível à proteção de produtos alimentícios.

Com o desenvolvimento da tecnologia, surgiu uma ampla gama de materiais com as características adequadas para suprir a grande diversidade de demanda específica que necessita uma embalagem para alimento.

Os materiais de embalagem mais tradicionais utilizados no mercado são: vidro, papel, metal e plástico (ABRANTES, 1998). A Figura 1 apresenta a distribuição de consumo dos materiais para embalagens. A rápida expansão alcançada pelos plásticos, como matéria-prima básica de milhares de produtos de largo consumo é um dos mais extraordinários marcos da moderna tecnologia industrial.

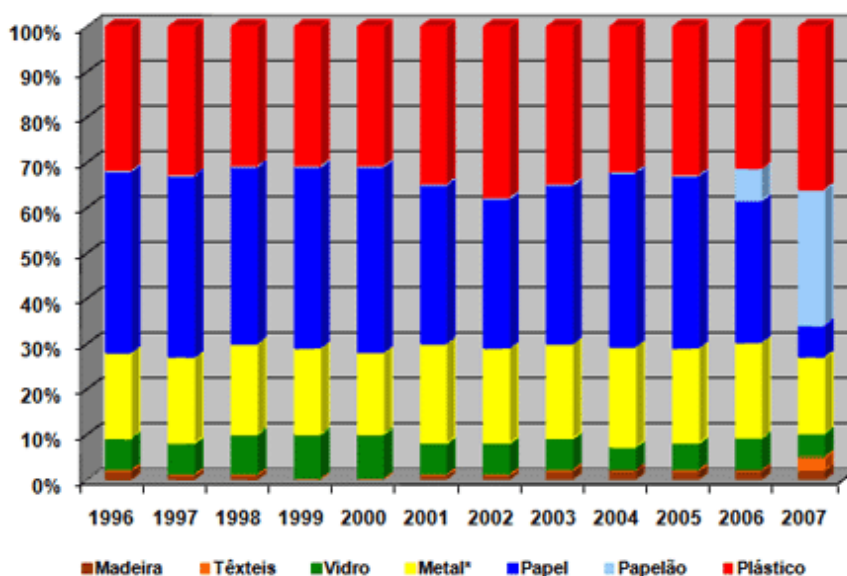


Figura 1 – Gráfico de distribuição de consumo de embalagens no Brasil ao longo dos anos (Fonte: ABRE, 2008)

Os plásticos são produtos versáteis que conseguem reunir as qualidades de diversos materiais, além das que lhe são inerentes (MÍDIO e IZUMIDA, 2000). Os plásticos utilizados em embalagens de alimentos são constituídos de macromoléculas de alto peso molecular (AUTIAN, 1980). As poliamidas, tratadas no próximo tópico, são um exemplo claro da expansão da utilização dos plásticos pela indústria alimentícia.

1.1. Poliamidas

As poliamidas são polímeros que apresentam uma seqüência de grupos amida na cadeia. *Nylon* é o nome genérico da família de poliamidas sintéticas. Os *nylons* se tornaram comercialmente disponíveis para o mercado de embalagem na década de 50. As poliamidas apresentam satisfatória barreira a gases e a aromas, alta resistência mecânica (à abrasão, perfuração, impacto e flexão), boa resistência térmica e apropriada resistência a óleos e gorduras, a produtos químicos e podem ser termoformados (SARANTÓPOULOS et al., 2002). Na área de embalagem, a maioria das poliamidas é usada na forma de filmes. A maior aplicação é na produção de filmes para embalagens a vácuo para produtos cárneos e queijos (SARANTÓPOULOS et al., 2002). Dentre os quais destacam-se a mortadela, o *blanquet* de peru, o peito de peru ou chester, apresuntado e patês.

As poliamidas mais utilizadas na fabricação de embalagens são os nylons 6, 6,6 e 11. Em torno de 73% do nylon 6 produzido no mundo destinam-se, sob a forma de fibras, a fabricação de tapetes e vestuário, enquanto os 27% restantes, sob a forma de resinas, são utilizados pela indústria para a produção de equipamentos de direção, sistemas e componentes automotivos, conectores, além de embalagens plásticas. As resinas ainda necessitam de tratamento prévio para consolidação do produto final. Para os equipamentos, sistemas e componentes automotivos, as resinas devem passar por um processo denominado de injeção. De outro modo, a resina deve sofrer um processo de extrusão para transformá-la em filmes ou filamentos que, agregados, darão origem à embalagem plástica (KOMA, 2001).

O nylon 6 (figura 2) é um tipo de poliamida constituída a partir da polimerização de monômeros de ϵ -caprolactama (SARANTÓPOULOS et al., 2002). Em 1999, a União Européia produziu um volume aproximado de 1×10^6 toneladas de CAP (figura 3). Anualmente, a Ásia produz mais de 1×10^6 toneladas e a América do Norte, aproximadamente, entre 5×10^5 e 1×10^6 toneladas da substância (OECD, 2001).

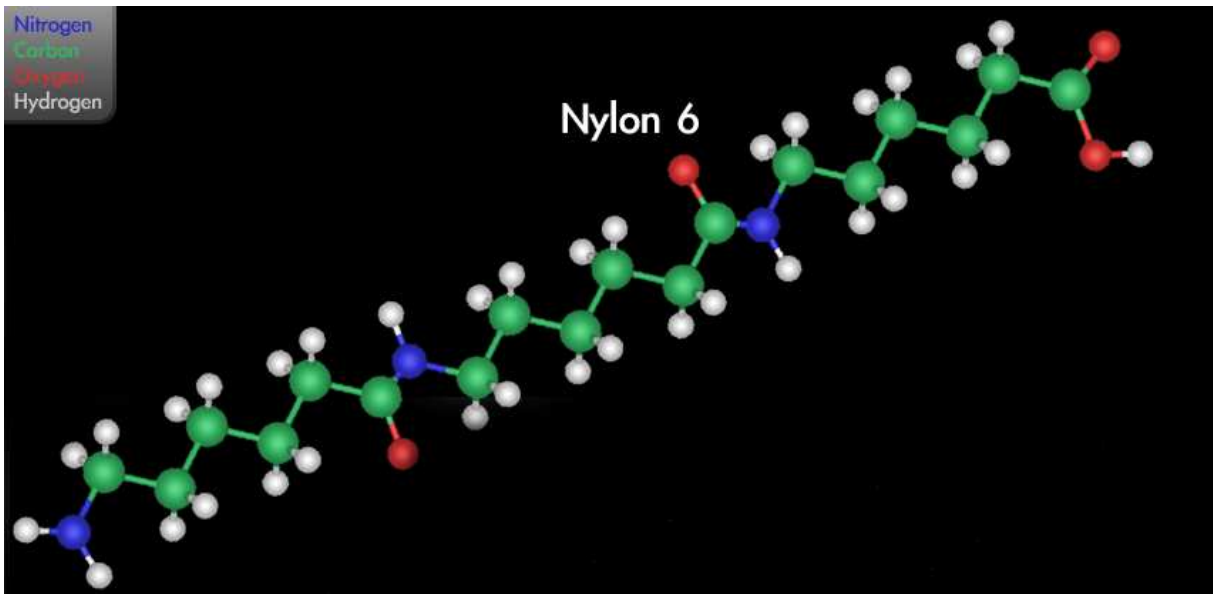


Figura 2: Estrutura tridimensional do polímero nylon 6 (Fonte: Macromedia Foundation, 2008)

A produção industrial baseia-se na reação química apresentada na figura 4. Como as reações de polimerização resultam usualmente em substâncias de alto peso molecular e essa conversão não alcança 100%, o polímero pode reter, na sua estrutura, monômeros residuais e oligômeros, em razão do tipo de tecnologia aplicada (ABRANTES, 1998).

Os monômeros, assim como os oligômeros, são capazes de migrar de materiais de embalagem para o alimento. Monômeros são substâncias biologicamente reativas e, por isso, potencialmente tóxicas. Portanto, a regulamentação visa restringir a quantidade de monômeros residuais na matéria-prima, plásticos e artigos produzidos a partir dos mesmos (ARVANITOYANNIS e BOSNEA, 2004).

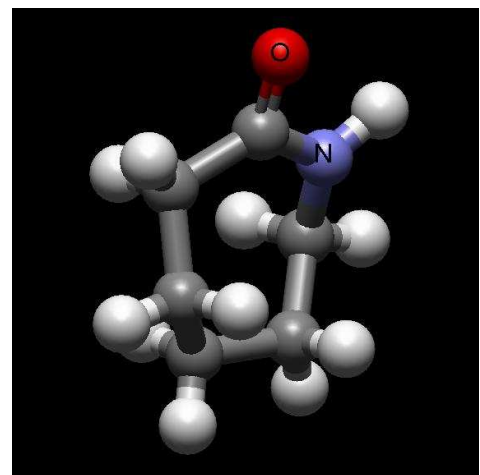


Figura 3: Estrutura tridimensional da molécula da ϵ - caprolactama (Fonte: Molecular Simulations, 1998)

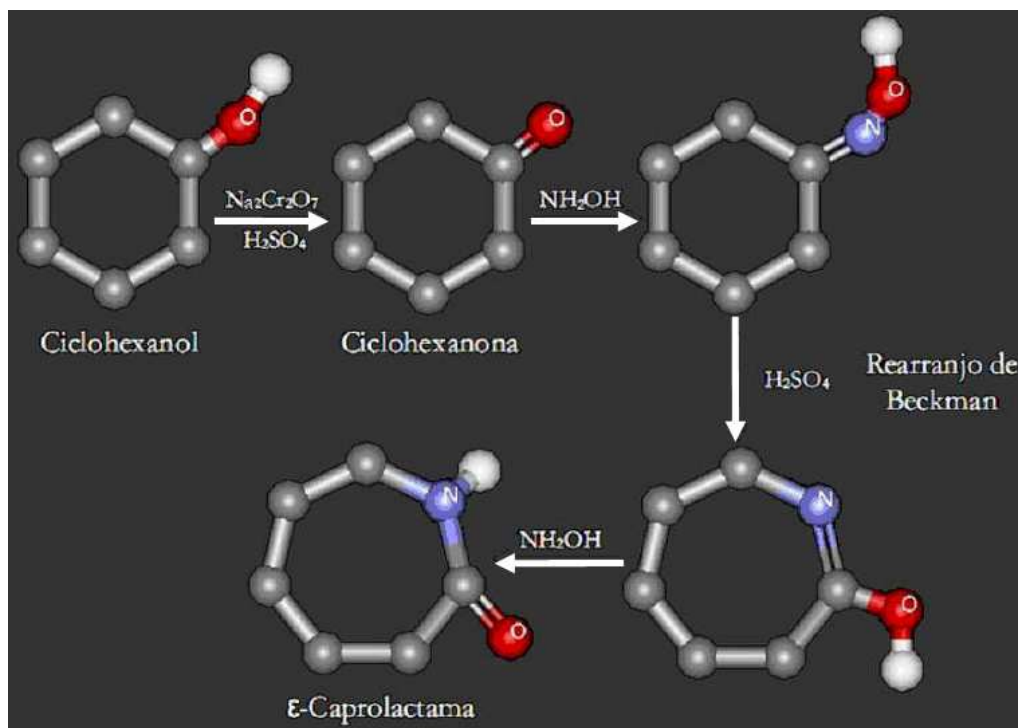


Figura 4 – Reação de obtenção da ε –caprolactama

(Fonte: *Molecular Simulations*, 1998)

1.2. Migração

Como já mencionado, a embalagem atua como barreira de proteção para o produto contra o contato direto com o ambiente, evitando alterações indesejáveis. Entretanto, a própria embalagem pode representar fonte de risco através da migração de substâncias de sua própria constituição para o alimento (MIDIO e IZUMIDA, 2000).

O termo migração é descrito na legislação brasileira como "...a transferência de componentes do material em contato com alimentos para estes produtos, devido a fenômenos físico-químicos" (BRASIL, 2001).

Há dois tipos de migração: a total ou global e a específica. A migração total refere-se à transferência total ou à quantidade de substâncias totais que migram da embalagem para o alimento, ou seja, é a transferência de todas as substâncias para o alimento, sendo tóxicas ou não. A migração específica relaciona-se à transferência de uma ou mais substâncias identificáveis, reconhecidas ou consideradas como de risco para a saúde do homem, não se levando em consideração a quantidade total de outros migrantes que passam para o alimento (FERNANDES et al., 1987).

O termo migração é descrito como um processo de difusão que pode ser fortemente influenciado pela interação de componentes do alimento e da

embalagem. Entretanto, componentes do alimento, particularmente a gordura (ácidos graxos), aumentam consideravelmente a mobilidade de substâncias da embalagem plástica para o alimento (ARVANITTOYANNIS e BORNEA, 2004).

A migração é uma questão de saúde pública e um problema legal na maioria dos países. Visando a harmonização das legislações, União Européia (EU) e *Food and Drug Administration* (FDA) iniciaram um controle global através de listas positivas de substâncias e restrições a substâncias potencialmente tóxicas. A proposta geral da legislação é garantir a segurança do consumidor (ARVANITTOYANNIS e BORNEA, 2004). Com o intuito de facilitar e proteger os consumidores da migração de substâncias perigosas de embalagens de alimentos, a União Européia (UE) e os Estados Unidos, através da FDA publicaram inúmeras diretivas (UE) e adotaram “limites regulatórios” (FDA). O controle da conformidade de materiais de embalagens através da regulamentação de UE é uma questão complicada. Entre as inúmeras dificuldades que poderiam ser enfatizadas há um grande número de substâncias incluídas em listas positivas, a ausência de informação de migrantes potenciais pelos fornecedores, a ausência de métodos analíticos padronizados, a duração dos procedimentos analíticos e dificuldades práticas na sua execução. A UE já listou milhares de aditivos e monômeros como migrantes potenciais. Muitos deles são autorizados com restrições ou limites de migração específica e razoável número de métodos analíticos foi padronizado. Porém, métodos de testes oficiais são frequentemente extensos, complexos e impraticáveis para a rotina ou controle diário. Nos Estados Unidos, a estrutura de regulação para embalagens de alimentos é, a princípio, mais criteriosa. Aprovação prévia pela FDA é corriqueiramente necessária para materiais utilizados nestas embalagens que não são reconhecidamente seguros, anteriormente sancionados ou que não se espera tornar-se componente do alimento. Estes componentes ou aditivos alimentares devem ser demonstrados, através de um processo de petição, como sendo seguros para o uso pretendido. (ARVANITTOYANNIS e BORNEA, 2004).

A Resolução nº 105, de 19 de maio de 1999, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e a Diretiva Européia nº 72, de 6 de agosto de 2002, estabelecem um limite de migração específica da CAP no alimento em 15 mg/kg. O limite de migração específica recomendado pela legislação brasileira coincide, por força de harmonização, com o da legislação européia.

1.3. Simulantes

As legislações brasileira e europeia prevêem a utilização de simulantes. É definido como “produto que imita o comportamento de um grupo de alimentos que tem características semelhantes” (BRASIL, 2001; CE, 1982). Para a realização de testes de migração, são empregadas substâncias orgânicas que simulam, tanto quanto possível, o comportamento dos alimentos (PAPASPYRIDES e TINGAS, 1998). Com relação à interação com as embalagens plásticas, os alimentos são classificados como mostrado na tabela 1:

Tabela 1 – Classificação dos tipos de alimentos, segundo CE (1982) e Brasil (1999)

<i>Tipo I:</i>	Alimentos aquosos não ácidos (pH > 5);
<i>Tipo II:</i>	Alimentos aquosos ácidos (pH < 5);
<i>Tipo III:</i>	a. Alimentos aquosos não ácidos contendo óleo ou gordura;
	b. Alimentos aquosos ácidos contendo óleo ou gordura;
<i>Tipo IV:</i>	Alimentos oleosos ou gordurosos;
<i>Tipo V :</i>	Alimentos alcoólicos (conteúdo em álcool superior a 5% (v/v);
<i>Tipo VI:</i>	Alimentos sólidos secos ou de ação extrativa pouco significativa.

Com a finalidade de realizar ensaios de migração em embalagens em contato com alimentos, são definidos os seguintes simulantes (Tabela 2):

Tabela 2 – Determinação dos simulantes por tipo de alimento, conforme CE (1982) e Brasil (1999)

<i>SIMULANTE A :</i>	Água destilada
<i>SIMULANTE B :</i>	Solução de ácido acético em água destilada a 3%(m/v)
<i>SIMULANTE C :</i>	Solução de etanol em água destilada a 15% ou na concentração mais próxima da real de uso
<i>SIMULANTE D :</i>	Azeite de oliva refinado; n-heptano

Estabelece-se ainda a indicação do simulante a ser utilizado para o alimento correspondente (Tabela 3) :

Tabela 3 - Correspondência entre simulantes e tipos de alimentos, conforme CE (1982) e Brasil (1999)

ALIMENTO	SIMULANTE
TIPO I	A
TIPO II	B
TIPO IIIa	A, D
TIPO IIIb	B, D
TIPO IV	D
TIPO V	C
TIPO VI	Nenhum, ou ocasionalmente A, B, C ou D, dependendo do tipo de alimento.

Apesar da resolução RDC nº105, de 19 de maio de 1999, estabelecer os simulantes para cada tipo de alimento, este projeto adotará uma alternativa ao uso de óleo de oliva e n-heptano para avaliação de migração em alimentos oleosos ou gordurosos. A utilização de simulante alternativo fundamenta-se em estudo desenvolvido por Baner et al. (1992) em que se sugere uma série de alternativas ao uso de óleos com este propósito. Baner et al. (1992) afirmam que o uso de simulantes com menor peso molecular que óleos e gorduras reduzem o trabalho analítico e, ao mesmo tempo, melhoram a sensibilidade e diminuem a variabilidade dos resultados. Quando se utilizam solventes apolares ou fracamente polares (como hidrocarbonetos e álcoois com mais de três átomos de carbono) as condições do teste de migração diferem muito daquelas do alimento ou dos óleos que deveriam ser usados. O fato se deve as fortes interações entre os simulantes e a maioria dos

polímeros, o que ocasiona valores de migração extremamente elevados se comparados aos resultados em óleos ou gorduras. Em geral, o etanol ou mistura etanol/água contendo maior proporção de etanol não altera as interações com a maioria dos polímeros. O autor conclui que o etanol é um bom simulante para alimentos gordurosos, pois possui baixa interatividade com muitos plásticos, os migrantes são prontamente solubilizados e o trabalho analítico é facilitado. A utilização de etanol e mistura de etanol/água é também apoiada por resultados experimentais publicados por Till et al. (1987) e Schwartz et al. (1988). Pogorzelska e Mielniczuk (2001); Castle et al. (2004) e Félix et al. (2008) utilizaram etanol 95% em seus ensaios de migração. Atualmente, os EUA (2005), através de seu órgão regulador FDA, utilizam o etanol 95% como solvente para extração, já que este determina limite de composição e não limite de migração. Já a CE (1982) incorpora o etanol 95% como simulante alternativo para avaliar a migração de substâncias de embalagens acondicionantes de alimentos gordurosos.

1.4. Validação do método

Vários laboratórios realizam, diariamente, mensurações analíticas que dão suporte às decisões dos mais diferentes setores da economia e da sociedade. O desenvolvimento tecnológico e científico aliado ao fenômeno da globalização ampliaram a necessidade de obtenção de medidas analíticas confiáveis e comparáveis, com vista ao reconhecimento mútuo e redução de barreiras técnicas entre os países. Nesse contexto, os laboratórios devem adotar medidas cabíveis que assegurem a qualidade requerida para seus resultados analíticos. Tais medidas seriam a utilização de métodos validados, procedimentos de controle de qualidade interna, participação de ensaios de proficiência e acreditação (THOMPSON, ELLISON e WOOD, 2002). No que diz respeito à área de alimentos, a validação de métodos relaciona-se somente à segurança alimentar e ao comércio internacional.

É notório que a validação por procedimentos interlaboratoriais está bem estabelecida por meio de estudos colaborativos. Contudo, os estudos não são capazes de acompanhar a demanda por garantia de qualidade e a velocidade dos avanços técnicos e científicos. Razões como questões técnicas, organizacionais, infraestruturais e financeiras podem ser enumeradas. As limitações de validações por estudos colaborativos praticamente conduzem os laboratórios à adoção de procedimentos para validação intralaboratorial, atualmente considerados apropriados para avaliar parâmetros de desempenho de um método (SOUZA, 2007). Da mesma

forma, é internacionalmente reconhecido como alternativa quando não há disponibilidade de procedimento interlaboratorial ou quando os procedimentos não são aplicáveis (THOMPSON, ELLISON e WOOD, 2002). A validação intralaboratorial diz respeito a estudos analíticos que envolvem um único laboratório, utilizando um mesmo método para analisar a mesma amostra, sob diferentes condições, em um intervalo de tempo justificado (UE, 2002).

1.5. Justificativa

A poliamida é um produto decorrente da polimerização da CAP e, como a reação não tem 100% de rendimento, algum resíduo pode permanecer adsorvido ou incluso na macromolécula formada. O contato de filmes e embalagens de poliamida com alimentos pode ocasionar a migração de CAP para os mesmos. Diante da incerteza quanto aos riscos potenciais da exposição à CAP em seres humanos, houve a necessidade de adotar-se uma posição de cautela ao analisar a questão; e considerar a possibilidade de ocorrência de agravos à saúde da população.

2. OBJETIVO GERAL

- Avaliar a migração de resíduos de CAP presentes em embalagens de poliamida e utilizadas, em geral, no acondicionamento de alimentos gordurosos.

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver e validar intralaboratorialmente método analítico para determinar a migração de CAP em alimentos gordurosos;
- Determinar e quantificar a migração de CAP de filmes de poliamidas (nylon 6) acondicionantes de alimentos gordurosos;
- Analisar criticamente o potencial de toxicidade da CAP a partir de dados da literatura e estudos pelas vias cutânea, ocular, inalatória e oral.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

- Naveta de vidro borossilicato;
- Becher de vidro borossilicato com capacidade para 50, 100 e 300 mL;
- Balão volumétrico calibrado com capacidade para 10 e 100 mL;
- Frasco de vidro borossilicato com capacidade de 100 mL;
- Lacre de alumínio;
- Septo de silicone com uma das faces em teflon com diâmetro de 20 mm;
- Selador;
- Microseringa até 500 µL calibrada;
- Frasco de vidro para injetor automático de cromatógrafo a gás com capacidade para 2 mL;
- Frasco de vidro para injetor automático de cromatógrafo a gás com capacidade para 4 mL;
- Septos para frasco de vidro para injetor automático de cromatógrafo a gás com capacidade para 2 mL;
- Septos para frasco de vidro para injetor automático de cromatógrafo a gás com capacidade para 4 mL ;
- Coluna 5% fenil-metil silicone HP-5 de 30m x 0,53mm x 2,65 µm, Hewlett Packard *serial number* US7126326H ;
- Coluna 100% dimetilsiloxano HP-1 de 30m x 0,25mm x 0,25 µm, Hewlett Packard *serial number* 190912-433;
- Septos de baixo sangramento para porta de injeção de cromatógrafo a gás Shimadzu GC-2010;
- Pipeta tipo Pasteur;
- Placas de Petri com 15 cm de diâmetro;
- Tampas de vidro de balão volumétrico;
- Pinça metálica;
- Bureta calibrada com capacidade de 10 mL;
- Proveta de vidro borossilicato com capacidade para 100 mL;
- Pipeta graduada com capacidade para 10 mL;

3.2. Equipamentos

- Refrigerador para amostras;
- Refrigerador para soluções e reagentes;
- Micropipeta automática calibrada de volume variável de 10 a 100 µL (Eppendorf);
- Balança analítica Sartorius modelo R200D com resolução de 0,1mg;
- Pipetador automático Accujet;
- Estufa Blue M modelo OV-475A-3 de 38° a 260°C;
- Termômetro digital VWR com variação de -50°C a 70 °C calibrado;
- Capela de exaustão Engelab;
- Sistema de cromatografia a gás Shimadzu modelo GC-2010 composto por injetor automático Shimadzu AOC-20i, detector por ionização em chama e computador para aquisição e processamento dos dados.

3.3. Reagentes e Padrões

- Acetonitrila com pureza 99,9% obtido da Vetec;
- Etanol com grau de pureza 95% obtido da Synth Laboratórios.
- Acetona para análise (P.A) da Vetec, além de acetona e água destilada, preparadas no laboratório, foram utilizadas para limpeza dos materiais.
- O padrão secundário de CAP com pureza igual ou superior a 99% (lote S4564300-618) foi fornecido pela Sigma-Aldrich.

3.4. Soluções

As soluções estoques de CAP com concentração igual a 1000 mg/L foram preparadas pela dissolução de 99,7 mg ± 0,5 do padrão da CAP (99% m/m) para 100 mL de etanol 95%. A solução foi preparada conforme a necessidade e armazenada sob refrigeração entre 6 e 10°C..

3.5. Amostras

Trata-se de embalagens multicamadas de poliamida, mais precisamente três filmes de nylon, destinadas a acondicionar alimentos gordurosos. Os alimentos gordurosos que tiveram as embalagens analisadas foram a mortadela, o *blanquet* de peru, peito de aves, patês e apresuntado. Esses alimentos apresentam uma particularidade. O processo de cozimento é realizado dentro da embalagem sob

temperaturas que variam de 70 a 100°C, num período entre 1 a 4 horas ou até que o centro do alimento alcance a temperatura de 72°C.

O material, composto de nylon 6/adesivo/nylon 6/adesivo/nylon 6 (80%) e nylon 6/6.6 (20%), foi fornecido por empresa reconhecida do setor de embalagens. Salienta-se que uma amostra, de mesmas características e denominada AMV, foi utilizada para o procedimento de validação analítica.

As amostras foram identificadas e armazenadas sob refrigeração entre 6 e 10°C, até o momento dos ensaios.

3.6. Métodos de Ensaio

O método de ensaio fundamenta-se na transferência de resíduos de CAP presentes em algumas embalagens de alimentos para um simulante que imita as características dos alimentos. Aqui, o ensaio de migração propõe o contato de 1 dm² (10x10 cm) do material com 100 mL do simulante selecionado, etanol 95%. A Resolução nº 105, de 19 de maio de 1999 determina que esta relação deva ser da ordem de 0,5 a 2,0 cm² de material plástico por mililitro ou miligramas de alimento. Com auxílio de placas de Petri de 15 cm de diâmetro, a amostra permaneceu em contato com o simulante (figura 5). O ensaio foi conduzido por imersão total do material que permaneceu à temperatura de 60 ± 0,5 °C durante 3h 30 min. As condições de realização do ensaio basearam-se na Diretiva Européia nº 711, de 18 de outubro de 1982. Essa estabelece que para alimentos submetidos ou elaborados em temperaturas entre 70 e 100°C, e por período de 1 à 4 h (como no caso das embalagens em questão); as condições de realização do ensaio com simulante alternativo etanol 95% devam ser aquelas adotadas nesse trabalho. Ao final do ensaio, os resíduos da CAP em etanol 95% são transferidos a um balão volumétrico e completado o volume a 100 mL, onde são retiradas alíquotas de 2 mL

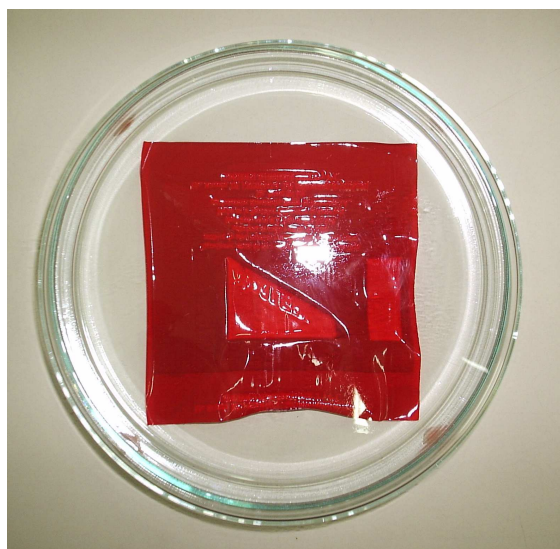


Figura 5 - Foto ilustrativa do ensaio de migração com filme contendo nylon 6

para detecção e quantificação por cromatografia gasosa acoplado à um detector por ionização em chama (CG-DIC). Ao final, foram determinadas as incertezas associadas ao resultado conforme Eurachem/CITAC (2001).

3.6.1. Orientações para proteção individual e coletiva

Utilização de equipamento de proteção individual como óculos, luvas e jaleco; e equipamento de proteção coletiva como capelas de exaustão química durante a condução dos ensaios.

3.6.2. Condicionamento da coluna cromatográfica, detecção e quantificação

Diariamente, a coluna era submetida ao procedimento de condicionamento visando assegurar o funcionamento correto e efetivo da mesma. Esse consistiu na permanência da coluna, injetor e detector em determinadas temperaturas durante um período de tempo. Tais condições podem ser visualizadas a seguir:

- Temperatura do injetor: 270 °C
- Temperatura do detector: 310°C
- Temperatura da coluna: 260°C
- Tempo: 1 h

As condições de operação do sistema de CG-DIC foram as seguintes:

- Coluna 5% fenil-metil silicone 30 m x 0,53 mm x 2,65 µm HP-5 (S/N: US7126326H)
- Volume de injeção: 2 µL
- Modo de injeção: Splitless ou sem divisão de fluxo
- Gás arraste: He
- Pressão: 60 kpa
- Fluxo da coluna: 10,14 mL/min
- Temperatura do injetor: 210 °C
- Temperatura do detector: 250 °C
- Temperatura da coluna: 100°C (1 min) a 180°C (3 m in), velocidade 4°C/min
- Tempo de corrida: 24 min

3.7. Caracterização do padrão e qualificação do equipamento

Cabe ressaltar que a validação foi precedida por dois procedimentos a entender: caracterização do padrão de CAP adquirido e qualificação do equipamento de análise (CG-DIC).

O padrão foi caracterizado de dois modos, através da determinação do ponto de fusão e espectroscopia por infravermelho. Os resultados confirmaram que o produto adquirido tratava-se da substância de interesse.

Uma vez que o padrão de CAP adquirido não se tratava de uma substância de referência certificada, sua pureza foi estudada. O objetivo foi confirmar se a pureza era aquela declarada pelo fabricante e, fundamentalmente, estimar um valor para o cálculo da incerteza. Como declarado pelo fabricante, a pureza da CAP é igual ou superior a 99%. A incerteza da pureza, não disponibilizada, foi calculada a partir da realização de cinco determinações de pureza do padrão. Adiante serão apresentados mais detalhes.

Procedeu-se também a qualificação do sistema cromatográfico através do POP INCQS n° 65.31.20.117. O objetivo era garantir que o CG-DIC apresente condições adequadas de uso. Com a utilização de material de referência certificado, realizaram-se ensaios para avaliar aspectos como precisão e exatidão do fluxo; precisão e arraste do injetor; e linearidade, ruído e deriva do detector. Todos os parâmetros encontravam-se dentro de critérios de avaliação estabelecidos.

3.8. Validação intralaboratorial

O procedimento para validação intralaboratorial foi basicamente descrito por Souza (2007). A adequação ao propósito do método foi determinada a partir dos resultados de parâmetros como faixa de trabalho, linearidade, efeitos de matriz, seletividade, recuperação, repetitividade, precisão intermediária, limites de detecção e quantificação. Salienta-se que a seletividade, a precisão intermediária e os limites de detecção e quantificação foram determinados segundo Lanças (2004); INMETRO (2007) e ICH (1996); e Frehse e Thier (1991), respectivamente.

3.8.1. Faixa de trabalho (FT)

A faixa de trabalho foi determinada observando-se critérios amplamente reconhecidos. Os níveis de trabalho devem pertencer, aproximadamente, ao intervalo de $0,1 < FT < 2$ do limite de restrição (FRAUNHOFER, 1994), 15 mg/kg de alimento. Assim, os níveis de trabalho deveriam constar do intervalo entre 1,5 e 30 mg/kg.

3.8.2. Linearidade

A linearidade foi realizada através de ensaios com soluções padrão. Foi preparada uma curva analítica $y = a + bx$, com níveis de concentração igualmente espaçados 2; 8; 14; 20; 26 e 32 mg/L, sendo três repetições independentes de cada nível. Alíquotas de 20; 80; 140; 200; 260 e 320 μ L, respectivamente, das soluções estoque de CAP foram utilizadas para a confecção da curva analítica. As soluções foram preparadas e analisadas aleatoriamente durante três dias, sendo dois níveis por dia. Brancos foram preparados a cada corrida, como ferramenta de controle de qualidade.

A linearidade foi avaliada através da estimativa dos parâmetros pelo método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO), inspeção visual dos dados e gráficos e tratamento de valores aberrantes. O MMQO, que minimiza a soma dos quadrados dos resíduos (erros) da regressão é utilizado para estimar os parâmetros de regressão. Os valores aberrantes foram tratados pelo teste de resíduos padronizados Jackknife, o qual foi aplicado consecutivamente até que novos valores aberrantes não fossem detectados ou até exclusão máxima de 22,2% do número de análises (BELSEY, KUH e WELSCH, 1980; HORWITZ, 1995). O MMQO parte da premissa que os resíduos seguem a distribuição normal, têm variância constante ao longo do eixo x e são independentes. Tais premissas relacionadas à análise de regressão foram avaliadas quanto à normalidade por Ryan e Joiner (1976); homoscedasticidade por Levene (1960) e Brown e Forsythe (1974); e independência dos resíduos da regressão por Durbin e Watson (1951). O teste F foi conduzido para verificar o ajuste ao modelo linear por meio da avaliação da significância da regressão (DRAPER e SMITH, 1998).

Estimativas dos parâmetros pelo MMQO

Num primeiro momento, há a inspeção visual dos dados e a construção do gráfico das respostas analíticas versus concentrações do analito. Os parâmetros da regressão α e β são estimadas como a e b , respectivamente, correspondentes aos valores que minimizam a soma de quadrados dos resíduos da regressão $\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2$ sendo \hat{y}_i o valor estimado de Y_i para um dado valor de X_i quando a e b são determinados.

As estimativas de inclinação b e interseção a da reta ajustada estão demonstradas nas Equações E.1 e E.2, respectivamente.

$$b = \frac{S_{xy}}{S_{xx}} \quad \text{Equação E.1}$$

$$a = \bar{y} - b\bar{x} \quad \text{Equação E.2}$$

sendo

$$S_{xy} = \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y}) = \frac{\sum_{i=1}^n x_i y_i - \sum_{i=1}^n x_i \sum_{i=1}^n y_i}{n}$$

$$S_{xx} = \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 = \frac{\sum_{i=1}^n x_i^2 - \left(\sum_{i=1}^n x_i\right)^2}{n}$$

$$\bar{y} = \frac{\sum_{i=1}^n y_i}{n}$$

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$$

x_i = concentração conhecida do analito

y_i = resposta medida

n = número de pontos da curva de calibração

Para cada concentração x_i , no qual uma resposta y_i está disponível, o resíduo e_i é dado pela equação E.3

$$e_i = y_i - \hat{y}_i \quad \text{Equação E.3}$$

sendo

\hat{y}_i = variável estimada pela equação de regressão

As variâncias de inclinação s_b^2 , da interseção s_a^2 e dos resíduos da regressão s_{res}^2 são calculadas pelas equações E.4, E.5 e E.6.

$$s_b^2 = \frac{s_{res}^2}{S_{xx}} \quad \text{Equação E.4}$$

$$s_a^2 = s_{res}^2 \frac{\sum_{i=1}^n x_i^2}{nS_{xx}} \quad \text{Equação E.5}$$

$$s_{res}^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{n-2} \quad \text{Equação E.6}$$

O coeficiente de determinação do ajuste R^2 é definido pela equação E.7.

$$R^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (\hat{y}_i - \bar{y})^2}{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2} \quad \text{Equação E.7}$$

Os valores estimados para a inclinação e interseção, assim como as suas respectivas variâncias, são utilizados para construir a equação a ser utilizada para estimar as concentrações de amostras. Os resíduos da regressão computados são empregados nos testes subseqüentes.

Tratamento de valores aberrantes

O gráfico dos resíduos da regressão versus os níveis de concentração é construído. Duas linhas pontilhadas horizontais correspondentes a $\pm t_{(1-\alpha/2; n-2)} S_{res}$ são utilizadas para indicar uma variabilidade aceitável entre os resíduos de regressão, sendo os pontos fora desses limites entendidos como tendências. Os valores aberrantes são avaliados pelo método de resíduos padronizados Jackknife, cuja estatística é o resíduo padronizado Jackknife J_{ei} , calculado para cada ponto da curva analítica e descrito na equação E.8.

$$J_{ei} = r_i \sqrt{\frac{n-p-1}{n-p-r_i^2}} \quad \text{Equação E.8}$$

sendo

p = número de parâmetros do modelo

$r_i = \frac{e_i}{s_{ei}}$, resíduo padronizado

$s_{ei} = s_{res} \sqrt{1-h}$, erro padrão do resíduo

$h_i = \frac{1}{n} + \frac{(x_i - \bar{x})^2}{S_{xx}}$, leverage

Os resíduos padronizados Jackknife seguem a distribuição de $t_{(1-\alpha/2; n-p-1)}$. Valores de J_{ei} maiores que o valor de t crítico para o nível de significância 0,05 foram considerados aberrantes (BELSLEY, KUH e WELSCH, 1980) e removidos até o limite percentual de 22,2% dos dados tratados (HORWITZ, 1995) ou até a última repetição de um nível de concentração. O MMQO foi recalculado a cada exclusão de valores aberrantes.

Teste de normalidade

A normalidade dos resíduos da regressão foi avaliada pelo teste de Ryan-Joiner, que se utiliza do teste de hipóteses para confirmar se os resíduos seguem a distribuição normal e, portanto, os desvios da normalidade não seriam significativos.

A estatística do teste é o coeficiente de correlação de Ryan-Joiner R . A hipótese nula é rejeitada se os coeficientes R são inferiores aos valores críticos estabelecidos. Os resíduos foram colocados em rol e foi construído um gráfico dos valores dos resíduos *versus* valores percentis estimados para uma distribuição normal reduzida. Um gráfico dos resíduos ordenados de uma amostra (e_i) de tamanho n versus os pontos dos percentis de uma distribuição normal reduzida (q_i) foi construído. Os quantis normais foram obtidos pela equação E.9.

$$q_i = \phi^{-1} \left\{ \frac{(i - 3/8)}{(n + 1/4)} \right\}, i = 1, \dots, n \quad \text{Equação E.9}$$

sendo

q_i = valor normal esperado

ϕ^{-1} = inverso de uma função de distribuição normal padrão

O coeficiente de correlação entre e_i e q_i foi calculado conforme equação E.10

$$R_{eq} = \frac{S_{eq}}{\sqrt{S_{ee} \times S_{qq}}} \quad \text{Equação E.10}$$

sendo

$$S_{eq} = \sum_{i=1}^n (e_i - \bar{e})(q_i - \bar{q}) = \sum_{i=1}^n e_i q_i - \sum_{i=1}^n e_i \sum_{i=1}^n q_i / n$$

$$S_{ee} = \sum_{i=1}^n (e_i - \bar{e})^2 = \sum_{i=1}^n e_i^2 - \left(\sum_{i=1}^n e_i \right)^2 / n$$

$$S_{qq} = \sum_{i=1}^n (q_i - \bar{q})^2 = \sum_{i=1}^n q_i^2 - \left(\sum_{i=1}^n q_i \right)^2 / n$$

$$\bar{e} = \frac{\sum_{i=1}^n e_i}{n}$$

$$\bar{q} = \frac{\sum_{i=1}^n q_i}{n}$$

Se o gráfico obedecer a uma linha reta, os dados seguem uma distribuição normal. Caso contrário, o gráfico apresentará algum grau de curvatura ou distribuição aleatória de dados e os mesmos serão provenientes de uma outra distribuição de probabilidade.

Os coeficientes de correlação críticos para conjunto de dados pertencentes à distribuição normal foram obtidos para o nível de significância igual a 0,05 pela

equação E.11 (RYAN e JOINER, 1976). Dessa forma, o resultado gráfico pôde ser confirmado pelo cálculo do coeficiente R .

$$R_{crit} \approx 1,0063 - \frac{0,1288}{\sqrt{n}} - \frac{0,6118}{n} + \frac{1,3505}{n^2} \quad \text{Equação E.11}$$

Teste de homoscedasticidade das variâncias dos resíduos

O teste de Levene (LEVENE, 1960) modificado por Brown e Forsythe (1974) foi utilizado para avaliar a homogeneidade das variâncias, a partir da hipótese nula de que as variâncias dos resíduos da regressão não diferem entre si, ou seja, há homoscedasticidade. Para a hipótese alternativa as variâncias dos resíduos seriam diferentes, havendo, no caso, heteroscedasticidade. A estatística do teste é o F de Levene F_L . No caso em questão, os resíduos foram divididos em dois grupos n_1 e n_2 , para 1 grau de liberdade, em que $t = \sqrt{F}$, e calculou-se a estatística t de Levene t_L . A hipótese nula é descartada quando t_L for superior ao t crítico $t_{(1-\alpha/2; n_1+n_2-2)}$. Os grupos foram distribuídos eqüitativamente, tendo o cuidado para não separar repetições de um mesmo nível em grupos distintos. As medianas dos resíduos de cada grupo \tilde{e}_1 e \tilde{e}_2 foram calculadas e obtidas as diferenças absolutas entre as medianas e os resíduos dos respectivos grupos $d_{1j} = |\tilde{e}_1 - e_{1j}|$ e $d_{2j} = |\tilde{e}_2 - e_{2j}|$. A média das diferenças \bar{d}_k e a soma dos quadrados dos desvios SQD_k dos valores \bar{d}_{kj} de cada grupo $k = 1$ e $k = 2$ foram calculadas. O valor de t_L foi obtido pela equação E.12.

$$t_L = \frac{(\bar{d}_1 - \bar{d}_2)}{\sqrt{\left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}\right) s_p^2}} \quad \text{Equação E.12}$$

sendo

$\bar{d}_k = \sum |\tilde{e} - e_{kj}| / n_k$, média dos módulos das diferenças entre o j-ésimo resíduo e a mediana de cada grupo $k = 1$ e $k = 2$

n_k = número de observações em cada grupo

\tilde{e}_k = mediana de cada grupo

$s_p^2 = \frac{(SQD_1 + SQD_2)}{(n_1 + n_2 - 2)}$, variância combinada

$SQD_k = \sum_{j=1}^{n_k} (\tilde{e}_k - e_{kj})^2$, soma dos quadrados dos desvios entre cada j-ésimo resíduo e a mediana de seu k-ésimo grupo, para cada grupo.

Caso t_L seja inferior ao valor crítico $t_{(1-\alpha/2; n_1+n_2-2)}$, há a indicação de homoscedasticidade, não havendo razões para rejeitar a hipótese nula e acreditar que a variância dos resíduos não seja constante. A significância p também deve ser superior a 0,05 (LEVENE, 1960; BROWN e FORSYTHE, 1974).

Teste de independência dos resíduos

A autocorrelação ou independência dos resíduos da regressão é verificada pelo teste de Durbin-Watson, considerando-se a hipótese nula de que não há autocorrelação entre os resíduos, ou seja, são independentes; e a hipótese alternativa de que há autocorrelação entre os resíduos e, portanto, não são independentes. Assumindo-se que os resíduos e_i são variáveis independentes, a autocorrelação entre os resíduos seria $\rho_s = 0$ (hipótese nula). Essa hipótese foi testada contra a alternativa em que $\rho_s = \rho (\rho \neq 0 \text{ e } |\rho| < 1)$. A estatística de Durbin-Watson é a ferramenta utilizada para a avaliação e está descrita na equação E.13.

$$d = \frac{\sum_{i=2}^n (e_i - e_{i-1})^2}{\sum_{i=1}^n e_i^2} \quad \text{Equação E.13}$$

Para cada grupo de dados, existem dois limites críticos d_L (inferior) e d_U (superior). Caso o valor de d esteja entre esses limites, o teste é inconclusivo. Valores de $d < d_L$ indicam autocorrelação e a hipótese nula é rejeitada para um nível de significância de 2α ; enquanto valores de $d > d_U$ indicam independência e a não rejeição da hipótese nula. O valor de d varia de zero a quatro. Se o valor converge para dois significa que não há autocorrelação e os resíduos são independentes. No mesmo sentido, se os valores se afastam de dois para zero ou quatro, então, a autocorrelação aumenta. Geralmente, valores entre 1,5 e 2,5 podem ser utilizados como ponto de corte inferior e superior (DURBIN e WATSON, 1951). Os valores limites de d são estimados pelas equações E.14 e E.15 para nível de significância igual a 0,05.

$$d_L \approx 1,9693 - \frac{2,8607}{\sqrt{n}} - \frac{3,4148}{n} + \frac{16,6400}{n^2} \quad \text{Equação E.14}$$

$$d_U \approx 1,9832 - \frac{3,0547}{\sqrt{n}} - \frac{1,3862}{n} + \frac{16,3662}{n^2}$$

Equação E.15

Teste de significância da regressão e do desvio da linearidade

Para a realização do teste, a variabilidade total das respostas é dividida em soma do quadrado dos resíduos da regressão (em torno da regressão) e soma dos quadrados devido à regressão. A soma de quadrados dos resíduos da regressão é separada em soma dos quadrados do desvio da linearidade (falta de ajuste ao modelo) e soma dos quadrados do erro puro. A segmentação da variabilidade total das respostas, em soma de quadrados entre níveis e soma de quadrados do erro puro (dentro dos níveis), também foi feita para auxiliar os cálculos.

A tabela de análise de variância para o teste é construída a partir das equações dispostas na tabela 4. A estatística do teste é a razão entre as variâncias, que segue a distribuição de F com os graus de liberdades correspondentes.

Tabela 4 - Análise de variância para significância da regressão e desvio de linearidade ($\alpha=0,05$)

<i>FV</i>	<i>GL</i>	<i>SQ</i>	<i>QM</i>	<i>F</i>
Regressão	1	$\frac{\left[\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y}) \right]^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$	$\frac{SQ_{regr}}{GL_{regr}}$	$\frac{QM_{regr}}{s_{res}^2}$
Resíduos	$n - 2$	$\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2$	$\frac{SQ_{res}}{GL_{res}} = s_{res}^2$	
Desvio da linearidade	$u - 2$	$\sum_{k=1}^u n_k (\hat{y}_k - \bar{y}_k)^2$	$\frac{SQ_{desv}}{GL_{desv}}$	$\frac{QM_{desv}}{QM_{Erro\ puro}}$
Entre níveis	$u - 1$	$\sum_{k=1}^u n_k (\bar{y}_k - \bar{y})^2$		
Erro puro	$n - u$	$\sum_{k=1}^u \sum_{j=1}^{n_k} (y_{kj} - \bar{y}_k)^2$	$\frac{SQ_{Erro\ puro}}{GL_{Erro\ puro}}$	
Total	$n - 1$	$\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2$	$\frac{SQ_{Total}}{GL_{Total}}$	

FV = fonte de variação, GL = grau de liberdade, SQ = soma dos quadrados, QM = quadrado médio, F = razão entre variâncias, n = número de i pontos de curva analítica, u = número de níveis de concentração, n_k = número de pontos j em cada nível de concentração k , y_i = resposta medida, x_i = concentração conhecida do analito, \hat{y}_i = variável dependente estimada pela equação de regressão, \bar{y} = média das respostas medidas, \bar{x} =

média das concentrações conhecidas, y_{kj} = j-ésima resposta medida do k-ésimo nível de concentração, \bar{y}_k = média de respostas medidas do k-ésimo nível de concentração \hat{y}_k = variável dependente estimada pela equação de regressão para o k-ésimo nível de concentração.

Para avaliação da regressão, é testada a hipótese nula de que a regressão linear não é significativa (ou seja, a variação dos valores de y_i não é explicada pela regressão) e a hipótese alternativa de que a regressão linear é significativa (variação dos valores de y_i é explicada pela regressão). A hipótese nula é rejeitada se o valor de F for maior que o valor crítico $F_{(1-\alpha;1;n-2)}$. Quanto à significância do desvio da linearidade, a hipótese nula de adequação ao modelo linear simples (não há desvio da linearidade) é confrontada com a hipótese alternativa de inadequação ao modelo linear (há desvio da linearidade). A hipótese nula é rejeitada quando o valor de F for maior que o valor crítico $F_{(1-\alpha;u-2;n-u)}$. A significância da distribuição F (p) também deve ser analisada. Para a regressão linear dos resíduos, p deve ser inferior a 0,001, enquanto para o desvio da linearidade, p deve ser superior a 0,05.

3.8.3. Efeito Matriz

A avaliação do efeito de matriz proposta por Souza (2007) sugere a confecção de duas curvas do analito: uma, denominada de solventes, originada a partir de soluções com padrão; e outra, denominada de matriz, originada de amostras.

A curva e as soluções do analito em solvente foram aquelas já utilizadas para a avaliação da linearidade. No item anterior, foram descritos todos os testes aos quais se submeteram os dados.

A curva da matriz foi checada pelo método de adição. Soluções de adição foram preparadas nos níveis de 2; 8; 14; 20; 26 e 32 mg/mL, sendo três repetições independentes de cada nível. O método proposto por Souza (2007) sugere a utilização de amostra branca ou material de referência certificado (MRC). Porém, diante da dificuldade de obtenção de tais amostras, as soluções foram adicionadas a uma amostra denominada AMV, com resposta média e migração estimada por ensaios. Foram realizados vinte ensaios com esse intuito. Tais valores também foram utilizados na determinação de outros parâmetros de desempenho como repetitividade e recuperação.

As áreas de cada ensaio foram subtraídas a área média da amostra AMV para obtenção somente da resposta relativa às soluções de adição. Tais valores foram então utilizados em todo tratamento estatístico e na confecção da curva analítica da matriz. O preparo e análise das curvas do analito em solvente e na matriz foram realizados sob condições emparelhadas.

Os dados experimentais obtidos para as curvas do analito em solvente e matriz foram analisados pelo MMQO, e pelas premissas descritas no item 3.8.2. Satisfeitas as premissas, a próxima etapa foi avaliar a homogeneidade das variâncias dos resíduos da regressão. A hipótese nula de que não há diferença entre as variâncias dos resíduos (há homoscedasticidade) foi testada contra a hipótese alternativa de que as variâncias dos resíduos são diferentes (há heteroscedasticidade). O parâmetro do teste é a razão entre as variâncias F sendo a maior variância no numerador e a menor no denominador (Equação E.16). A hipótese nula é rejeitada se o valor de F for maior que o valor crítico $F_{(1-\alpha/2; n_1-2; n_2-2)}$ (SNEDECOR e COCHRAN, 1989).

$$F = \frac{s_{res_1}^2}{s_{res_2}^2} \quad \text{Equação E.16}$$

Havendo homoscedasticidade, as inclinações e interseções das curvas de solventes e de matriz seriam comparadas pelo teste t com variâncias combinadas (Equações E.17 e E.18). A hipótese nula de que as inclinações ou interseções não diferem entre si seria testada contra a hipótese alternativa de que as mesmas são diferentes. A hipótese nula seria rejeitada se valor de t_b ou t_a for superior ao crítico $t_{(1-\alpha/2; n_1+n_2-4)}$ (ARMITAGE e BERRY, 1994).

$$t_b = \frac{|b_1 - b_2|}{\sqrt{\frac{s_p^2}{S_{xx_1}} + \frac{s_p^2}{S_{xx_2}}}} \quad \text{Equação E.17}$$

$$t_a = \frac{|a_1 - a_2|}{\sqrt{\frac{s_p^2 \sum x_1^2}{n_1 S_{xx_1}} + \frac{s_p^2 \sum x_2^2}{n_2 S_{xx_2}}}} \quad \text{Equação E.18}$$

sendo que índices 1 e 2 referentes, respectivamente, às curvas do analito no solvente e em matriz;

$$s_p^2 = \frac{(n_1 - 2)s_{res_1}^2 + (n_2 - 2)s_{res_2}^2}{n_1 + n_2 - 4}$$

3.8.4. Seletividade, Repetitividade, Precisão intermediária e Recuperação

A seletividade foi determinada analisando-se uma amostra em duas colunas com características diferentes, uma mais polar (5% fenil metil silicone) e outra apolar (100% dimetilsiloxano). As condições cromatográficas no experimento com a coluna apolar foram alterados, enquanto o ensaio com a coluna mais polar foi realizado conforme descrito no item 3.6.2. A temperatura inicial da coluna apolar foi reduzida para 80°C e o fluxo na coluna ajustado para 1mL/min. Os demais parâmetros permaneceram inalterados.

A repetitividade e a recuperação sob condições equivalentes (mesmo analista, mesmo equipamento, mesmo laboratório, mesmos reagentes e curto período de tempo) foram avaliadas por ensaios de migração com a amostra AMV já mencionada no item 3.8.3.. As amostras AMV foram submetidas ao ensaio de migração e, posteriormente, adicionadas por alíquotas em níveis correspondentes a 2; 8; 14; 20; 26 e 32 mg/L, com pelo menos cinco repetições genuínas de cada nível, dois níveis por dia. As alíquotas foram tomadas como se a amostra AMV não apresentasse qualquer resíduo de CAP. As áreas obtidas em cada nível foram subtraídas pela resposta média da amostra AMV com objetivo de estimar somente a resposta relativa às soluções de adição. Tais valores foram então utilizados em todo tratamento estatístico.

A precisão intermediária ou precisão intercorridas define a precisão dentro de um mesmo laboratório para medidas obtidas por diferentes analistas, ou em diferentes dias, ou por equipamentos diferentes (BRUCE, MINKKINEN e RIEKKOLA, 1998). Para determinação do parâmetro foram realizadas 10 repetições de uma mesma amostra em três dias distintos com intervalos de 7 e 13 dias.

Seletividade

O procedimento já descrito teve por objetivo verificar a existência de co-eluição da CAP com outros componentes no sistema cromatográfico. Ao final, foram comparados os cromatogramas das duas colunas (mais polar e apolar) quanto a existência de picos próximos ao tempo de retenção da CAP. Esse fator foi considerado suficiente para determinação da seletividade.

Recuperação

A recuperação aparente foi estimada a partir de repetições de amostras adicionadas em cada nível da amostra. Os valores aberrantes das recuperações

aparentes foram avaliados segundo teste de Grubbs. A recuperação aparente foi calculada através da equação E.19.

$$R_i = \frac{(M_{iA} - M_{iB}) \times 100}{C_{iT}} \quad \text{Equação E.19}$$

sendo

M_{iA} = migração estimada de CAP para as amostras adicionadas

M_{iB} = migração estimada de CAP para a amostra AMV

C_{iT} = concentração teórica adicionada

Após análise inicial dos dados os valores de recuperação aparente de cada nível foram dispostos em rol para avaliação de valores aberrantes pelo teste de Grubbs. Os parâmetros de G_1 (equações E.20 e E.21), G_2 (equação E.22) e G_3 (equações E.23 e E.24) foram realizados para os grupos de resultados de recuperação aparente de cada nível de concentração.

$$G_{1L} = \frac{|\bar{R} - R_1|}{s} \quad \text{Equação E.20}$$

$$G_{1U} = \frac{|\bar{R} - R_n|}{s} \quad \text{Equação E.21}$$

$$G_2 = \frac{R_n - R_1}{s} \quad \text{Equação E.22}$$

$$G_{3L} = 1 - \left(\frac{(n-3)s_{n-2}^2}{(n-1)s} \right) \quad \text{Equação E.23}$$

$$G_{3U} = 1 - \left(\frac{(n-3)s_{n-2}^2}{(n-1)s^2} \right) \quad \text{Equação E.24}$$

sendo

$$\bar{R} = \frac{\sum_{i=1}^n R_i}{n}, \text{ média da recuperação aparente, no nível de migração estudado.}$$

n = nº de observações do nível de migração estudado.

R_i = menor recuperação aparente, no nível de migração estudado.

R_n = maior recuperação aparente, no nível de migração estudado.

$s = \sqrt{\frac{\sum (R_i - \bar{R})^2}{n-1}}$, desvio padrão das recuperações aparentes, no nível de migração estudado.

$s_{n-2}^2 = \frac{\sum (R_i - \bar{R})^2}{n-2-1}$, variância das recuperações aparentes, excluindo os dois valores extremos, no nível de migração estudado.

$s^2 = \frac{\sum (R_i - \bar{R})^2}{n-1}$, variância das recuperações aparentes, no nível de migração estudado.

Valores da estatística de Grubbs superiores a valores críticos para um nível de significância de 0,05 foram considerados aberrantes. Os resultados médios de recuperação aparente foram comparados a critérios de aceitabilidade para exatidão descritos pela UE (2002). A recuperação média dentro de tais valores indica que não há falta de exatidão. O valor deve ser analisado para cada nível de concentração separadamente.

Repetitividade

Os experimentos conduzidos sob condições de repetitividade permitem que a precisão seja expressa em termos de coeficiente de variação $CV(\%)$ (equação E.25) dos resultados de recuperação aparente obtidos em cada nível estudado.

$$CV(\%) = RSD_r = \frac{100 \times s}{\bar{R}} \quad \text{Equação E.25}$$

No entanto, a estatística adotada para avaliação da precisão foi o *HorRat*, obtido a partir do RSD_R e $PRSD_R$, sob condições de reprodutibilidade. O $PRSD_R$, calculado por $2C^{-0,15}$ (sendo C a concentração do analito), é um critério de aceitabilidade estimado pela função de Horwitz e Albert (2006). Para condições de repetitividade, o *HorRat* (equação E.26) pode ser obtido pelo $CV(\%)$ dos resultados de recuperação aparente dividido pelo $PRSD_r$ estimado. Esse último é igual a, no máximo, dois terços do valor do $PRSD_R$ (HORWITZ e ALBERT, 2006; UE, 2002). Em casos onde o limite de restrição é superior a 0,1 mg/kg, o valor do *HorRat* deve ser inferior ou igual a 2.

$$HorRat = \frac{CV(\%)}{\frac{2}{3} PRSD_R} \quad \text{Equação E.26}$$

Precisão intermediária

Os experimentos conduzidos em três diferentes dias permitem avaliar a precisão intermediária através do $CV(\%)$. O coeficiente de variação é obtido a partir do desvio padrão da precisão intermediária (equação E.27) e da média das mensurações dos três dias, sendo comparado com critérios de aceitabilidade estimados pela função de Horwitz e Albert (2006) e UE (2002), de preferência, por faixa de concentração (INMETRO, 2007; ICH, 1996). Salienta-se que resultados com valores da estatística de Grubbs superiores a valores críticos para um nível de significância de 0,05 foram considerados aberrantes

$$S_i = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^t \sum_{k=1}^n (y_{jk} - \bar{y})^2}{t(n-1)}}, \quad \text{Equação E.27}$$

sendo:

S_i = desvio padrão da precisão intermediária (onde as variações intermediárias da precisão podem aparecer entre parenteses).

t = total de amostras ensaiadas

n = total de ensaios efetuados por amostra

j = número da amostra $j = 1, n$

k = número do ensaio da amostra j , $k = 1, n$

y_{jk} = valor do resultado k para a amostra j

\bar{y} = representa a média aritmética dos resultados da amostra j

3.8.5. Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção e quantificação foram determinados e baseados em referência distinta daquela utilizada até então. Os limites foram estimados graficamente a partir da inclinação e interseção da curva analítica como sugerido por Frehse e Thier (1991).

3.9. Incerteza de Medição

A metodologia adotada para a determinação de incerteza de medição baseia-se em recomendações da Eurachem/CITAC (2001).

A incerteza é um parâmetro associado ao resultado de uma medição, que caracteriza a dispersão de valores que poderiam ser atribuídas ao mensurando (Vocabulário Internacional de Termos Básicos e Genéricos em Metrologia - VIM). A incerteza de medição, em geral, compreende inúmeros componentes. Cada componente é caracterizado como uma fonte de incerteza associada a contribuições distintas. Assim, num primeiro momento, foram analisados e quantificados separadamente, dando origem ao que se denomina incerteza padronizada u_c . Para uma medição, a incerteza total é denominada de incerteza padronizada combinada $u_c(y)$. Contudo, na maioria das aplicações em química analítica deve ser utilizada a incerteza expandida U .

A identificação das fontes de incerteza obedeceu a critérios próprios de maior relevância sobre o valor do mensurando. Dentro da metodologia, poderiam ser enumerados diversos componentes de incerteza, porém, o trabalho ateve-se a três principais. A incerteza da diluição dos padrões, da curva analítica e da repetitividade do equipamento foram identificadas e consideradas mais relevantes para a determinação do parâmetro no método. A incerteza padronizada de cada componente foi estimada através das equações E.30, E.31 e E.32. A estimativa da incerteza da diluição dos padrões exige a determinação da incerteza da solução estoque e de cada padrão separadamente (equações E.28 e E.29, respectivamente). No caso, a determinação da incerteza das soluções estoque apresenta uma dificuldade, pois é necessário que a pureza do padrão esteja associada a um valor de incerteza de medição. O padrão de CAP disponível não se trata de um material de referência certificado no qual constaria um valor de pureza e incerteza. Diante desse fato, realizou-se procedimento alternativo para confirmação da pureza do padrão relatada pelo fabricante e o estabelecimento de uma incerteza aproximada. Com esse intuito, foram conduzidas cinco injeções originadas de repetições de análise. O desvio padrão dos resultados foi utilizado para o cálculo da incerteza.

$$u_{est} = \sqrt{\left(\frac{P_p \times u_m}{100 \times V_f}\right)^2 + \left(\frac{P_p \times m \times u_v}{100 \times V_f^2}\right)^2 + \left(\frac{u_p \times m}{100 \times V_f}\right)^2} \quad \text{Equação E.28}$$

sendo

u_{est} = incerteza da solução estoque

P_p = pureza do padrão de CAP

u_m = incerteza da pesagem da massa

V_f = volume final da solução

m = massa do padrão

u_v = incerteza do volume final

$u_p = \frac{s}{\sqrt{n}}$, incerteza da pureza do padrão definida por

s = desvio padrão das purezas mensuradas

n = número de repetições

$$u_{(P_n)} = \sqrt{\left(\frac{C_{est} \times u_{aliqu}}{V_f}\right)^2 + \left(\frac{V_{aliqu} \times u_v \times C_{est}}{V_f^2}\right)^2 + \left(\frac{V_{aliqu} \times u_{est}}{V_f}\right)^2}$$

Equação E.29

sendo

$u_{(P_n)}$ = incerteza do preparo do padrão

C_{est} = concentração da solução estoque

u_{aliqu} = incerteza do volume da alíquota

V_{aliqu} = volume da alíquota

$$u_{(dil)} = \sqrt{\left(\frac{u_{(P_1)}}{C_{P_1}}\right)^2 + \left(\frac{u_{(P_2)}}{C_{P_2}}\right)^2 + \dots + \left(\frac{u_{(P_n)}}{C_{P_n}}\right)^2}$$

Equação E.30

sendo

$u_{(dil)}$ = incerteza combinada da diluição dos padrões

C_{P_n} = concentração de cada padrão

$$u_{(Curva)} = \frac{s_{res}}{B_1} \times \sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \frac{(C_0 - \bar{C})^2}{S_{xx}}}$$

Equação E.31

sendo

$u_{(Curva)}$ = incerteza da curva

C_0 = concentração da amostra

\bar{C} = concentração média do padrão

p = número de repetições ou replicatas

$$s_{res} = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^n [A_j - A_{Esp}]^2}{n-2}}$$
, desvio padrão residual onde A_j = área medida; n = número de medições para confecção da curva analítica; $A_{Esp} = B_0 + B_1 \times C_j$, área esperada tendo B_0 = interseção da curva analítica; B_1 = inclinação da curva analítica; C_j = concentração do padrão.

$$S_{xx} = \sum_{j=1}^n (C_j - \bar{C})^2$$

$$u_{(rep)} = \frac{s_{\text{áreas}}}{\sqrt{p}} \quad \text{Equação E.32}$$

sendo

$s_{\text{áreas}}$ = desvio padrão das respostas (áreas) relativas à amostra em análise

Por sua vez, a incerteza padronizada de cada componente foi combinada de forma a imputar ao valor do mensurando uma incerteza (Equação E.33).

$$u_{Comb} = C_o \times \sqrt{(u_{dil})^2 + \left(\frac{u_{rep}}{C_o}\right)^2 + \left(\frac{u_{curva}}{C_o}\right)^2} \quad \text{Equação E.33}$$

Para que o valor verdadeiro do mensurando se encontre dentro de um intervalo com um nível de confiança de 95%, a incerteza combinada foi multiplicada por um fator de abrangência k (Equação E.34). O fator de abrangência para um nível de confiança de 95% é 2.

$$U = k \times u_{(Comb)} \quad \text{Equação E.34}$$

3.10. Revisão bibliográfica sobre a toxicologia da CAP

A localização dos artigos foi conduzida por meio de ferramentas de busca na rede internacional de computadores. Portais de pesquisa científica como *Science Direct*, Periódicos Capes, o sistema Toxnet de Medicina, o *Micromedex Healthcare Series* e documentos relativos às posições da *Environmental Protection Agency* (EPA) e *International Agency for Research on Cancer* (IARC) com relação à CAP foram utilizados. Os artigos científicos não disponíveis na internet foram requisitados pelo Comut, com

auxílio do Instituto Brasileiro de Informação em Ciência e Tecnologia que coordena o Catálogo Coletivo Nacional de Publicações Seriadas (CCN).

Essa revisão abordou principalmente, a toxicocinética, os efeitos da exposição humana e animal pelas vias cutânea, ocular e inalatória, a genotoxicidade *in vitro* e *in vivo*, a carcinogenicidade, bem como os efeitos sobre a reprodução e desenvolvimento dos animais.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Validação do método

Os resultados obtidos a partir de procedimentos já mencionados e referentes a validação do método são apresentados nos itens subsequentes.

4.1.1. Linearidade e curva analítica

A avaliação da linearidade e a confecção da curva analítica (figura 6) foram realizadas através do método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO). Para a utilização do MMQO, deve-se efetuar algum teste de modo a confirmar as premissas do método. As premissas devem ser satisfeitas, caso contrário, o MMQO não pode ser realizado. Estas se relacionam aos resíduos da regressão e dizem respeito a testes de normalidade, independência, autocorrelação e homogeneidade das variâncias dos resíduos, além da análise de variância da regressão e desvio da linearidade dos resíduos foram realizados. Os valores aberrantes foram analisados previamente. A cada exclusão, os testes eram novamente executados. A metodologia consta no item 3.8.2.

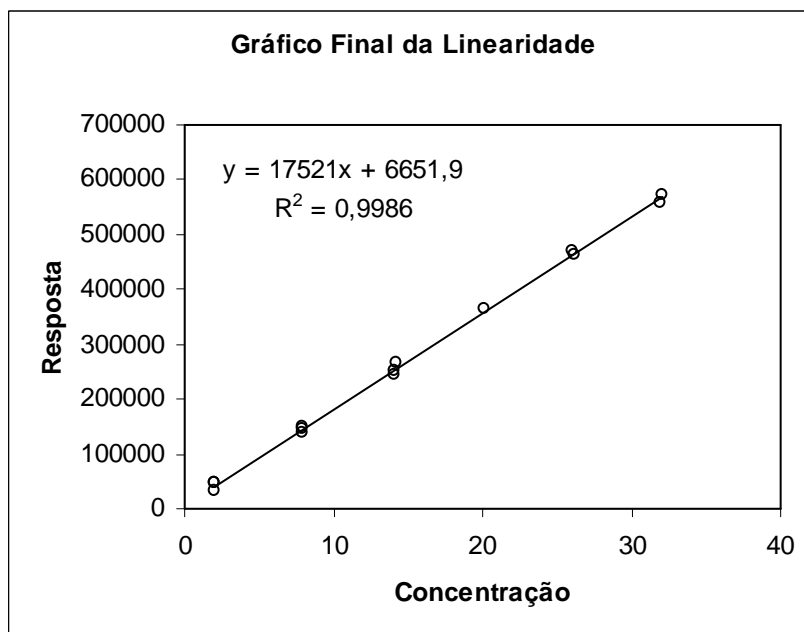


Figura 6 – Curva analítica da CAP em solvente (Área x Concentração em mg/L)

Tratamento de valores aberrantes

Após realização do teste de resíduos padronizados Jackknife, quatro repetições ou dados foram rejeitados (vide figura 7), permanecendo dentro do limite de 22,2% das mensurações estabelecido por Horwitz (1995). O MMQO assim como a identificação de valores aberrantes eram recalculados a cada rejeição de dados. Uma questão que pode ser discutida e que não é mencionada por Souza (2007) é a rejeição de valores num mesmo nível. Há a possibilidade da permanência de somente um dado no nível. Por exemplo, no nível de concentração 20 mg/L restou somente um dado após a exclusão dos valores aberrantes. Isso poderia ocasionar dificuldades quanto a realização de alguns testes de homoscedastidade, como no caso do teste de homogeneidade sugerido por Snedecor e Cochran (1989) que utiliza a variância do nível. Para o teste de homoscedasticidade proposto por Brown-Forsythe (1974) aqui empregado não existe qualquer empecilho. No entanto, precisa ser considerado que a existência de inúmeros aberrantes pode estar associado à ocorrência de erros sistemáticos. A realização de novo procedimento seria, então, a conduta mais correta.

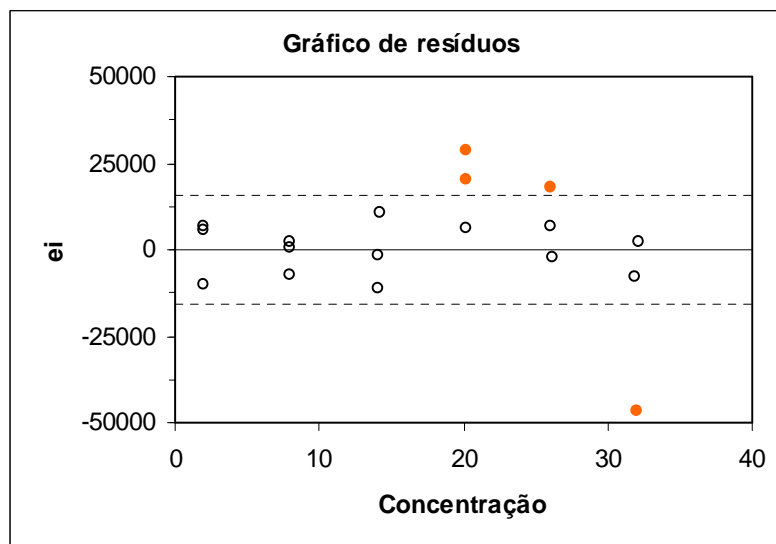


Figura 7 - Gráfico exploratório dos resíduos da regressão da curva analítica

Teste de normalidade dos resíduos

A figura 6 demonstra que os dados seguem a distribuição normal. Isso pode ser constatado de duas formas. Uma pelo coeficiente de correlação Ryan-Joiner (teste Ryan-Joiner). O coeficiente de correlação calculado (0,9755) foi superior ao valor crítico estabelecido de 0,9351 ($\alpha = 0,05$), não havendo razões para rejeitar a hipótese nula de que os dados seguem a distribuição normal. Outra seria pelo gráfico do valor normal esperado versus valor observado (Fig. 8). O gráfico que obedece a linha reta demonstra que os resíduos seguem uma probabilidade norma

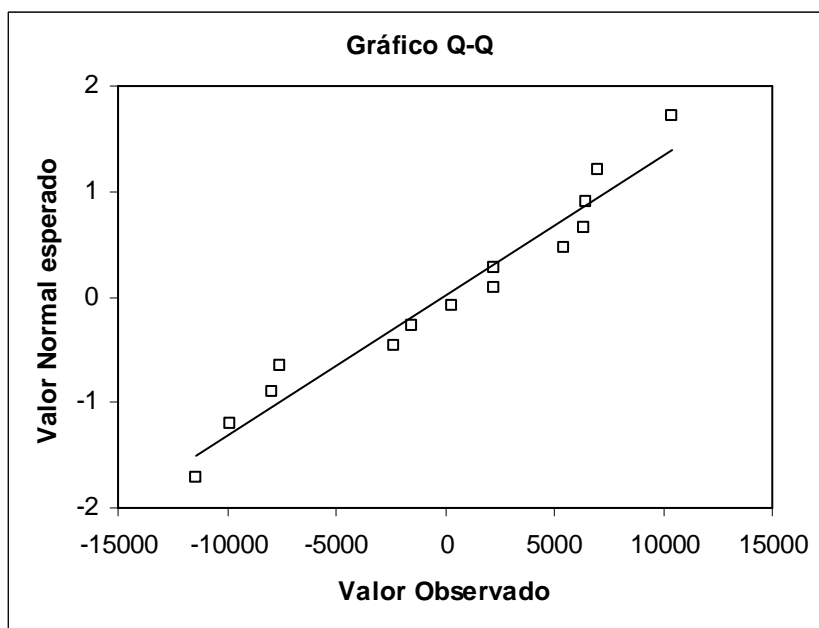


Figura 8 – Gráfico de probabilidade normal da curva analítica

Teste de homogeneidade das variâncias dos resíduos da regressão

O teste de Levene adaptado por Brown-Forsythe para avaliar a homogeneidade das variâncias dos resíduos foi realizado. As estatísticas de análise são os valores de t_L e a significância p . O valor de t_L calculado foi igual a 0,274 e inferior ao t_L tabelado de 2,18. A significância p calculada foi 0,79, superior a significância 0,05. Como os valores de t_L e da significância p calculados satisfizeram os critérios, é aceita a hipótese nula de que as variâncias dos resíduos da regressão são constantes e conclui-se que há homogeneidade das mesmas.

Teste de independência dos resíduos

A autocorrelação ou independência dos resíduos da regressão foi avaliada pelo teste de Durbin-Watson. A estatística do teste é o valor de d , inferiores ou superiores. O valor de d calculado foi igual a 1,52, acima dos valores críticos para d_L e d_U , respectivamente, 1,05 e 1,35 ($\alpha = 0,05$). Ou seja, a hipótese nula não foi rejeitada e confirmou-se a independência dos resíduos da regressão. A figura 9 representa graficamente a independência dos resíduos da regressão.

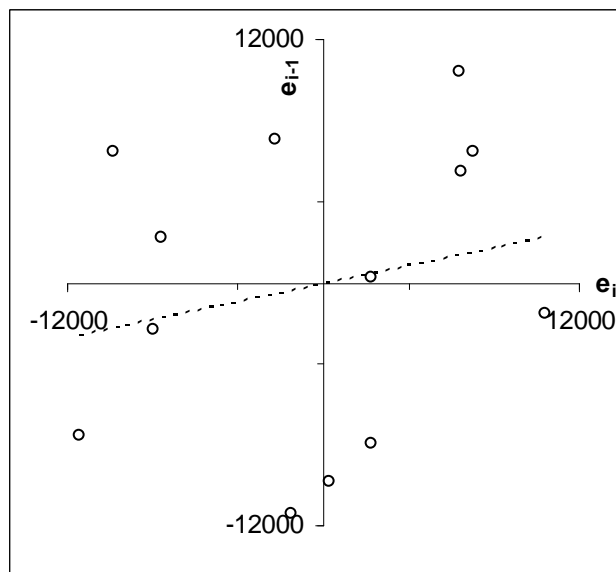


Figura 9 - Gráfico de Durbin-Watson da curva analítica ($e_i \times e_{i-1}$)

Análise de variância dos resíduos da regressão e desvio da linearidade

A regressão linear bem como o ajuste ao modelo foi confirmada através da ANOVA. Os dados são apresentados na tabela 5.

Tabela 5 – Resultados da análise de variância para significância da regressão e desvio de linearidade ($\alpha = 0,05$)

<i>FV</i>	<i>GL</i>	<i>SQ</i>	<i>QM</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	<i>Significância</i>
Regressão	1	$4,65 \times 10^{11}$	$4,65 \times 10^{11}$	8758,25	$1,48 \times 10^{-18}$	$p < 0,001$
Resíduos	12	$6,37 \times 10^8$	$5,31 \times 10^7$			
Desvio da linearidade	4	$5,83 \times 10^7$	$1,46 \times 10^7$	0,201	$9,31 \times 10^{-1}$	$p > 0,05$
Entre níveis	8	$4,65 \times 10^{11}$				
Erro puro	13	$5,78 \times 10^8$	$7,23 \times 10^7$			
Total	1	$4,65 \times 10^{11}$				

Regressões significativas ($p < 0,001$) e o ajuste ao modelo linear ($p > 0,05$) foram observados nos testes de F.

Ao final, a linearidade do método foi comprovada na faixa de trabalho de 2 a 32 mg/mL. A equação final de regressão foi $y = 6651,9 + 17521x$, sendo y a área do pico da CAP e x a concentração do analito.

4.1.2. Efeito matriz

A amostra AMV foi adicionada, nas concentrações de trabalho da curva analítica, e submetida ao ensaio de migração. As respostas obtidas foram subtraídas do valor estimado da amostra AMV. A resposta média (área) e a migração estimada para amostra AMV (M_{iA}) foram de 142087,5 e 7,73 mg/L, respectivamente. A curva analítica da CAP em matriz pode ser visualizada na Figura 10. Pelo teste padronizado de resíduos Jackknife, foram rejeitados quatro valores aberrantes.

Durante a avaliação do efeito matriz, Souza (2007) relata que somente os testes de normalidade e ajuste ao modelo linear são considerados requisitos. Porém, todos os testes de premissas foram realizados (tabela 6).

Tabela 6 – Testes de premissas para curva analítica em matriz ($\alpha = 0,05$)

Testes estatísticos	Estatística	Matriz	Valor crítico
<i>Normalidade</i>	<i>R</i>	0,9880	0,9383
<i>Homoscedasticidade</i>	$t_L; p$	0,302; $p = 0,77$	2,16; $p > 0,05$
<i>Independência</i>	<i>d</i>	2,05	$d_L=1,08; d_U=1,36$
<i>Regressão</i>	<i>p</i>	$1,06 \times 10^{-16}$	$< 0,001$
<i>Desvio da linearidade</i>	<i>p</i>	0,60	$> 0,05$

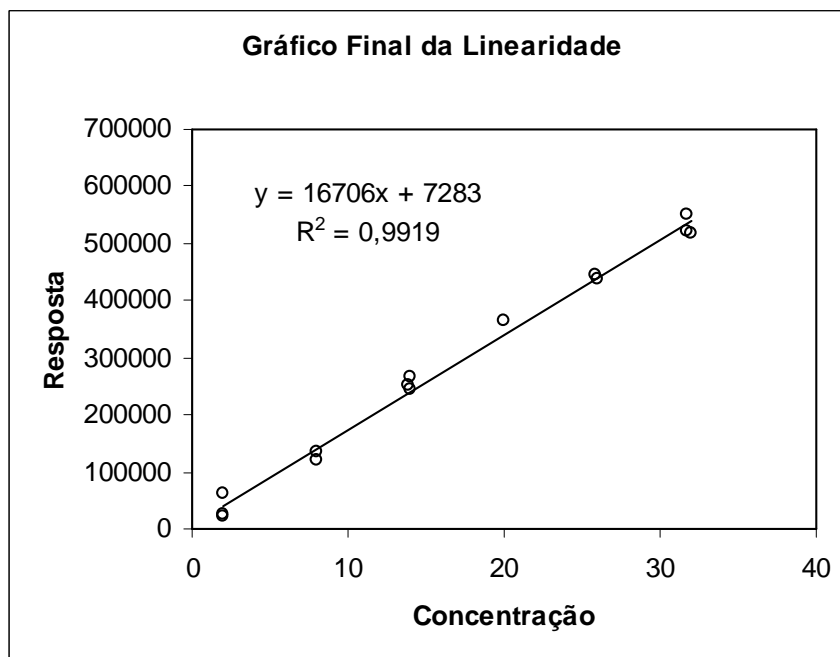


Figura 10 – Curva analítica da CAP em matriz (Área x Concentração em mg/L)

Os dados do analito em solvente foram aqueles obtidos no momento da avaliação da linearidade descritos no item 4.1.1.

Satisfeitas as premissas e confirmada a linearidade do analito em matriz, as etapas subsequentes como o teste de homoscedasticidade das variâncias dos resíduos e o teste t para variâncias combinadas foram realizados (tabela 7).

Tabela 7 – Resultados dos testes para avaliação do efeito matriz ($\alpha = 0,05$)

Testes estatísticos	Estatística	Calculado	Valor crítico
<i>Homoscedasticidade das variâncias dos resíduos</i>	F	0,16	2,06
<i>Teste t para variâncias combinadas</i>	$t_b; t_a$	$t_b = 1,75$ $t_a = 0,07$	2,06

Conforme apresentado na tabela 7, os resultados dos testes permitem afirmar que o método não apresenta efeito matriz, pois, estatisticamente ($\alpha = 0,05$), as curvas analíticas da CAP em solvente e em matriz se equivalem.

4.1.3. Seletividade

A seletividade foi determinada basicamente por inspeção gráfica onde se constatou a ausência de picos interferentes próximos as respostas da CAP em amostra analisada em colunas com características distintas, uma apolar e outra mais polar. O fato foi considerado suficiente para determinação da seletividade. A figura 11 apresenta os cromatogramas que sustentam tal colocação.

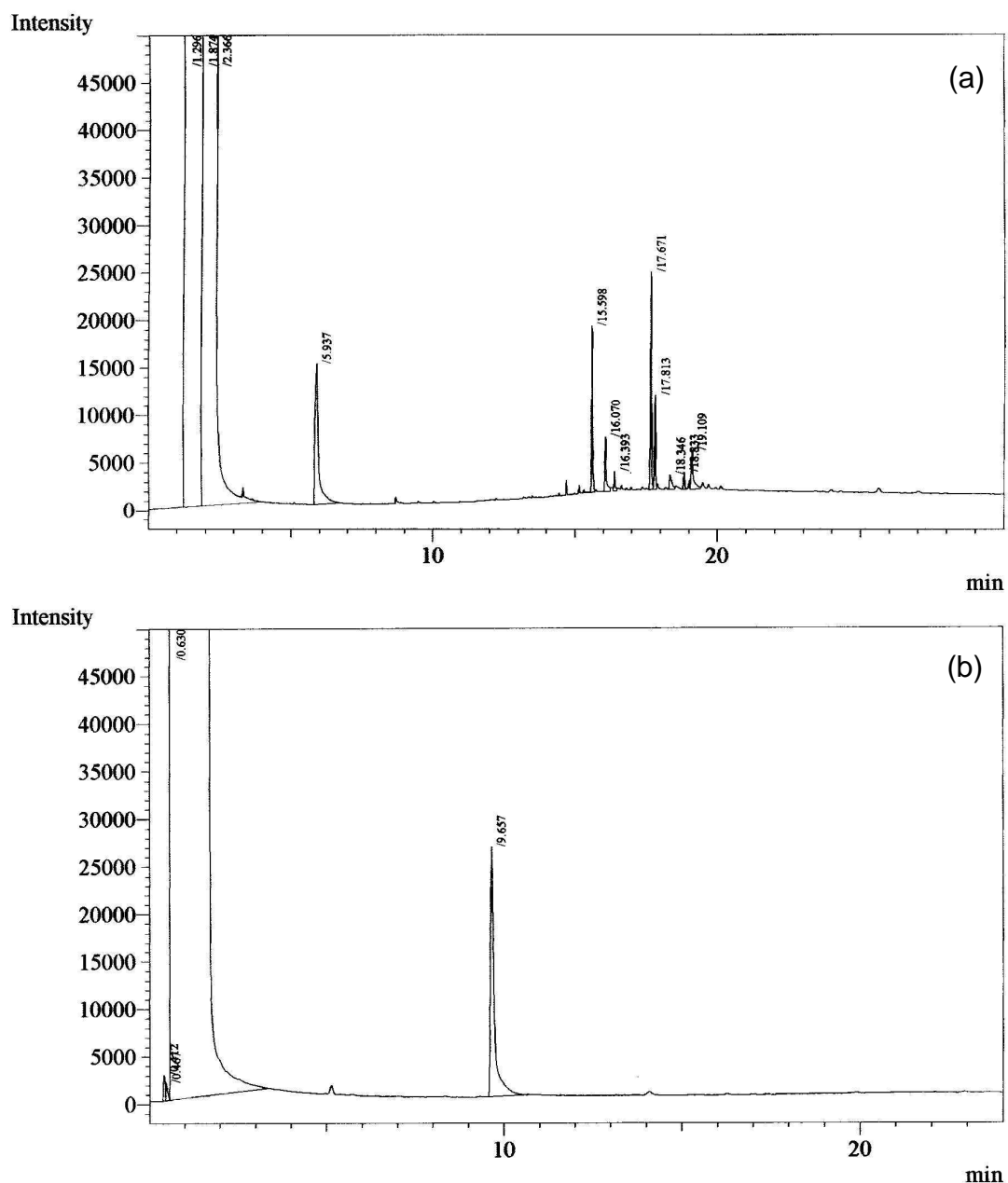


Figura 11 – (a) Cromatograma típico de uma amostra em coluna apolar HP-1; (b) cromatograma típico de uma amostra em coluna mais polar HP-5.

4.1.4. Recuperação

Os valores obtidos (tabela 8) para a recuperação média em cada nível de concentração encontram-se dentro de limites estabelecidos por Horwitz e Albert (2006) e UE (2002). Caso o laboratório não disponha de materiais de referência certificados para realização dos ensaios, Souza (2007) sugere que o método não seja caracterizado como exato. O adequado seria considerar que não há indicativo de falta de exatidão para o método.

4.1.5. Repetitividade

Baseando-se em critérios estabelecidos a partir da equação de Horwitz e Albert (2006), os valores de *HorRat* encontrados (tabela 8) indicam que o método apresenta repetitividade adequada.

Tabela 8 – Avaliação da repetitividade e recuperação do método para cada nível de concentração

Critérios de desempenho	Estatística	Concentração (mg/L)	Valor Calculado	Critério de aceitabilidade	Fonte
<i>Repetitividade</i>	<i>HorRat</i>	2	0,6	≤ 2,0	HORWITZ e ALBERT, 2006
		8	0,9		
		14	0,6		
		20	0,1		
		26	0,9		
		32	0,7		
<i>Recuperação</i>	\bar{R} (%)	2	97,5	80 a 110%	UE, 2002
		8	98,9		
		14	101,8		
		20	106,5		
		26	101,4		
		32	99,0		

4.1.6. Precisão intermediária

Os valores de $CV(\%)$ encontrados (tabela 9) indicam que o método apresenta precisão adequada quando as medidas de uma única amostra são obtidas em dias diferentes.

Tabela 9 – Avaliação da precisão intermediária do método através de ensaios realizados em três dias diferentes

Amostras	Concentração em mg/L		
	Dia 1	Dia 2	Dia 3
1	6,70	5,98	7,14
2	7,51	7,51	9,28
3	5,84	7,78	8,17
4	6,58	8,27	8,95
5	7,62	6,46	8,49
6	6,39	8,18	8,78
7	7,46	8,12	9,72
8	7,80	7,14	8,49
9	8,12	7,10	9,14
10	8,49	8,14	7,68
Média	7,25	7,47	8,58
$S_{i(\text{tempo})}$	0,36		
CV(%)	4,6		

4.1.7. Limites de detecção e quantificação

A figura 12 ilustra e demonstra a metodologia utilizada para a estimativa dos limites. A curva analítica de equação $y = 6651,9 + 17521x$ foi utilizada para a determinação dos limites. As linhas tracejadas indicam os limites superiores e inferiores do intervalo de confiança.

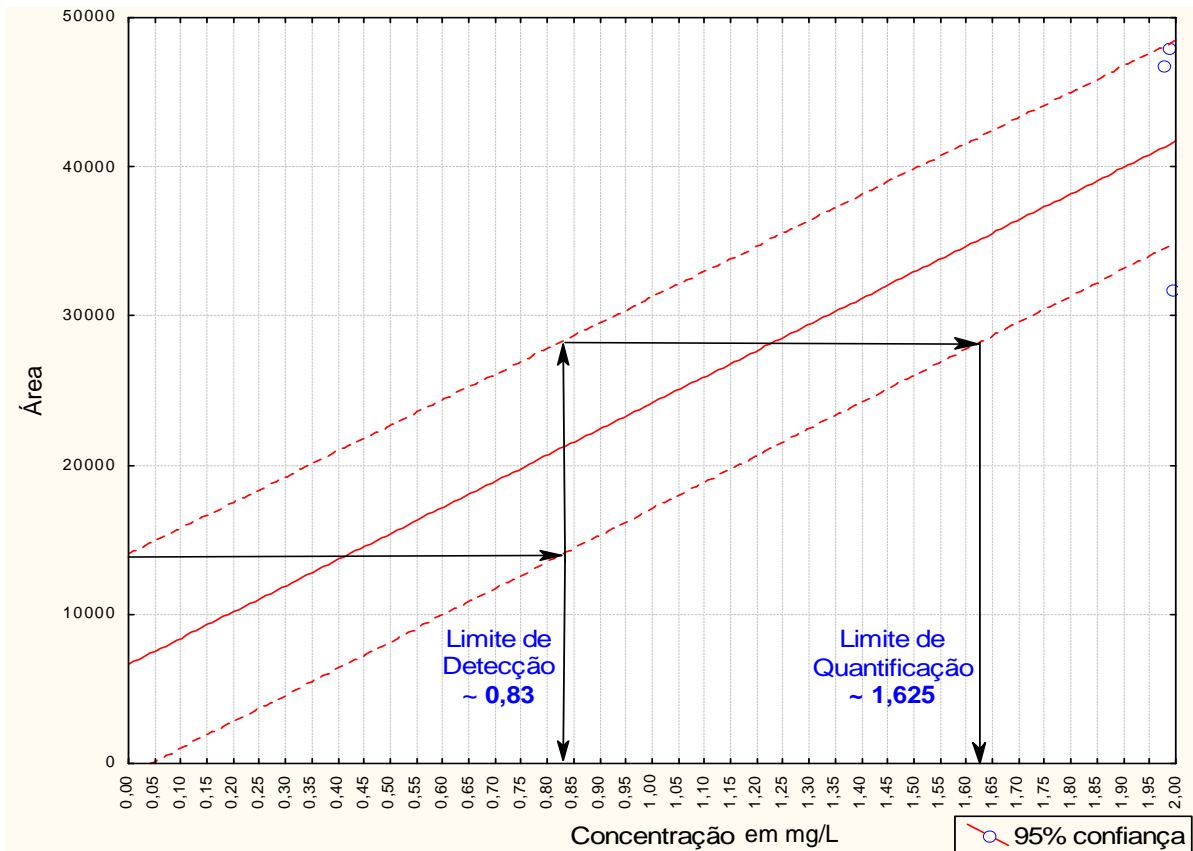


Figura 12 - Determinação dos limites de detecção e quantificação (Statsoft, 2004)

4.2. Resultados das amostras

Quarenta embalagens de filmes de nylon 6 destinadas a acondicionar alimentos gordurosos como mortadela, *blanquet* de peru, peito de aves, patês e apresuntado foram avaliadas quanto à migração de resíduos de CAP. A identificação do tipo de alimento ao qual o material destinava-se a acondicionar ocorreu por meio dos rótulos e da impressão do material. Aquelas embalagens onde não havia essa possibilidade de identificação foram denominadas de ND, não disponível. A figura 13 ilustra a quantidade percentual de amostras analisadas por tipo de alimento. Percebe-se que as embalagens denominadas por ND e aquelas utilizadas para o acondicionamento de mortadelas (frango, chester ou suína) perfazem quase 80% das amostras analisadas.

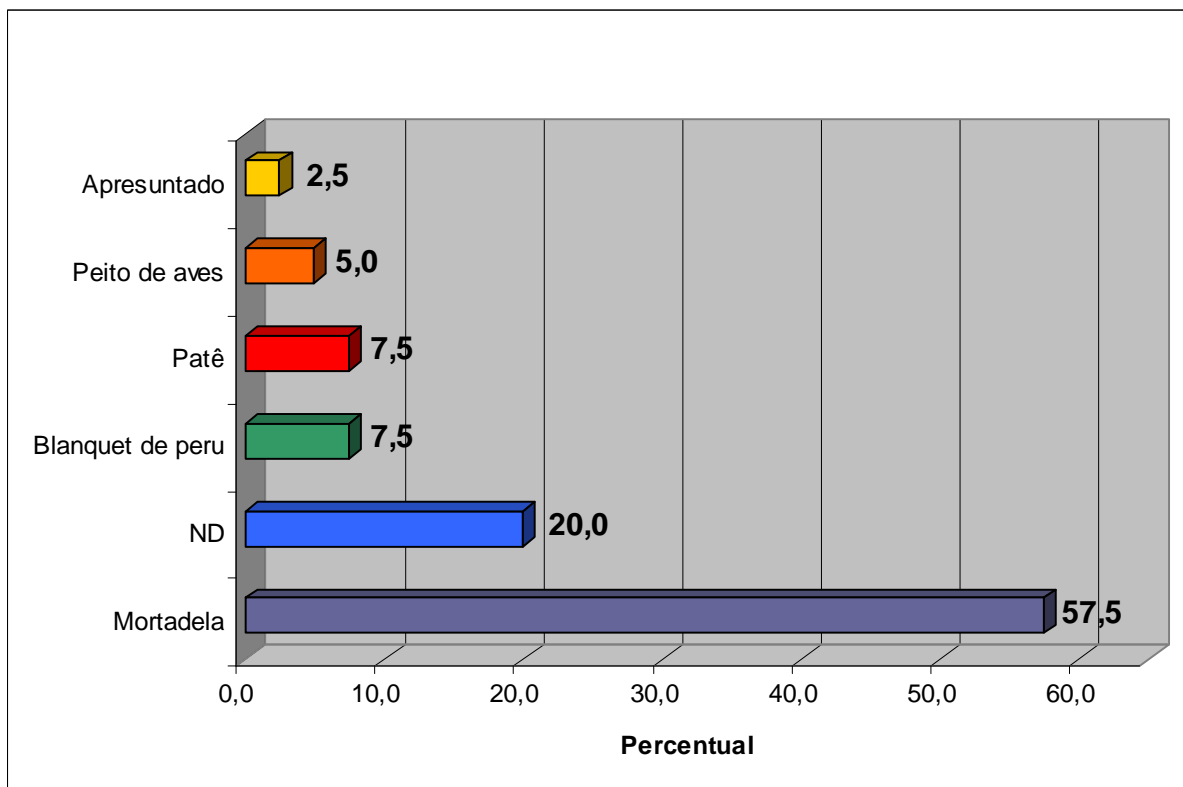


Figura 13 - Gráfico da distribuição percentual do número de amostras por tipo de alimento (n = 40)

Previamente, duas questões devem ser ponderadas. Uma relacionada ao simulante utilizado e outra aos valores de migração obtidos. Ambas, contudo, atreladas a aspectos legais.

Como já mencionado, a Resolução nº 105, de 19 de maio de 1999 estabelece o azeite de oliva e o n-heptano como simulantes D para alimentos gordurosos. Assim, no âmbito nacional, a utilização do etanol 95% não seria indicada para efeito de controle sanitário. Em contrapartida, a adoção do etanol 95% como simulante alternativo ao uso dos demais simulantes D é prevista pela legislação europeia, mais especificamente, a Diretiva nº 711, de 18 de outubro de 1982, e reiterada por trabalhos científicos já mencionados (TILL et al., 1987; SCHWARTZ et al., 1988; CASTLE et al., 2004; FÉLIX et al., 2008; POGORZELSKA e MIELNICZUK, 2001). Obviamente, as condições do ensaio como tempo e temperatura são diferenciadas dos demais simulantes por se tratar de um solvente volátil. Os limites de migração específica (LME) da CAP tanto da legislação brasileira quanto da legislação europeia são idênticos, ou seja, 15 mg/kg de alimento. Como exercício científico, os valores obtidos de migração serão comparados com ambas às legislações.

Existe nas legislações brasileira e europeia (BRASIL, 1999; CE, 1985) uma determinação que os valores de migração fossem corrigidos por um número denominado de coeficiente ou fator de redução de gorduras. O fator, que varia de 1 a 5, está relacionado diretamente ao potencial de extração do simulante D ou seus substitutos para um tipo de alimento, e só posteriormente os valores de migração poderiam ser comparados com a legislação. Esse fato suscitava muitas dúvidas quanto a aplicação do procedimento. Recentemente, a UE através da Diretiva nº 19, de 2 de abril de 2007 inseriu no texto da Diretiva nº 72 (2002) e 572 (1985) pontos que estipulam as condições em que o fator de redução deve ser praticado. Define que o mesmo deve ser utilizado para ensaios com embalagens que contenham alimentos com mais de 20% de gordura e substâncias caracterizadas como lipofílicas, inclusive estabelecendo uma lista positiva.

As amostras avaliadas neste estudo destinam-se a alimentos com percentual de gordura superior a 25%, sendo que a CAP não consta da lista de substâncias lipofílicas estabelecidas pela emenda europeia. O caráter hidrofílico da CAP é evidenciado por Stoffers et al. (2004). Estes realizaram experimento no qual um filme monocamada de nylon 6 permaneceu em contato simultâneo com os simulantes óleo de oliva e água através de uma célula de migração *two sided*. Ao final, 99% dos resíduos de CAP migraram para a água, ratificando a posição de que a mesma não se trata de uma substância lipofílica. Dessa forma, os resultados de migração dos filmes contendo nylon 6 não foram corrigidos pelo fator de redução de gorduras.

Os valores obtidos de migração da CAP (em mg/L) a partir de embalagens contendo nylon 6 e a respectiva incerteza são apresentados na tabela 10. A migração foi estimada a partir da equação da reta $y = 17521x + 6651,9$.

Tabela 10 – Resultados obtidos nos ensaios de migração e respectivas incertezas (em mg/L)

Embalagens	Mortadela		Embalagens	ND	
	Migração	Incerteza		Migração	Incerteza
1	10,5	1,01	24	11,6	0,72
2	10,0	0,90	25	7,8	0,64
3	11,3	0,73	26	9,8	0,90
4	7,9	0,73	27	12,9	0,89
5	11,3	0,81	28	13,8	1,11
6	9,5	0,74	29	13,9	1,37
7	18,1	1,22	30	11,2	0,69
8	10,3	0,70	31	14,0	0,71
9	12,9	0,79		<i>Blanquet de Peru</i>	
10	9,7	0,64		Migração	Incerteza
11	19,1	0,76	32	19,9	1,07
12	20,7	0,78	33	12,0	0,60
13	15,1	0,83	34	11,9	0,60
14	13,2	0,90		<i>Patê</i>	
15	14,5	0,69		Migração	Incerteza
16	18,0	0,71	35	29,7	1,55
17	10,9	0,76	36	17,1	0,81
18	20,1	0,96	37	26,0	0,92
19	17,5	0,67		<i>Peito de Aves</i>	
20	20,7	1,10		Migração	Incerteza
21	9,6	0,59	38	21,8	0,97
22	23,2	1,09	39	25,4	1,13
23	8,2	0,58		<i>Apresentado</i>	
				Migração	Incerteza
			40	10,4	0,72

Os resultados de migração dos filmes de nylon 6 destinados a acondicionar os referidos produtos demonstraram que algumas amostras para mortadela, *blanquet* de peru, peito de aves e patê apresentavam níveis de migração superiores aos limites.

Oito amostras de embalagens de mortadela apresentaram migração superior a 15 mg/kg, perfazendo um total de 35% das amostras analisadas. Uma amostra de *blanquet* de peru (33%) e três de peito de aves e patês (100%) também superaram

os limites de migração específica para a CAP. No entanto, não se constatou migração acima dos limites nas embalagens ND e de apressuntado. A figura 14 ilustra alguns desses dados. Recomenda-se para controle sanitário a realização de estudos com simulante azeite de oliva para confirmação ou não dos resultados obtidos nessas amostras.

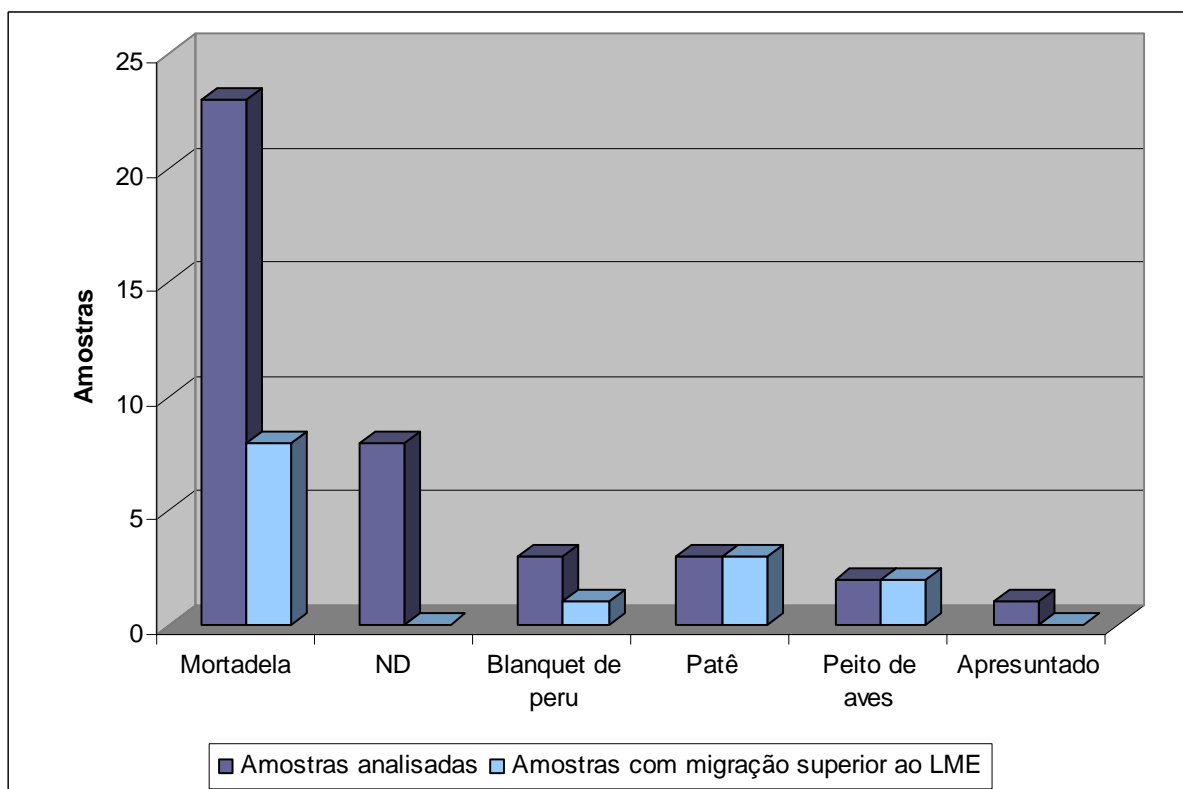


Figura 14 – Número de amostras com níveis superiores e inferiores aos limites estabelecidos pela legislação brasileira (BRASIL, 1999) e europeia (UE, 2002)

A literatura científica acerca de estudos de migração com o nylon 6 é reduzida. Particularmente, não existem até o momento trabalhos que avaliem as embalagens contendo nylon 6 produzidas no Brasil. Pogorzelska e Mielniczuk (2001) avaliaram diversos produtos contendo nylon 6 em sua constituição e relataram níveis de migração da CAP que oscilaram entre 6,4 e 42,7 mg/kg para simulante etanol 95%. Esses valores parecem consistentes com os resultados encontrados.

Contudo, a metodologia do ensaio de migração merece aqui uma maior discussão. A forma como o ensaio de migração é conduzido pode influenciar diretamente os resultados.

O ensaio realizado sob imersão total em filmes multicamadas pode gerar incertezas quanto à estimativa de migração de qualquer substância, pois as duas superfícies do material plástico permanecem em contato com o simulante, situação não condizente com a realidade. Nesse caso, a transferência da CAP aconteceria tanto da camada mais externa quanto da camada mais interna, e que de fato estaria em contato direto com o alimento. Assim, o valor de migração poderia ser superestimado. No mesmo sentido, a UE (2002) determina que as embalagens submetidas ao ensaio de migração deveriam permanecer em contato com o simulante de maneira que representem as condições reais de contato com o alimento. Além das condições de tempo e temperatura, deve-se também garantir que somente as partes da amostra que entrariam em contato com o alimento fossem mantidas igualmente em contato com o simulante. Essa colocação é particularmente importante em casos de filmes multicamadas, sendo mais adequado a utilização de células de migração *single sided* que assegurem o contato com o simulante apenas da camada de interesse. Porém, as limitações para sua utilização são inúmeras, dentre as quais destacam-se as de natureza técnica, pela necessidade de utilização de várias células, e por consequência, a financeira para a aquisição das mesmas (preço). Dessa forma, as condições do ensaio de migração foram as mais apropriadas frente a questões técnicas e institucionais. Salienta-se que a Resolução nº 105, de 19 de maio de 1999, adequando-se a realidade brasileira, não faz qualquer menção às situações de contato, somente as condições de tempo e temperatura. Castle et al. (2004), por exemplo, realizaram procedimento para avaliação da incerteza em ensaios de migração total. Para tal utilizaram dados obtidos de ensaios de migração conduzidos num estudo de proficiência organizado pela *Food Analysis Performance Assessment Scheme* (FAPAS) e iniciado em 1994. A legislação europeia desde aquele tempo (CE, 1990; UE, 2002) já mencionava a determinação supracitada para o contato dos filmes e, mesmo assim, seus experimentos com filme de nylon utilizando etanol 95% como simulante foram realizados por imersão. Muito provavelmente, todos os laboratórios participantes não observaram a determinação da referida legislação.

A temperatura utilizada para o ensaio corresponde à pior situação prevista no contato desse tipo de alimento com a embalagem. Bradley et al. (2004) afirmam que embalagens de nylon 6 submetidas a temperaturas mais altas por força do cozimento ou aquecimento do alimento no próprio filme apresentam migração superior àquelas no qual tal procedimento não é realizado.

Os resultados evidenciaram uma questão interessante. Não foram observados níveis de migração superiores a 15 mg/kg em amostras ND, desprovidas de rótulo ou qualquer impressão. Isso permite considerar a hipótese de que a existência de tais características poderia, de alguma forma, potencializar o fenômeno da migração. Essa possibilidade ainda não foi confirmada por literatura científica ou por este trabalho. Baseado nos resultados obtidos, recomenda-se a realização de estudos acerca do impacto de rótulos e impressões sobre a migração da ϵ -caprolactama.

4.3. Toxicologia da CAP

Tais resultados suscitaram questionamentos quanto à repercussão de tais evidências à saúde humana e estimularam uma revisão bibliográfica da toxicologia da CAP, com a finalidade de se identificar os possíveis riscos de agravos à saúde, advindos de uma exposição à CAP, principalmente em níveis superiores ao limite estabelecido pela legislação. Uma vez identificado o risco, subsidiaria a tomada de decisões visando à proteção da saúde humana.

4.3.1. Toxicocinética

Os estudos referentes à absorção da CAP em animais pelas vias oral, parenteral e inalatória foram descritos em documentos da IARC (1986).

Unger e Friedman (1981) constataram que a CAP foi rapidamente absorvida e eliminada em ratos em menos de 24h. Em geral, não há muita informação sobre o metabolismo da CAP. Alguns trabalhos como da IARC (1986) afirmam que parte da CAP é biotransformada a ácido ϵ -aminocapróico em ratos. O ácido ϵ -aminocapróico é formado a partir da 4-hidroxicaprolactama, que também pode ser espontaneamente rearranjada a uma mistura de, principalmente, 4-amino- γ -aminocaprolactona e ácido 6-amino-4-hidroxihexanóico (KIRK et al., 1987). A CAP é eficientemente eliminada pelo fígado e rins em ratos (IARC,1986). Já em coelhos, entre 9 e 22% da dose administrada é excretada pela urina e fezes como lactama. O processo de excreção da CAP em ratos se dá também através da bile, pois a mesma não parece ser reabsorvida na circulação entero-hepática (IARC, 1986).

Durante a gestação de ratos, a CAP, administrada por via oral, é eliminada tanto pela mãe quanto pelo feto em 24 horas (IARC,1986).

4.3.2. Efeitos em humanos

A grande maioria dos estudos que tratam dos efeitos clínicos da CAP decorre de exposição ocupacional, porém alguns foram conduzidos com voluntários. Em geral, são trabalhadores de indústrias químicas produtoras da CAP ou aquelas responsáveis pela transformação da CAP em fibras ou resinas de nylon 6.

4.3.2.1. *Exposição cutânea e ocular*

Em 1954, Goldblatt et al. aplicaram solução de 5% de CAP em antebraços de 11 voluntários e somente 5 apresentaram sinais de irritação. Kelman (1986) observou efeitos como irritação, descamação e/ou fissura cutâneas em 8 trabalhadores expostos a níveis médios de 68 mg/dm³ de CAP sob a forma de poeira. Um trabalhador têxtil, manipulador de fibras de nylon, e com histórico de dermatite por contato ocupacional, foi submetido por Aguirre et al. (1995) ao teste tópico com solução aquosa de CAP 5%. Observou-se eczema eritematoso difuso em pescoço, tórax e membros. Há também relatos de dermatite de contato e eczema, fissuras e hiperqueratose em trabalhadores expostos segundo EUA (2005). Em síntese, os estudos demonstram que a CAP pode ocasionar dermatite, irritação, descamação e/ou fissuras na pele, além de conjuntivite e queimaduras na córnea (FERGUSON e WHEELER, 1973; USCG, 1996). Os efeitos podem se originar do contato direto ou da exposição ao vapor/poeira de CAP. Um fato que pode servir de alerta é que foram constatados consideráveis agravos à pele num trabalhador têxtil, manipulador de fibras de nylon (AGUIRRE et al., 1995). A princípio, a manipulação de fibras de nylon não representaria maiores preocupações, porém o trabalho indicou uma situação oposta.

4.3.2.2. *Exposição por via inalatória*

Durante exposição aguda aos vapores de CAP (conc. 61 mg/dm³), produziu-se secreta, rinorréia e produção de secreção em trato respiratório superior (HOHENSEE, 1951). Voluntários também apresentaram queimação no nariz e garganta quando expostos a partículas em suspensão ou ao vapor de CAP em concentrações iguais a 66 mg/dm³ (FERGUSON e WHEELER, 1973). Irritação, tosse, sensibilização do sistema respiratório e broncoespasmo foram observados em trabalhadores expostos a partículas de CAP em suspensão ou vapor (SITTIG, 1985; USCG, 1996; UNEP, 1985).

Efeitos neurológicos e hematológicos agudos como crise convulsiva, febre e leucocitose foram relatados num trabalhador da indústria de nylon exposto durante três

dias à CAP (TUMA et al, 1981). Estudos em ratos apontam para efeitos similares àqueles relatados em humanos. KERR et al. (1976) relataram convulsões em ratos expostos à doses superiores a 600 mg/kg de CAP por via intraperitoneal, ocasionada pelo antagonismo do ácido γ -aminobutírico (GABA), mediador químico em sinapses inibitórias do sistema nervoso central.

Os possíveis efeitos clínicos associados à exposição crônica à CAP podem ser visualizados na Tabela 11. Existe um número razoável de estudos que tratam dos efeitos da inalação de vapor/poeira de CAP em humanos. No entanto, são confusos, pois a maioria são co-exposições, ou seja, de exposição a múltiplos compostos como nos trabalhos de Martynova et al. (1972) e Nadezhdina e Talakina (1971). As numerosas deficiências nos relatos, na apresentação dos dados e métodos, no número reduzido da amostra (BILLMAIER et al., 1992), na ausência de informações como duração de exposição (LIU et al., 1988) e níveis de exposição (NADEZHDINA, TALAKINA, 1971), além de fatores não considerados como estilos de vida dos trabalhadores impedem sua utilização em avaliações mais consistentes. A EPA, inclusive, considera os estudos inadequados para o estabelecimento de uma concentração de referência para exposição crônica por via inalatória.

Tabela 11 - Estudos de exposição por via inalatória à CAP em humanos

Período de exposição	Órgãos/Sistemas	Efeitos clínicos relatados	Referência
Crônica	Geniturinário/Reprodutivo	Distúrbios em funções ovarianas e menstruais em 170 gestantes expostas à CAP (37,1% versus 12,8% do controle com 101 gestantes) Os níveis não foram disponibilizados.	NADEZHDINA e TALAKINA, 1971
Crônica	Geniturinário	Dismenorréia em 300 trabalhadoras e aumento de toxicose, parto prematuro e hemorragias pós-natal em 136 trabalhadoras envolvidas na produção de <i>caprona</i> (uma espécie de fibra têxtil que utiliza nylon 6 para sua produção). Em ambos os casos, a concentração de CAP excedeu em nove vezes o limite russo de 10 mg/m ³ durante nove anos.	MARTYNOVA et al., 1972
Crônica	Geniturinário/Reprodutivo	Disfunções no ciclo menstrual (48,2%) em 300 trabalhadoras de indústria da CAP; e complicações na gestação e no parto em 33,8% das gestantes das expostas a CAP contra 18,1% de gestantes controle.	MARTYNOVA et al., 1972

Tabela 11 (cont.) - Estudos de exposição por via inalatória à CAP em humanos

Período de exposição	Órgãos/Sistemas	Efeitos clínicos relatados	Referência
Crônica	Geniturinário/Reprodutivo	Doenças inflamatórias do útero e anexos foram mais prevalentes em 492 trabalhadoras expostas a níveis inferiores a 10 mg/m ³ de CAP e bifenil em relação à população controle (8,9% contra 1,08%).	PETROV, 1975
Não definida	Geniturinário/Reprodutivo	Menstruação irregular foi significativamente maior que nos controles pareados (34,3% contra 25%) em coorte de 304 trabalhadoras expostas a níveis inferiores a 10 mg/m ³ de CAP.	LIU et al., 1988
Crônica	Geniturinário/Reprodutivo	Num coorte de 616 trabalhadoras expostas a vários compostos, incluindo CAP em concentrações inferiores a 10 mg/m ³ , a incidência de mioma uterino (um tumor de tecido muscular) foi 2 a 3 vezes superior ao do grupo controle de 182 mulheres.	ANGELOV, 1988
Crônica	Nariz e Garganta	Alterações distróficas das mucosas nasal e da garganta, além de rinorréia e ressecamento da mucosa nasal.	UNEP, 1985

Tabela 11 (cont.) - Estudos de exposição por via inalatória à CAP em humanos

Período de exposição	Órgãos/Sistemas	Efeitos clínicos relatados	Referência
Crônica	Respiratório	Avaliação da função respiratória (espirometria) em 173 trabalhadores da indústria da CAP. Nenhuma diferença entre o grupo exposto e o controle.	PATEL, 1990
Crônica	Respiratório	Não houve diferença significativa para testes de função pulmonar em 39 trabalhadores de duas plantas, com exposição mínima de dez anos a concentrações de CAP no ar de cerca de 3,7 mg/m ³ em uma planta e de 4,5 e 9,9 mg/m ³ de CAP, em outra planta.	BILLMAIER et al., 1992
Crônica	Respiratório	Elevação da incidência de asma e bronquite em grupo de trabalhadores expostos.	EUA, 2005
Crônica	Cardiovascular	Desconforto no peito e palpitações com maior tendência a desenvolver taquicardia e hipotensão média. Alterações no ECG: bradicardia sinusal, disritmia sinusal, oscilação da onda P e prolongação do intervalo PR.	EUA, 2005

Um outro estudo que apresenta várias deficiências foi o desenvolvido por Ferguson e Wheeler (1973) que realizaram uma retrospectiva de exposições ocupacionais de 155 trabalhadores de duas plantas de produção de CAP, alguns com 17 anos de exposição, e outro de 5 trabalhadores voluntários expostos momentaneamente à CAP. Nesse último caso, a irritação de olhos, nariz e garganta foi transitória, cessando os efeitos após o término da exposição. Tais efeitos foram observados em concentrações de 100 ppm, reduzindo sua magnitude em concentrações inferiores a 25 ppm. Os autores sugerem que o desconforto percebido foi maior em trabalhadores de plantas do polímero do que nas indústrias do monômero, apesar da não mensuração do grau de desconforto apresentado pelos indivíduos. Sugeriu-se que a maior umidade na indústria do monômero protegeria os indivíduos de efeitos irritantes da CAP por promover a hidratação dos tecidos e depuração biológica. Na parte ocupacional do estudo, não foram declaradas as durações médias de exposição, o número exato de expostos em cada planta, os dados históricos individuais e os níveis de CAP no ar, sendo todas as exposições determinadas por área e não por amostras aleatórias. A partir dessas constatações, não foi possível considerar o referido estudo como de duração crônica uma vez que não foram definidas a população de trabalhadores e a duração média da exposição.

Os limites de exposição ocupacional à CAP recomendados por instituições norte americanas de regulação, segurança e medicina do trabalho, como a *American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH)* e *National Institute of Occupational Safety and Health (NIOSH)*, são, respectivamente, 5 mg/m³ e 1 mg/m³ para vapor e poeira. Reinhold et al. (1998) consideram apropriado, nessas circunstâncias (vapor/poeira), um limite de exposição à CAP igual à 23 mg/m³.

4.3.3. Efeitos em animais

4.3.3.1. Exposição cutânea e ocular

Os estudos em animais confirmam alguns efeitos descritos em humanos. Numa revisão de trabalhos russos organizada pelo Programa Ambiental das Nações Unidas (UNEP, 1985) concluiu-se que a CAP pode ocasionar irritação ocular e queimaduras na córnea em coelhos e sensibilização ou dermatite em cobaias. A irritação ocular ocorre a partir de concentrações de 10% de CAP, sendo que as concentrações entre 25 e 50 % de CAP causam queimaduras na córnea.

Trabalho citado pela Organização para Cooperação Econômica e Desenvolvimento (OECD, 2001) contraria os resultados acima. A CAP não foi

considerada sensibilizante em cobaias no teste de maximização (75% CAP em água) e no teste modificado de Buehler (25% de CAP em água) realizado de acordo com as diretrizes estabelecidas pelo Protocolo 870.2600 (EPA, 1998).

4.3.3.1. *Exposição por via inalatória:*

A realização de estudos toxicológicos pela inalação de vapores de CAP torna-se quase impraticável devido à sua pressão de vapor extremamente baixa (0,13 Pa a 20°C). Assim, historicamente, os estudos da CAP em animais decorrem, principalmente, da administração por via oral. No entanto, há relatos sobre possíveis efeitos nos sistemas respiratório, cardiovascular, geniturinário, hematológico e hepático decorrentes da exposição inalatória. Após exposição aguda por via inalatória, animais apresentaram hipotensão, hipertensão, hipoventilação (camundongos), hepatotoxicidade, lesões renais e danos sobre a espermatogênese (ACGIH, 1991; EUA, 2005; IARC, 1986; UNEP, 1985). Krichevskaya (1968) constatou também alterações na colinesterase sanguínea em ratos machos albinos (15/grupo) expostos durante 82 dias, a uma concentração máxima de vapor de CAP igual a 6,0 mg/m³. O significado desses resultados não está claro e poucas informações estão disponíveis, como o período de exposição diário (EPA, 2008). Não foram observadas alterações anátomo-patológicas ou evidências de mobilidade anormal em cobaias expostas a concentrações de CAP de 51 mg/m³ durante 26 a 30 dias, porém observou-se leve irritação em mucosa nasal (HOHENSEE, 1951). Reinhold et al. (1998) avaliaram os efeitos de CAP em ratos Sprague-Dawley expostos, durante 91 dias, a 24, 70 e 243 mg/m³ (10 ratos/sexo). A queratinização da laringe foi observada na maior concentração estudada. Reinhold et al. (1998) estabeleceram em ratos um nível de dose onde não é observado efeito adverso (NOAEL) de 70 mg/m³ para sistema respiratório superior e 243 mg/m³ para toxicidade sistêmica, neurotoxicidade e sistema respiratório inferior.

Em contrapartida, alguns trabalhos relatam a inexistência de quaisquer agravos às espécies testadas. Em estudo subagudo, cobaias foram expostas por 30 min durante 5 dias consecutivos à atmosfera e aerossóis de CAP em concentrações de 3, 10 e 30 mg/m³, sendo monitoradas por pletismografia quanto a ocorrência de irritação, tosse, hipersensibilidade pulmonar e hipereatividade. Nenhum efeito foi observado (ALARIE e STOCK, 1990). No mesmo sentido, Lomonova (1966) não identificou qualquer efeito relacionado à exposição crônica de ratos albinos à CAP em concentrações de 10 mg/m³, quanto ao peso corpóreo, ao comportamento e a

ocorrência de alterações clínicas e anátomo-patológicas. Goldblatt et al. (1954) constataram a inexistência de efeitos adversos em cobaias expostas, durante 7 dias, à CAP em concentrações de 118 a 261 mg/m³.

4.3.4. Genotoxicidade

4.3.4.1. Mutagenicidade em *Salmonella typhimurium* e células de mamífero *in vitro*

Nas Tabelas 12 e 13 são apresentados os estudos referentes a mutagenicidade *in vitro* da CAP, respectivamente, em cepas de *Salmonella typhimurium* (teste de Ames) e em células de mamífero e a respectiva avaliação tendo por base as diretrizes estabelecidas pela *Organization for Economic Cooperation and Development* (OECD) para testes de substâncias químicas.

Tabela 12 - Estudos de mutagenicidade da CAP em *Salmonella typhimurium* (Teste de Ames)

Cepas	Ativação metabólica	Método	Concentração (µg/placa)	Resultado	Referência
TA97; TA98; TA100; TA102	-S9/+S9 Aroclor 1254	Padrão	32-1000	Negativo	Baker e, Bonin, 1985 ^a
TA98; TA100; TA1535; TA1537; TA1538	-S9/+S9 Aroclor 1254	Padrão	50-5000	Negativo	Rexroat e Probst, 1985 ^a
TA97; TA98; TA100; TA1535	-S9/+S9 Aroclor 1254	Pré- incubação	100-10000	Negativo	Zeiger e Haworth, 1985 ^a
TA102	+S9 Aroclor 1254	Padrão	1-5000	Negativo	Jung, et. al., 1992; Mueller, et. al., 1993 ^a

Nota:(^a) Dados obtidos do Sistema de Informação e Pesquisa em Carcinogênese Química, base de dados da Livraria Nacional do Sistema TOXNET de Medicina (<http://toxnet.nlm.nih.gov>)

O teste de mutação reversa de Ames emprega linhagens de *Salmonella typhimurium* auxotróficas para histidina (his-), apresentando mutações no operon desse aminoácido o que não as torna capaz de crescer em meio de cultura mínimo,

sem histidina. Tais linhagens foram construídas para detectar mutações no operon histidina, do tipo deslocamento do quadro de leitura (TA98, TA1537 ou TA97 e TA1538), de substituição de pares de base (TA1535) e de ambos os tipos (TA100). A TA102 detecta mutágenos intercalantes. O ensaio baseia-se na capacidade das células bacterianas de reverterem mutações e restabelecer a funcionalidade de síntese de histidina. A CAP apresentou resultados negativos em todas as linhagens testadas, pelos métodos padrão e de pré-incubação, na ausência e presença de ativação metabólica (mistura S9) estando de acordo com as diretrizes estabelecidas pelo Protocolo 471 (OECD, 1997). Apesar da concentração máxima de 5000 µg/placa de CAP não ter sido testada (BAKER e BONIN, 1985) pelo método padrão, concentração de até 10000 µg/placa de CAP através da pré-incubação foi testada apresentando resultados negativos (ZEIGER e HAWORTH, 1985).

A Tabela 13 mostra os resultados dos ensaios de mutagenicidade/genotoxicidade *in vitro* da CAP em células V79, CHO, L5178Y, linfócitos humanos e em hepatócitos de ratos para detecção de mutações gênicas e cromossômicas, bem como de trocas recíprocas de DNA entre cromátides irmãs e de síntese de DNA não programada (UDS).

Tabela 13 - Estudos de mutagenicidade da CAP em células de mamífero *in vitro*

Ensaio	Células	Ativação metabólica	Concentração	Resultado	Referência
Mutação gênica/TK	L5178Y	-S9/+S9 Aroclor 1254	1130- 11320µg/mL	Negativo	AMACHER e TURNER, 1985 ^a
Mutação gênica/HPRT/6Tg	V79	-S9	1-1000 µg/mL	Negativo	KURODA, et. al., 1985 ^a
Mutação gênica/HPRT/6Tg	V79	+S9 (fenobarbital e benzoflavona)	32-1000 µg/mL	Negativo	KURODA, et. al., 1985 ^a
Mutação gênica/HPRT/6Tg	V79	-S9	1000-4000 µg/mL	Negativo	FOX e DELOW, 1985 ^a
Mutação gênica/HPRT/6Tg	V79	+S9 (fenobarbital e β-naftoflavona)	300-3000 µg/mL	Negativo	FOX e DELOW, 1985 ^a
UDS/ ³ H-TdR	Hepatócitos de ratos	-S9	0,001- 10mM	Negativo	GLAUERT, et. al., 1985 ^a

Tabela 13 (cont.) - Estudos de mutagenicidade da CAP em células de mamífero *in vitro*

Ensaio	Células	Ativação metabólica	Concentração	Resultado	Referência
Mutação gênica/ HPRT/6Tg	CHO	-CEH/+CEH	1000-2000µg/mL	Negativo	ZDIENICKA e SIMMONS, 1985 ^a
Mutação gênica/ HPRT/ Ouabaína	CHO	-CEH/+CEH	1000-2000µg/mL	Negativo	ZDIENICKA e SIMMONS, 1985 ^a
Mutação gênica/ HPRT/ Ouabaína	V79	+CEH	0,1-1mM	Negativo	KUROKI e MUNAKATA, 1985 ^a
Mutação gênica/ HPRT/ Ouabaína	V79	+S15 (fenobarbital e benzoflavona)	0,1-1mM	Negativo	KUROKI e MUNAKATA, 1985 ^a
Mutação gênica/TK	L5178Y	-S9/+S9 Aroclor 1254	500-10000 µg/mL	Negativo	OBERLY et al., 1985 ^a
Aberração cromossômica	Linfócitos humanos	-S9/+S9 Aroclor 1254	2500-10000 µg/mL	7500 µg/mL: Positivo	KRISTIANSEN e SCOTT, 1989 ^a
Aberração cromossômica	Linfócitos humanos	-S9/+S9 Aroclor 1254	550-5500 µg/mL	5500 µg/mL: Positivo	SHELDON, 1989 ^a
Aberração cromossômica	Linfócitos humanos	+S9 Aroclor 1254	25-400 mM	200 mM: Positivo	NORPPA e JARVENTAUS, 1989 ^a
Aberração cromossômica	Linfócitos humanos	-S9	12,5-100 mM	50 mM: Positivo	NORPPA e JARVENTAUS, 1989 ^a
Troca entre cromátides-irmãs	CHO	-S9/+S9 Aroclor 1254	15,6-250 mM	125 mM(+S9): Positivo -S9: Negativo	NORPPA e JARVENTAUS, 1989 ^a

Nota: (a)Dados obtidos do Sistema de Informação de Pesquisa em Carcinogênese Química, base de dados da Livraria Nacional do Sistema TOXNET de Medicina (<http://toxnet.nlm.nih.gov>); UDS: Síntese de DNA não programada; CEH: Células embrionárias de hamster; TK: Timidina quinase; HPRT: Hipoxantina-guanina fosforibosil transferase; 6Tg: 6-Tioguanina; ³H-Tdr: Timidina tritiada; L5178Y: Células de linfoma de camundongo; CHO: Células de ovário de hamster chinês; V79: Células de pulmão de hamster chinês.

A CAP foi negativa nos ensaios UDS (Protocolo 482, OECD, 1986), CHO e V79/HPRT e L5178Y/TK mesmo quando testada em concentrações acima (AMACHER e TURNER, 1985; OBERLY et al., 1985) da concentração limite recomendada de 5000 µg/mL (Protocolo 476, OECD, 1997), na ausência e na

presença de diferentes sistemas de ativação metabólica (S9 de fígado de rato induzido por Aroclor 1254 e fenorbabital/ β -naftoflavona e CEH). Quanto aos ensaios de aberrações cromossômicas em linfócitos humanos e de trocas entre cromátides irmãs em células CHO, a CAP somente causou resultados positivos não relevantes em concentrações acima da recomendada de 5000 $\mu\text{g/mL}$ ou 10 mM (Protocolos 473, OECD, 1997; 479, OECD, 1986). A maioria desses resultados parece estar associada a erros técnicos aleatórios, pois os efeitos são geralmente fracos e não reprodutíveis no mesmo ou entre laboratórios utilizando o mesmo sistema teste (ASHBY e SHELBY, 1989).

4.3.4.2. Genotoxicidade *in vivo*

Nessa seção, são apresentados os estudos referentes a genotoxicidade *in vivo* da CAP (Tabela 14) e a respectiva avaliação tendo por base as diretrizes estabelecidas pelos Protocolos 477, OECD, 1984; 484, OECD, 1986; 474, 475, 483 e 486, OECD, 1997. Em caso de inexistência de diretrizes da OECD para os ensaios de interesse, as diretivas da EPA foram utilizadas como referência alternativa.

Os testes conduzidos por Vogel (1989) em *Drosophila melanogaster* empregando duas metodologias: SMART (teste de recombinação e de mutação somática) e SLRL ou teste recessivo letal ligado ao sexo (Protocolo 477, OECD, 1984) mostraram que a CAP induziu respectivamente, mutações em células somáticas e alterações nos estágios iniciais das células germinais, porém não causou mutações nas células germinais do inseto. Quando comparado ao SMART, o ensaio SLRL, tem uma maior relevância, pois permite a detecção de mutações recessivas letais em cerca de 880 diferentes *locus* no cromossomo X o que representa aproximadamente 80 % de todo cromossomo X, que, por sua vez, corresponde a cerca de 1/5 do genoma total do inseto. Tanto a OECD quanto a EPA não disponibilizam diretrizes para o teste SMART.

No ensaio de micronúcleo em células de medula óssea, a CAP, quando administrada pelas vias oral (SHELDON, 1989) e intraperitoneal (ISHIDATE e ODAGIRI, 1989) a duas diferentes cepas de camundongos não induziu dano cromossômico e ao aparelho mitótico do eritroblasto. Baseado no Protocolo 474 (OECD, 1997), o número recomendado de células policromáticas micronucleadas a ser analisado é de, no mínimo, 2000 células, sendo os resultados negativos obtidos por Sheldon (1989) em ambos os sexos mais consistentes do que os obtidos por Ishidate e Odagiri (1989).

A CAP, por via intraperitoneal, não induziu trocas entre cromátides irmãs e aberrações cromossômicas em células de medula óssea de camundongos machos B6C3F1 (MCFEE e LOWE, 1989) estando em termos gerais de acordo com as diretrizes estabelecidas pela OECD (Protocolo 475, 1997). A OECD não disponibiliza diretrizes para o ensaio *in vivo* de trocas entre cromátides irmãs, porém de acordo com as recomendações da EPA (Protocolo OPPTS 870.5915, 1996) a restrição encontra-se na utilização de apenas um sexo e no número de animais inferior ao sugerido (5 animais/grupo). Apesar da diretiva ser flexível e admitir tal delineamento em caso de justificativa, o artigo não a apresentou. Dessa forma, o trabalho está em desacordo com o recomendado.

O Protocolo 486 (OECD, 1997) recomenda que os testes UDS *in vivo* em células hepáticas, principalmente de ratos, sejam realizados em ambos os sexos, com 3 animais por grupo e com pelo menos 2 níveis de dose administradas preferencialmente por via oral. Salienta-se que a utilização de ambos os sexos pode ser ignorada se houver dados disponíveis que comprovem a equivalência de efeito entre os sexos para as espécies e vias de exposição a serem estudadas. O estudo desenvolvido por Working (1989) utilizou espermátócitos, ao invés de hepatócitos de ratos. Não há guias na OECD ou EPA para ensaios UDS em células diferentes de hepatócitos. Em contraposição ao sugerido pela OECD, Bermudez et al. (1989) avaliaram somente uma dose de CAP por via oral (750 mg/kg). Já Parodi et al. (1989), confirmaram os resultados negativos quanto a genotoxicidade da CAP em hepatócitos de ratos obtidos por Bermudez et al. (1989). Parodi et al. (1989) analisaram a fragmentação do DNA em hepatócitos de ratos e camundongos, após administração via intraperitoneal de dose única de CAP (580 mg/kg), por três diferentes métodos. Os ensaios realizados pelo método viscosimétrico e fluororimétrico (considerados pelos autores mais consistentes) apresentaram resultados negativos. Somente os resultados obtidos a partir da eluição alcalina mostraram que a CAP pode ocasionar alterações na conformação da dupla hélice do DNA, não relacionadas a qualquer dano no mesmo (PARODI et al., 1989). A OECD e a EPA não disponibilizam guias para o ensaio de medida de fragmentação de DNA mencionado acima.

A OECD (Protocolo 484, 1986) recomenda que o *spot test* em camundongos para a detecção *in vivo* de mutações somáticas em células fetais seja realizado, empregando-se pelo menos, dois níveis de dose de até 1000 mg/kg para substâncias relativamente não tóxicas. Caso não seja possível, a maior dose

praticável deve ser utilizada. Sob esta ótica, os resultados de Fahrig (1989); Fahrig e Klauss (1989) são relevantes, pois estão de acordo com o protocolo disponibilizado pela OECD.

Friedman e Salerno (1980) avaliaram em ratos F344 os efeitos decorrentes da administração por via oral de dose única de CAP (1500 mg/kg) sobre o metabolismo de aminoácidos, através da determinação das atividades enzimáticas da tirosina aminotransferase (TAT) e da triptofano-oxigenase (TFO). A estrutura da CAP sugere que a partir de sua hidrólise *in vivo* se forme o ácido ϵ -aminocapróico. É esperado que essa substância modifique as vias metabólicas normais, pois o aumento de aminoácidos não-essenciais e de amino-compostos podem ocasionar alterações nas vias de síntese e de degradação. Assim, a alta ingestão do aminoácido poderia causar desequilíbrio ou ocasionar toxicidade que, eventualmente, pudesse estar relacionada a estas alterações bioquímicas. Os autores desconsideraram a possibilidade de que o aumento na indução de ambas enzimas pela CAP estivesse associado a dano ao DNA ou na atividade da RNA polimerase, pois a indução permaneceu mesmo após a administração de actinomicina D, bloqueadora da RNA polimerase. Os autores ainda chamam a atenção para o fato de haver redução dessa resposta para o tratamento em doses repetidas e sugerem estudos adicionais. Sobre esta ótica, é preciso compreender melhor a toxicocinética da CAP e estabelecer seus reais efeitos sobre as vias metabólicas. A OECD e a EPA não disponibilizam protocolo para este ensaio.

Tabela 14 - Estudos da genotoxicidade *in vivo* da CAP

<i>Ensaio</i>	<i>Espécie</i>	<i>Células</i>	<i>Grupos (n°, sexo)</i>	<i>Via de exposição</i>	<i>Doses</i>	<i>Efeitos</i>	<i>Referência</i>
Micronúcleo em eritrócitos	Camundongos C57BL/6J	Medula óssea	5 machos e 5 fêmeas/grupo	Oral (dose única)	435; 700 mg/kg	700 mg/kg (1000 células analisadas): Positivo (5000 células analisadas): Negativo	SHELDON, 1989
Micronúcleo em eritrócitos	Camundongos ICR/JCL	Medula óssea	5 machos/grupo	Intraperitoneal (dose única)	125; 250; 500 mg/kg	1000 células analisadas: Negativo	ISHIDATE e ODAGIRI, 1989
Trocas entre cromátides-irmãs (SCE) e aberração cromossômica(AC)	Camundongos B6C3F1	Medula óssea	SCE: 4 machos/grupo AC.: 8 machos/grupo	Intraperitoneal (dose única)	175; 350; 700 mg/kg	Ausência de indução de SCE e AC.	MCREE e LOWE, 1989
UDS	Ratos F344	Hepatócitos	3 machos/tempo 12; 24 e 48h	Oral (dose única)	750 mg/kg	Ausência de indução de dano ao DNA.	BERMUDEZ et al., 1989
UDS	Ratos F344	Espermatócitos	3 machos/tempo 12; 24 e 48h	Oral (dose única)	750 mg/kg	Ausência de indução de dano ao DNA em espermatócitos no paquiteno	WORKING, 1989

Nota: UDS: Síntese de DNA não programada.

Tabela 14(cont.) - Estudos da genotoxicidade *in vivo* da CAP

Ensaio	Espécie	Células	Grupos (nº; sexo)	Via de exposição	Doses	Efeitos	Referência
Spot test em camundongo	Camundongos C57/B1XT	Melanoblastos	Fêmeas: Mínimo 95/grupo	Intraperitoneal (dose única)	400; 500 mg/kg	Indução de mutações e de possível efeito recombinogênico	FAHRIG, 1989; FAHRIG e KLAUSS, 1989
Fragmentação de DNA: eluição alcalina	Ratos Sprague-Dawley	Hepatócitos	3 machos/grupo	Intraperitoneal (dose única)	580 mg/kg	Negativo com alteração da conformação do DNA	PARODI et al., 1989
Fragmentação de DNA: eluição alcalina	Camundongos CD-1 Swiss	Hepatócitos	5 machos/grupo	Intraperitoneal (dose única)	580 mg/kg	Negativo com alteração da conformação do DNA	PARODI et al., 1989
SMART	<i>Drosophila melanogaster</i>	Células somáticas	Fêmeas: Mínimo 406 olhos testados/grupo	Oral	2,5; 5,0;10; 20 mM	5; 10; 20 mM: Clastogênica	VOGEL, 1989
SLRL	<i>Drosophila melanogaster</i>	Células germinais	Machos e fêmeas: Mínimo de 88/grupo	Oral	2,5; 5,0;10; 20 mM	Fêmeas: Clastogênica Machos: Não clastogênica	VOGEL, 1989

Notas: SMART: Teste de recombinação e de mutação somática em *Drosophila melanogaster*; SLRL: Teste recessivo letal ligado ao sexo em *Drosophila melanogaster*.

Resumindo, tanto *in vitro* quanto *in vivo* os estudos de genotoxicidade apresentaram, em sua grande maioria, resultados negativos. Em contrapartida, poucos são aqueles que atribuem um possível efeito genotóxico à CAP. Por exemplo, a CAP foi considerada clastogênica para *D. melanogaster* (VOGEL, 1989) e mutagênica em melanoblastos de camundongos (FAHRIG, 1989).

4.3.5. Carcinogenicidade

A carcinogenicidade é a capacidade de substâncias xenobióticas ou de outros fatores do meio ambiente de induzir a formação de neoplasias malignas ou cânceres. Em geral, a carcinogenicidade de uma substância química é a grande preocupação no meio científico. Porém, a realização de estudos de longa duração em ratos e camundongos exigem esforços financeiros e técnicos consideráveis. Nessa área, um estudo é considerado referência quando nos referimos a exposição por via oral à CAP. O estudo foi desenvolvido pelo *National Toxicology Program* (NTP) em 1982, órgão ligado ao governo americano (Tabela 15). Trata-se de uma avaliação bem abrangente e confiável. O estudo é consistente com os resultados apresentados por Serota et al. (1988) no que se refere à redução do peso corporal médio e de consumo de ração dos animais. Nenhum efeito carcinogênico foi constatado. O estudo atendeu a todas as recomendações estabelecidas pelo Protocolo 451 (OECD, 1981). Adicionalmente, a IARC através da Monografia de Avaliação dos Riscos Carcinogênicos para Humanos (1999), no caso específico da CAP, menciona que não existem dados epidemiológicos relevantes quanto a carcinogenicidade da CAP e que há evidências sugerindo ausência de atividade carcinogênica em animais experimentais. A inexistência de dados epidemiológicos consistentes em humanos levou a IARC a classificar a CAP como *provavelmente* não carcinogênica.

Tabela 15 - Estudos toxicológicos *in vivo* da CAP desenvolvidos pelo National Toxicology Program

<i>Ensaio</i>	<i>Espécie</i>	<i>Parâmetros</i>	<i>Grupos (n°, sexo)</i>	<i>Via e duração de exposição</i>	<i>Doses (mg/kg)</i>	<i>Efeitos</i>
Toxicidade aguda	Ratos F344	Mortalidade	5 machos e fêmeas/grupo	Gavagem (dose única)	681; 1000; 1470; 2150; 3160	Machos: mortes em doses \geq 1470 mg/kg DL ₅₀ = 1650 mg/kg Fêmeas: mortes em doses \geq 1000 mg/kg DL ₅₀ = 1210 mg/kg
Toxicidade aguda	Camundongos B6C3F1	Mortalidade	5 machos e fêmeas/grupo	Gavagem (dose única)	1000; 1470; 2150; 3160; 4640	Machos e fêmeas: mortes em doses \geq 2150 mg/kg Machos: DL ₅₀ = 2070 mg/kg Fêmeas: DL ₅₀ = 2490 mg/kg
Toxicidade Subaguda	Ratos F344 e Camundongos B6C3F1	Mortalidade, sinais clínicos e alterações anátomo-patológicas	5 machos e fêmeas/grupo	Oral (14 dias)	5000; 10000; 15000; 20000; 30000*	Observou-se palidez e manchas nos rins de ratos machos em todas as doses (60 a 100% de incidência). 5000 ppm: morte de 1 rato macho
Toxicidade Subcrônica	Ratos F344	Mortalidade, sinais clínicos e alterações anátomo-patológicas	12 machos e fêmeas/grupo	Oral (90 dias)	625; 1250; 2500; 5000; 7500*	Ausência de mortalidade e alterações anátomo-patológicas. Redução no ganho de peso em torno de 13%, não dose-dependente. 7500 ppm: redução do consumo de ração em torno de 21 %.
Toxicidade Subcrônica	Camundongos B6C3F1	Mortalidade, sinais clínicos e alterações anátomo-patológicas	10 machos e fêmeas/grupo	Oral (90 dias)	5000; 10000; 15000; 20000; 30000*	Ausência de alterações anátomo-patológicas. Fêmeas: 2 mortes em dose de 30000 ppm. Machos: redução (36%) no ganho de peso para todas as doses, não dose-dependente. Fêmeas: redução no ganho de peso para todas as doses, dose-dependente.

Tabela 15 (cont.) - Estudos toxicológicos *in vivo* da CAP desenvolvidos pelo National Toxicology Program

Ensaio	Espécie	Parâmetros	Grupos (nº, sexo)	Via e duração de exposição	Doses (mg/kg)	Efeitos
Carcinogenicidade	Ratos F344	Alterações anátomo- patológicas	50 machos e fêmeas/grupo	Oral (720 dias)	3750; 7500*	Negativo, porém apresentou ganho de peso inferior ao controle em ambas as doses.
Carcinogenicidade	Camundongos B6C3F1	Alterações anátomo- patológicas	50 machos e fêmeas/grupo	Oral (720 dias)	7500; 15000*	Negativo, porém apresentou ganho de peso inferior ao controle em ambas as doses.

Nota: (*) Doses de CAP em ppm na ração

4.3.6. *Efeitos sobre a reprodução e desenvolvimento de animais*

Os trabalhos que tratam dos possíveis efeitos da CAP sobre o desenvolvimento e reprodução apresentaram resultados coerentes. Durante a gestação, Gad et al.(1987) trataram por via oral, ratos F344 (20/grupo experimental), com 3 doses de CAP (100, 500 e 1000 mg/kg de peso corpóreo) e coelhos Nova Zelândia (20/grupo), com doses de 50, 150 e 250 mg/kg peso corpóreo. Não foram observados efeitos embriotóxicos ou teratogênicos. Baseado no Protocolo 414 referente à toxicidade de desenvolvimento pré-natal (OECD, 2001), o estudo realizado por Gad et al. (1987) não apresenta qualquer limitação. Já Serota et al. (1988) realizaram um estudo mais abrangente de reprodução em três gerações, por via oral, também em ratos F344 (10 machos e 20 fêmeas/grupo), no qual analisaram diversos parâmetros, tais como, mortalidade, sinais clínicos, desempenho reprodutivo e alterações anátomo-patológicas, especialmente dos órgãos do sistema reprodutivo. O estudo não constatou quaisquer alterações clínicas, anátomo-patológicas bem como em índices de fertilidade/gestação, de sobrevivência da prole, no número de nascidos vivos e filhotes por ninhada em ratos F344 de ambos os sexos expostos à dose de 1000 ppm de CAP na ração equivalente à dose diária de 50 mg/kg de peso corpóreo. Entretanto as doses de 5000 e 10000 ppm de CAP na ração, correspondentes a 2500 e 5000 mg/kg de peso corpóreo, causaram redução no ganho de peso corpóreo e no consumo de ração, principalmente, em animais da 2ª e 3ª gerações. Adicionalmente, na dose de 10000 ppm ocorreu um leve aumento de nefropatias espontâneas em machos da 1ª geração. Cabe salientar que a OECD disponibiliza diretrizes para estudos sobre reprodução e desenvolvimento, porém nenhum que se enquadre perfeitamente nos experimentos realizados por Serota et al. (1988). A OECD oferece os Protocolos 415 de 1983 e 416 de 2001 para o tipo de ensaio desenvolvido por Serota et al. (1988), referentes, respectivamente, aos estudos de toxicidade reprodutiva em uma e duas gerações. Apesar disso, o Protocolo 416, foi utilizado na análise do estudo de Serota et al.(1988). Esse estudo encontra-se de acordo com as diretrizes da OECD (2001).

Resumindo, a CAP não provoca efeitos adversos sobre a reprodução e desenvolvimento pré-natal na mesma cepa de ratos F344 e não induz câncer em camundongos B6C3F1 e em ratos F344 de ambos os sexos. Baseado nos estudos de carcinogenicidade e desenvolvimento, a exposição prolongada à CAP pode, entretanto, promover redução do consumo alimentar e redução de peso corporal.

5. CONCLUSÕES

- O método desenvolvido e validado para a detecção e quantificação da migração de caprolactama a partir de filmes contendo nylon 6 em simulante etanol 95% foi considerado adequado ao propósito. Todos os parâmetros avaliados como faixa de trabalho, linearidade, efeito matriz, seletividade, repetitividade, precisão intermediária, recuperação e limites de detecção e quantificação apresentaram resultados satisfatórios. A linearidade foi comprovada na faixa de concentração de 2 a 32 mg/L. O limite de detecção e quantificação estabelecidos foram de 0,83 e 1,63 mg/L, respectivamente. A repetitividade apresentou valores para *HorRat* inferiores a 2 e a recuperação oscilou entre valores de 97,5 e 106,5%.
- Os filmes multicamadas contendo nylon 6 e destinados ao acondicionamento de mortadela, *blanquet* de peru, peito de aves, apresuntado, além daquela denominada ND foram avaliadas quanto à migração de ϵ -caprolactama. Os resultados para ϵ -caprolactama oscilaram de 7,8 a 29,7 mg/kg de simulante. Dentre as embalagens analisadas, 35% para mortadelas (suína, frango ou chester), 33% para *blanquet* de peru e 100% para peito de aves e patês apresentaram migração superior a 15 mg/kg. Caso o etanol 95% fosse aceito como simulante D alternativo pela legislação brasileira (BRASIL, 1999), como é pela legislação europeia (CE, 1982), tais amostras seriam consideradas não conformes por ambas as legislações (BRASIL, 1999; EU, 2002). Somente os limites de migração específica nas embalagens ND e de apresuntado não foram ultrapassados.
- Com relação a toxicologia da CAP, pode-se concluir que:

A CAP pode ocasionar irritação ocular e queimaduras na córnea em coelhos e dermatite cutânea em cobaias. Porém, há controvérsia quanto à capacidade da CAP causar sensibilização em cobaias. Os estudos em animais confirmaram efeitos cutâneos e oculares descritos em humanos a partir do contato direto ou pela exposição aos vapores ou poeira da CAP. Tais efeitos são caracterizados por sinais de dermatite, eczema, fissuras e/ou descamação da pele bem como conjuntivite e queimaduras da córnea.

De acordo com a EPA, os estudos epidemiológicos por via inalatória foram considerados inadequados para o estabelecimento de uma concentração de

referência de CAP para exposição crônica por via inalatória. Diferentemente, a ACGIH e o NIOSH estabeleceram, respectivamente, como concentrações limites de exposição ocupacional à CAP no ar, as concentrações de 5 mg/m³ e 1mg/m³.

Apesar das deficiências e problemas nos relatos epidemiológicos, há uma sinalização de que a CAP possa causar em humanos, irritação nasal e na garganta, tosse e broncoespasmo quando expostos por via inalatória à concentrações cerca de 60 e 12 vezes superiores aos limites estabelecidos, respectivamente pelo ACGIH e NIOSH. Podem ocorrer ainda rinorréia, ressecamento nasal, hipotensão, taquicardia, palpitações, alterações no ciclo menstrual, complicações no parto, além de convulsão e leucocitose.

Quanto à exposição por via oral, baseando-se em Serota et al. (1988), a EPA estabeleceu o valor de 0,5 mg/kg/dia ou de 35 mg/dia como a ingestão diária tolerável (IDT) para CAP para um indivíduo de 70 kg.

A UE e o Brasil estabeleceram seus limites de migração específica de CAP para embalagens plásticas (nylon 6) de alimentos, com base no estudo desenvolvido pelo NTP. Visando a proteção da saúde humana, a UE recomendou um valor para IDT de 0,25 mg/kg de peso de alimento/dia correspondente a 15 mg/kg de alimento para adultos pesando, em média, 60 kg. Algumas amostras de embalagens ultrapassaram esse limite com valores quase o dobro do recomendado.

Os riscos à saúde advindos da exposição por via oral à CAP, principalmente em níveis superiores ao limite estabelecido pela legislação (IDT) são, de uma certa forma, menos preocupantes do que por outras vias de exposição. Nos estudos com animais por via oral a CAP não foi genotóxica, teratogênica, carcinogênica e mostrou ausência de efeitos sobre o desenvolvimento e a reprodução. A exposição prolongada à CAP pode, entretanto promover redução do consumo alimentar e de peso corpóreo.

Um aspecto a ser investigado por via oral é a toxicocinética da CAP e o seu efeito sobre o metabolismo como, por exemplo, o mecanismo pelo qual o tratamento agudo leva a indução de TAT e TFO em ratos enquanto, em doses repetidas, há a reversão de tal efeito.

Diante desse levantamento, é evidente a necessidade de realização de estudos relativos à natureza e a participação da CAP nas vias metabólicas ou endócrinas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRANTES, S.M.P. Uso da eletroforese capilar para a determinação da migração química em alimentos em contato com embalagens. **Tese em Química Orgânica submetida ao Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro**. Rio de Janeiro, 182p, 1998.
- AMERICAN CONFERENCE OF GOVERNMENTAL INDUSTRIAL HYGIENISTS (ACGIH). **Documentation of the Threshold Limit Values and Biological Exposure Indices**. Cincinnati, Ohio, p. 208-11, 1991.
- ARMITAGE, P.; BERRY, G. **Statistical methods in medical research**. Oxford: Blackwell Science Ltd., 620 p., 1994.
- ARVANITOYANNIS, I.S.; BOSNEA, L. Migration of substances from food packaging materials to foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. v. 44, p. 63-73, 2004. ISSN: 1040-8398.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE EMBALAGENS (ABRE). **Centro de informações: Dados de mercado**. Disponível em: http://www.abre.org.br/centro_dados.php. Acesso em 25 de abril de 2008.
- AUTIAN, J. Plastics. In: **CASARETT & DOULL's Toxicology: The Basic Science of Poisons**. New York: Macmillan, 2ª ed, p. 531-536, 1980.
- BANER, A; BIEBER, W.; FIGGE, R.; FRANZ, R; PIRINGER, O. Alternative fatty food simulants for migration testing polymeric food contact materials. **Food Additive Contaminants**. v. 9, n°2, p. 137-148, 1992.
- BELSEY, D.A.; KUH, E.; WELSCH, R.E. **Regression diagnostics: identifying influential data and sources of colinearity**. New York: Wiley. 292 p., 1980.
- BRADLEY, E.L.; SPECK, D.R.; READ, W.A.; CASTLE, L. Method of the test and survey of caprolactam migration into foods packaged in nylon 6. **Food Additives and Contaminants**. v.21, n. 12, p. 1179-85, 2004.
- BRASIL. Lei n° 8080, de 19 de setembro de 1990. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília, DF, 20 de setembro de 1990.
- BRASIL. Resolução n° 105 de 19 de maio de 1999. Aprova os regulamentos técnicos e disposições gerais para embalagens e equipamentos plásticos em contato com alimentos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília, DF, 20 de maio de 1999.
- BRASIL. Resolução RDC n°91 de 11 de maio de 2001. Aprova regulamento técnico – critérios gerais e classificação de materiais para embalagens e equipamentos em

contato com alimentos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília, DF, 15 de maio de 2001.

BROWN, M.B.; FORSYTHE, A.B. Robust tests for the equality of variances. **Journal of The American Statistical Association**. v.69, p. 364-67, 1974.

BRUCE, M.E.; MINKKINEN, P.; RIEKKOLA, M.L. Practical method validation: validation sufficient for an analysis method. **Mikrochim. Acta**, v.128, p.92-106, 1998.

CASTLE, L.; MACARTHUR, R.; MEAD, E.M.; READ, W.A. Measurement uncertainty associated with overall migration testing. **Food Additives and Contaminants**. v. 21, n.3, p. 256-64, 2004.

COMUNIDADE EUROPÉIA (CE). Commission Directive 90/128/CEE, 13 de fevereiro de 1990. Relating to plastics material and articles to come into contact with foods. **Official Journal of the European Communities**, L. 75, 1990.

COMUNIDADE EUROPÉIA (CE). Directive 82/711/CEE, 18 de outubro de 1982. Estabelece as regras de base necessárias à verificação da migração dos constituintes dos materiais e objectos em matéria plástica destinados a entrar em contacto com os gêneros alimentícios. **Official Journal of the European Communities**, L. 340, 1982.

COMUNIDADE EUROPÉIA (CE). Directive 85/572/CEE, 19 de dezembro de 1985. Fixa a lista dos simuladores a utilizar para verificar a migração dos constituintes dos materiais e objectos em matéria plástica destinados a entrar em contacto com gêneros alimentícios. **Official Journal of the European Communities**, L. 372, 1985.

CROSBY, N.T. **Food Packaging Materials: Aspects of analysis and migration of contaminants**. Londres: Applied Science Publishers, 1981.

DRAPER, N.R.; SMITH, H. **Applied regression analysis**. New York: Wiley. 706 p., 1998.

DURBIN, J.; WATSON, G.S. Testing for serial correlation in least squares regression. **Biometrika**, v.38, p. 159-78, 1951.

EDUARDO, M.B.P. **Vigilância Sanitária**. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da Universidade do Estado de São Paulo, v.8, 1998.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA). Caprolactam (CASRN 105-60-2). **Integrated Risk Information System**. Disponível em: <http://www.epa.gov/iris/subst/0357.html>. Acesso em 12/04/2008.

ESTADOS UNIDOS DA AMÉRICA (EUA). Carcinogenesis Bioassay of Caprolactam (CAS nº 105-60-2) in F344 Rats and B6C3F1 Mice (Feed Study). **National Toxicology**

Program: Technical Report Series. U.S. Department of Health and Human Services, mar. 1982.

ESTADOS UNIDOS DA AMÉRICA (EUA). Caprolactam. **Hazardous Substances Data Bank (HSDB)**, National Library of Medicine. Atualizado em 2005.

ESTADOS UNIDOS DA AMÉRICA (EUA). Indirect Food Additives: Polymers. **Code of Federal Regulation**, title 21, v. 3. Food and Drug Administration. U.S. Department of Health and Human Services, abr. 2005.

Eurachem/CITAC. **Primeira Edição Brasileira do Guia Eurachem/CITAC: Determinando a Incerteza na Medição Analítica**, 2002.

FÉLIX, J.S.; MONTEIRO, M.; MANZOLI, J.E.; PADULA, M.; PEZO, D.; ROMERO, J.; NERIN, C. Identification and migration of degradation compounds from irradiation of multilayer polyamide 6 films for meat foodstuffs and cheese. **Analytical and Bionalytical Chemistry**, DOI 10.1007/s00216-008-1893-3, 2008. ISSN 1618-2642.

FERNANDES, M.H.C.; GARCIA, E.E.C.; PADULA, M. **Migração de Componentes e Embalagens Plásticas para Alimentos**. Campinas: Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL), 153p, 1987.

FRAUNHOFER INSTITUT FÜR LEBENSMITTELTECHNOLOGIE UND VERPACKUNG. **Guide for testing of analytical method for the determination of monomers in foods simulants and polymers**. München. 3p. M&T Project Development of methods of analysis, 1994.

FREHSE, H.; THIER, H.P. **Die ermittlung er nachweisgrenze und bestmimmungsgrenze bei ruck standanalysen nach dem neuen**. DFG-Konzept. GIT Fachzeitschrift für das Laboratorium. v.35, p. 285-91, 1991.

GERMANO, P.M.L.; GERMANO, M.I.S. **Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, 2º ed. ,655p, 2001. ISBN:85 -85519-57-6

HARTE, B.R.; BRZOZOWSKA, A; GIANCIN, J; MANNHEIM, C. Harmful effects of packagings on food products. In: **Korea International Packagin Exhibition**, Seoul, 43p., 1985.

HORWITZ, W.; ALBERT, R. The Horwitz Ratio (HorRat): A Useful Index of Method Perfomance with Respect to Precision. **Journal of AOAC International**, v. 89, n. 4, p. 1095-1109, 2006.

HORWITZ, W. Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies. **Pure Applied Chemistry**. v. 67, p. 331-43, 1995.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION (ICH). Technical requirements for the registration of pharmaceuticals for human use. **Validation of analytical procedures**. ICH Q2B. Geneva, 1996.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA (INMETRO). **Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos: DOQ-CGCRE-008**. Normatização e Qualidade Industrial. Revisão 2 em junho de 2007.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). **IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks of Chemicals to Man: Caprolactam**. World Health Organization, Geneva, v.39, p.247-76, 1986.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). **IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: Caprolactam**. v. 71, p. 383, 1999.

ISHIDATE, M.; ODAGIRI, Y. Negative micronucleous tests on caprolactam and benzoin in ICR/JCL male mice. **Mutation Research**, v.224, p.357-59, 1989.

JENKINS, W.A.; HARRINGTON, J.P. **Packaging Food with Plastics**. Lancaster: Technomic Publishing, 1991.

JUNG, R.; ENGELHART, G.; HERBOLT, B.; JAECKH, R.; MUELLER, W. Collaborative study of mutagenicity with *Salmonella typhimurium* TA102. **Mutation Research**, v.278, p.265-70, 1992.

KELMAN, G.R. Effects of human exposure to atmospheric epsilon-caprolactam. **Human Toxicology**, v.5, p.57-59, 1986.

KERR, D.I.B.; DENNIS, B.J.; BREUKER, E.L.M. Antagonism of GABA-mediated inhibition in the central nervous system by caprolactam derivatives. **Brain Research**, v.110, p.413-16, 1976.

KIRK, L.K.; LEWIS, B.A.; ROSS, D.A. Identification of ninhydrin-positive caprolactam metabolites in the rat. **Food and Chemical Toxicology**, v.25, p.233-39, 1987.

KOMA, A. The potential of nylon engineering plastics in Asia. Nylon 6 Promotional Group. **UBE Industries**, 2001. Disponível em: <http://www.npg-6.com/filesystem/upload/Publications/Engineering%20Plastics%20in%20Asia.pdf>. Acesso em 15/05/2007.

KRICHEVSKAYA, I.M. Biological effect of caprolactam and its sanitary-hygienic assessment as an atmospheric pollutant. **Hygiene Sanitaria**, v.33, p.24-30, 1968.

KRISTIANSEN, E.; SCOTT, D. Chromosomal analyses of human lymphocytes exposed *in vitro*. **Mutation Research / Genetic Toxicology**, v.224, p.329-32, 1989.

KURODA, Y.; YOKOIYAMA, A.; KADA, T. Assays for the induction of mutations to 6-thioguanine resistance in Chinese hamster V79 cells in culture. In: J. Ashby, F.J. de Serres, M. Draper, M. Ishidate, Jr., B.H. Margolin, B.E. Matter and M.D. Shelby (eds.), **Progress in Mutation Research**, New York: Elsevier Science Publishers, v.5, p.537-42, 1985.

KUROKI, T.; MUNAKATA, K. Assays for the induction of mutations to ouabain resistance in V79 chinese hamster ovary (CHO) cells in culture with cell or microsome-mediated metabolic activation. In: J. Ashby, F.J. de Serres, M. Draper, M. Ishidate, Jr., B.H. Margolin, B.E. Matter and M.D. Shelby (eds.), **Progress in Mutation Research**, New York: Elsevier Science Publishers, v.5, p.543-45, 1985.

LANÇAS, F.M. **Validação de Métodos Cromatográficos de Análise**. São Carlos: Rima, 2004.

LEVENE, H. Robust tests for equality of variances. In: OLKIN, I; GHURYE, S.G.; HOEFFDING, W.; MADOW, W.G.; MANN, H.B. (Ed.). **Contributions to probability and statistics**. Stanford University Press, 278-92, 1960.

LIU, F.; BAO, Y.; ZHENG, C.L. The investigation on the effect of caprolactam on the sexual functions of a female worker. **Journal China Work Health Occupational Disease**. v.6, p. 201-3, 1988.

LOMONOVA, G.V. Toxicity of caprolactam. **Gigiena Truda i Professional'nye Zabolevaniya**. v.10, p.54-7, 1966.

MARTYNOVA, A.P.; LOTIS, V.M.; KHADZHIEVA, E.D.; GAIDOVA, E.S. Occupational hygiene of women engaged in the production of capron fiber. **Gigiena Truda i Professional Zabde**. v.11, p. 9-13, 1972.

MCREE, A.F; LOWE, K.W. Caprolactam and benzoin: tests for induction of chromosome aberrations and SCEs in mouse bone marrow. **Mutation Research / Genetic Toxicology**. V.221, p. 347-50, 1989.

MIDIO, A.F.; IZUMIDA, D. **Toxicologia de Alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, p.232-252, 2000.

MOLECULAR SIMULATIONS INC. **Web Lab Viewer Pro versão 3.1**. San Diego, 1998.

NADEZHDINA, L.D.; TALAKINA, E.I. Status of the menstrual and child-bearing function of pregnant female workers in the caprolactam industry. **Gigiena Trudai Zabde**, v. 15, p. 43-44, 1971.

NORPPA, H.; JARVENTAUS, H. Induction of chromosome aberrations and sister-chromatid exchanges by caprolactam *in vitro*. **Mutation Research / Genetic Toxicology**. v. 224, p. 333-37, 1989.

OBERLY, T.Y.; BEWSEY, B.J.; PROBST, G.S. Tests for the induction of forward mutations at the thymidine-kinase locus of L5178Y mouse lymphoma cells in culture. In: J. Ashby, F.J. de Serres, M. Draper, M. Ishidate, Jr., B.H. Margolin, B.E. Matter and M.D. Shelby (eds.), **Progress in Mutation Research**, New York: Elsevier Science Publishers. v. 5, p. 569-82, 1985.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). **SIDS Initial Assessment Report for 12° SIAM: ϵ -Caprolactam.** United Nations Environment Programme Publications, France, 2001

ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). Test N° 451: Carcinogenicity Studies. **OECD Guidelines for the Testing of Chemicals: Health Effects.** OECD Publications, 1981.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). Test N° 471: Bacterial Reverse Mutation Test. **OECD Guidelines for the Testing of Chemicals: Health Effects.** OECD Publications, 1997.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). Test N° 476: *In vitro* Mammalian Cell Gene Mutation Test. **OECD Guidelines for the Testing of Chemicals: Health Effects.** OECD Publications, 1997.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). Test N°477: Sex-Linked Recessive Lethal Test in *Drosophila melanogaster*. **OECD Guidelines for the Testing of Chemicals: Health Effects.** OECD Publications, 1984.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). Test N° 473: *In vitro* Mammalian Chromosome Aberration Test. **OECD Guidelines for the Testing of Chemicals: Health Effects.** OECD Publications, 1997.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). Test N°482: DNA Damage and Repair, Unscheduled DNA Synthesis in Mammalian Cells *in vitro*. **OECD Guidelines for the Testing of Chemicals: Health Effects.** OECD Publications, 1986.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). Test N° 484: Mouse Spot Test. **OECD Guidelines for the Testing of Chemicals: Health Effects.** OECD Publications, 1986.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). Test N° 479: *In vitro* Sister Chromatid Exchange Assay in Mammalian Cells. **OECD Guidelines for the Testing of Chemicals: Health Effects.** OECD Publications, 1986.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). Test N° 474: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test. **OECD Guidelines for the Testing of Chemicals: Health Effects.** OECD Publications, 1997.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). Test N° 475: Mammalian Bone Marrow Chromosome Aberration Test. **OECD Guidelines for the Testing of Chemicals: Health Effects.** OECD Publications, 1997.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). Test N° 486: Unscheduled DNA Synthesis (UDS) Test with Mammalian Liver Cells. **OECD Guidelines for the Testing of Chemicals: Health Effects**. OECD Publications, 1997.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). Test N°416: Two-Generation Reproduction Toxicity. **OECD Guidelines for the Testing of Chemicals: Health Effects**. OECD Publications, 2001.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). Test N° 414: Prenatal Development Toxicity Study. **OECD Guidelines for the Testing of Chemicals: Health Effects**. OECD Publications, 2001.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). Test N°416: One-Generation Reproduction Toxicity Study. **OECD Guidelines for the Testing of Chemicals: Health Effects**. OECD Publications, 1983.

PAPASPYRIDES, C.D.; TINGAS, S.G. Comparison of isopropanol and isooctane as food simulants in migration tests. **Food and Additive Contaminants**. v. 15, n°5, p. 681-689, 1998.

PARODI, S.; ABELMOSCHI, M.L.; BALBI, C.; ANGELI, M.T.; PALA, M.; RUSSO, P. Induction of chromosome aberrations and sister-chromatid exchanges by caprolactam *in vitro*. **Mutation Research / Genetic Toxicology**, v. 224, p. 379-84, 1989.

PASCUET, N. Legislação da União Européia e IDA com respeito a contaminantes provenientes de embalagens e sua implantação nos países-membros. **“Fortalecimento do Comitê Codex Alimentarius”**. Campinas, 27p, 1996.

PATEL, M.B. Study of lung functions in caprolactam workers. **Indian Journal of Industrial Medicine**, v. 36, p. 76-81, 1990.

PETROV, N.V. Health status of women working in the chemical fiber industry based on data from medical examinations. **Vrachebnoye Delo**, v.10, p.145-48, 1975.

POGORZELSKA, Z.; MIELNICZUK, Z. Determination of ϵ -caprolactam migration from polyamide plastics: A new approach. **Packaging and Technology Sciences**. v.14, n.1, p.31-35, 2001.

REINHOLD, R.W.; HOFFMAN, G.M.; HENRY, F.B.; RINEHART, W.E.; RUSCH, G.M.; PAROD, R.J.; KAYSER, M. Subchronic inhalation toxicity study of caprolactam (with a 4 week recovery) in the rat via whole-body exposures. **Toxicological Sciences**, v.44. p. 197-205, 1998.

REXROAT, M.A.; PROBST, G.S. Mutation tests with *Salmonella* using the plate-incorporation assay. In: J. Ashby, F.J. de Serres, M. Draper, M. Ishidate, Jr., B.H.

Margolin, B.E. Matter and M.D. Shelby (eds.), **Progress in Mutation Research**, New York: Elsevier Science Publishers, v. 5, p. 201-12, 1985.

ROZENFELD, S.(org). **Fundamentos da Vigilância Sanitária**. Rio de Janeiro: Ed. Fiocruz, 2000.

RYAN, T.A.; JOINER, B.L. **Normal probability plots and tests for normality**. The States College: Pennsylvania State University, 15 p., 1976.

SARANTÓPOULOS C.I.G.L.; OLIVEIRA, L.M.; PADULA, M.; COLTRO, L; ALVES, R.M.V.; GARCIA, E.E.C. **Embalagens Plásticas Flexíveis: Principais polímeros e avaliação de propriedades**. Campinas: Centro de Tecnologia de embalagem (CETEA) / Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL), 2002.

SCHWARTZ, P.S. Food packaging regulations in the United States. **Food Additives and Contaminants**. v. 5, suppl. 1, p. 537-541, 1988.

SEROTA, C.G.; HOBERMAN, A.M.; GAD, S.C. Three generation reproduction study with caprolactam in rats. **Journal of Applied Toxicology**, v.8, p. 285-93, 1988.

SHELDON, T. An evaluation of caprolactam and benzoin in the mouse micronucleus test. **Mutation Research / Genetic Toxicology**, v.224, p. 351-55, 1989.

SHELDON, T. Chromosomal damage induced by caprolactam in human lymphocytes. **Mutation Research / Genetic Toxicology**, v.224, n°3, p. 325-327, 1989.

SILVA, A.S.; GARCIA, R.S.; COOPER, I.; FRANZ, R.; LOSADA, P.P. Compilation of analytical methods and guidelines for the determination of selected model migrants from plastic packaging. **Trends in Food Science and Tecnolog**, v.17, p. 535-46, 2006.

SITTIG, M. **Handbook of Toxic and Hazardous Chemicals and Carcinogens**. New Jersey: Noyes Publications, 2°ed., p. 179-80, 1985 .

SNEDECOR, G.W.; COCHRAN, W.G. **Statistical methods**. Ames: Iowa State University. 503 p., 1989.

SOUZA, S.V.C. Procedimentos para validação intralaboratorial de métodos de ensaio: delineamento e aplicabilidade em análises de alimentos. **Tese de Doutorado em Ciência de Alimentos pela Faculdade de FÁrmacia da Universidade Federal de Minas Gerais**, 2007.

STOFFERS, N.H.; DEKKER, M.; LINSSEN, J.P.H.; STORMER, A.; FRANZ, R.; VAN BOEKEL, M.A.J.S. Modelling of simultaneous two-sided migration into water and olive oil from nylon food packaging. **European Food Research and Technology**, 2004.

STATSOFT INC. **Statistica (data analysis software system) versão 7.0**, 2004.

THOMPSON, M.; ELLISON, S.L.R.; WOOD, R. Harmonized guidelines for a single-laboratory validation of methods of analysis. **Pure Applied Chemistry**, v.74, p. 835-855, 2002.

TILL, D.; SCHWOPE, A.D.; EHNTHOLT, D.J.; SIDMAN, K.R.; WHELAN, R.H.; SCHWARTZ, P.S.; REID, R.C. Indirect food additive migration from polymeric food packaging materials. **Critical Reviews in Toxicology**, v.18, p. 161-188, 1987.

TUMA, S.N.; ORSON, F.; FOSSELA, F.V. Seizures and dermatitis after exposure to caprolactam. **Archives of Internal Medicine**, v. 141, p. 1544-45, 1981.

UNGER, P.D.; Friedman, M.A. Disposition of [14C] caprolactam in the rat. **Food and Cosmetics Toxicology**, v.19, p. 457-62.

UNIÃO EUROPÉIA (UE). Commission Directive 2002/72/EC. 06 de agosto de 2002. Relating to plastic materials and articles intended to come into contact with foodstuffs. **Official Journal of the European Communities**, L. 220, 15 de agosto de 2002.

UNIÃO EUROPÉIA (UE). Directiva 2007/19/CE, 02 de abril de 2007. Altera a Diretiva 2002/72/CE e a Diretiva 85/572/CEE. **Official Journal of the European Union**, L. 97, 2007.

UNIÃO EUROPÉIA (UE). Performance of analytical methods and the interpretation of results. **Official Journal of European Union**. L. 221-8, 2002.

UNITED NATIONS ENVIRONMENT PROGRAMME (UNEP). **Scientific Reviews of Soviet Literature on Toxicity and Hazards of Chemicals: Caprolactam**. International Register of Potentially Toxic Chemicals. UNEP Publications. Moscou, 1985.

UNITED STATES COAST GUARD (USCG). **CHRIS: Hazardous Chemical Data**. The Chemical Hazard Response Information System (CHRIS). United States Department of Transportation. Washington, 1996.

VOGEL, E.W. Caprolactam induces genetic alterations in early germ cell stages and in somatic tissue of *D. melanogaster*. **Mutation Research**, v.224, p. 339-42, 1989.

WIKIPEDIA FOUNDATION INC. **Wikipedia: the free encyclopedia**. Disponível em <http://en.wikipedia.org/wiki/Nylon>. Acesso em 10/02/2008.

WORKING, P.K. Assessment of unscheduled DNA synthesis in Fischer F344 rat pachytene spermatocytes exposed to caprolactam or benzoin *in vivo*. **Mutation Research**, v.224, p.365-68, 1989.

ZDZIENICKA, M.Z.; SIMMONS, J.W. Assays for the induction of mutations to 6-thioguanine and ouabain resistance in chinese hamster ovary (CHO) cells in culture. n: J. Ashby, F.J. de Serres, M. Draper, M. Ishidate, Jr., B.H. Margolin, B.E. Matter

and M.D. Shelby (eds.), **Progress in Mutation Research**, New York: Elsevier Science Publishers, v. 5, p. 583-86, 1985.

ZEIGER, E.; HAWORTH, S. Tests with a preincubation modification of the *Salmonella* / Microsome assay. In: J. Ashby, F.J. de Serres, M. Draper, M. Ishidate, Jr., B.H. Margolin, B.E. Matter and M.D. Shelby (eds.), **Progress in Mutation Research**, New York: Elsevier Science Publishers, v. 5, p. 187-99, 1985.