

# DESENVOLVIMENTO DE PROCEDIMENTO DE PREPARO DE AMOSTRAS DE LEITE PARA TRIAGEM DE ORGANOFOSFORADOS POR TESTE ENZIMÁTICO E CONFIRMAÇÃO POR CROMATOGRAFIA GASOSA

## RESUMO

Um método para a detecção de resíduos de organofosforados em leite bovino, que utiliza um kit baseado na inibição da enzima acetilcolinesterase, é apresentado. Para isso, uma nova técnica de extração de organofosforados em leite bovino, que também pode ser utilizado na quantificação de tais compostos por cromatografia gasosa, foi desenvolvida. Amostras de leite UHT orgânico foram fortificadas com 0,005 a 0,1 µg/ mL de parationa-metílica e clorpirifós. O limite de detecção calculado para ambos os compostos foi de 0,005 µg/ mL. A metodologia provou ser adequada para a adoção em programas de monitoramento que visam o controle de qualidade do leite bovino.

**Palavras-chave:** Agrotóxicos Organofosforados. Leite Bovino. Enzima Acetilcolinesterase.

## SUMMARY

A method for detection of organophosphate residues in bovine milk, using a kit based on the inhibition of acetylcholinesterase, is presented. For this purpose, a new technique for extracting organophosphorus in bovine milk, which can also be used in the quantification of such compounds by gas chromatography, was developed. This extraction method can also be used in the quantification of such compounds by gas chromatography. Samples of UHT organic milk were fortified with 0,005 to 0.1 µg/mL of parathion-methyl and chlorpyrifos. The calculated detection limit for both compounds was 0,005 µg/mL. The methodology proved to be suitable for adoption in programs aiming the monitoring of bovine milk quality.

**Keywords:** Organophosphorus Pesticides. Bovine Milk. Acetylcholinesterase.

## INTRODUÇÃO

Muito se tem dito e proposto sobre a proteção do trabalhador do campo diretamente exposto à intoxicação aguda pelos agrotóxicos que são, quase sempre, inadequadamente manuseados (1-3). O mesmo não ocorre, no entanto, quanto à proteção das populações humanas e de organismos vivos em geral, indiretamente expostos através da contaminação do ar, da água e

de alimentos que contém níveis, às vezes perigosos, de resíduos de agrotóxicos (4,5).

É indiscutível a importância de uma avaliação continuada (monitoramento) da presença, em níveis indesejáveis, de resíduos dos contaminantes químicos em alimentos. No entanto, nenhum teste isoladamente preenche todos os requisitos analíticos requeridos (6).

*Christina Maria Queiroz de Jesus Moraes<sup>1\*</sup>,  
Robson Alves Luiz<sup>1</sup>,  
Silvana do Couto Jacob<sup>1</sup>,  
Cláudia Melo Moura<sup>2</sup> e  
Mauro Velho de Castro Faria<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>Departamento de Química,  
Instituto Nacional de Controle de  
Qualidade em Saúde - INCQS,  
Fundação Oswaldo Cruz-  
FIOCRUZ

<sup>2</sup>Departamento de Biologia  
Celular, Instituto de Biologia,  
Universidade do Estado do Rio de  
Janeiro - UERJ

\*Correspondência:  
christina.morais@incqs.fiocruz.br

O desenvolvimento de um sistema integrado que empregue ensaios de triagem e de confirmação parece ser crucial para assegurar que os alimentos contendo contaminantes em níveis superiores aos limites máximos de resíduos (LMR), estabelecidos pelas regulamentações vigentes, sejam introduzidos na cadeia alimentar (7). De fato, a conjugação de métodos de triagem com métodos de confirmação físico-químicos multirresíduos é a atual tendência nos países desenvolvidos. A validação de métodos rápidos, de execução simples, de baixo custo e com exatidão conhecida é, portanto, de grande valia na detecção de níveis perigosos de agrotóxicos nos alimentos destinados ao consumo humano (8,9). Tais métodos, se usados como ferramenta de triagem, detectando amostras positivas, facilitariam grandemente o trabalho da análise instrumental.

O leite é um dos alimentos mais completos, sendo importante fonte de carboidratos (lactose principalmente), gorduras, proteínas (caseína), sais minerais (cálcio) e vitaminas em diferentes estados de dispersão na água. No Brasil, deve-se enfatizar a importância do setor leiteiro como gerador de renda (3º lugar na formação da renda bruta agropecuária) e como fixador de mão-de-obra no campo, onde trabalham 2,5 milhões de produtores e seus familiares (10). No entanto, devido ao clima favorável, o crescimento de pragas é considerável, dentre as quais o carrapato (*Boophilus microplus*), que acomete preferencialmente o rebanho bovino. O uso intensivo de inseticidas é a principal estratégia em seu combate, contribuindo para tornar nosso país o líder mundial em consumo de agrotóxicos (11). A presença desses resíduos no leite pode ocorrer, também, mediante a contaminação de rações e pastagens. No entanto, poucos trabalhos de monitoramento de leite bovino têm aqui sido realizados (12,13). Vale notar que Rangel (14), ao analisar a presença de organoclorados em vinte amostras de leite “longa vida”, detectou resíduos do organofosforado clorpirifós-etil em 75% das amostras. A quantidade encontrada variou entre 0,182 e 2,846 mg/kg, valores bem acima do limite máximo de resíduos (LMR), que é de 0,01 mg/kg (15).

Considerando o acima exposto, desenvolveu-se um método de extração de resíduos de agrotóxicos organofosforados (OFs) em leite bovino para a detecção desta classe de substâncias através da inibição da atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) e posterior confirmação por cromatografia gasosa (CG). O kit utilizado foi desenvolvido pelo Laboratório de Toxicologia Enzimática (ENZITOX) da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), sendo próprio para análise de OFs em água, sendo por nós adaptado para a detecção de OFs

em leite bovino. A AChE, enzima presente nas sinapses do sistema nervoso central e periférico (16-21) é, em princípio, muito sensível aos OF que possuem em sua estrutura química o grupamento P=O, mas pouco sensível aos mais comuns (parationa metílica, fenitrotiona, malationa etc.) que apresentam o grupamento P=S. Tais compostos, normalmente, precisam ser ativados previamente, formando seus análogos oxon (P=O), processo que é normalmente realizado pelas enzimas oxidases mixtas presentes em órgãos como o fígado. No entanto, a preparação de AChE do kit acima citado é capaz de ativá-los, sendo necessário apenas uma incubação por 120 min, o que permite seu uso na detecção de todos os OF (17, 22).

Na presente comunicação descrevemos a metodologia de extração desenvolvida bem como o uso do kit de AChE na detecção de OFs em leite. Dessa forma, pretendemos contribuir para a realização de um programa nacional de monitoramento de resíduos de agrotóxicos em leite, que poderá ser somado aos demais programas visando a prevenção e controle dos riscos à saúde humana decorrente do consumo de alimentos contaminados (23-26).

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Amostras

As análises foram realizadas em 2 lotes diferentes de uma marca de leite UHT integral orgânico adquirida no mercado varejista da cidade do Rio de Janeiro e de São Paulo. Essas amostras foram inicialmente testadas pelo kit enzimático para verificação da presença ou não de algum inibidor de AChE. Todas as amostras de leite foram fortificadas com soluções dos padrões de clorpirifós e parationa metílica em concentrações entre 5 e 100 ng/mL. A utilização de leite orgânico deveu-se a inexistência de material de referência certificado (MRC), na época das análises.

### Kit enzimático

- Frasco com preparação liofilizada de acetilcolinesterase obtida a partir de cérebro de rato, com a propriedade de ativação de agrotóxicos tiofosforados, e preparada conforme CUNHA BASTOS *et al* (17) LIMA *et al* (22) e CASTRO FARIA (27). A preparação é suspensa em volume de água destilada indicado no rótulo do frasco, perfazendo uma concentração final de proteína igual a 20 mg/mL;
- Frasco com o reagente ditionitrobenzoato tamponado (solução 1,0 mM de DTNB em tampão de fosfato de sódio 0,5 M);

- Frasco com o substrato iodeto de acetiltiocolina (dessecado, sob vácuo ou atmosfera de nitrogênio) e dissolvido no volume de água destilada indicado no rótulo para fazer uma solução 1,25 mM de acetiltiocolina
- A validade do kit é de seis meses.

### Método enzimático

O método de detecção enzimática foi concebido, primeiramente, para análise de água (17). Por isso, foi pesquisado e desenvolvido um novo e eficiente método de extração de organofosforados da matriz leite bovino que pode ser usado não só como preparação prévia para o método qualitativo (enzimático), mas também para o método quantitativo de cromatografia a gás (confirmação da presença da substância).

### Extração

O método de extração foi realizado em amostras de leite UHT orgânico integral. Para isso, extratos das amostras foram inicialmente testadas quanto à presença de inibidores da AChE e, caso negativo, fortificadas com parationa metílica (agrotóxico referência para o kit enzimático) e clorpirifós que, segundo as monografias da ANVISA (15), é permitido na gordura do leite como resíduo não intencional na concentração de 0,01 µg/mL.

A 10 mL de leite, adicionou-se 10 mL de acetonitrila (grau HPLC), agitou-se fortemente por 30s e centrifugou-se a 3.000 rpm por 10 min para a remoção das proteínas do leite (28). Em seguida, transferiu-se o sobrenadante para tubo limpo e acrescentou-se 10 mL de acetato de etila (grau HPLC) e 8g de sulfato de sódio anidro, para retirada da água. Agitou-se fortemente por pelo menos 1 min e centrifugou-se a 3.000 rpm por 15 min, para a perfeita separação das fases. Coletou-se 1 0mL da fase acetato de etila (superior) e evaporou-se até à secura (35°C). O resíduo foi dissolvido em n-hexano (5 mL) e extraído com duas porções de 10 mL de acetonitrila saturada com n-hexano (29). Adicionou-se, então, sob agitação, 8g de sulfato de sódio anidro. Após filtração em papel de filtro qualitativo (30), o extrato foi evaporado em corrente de nitrogênio até a completa secagem, em banho-maria com temperatura ajustada entre 35 e 40°C. Foram também preparados controles nos quais a amostra de leite foi substituída por 10 mL de água pura.

### Dosagem da acetilcolinesterase

Utilizou-se uma modificação do método de Ellman (16), conforme descrito a seguir. O resíduo de evaporação do solvente foi dissolvido em 0,25mL da preparação enzimática convenientemente diluída conforme

instruções do kit. Agitou-se fortemente e incubou-se durante 120min a 37°C. À preparação incubada, adicionou-se 0,5mL da solução do reagente de cor ditio-nitrobenzoato (DTNB) e, em seguida, 0,5mL da solução do substrato acetiltiocolina. Após a mistura, a solução foi imediatamente transferida para cubeta de 1,0mL de espectrofotômetro (Shimadzu mod. 160 A), procedendo-se à leitura da absorvância em 412nm no módulo cinético por 3 min. A atividade enzimática foi expressa em variação da absorvância por min ( $\Delta A/\text{min}$ ). Os controles (100% de atividade) foram preparados a partir de extratos de leite previamente identificados como não contaminados por inibidores da AChE e apresentaram atividades em torno de 0,1  $\Delta A/\text{min}$ , que se mostraram iguais às obtidas quando a extração é feita diretamente a partir de água pura.

### Método cromatográfico

As condições cromatográficas foram estabelecidas pelo laboratório de Resíduos de Agrotóxicos do INCQS que constam do POP nº 65.3120.081 (31) e estão transcritas nesse manuscrito. Foi utilizado o cromatógrafo a gás 14A (shimadzu), equipado com o detector fotométrico de chama (FPD- *Flame Photometric Detector*) modelo 14B - Shimadzu, seletivo para análises de substâncias contendo enxofre e/ou fósforo, com sistema de injeção automático. As temperaturas do detector e do injetor foram de 290°C e 230°C, respectivamente. Foi usada a coluna capilar DB-5MS com 30m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro e 0,25 µm de espessura do filme. A vazão foi mantida constante em 1 mL/min, usando-se como gás de arraste o Hélio. Programação de temperatura do forno: 170°C, 1min (25°C/min); 180°C, 1min (1°C/min); 230°C, 0min (1°C/min); 260°C, 5min (5°C/min); 280°C, 5min (20°C/min). O extrato seco proveniente da evaporação do combinado de acetonitrila descrito anteriormente (método de extração) foi dissolvido em 0,25mL de acetato de etila. Desse volume, transferiu-se uma alíquota de 0,1 mL para "vial" de vidro com "insert". Foram aplicados 2,5 µL dessa alíquota na coluna cromatográfica.

### Validação do método e avaliação dos critérios de desempenho

A validação do método de extração e detecção baseou-se em vários documentos encontrados na literatura científica (32-40). A norma ABNT-NBR ISO/IEC 17025 (36) define validação de método como "a confirmação, mediante exame e o fornecimento de provas cabais de que são respeitados os requisitos específicos para uma determinada utilização pretendida".

Segundo a EURACHEM (32), os parâmetros de desempenho para métodos qualitativos que devem ser avaliados são a confirmação da identificação, a sensibilidade, a seletividade/especificidade e a precisão.

O limite de detecção do método proposto foi determinado em amostras de leite orgânico contendo, progressivamente, quantidades menores dos agrotóxicos (parationa metílica e clorpirifós) até que não se conseguisse mais detectar, de modo confiável, a presença dos mesmos. Os valores obtidos de atividade enzimática ( $\Delta A/\text{min}$  a 412nm) foram avaliados quanto à presença de valores aberrantes "outliers", pela aplicação do teste de Grubbs ( $G_{\text{calculado}} < G_{\text{tabelado}}$ ).

O estudo da recuperação de parationa metílica e clorpirifós em amostras de leite fortificadas por diferentes concentrações dessas substâncias permitiu a determinação da exatidão do método, pela comparação entre concentração real adicionada com aquela obtida experimentalmente. A recuperação para cada nível de fortificação foi calculada através da seguinte equação:

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{C_{\text{exp.}}}{C_{\text{real}}} \times 100 \quad \text{Equação 1}$$

Onde:  $C_{\text{exp.}}$  = concentração determinada experimentalmente e

$C_{\text{real}}$  = concentração de fortificação da amostra.

A precisão foi medida sob condições repetitivas para cada concentração

estudada e expressa pelo coeficiente de variação (CV%) calculado através da equação:

$$\text{CV\%} = (s/\bar{x}) \times 100 \quad \text{Equação 2}$$

Onde:  $\bar{x}$  = média das atividades obtidas ( $\Delta A/\text{min}$ ) para cada concentração  $S$  = desvio padrão

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A vantagem do uso de métodos de triagem em programas de monitoramento de contaminantes químicos no leite já foi demonstrada no trabalho realizado pelo INCQS e a VISA municipal do Rio de Janeiro, em que a presença de resíduos de antibióticos (betalactâmicos, tetraciclina e estreptomicina) foi avaliada em 57 amostras de leite pasteurizado e, em 37 delas, detectou-se a presença de antibióticos diversos. Os resultados mostraram a necessidade da implementação de um programa de monitoramento de resíduos de medicamentos veterinários nas diferentes formas de apresentação do leite bovino (41).

Dentre os trabalhos publicados sobre a detecção da presença de organofosforados em leite bovino (13,28-30,42-47), alguns envolvem o monitoramento do leite consumido (13, 29, 43, 45, 47), os restantes são estudos de métodos de extração e quantificação de OFs que não utilizam solventes tóxicos (45) ou envolvem análises rápidas e simples (28, 30, 42, 43). No entanto, todos os trabalhos citados utilizaram análises quantitativas feitas através da cromatografia em fase gasosa ou líquida, que envolvem longo tempo nas etapas iniciais de preparação das amostras, maior quantidade de reagentes e instrumentação dispendiosa, o que eleva substancialmente o custo final das análises.

Na busca de biomarcadores para serem usados como indicadores de contaminação ambiental, ocupacional e alimentar, a atividade da enzima AChE é considerada como um dos mais antigos (48). Os agrotóxicos OFs e os carbamatos são compostos conhecidamente anticolinesterásicos. Outras classes, como o organoclorado endossulfano (48,49) e o piretroide deltametrina (50) também foram avaliados quanto a essa característica, sem que diferenças significativas de inibição da AChE fossem encontradas, corroborando a especificidade dessa enzima em relação aos OF e carbamatos.

O ensaio enzimático aqui proposto, primeiramente desenvolvido para análise de água, frutas e hortaliças, foi adaptado para análise de organofosforados em leite, matriz que contém uma proporção de gorduras bem maior do que aquelas já testadas. Os resultados obtidos demonstraram que, para o leite integral, o método é sensível e capaz de detectar, com segurança, a partir do nível de 5ng/mL tanto a parationa metílica quanto o clorpirifós, como demonstrado na Figura 1 e na Tabela 1.

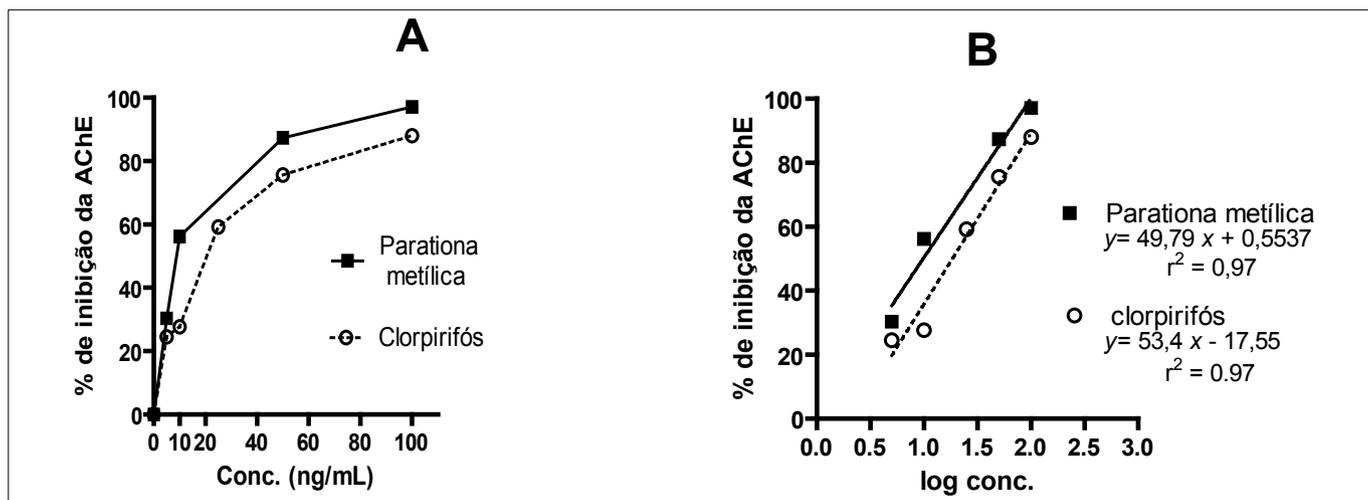
Observando-se as recuperações calculadas na Tabela 2, verifica-se que, para o clorpirifós, foram obtidos valores superiores aos 120% de recuperação, limite recomendado pelo documento do DG SANCO (40), apenas para a concentração de 5ng/mL, que se situa abaixo do LMR para esse agrotóxico. Portanto, o método demonstrou ser preciso, exato e adequado para o clorpirifós. Considerando a parationa metílica, valores de recuperação superiores aos 120% e coeficientes de variação acima de 20% foram encontrados para as concentrações de fortificação de 10 e 100ng/mL, demonstrando que, para esse agrotóxico, o método foi pouco preciso e pouco exato, embora tenha apresentado o indicador de desempenho (sensibilidade) apropriado.

**Tabela 1.** Percentagem de inibição da enzima AChE pela parationa metílica e clorpirifós em leite orgânico integral

Conc. (ng/ml)	% inibição da AChE por parationa metílica *	% inibição da AChE por clorpirifós*	log conc.	log conc. (calculado) parationa metílica**	log conc. (calculado) clorpirifós**	Conc. Calculada Parationa metílica (ng/ml)	Conc. calculada clorpirifós (ng/ml)
0	0	0					
5	30,4	24,5	0,698	0,599	0,787	3,97	6,1
10	56,2	37,7	1,0	1,118	1,0346	13,1	10,8
25	X	59,2	1,397	x	1,437	x	27,4
50	85,4	75,6	1,698	1,704	1,744	50,6	55,5
100	97,1	88	2,0	1,939	1,976	87	94,7

\* Média de três diferentes experimentos.

\*\* os log conc. calculados foram obtidos aplicando-se as equações da figura 1B.



**Figura 1.** Curva de inibição da AChE por parationa metílica e clorpirifós em leite. Amostras de leite orgânico integral fortificadas com esses agrotóxicos foram avaliadas, após extração, quanto a inibição da atividade da AChE. As concentrações dos pesticidas indicadas no gráfico A (em ng/ml) correspondem às concentrações de fortificação. O gráfico B representa as determinações das equações das retas a partir desses mesmos dados e dos  $IC_{50}$  para parationa metílica e clorpirifós, que foram iguais a 9,8 e 18ng/mL, respectivamente. Cada ponto representa a média de 3 diferentes experimentos

**Tabela 2.** Recuperações e coeficientes de variação calculados para leite orgânico integral após fortificação com parationa metílica e clorpirifós\*

Agrotóxico	Fortificação (ng/ml)	Recuperação (%)	CV (%)
Parationa metílica (n=3)	5	112,2	8,1
	10	261,7	29,7
	100	384,5	25
	5	127,7	4,5
Clorpirifós (n=3)	10	73,1	2,8
	25	109,4	5,1
	50	108,5	8,2
	100	91,4	19,3

O clorpirifós somente foi detectado por cromatografia gasosa a partir de 10ng/mL, o que, dada a concentração de 40 vezes efetuada durante a extração, corresponde a uma concentração injetada entre 300 e 1100

ng/mL, ou seja, dentro da faixa de calibração utilizada pelo método cromatográfico desenvolvido e validado pelo Laboratório de Resíduos de Agrotóxicos do Departamento de Química do INCQS (31) (Figuras 2 e 3).

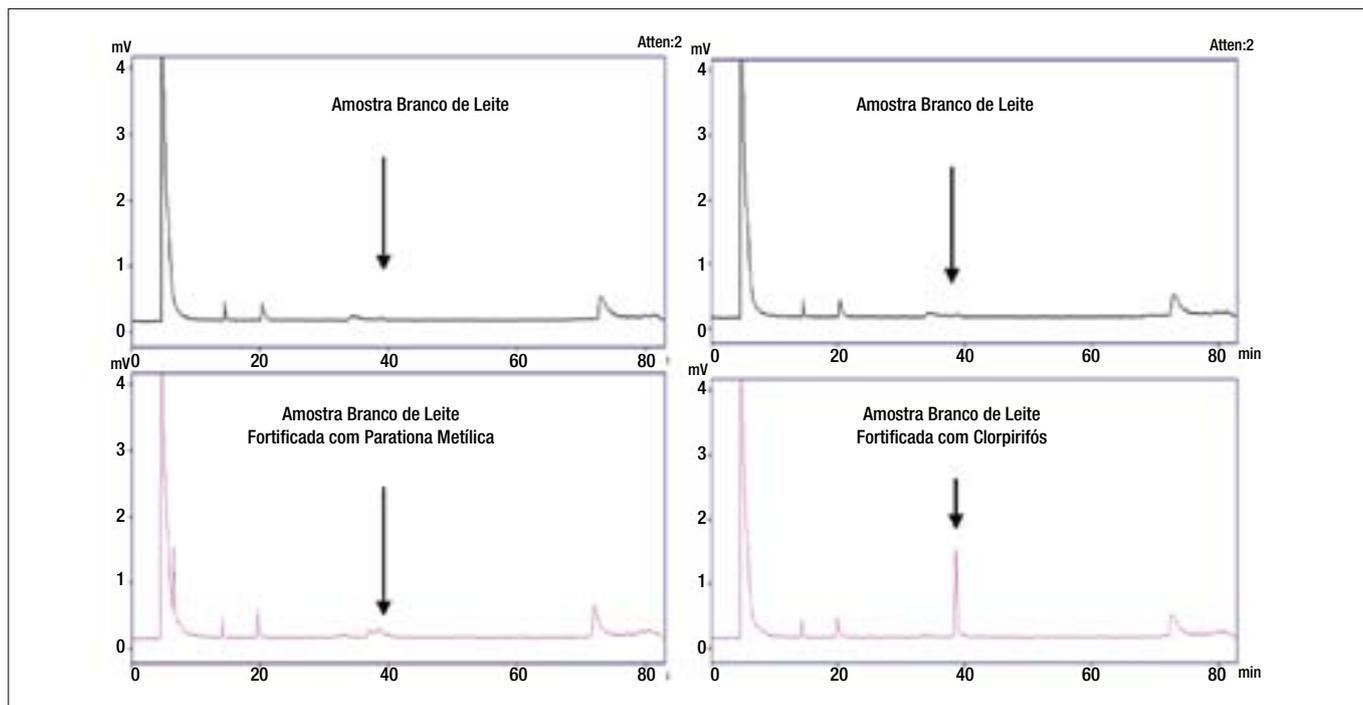


Figura 2. Sobreposição dos cromatogramas da amostra branco de leite e amostra branco de leite fortificada com parationa metilica e clorpirifós a 10 ng/ml

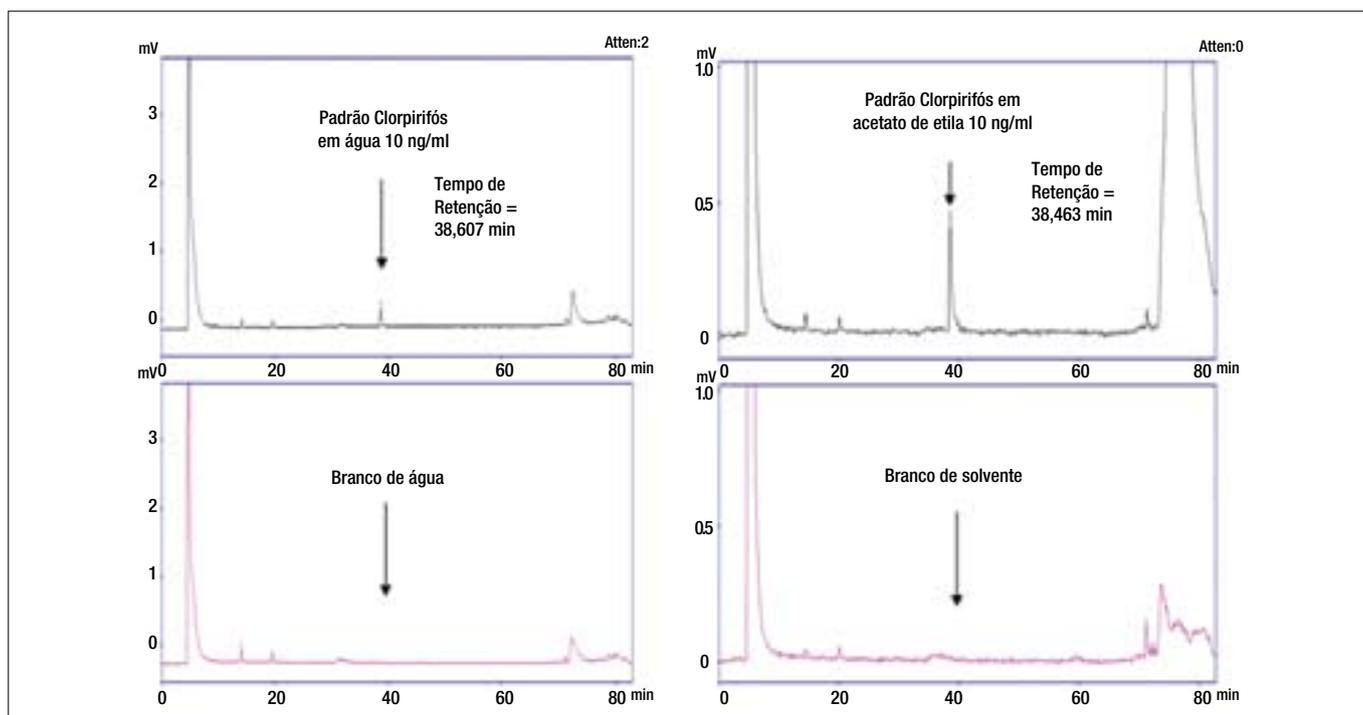


Figura 3. Sobreposição dos cromatogramas de branco de água e branco de solvente fortificados com clorpirifós a 10 ng/ml

No teste enzimático, seja qual for o agrotóxico inibidor presente na amostra de leite, o resultado deve ser expresso em “equivalentes” (ng/mL) de clorpirifós, escolhido como o organofosforado de referência, não só devido ao seu desempenho nessa matriz, mas também por atender à legislação brasileira, que definiu um LMR para esse OF no leite bovino. O laboratório que desejar utilizar o método em amostras desconhecidas de leite deverá construir, inicialmente, uma curva padrão de inibição por clorpirifós similar a mostrada na figura 1. As amostras que apresentarem resultados positivos (concentração igual ou maior que o LMR) poderão ser encaminhadas para confirmação por análise cromatográfica.

## CONCLUSÕES

No presente trabalho, o principal objetivo atingido foi o de verificar a viabilidade da utilização da atividade da AChE como biomarcador em programas de monitoramento da qualidade de um alimento gorduroso, o leite bovino. Foi possível desenvolver um procedimento de preparo de amostra que permitiu a triagem de organofosforados em leite utilizando o kit desenvolvido originalmente para análise de água. Além disso, o método de extração desenvolvido pode ser empregado, também, para confirmação de resultados por cromatografia.

O kit de inibição enzimática demonstrou ser apropriado para utilização em programas de monitoramento quanto à

presença de agrotóxicos OFs no leite, permitindo a avaliação de grande número de amostras. Esse kit também pode ser utilizado como ferramenta para normatização dos limites de tolerância dos resíduos de agrotóxicos desse grupo químico para o leite bovino, já que a Instrução Normativa 51 (IN 51) (51) não regulamenta essa classe de substâncias, referindo-se, apenas, às análises físico-químicas, microbiológicas, CCS e de resíduos de antibióticos com enfoque nas perdas industriais (52).

Os métodos propostos de extração e detecção apresentaram eficiência e sensibilidade adequadas para o monitoramento de resíduos do organofosforado clorpirifós no leite bovino sendo apropriados quanto à seletividade, já que outras classes de agrotóxicos, como organoclorados e piretroides, não inibem significativamente a atividade dessa enzima.

O limite de detecção (LOD) de 5ng/mL obtido para clorpirifós etil, mostrou que o teste é sensível por ter um LOD abaixo do LMR de 10 ng/mL previsto na legislação brasileira.

Os valores de recuperação e de CV(%) calculados para o clorpirifós estão de acordo com o estabelecido pelo documento DG SANCO (40), demonstrando a adequação do método a sua finalidade. O método se mostrou em concordância com o estabelecido pela organização internacional AOAC (39), o guia EURACHEM (32) e a norma ABNT-NBR ISO/IEC 17025 (36), para as análises qualitativas do agrotóxico organofosforado clorpirifós em leite.

## REFERÊNCIAS

- MOREIRA, J. C.; JACOB, S. C.; PERES, F.; LIMA, J. S.; MEYER, A.; OLIVEIRA-SILVA, J. J.; SARCINELLI, P. N.; BATISTA, D. F.; EGLER, M.; CASTRO-FARIA, M. V.; ARAÚJO, A. J.; KUBOTA, A. H.; SOARES, M. O.; ALVES, S. R.; MOURA, C. M.; CURI, R. *Ciência e Saúde Coletiva*, 2002, 7, 299.
- FARIA, N. M. X.; FASSA, A. G.; FACCHINI, L. A. *Ciência e Saúde Coletiva*, 2007, 12, 25.
- RIBEIRO, A. C. C.; MELLA, E. A. C. *CESUMAR*, 2007, 9, 125.
- STOPPELLI, I. M. B. S.; MAGALHÃES, C. P. *Ciência e Saúde Coletiva*, 2005, 10 (sup.), 91.
- VEIGA, M. M.; SILVA, D. M.; VEIGA, L. B. E.; CASTRO-FARIA, M. V. *Cadernos de Saúde Pública*, 2006, 22, 2391.
- MORAIS, C. M. Q. J.; LUIZ, R. A.; JACOB, S. C.; MOURA, C. M.; CASTRO-FARIA, M. V. *Anais do Encontro Nacional e II Congresso Latino-Americano de Analistas de Alimentos*, Belo Horizonte. Brasil, 2009.
- GALLI, A.; SOUZA, D.; GARBELLINI, G. S.; COUTINHO, C. F. B.; MAZO, L. H.; AVACA, L. A.; MACHADO, S. A. S. *Quím. Nova*, 2006, 29, 105.
- RAZAK, C. N. A.; SALAM, F.; AMPON, K.; BASRI, M.; SALLEH, A.B. *Ann. New York Acad. Sci.*, 1998, 864, 479.

## REFERÊNCIAS

- CHO, Y. A.; SEOK, J.; LEE, H.; KIM, Y. J.; PARK, Y. C.; LEE, Y. T. *Anal. Chim. Acta*, 2004, 62, 215.
- SILVA, N. O.; GROOTENBOER, C. S. *PUBVET*, 2008, 2 Disponível em: <http://www.pubvet.com.br/texto.php?id=164> acessada em 15 maio de 2009. [http://www.anvisa.gov.br/divulga/noticias/2009/100309\\_1.htm](http://www.anvisa.gov.br/divulga/noticias/2009/100309_1.htm), acessada em março 2009.
- HECK, M. C.; SANTOS, J. S.; BOGUSZ, JR. S.; COSTABEBER, I.; EMANUELLI, T. *Food Chem.*, 2007, 102, 288.
- NERO, L. A.; MATTOS, M. R.; BELITI, V.; BARROS, M. A. F.; PONTES-NETTO, D.; FRANCO, B. D. G. M. *Ciênc. Tecnol. Alimentos*. 2007, 27, 201.
- RANGEL, T. B. A. *Dissertação de Mestrado*, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Brasil, 2006. <http://www.anvisa.gov.br/toxicologia/monografias/index.htm>, acessada em julho 2009.
- ELLMAN, G. L.; COURTNEY, K. D.; ANDRES, V. JR.; FEATHER-STONE, R. M. *Biochem. Pharmacol.*, 1961, 7, 88.
- CUNHA BASTOS, V. L. F.; BASTOS, J. C.; LIMA, J. S.; CASTRO FARIA, M. V. *Water Res.*, 1991, 25, 835.
- HE, F. *Toxicol. Lett.*, 1999, 108, 277.
- LEE, H. S.; KIM, Y. A.; CHO, Y. A.; LEE, Y. T. *Chemosphere*, 2002, 46, 571.
- SCHULZE, H.; SCHERBAUM, E.; ANASTASSIADES, M.; VORLOVÁ, S.; SCHMID, R. D.; BACHMANN, T. T. *Biosens. Bioelectron.*, 2002, 17, 1095.
- ANDREESCU, S.; MARTY, J. L. *Biomol. Eng.*, 2006, 23, 1.
- LIMA, J. S. *et al. Toxicol. Lett.*, 1996, 87, 53.
- ABAD, A.; MORENO, M. J.; PELEGRÍ, R.; MARTÍNEZ, M. I.; SÁEZ, A.; GAMÓN, M.; MONTOYA, A. *J. Chromatogr.*, A, 1999, 833, 3.
- ABAD, A.; MONTOYA, A. *J. Agric. Food Chem.*, 1994, 42, 1818.
- HENNION, M. C.; BARCELÓ, D. *Anal. Chim. Acta*, 1998, 12, 3.
- MANCLÚS, J. J.; MONTOYA, A. *Anal. Chim. Acta*, 1995, 311, 341.
- CASTRO-FARIA, M. V. Em *É veneno ou é remédio?*; Peres, F. & Moreira, J. C. ; Editora FIOCRUZ: Rio de Janeiro, 2003, parte II.
- BEAM, J. E.; HANKINSON, D. J.; *J. Dairy Sci.*, 1964, 47, 1297.
- SALAS, J. H.; GONZÁLES, M. M.; NOA, M.; PÉREZ, N. A.; DÍAZ, G.; GUTIÉRREZ, R.; ZAZUETA, H.; OSUNA, I. *J. Agric. Food Chem.*, 2003, 51, 4468.
- PAGLIUCA, G.; GAZZOTTI, T.; ZIRONI, E.; STICCA, P. *J. Chromatogr. A*, 2005, 1071, 67.
- DETERMINAÇÃO de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos por Cromatografia. Rev. 05. In MANUAL da Qualidade. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2009. Seção 10. 21p. (65.3120.081).
- EURACHEM. The fitness for purpose of analytical methods: A laboratory guide to method validation and related topics. LGC, Teddington, Middlesex, UK: 1998. 46 p.
- VACÁRCEL, M.; CÁRDENAS, S.; GALLEGU, M. *TrAC Trends Anal. Chem.*, 1999, 18, 685.
- ANKLAM, E.; HEINZE, P.; KAY, S.; VAN DEN EEDE, G. *J. AOAC Int.*, 2002, 85, 809.
- COMUNIDADE EUROPEIA. *Council Directive 96/23/EC*, de 12 de agosto de 2002.
- ABNT-NBR ISO/IEC 17025: 2005(E). Genebra, second edition 2005-05-15.
- ELLISON, S. L. R.; FEARN, T. *TrAC Trends Anal. Chem.*, 2005, 24, 468.
- RÍOS, A.; TELLEZ, H. *TrAC, Trends Anal. Chem.*, 2005, 24, 509. <http://www.aoac.org/testkits/perftestedmtd.html>, acessada em julho 2007.
- DG-SANCO, Documento nº SANCO/2007/3131. Supersedes doc. SANCO/10232/2006 de 31 outubro de 2007.

## REFERÊNCIAS

JESUS-MORAIS, C. M. Q.; DURÃES, T. S.; NÓBREGA, A. W.; JACOB, S. C. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, no prelo, 2009.

TOYODA, M.; ADACHI, K.; IDA, T.; NODA, K.; MINAGAWA, N. *J. AOAC Int.*, 1990, 73, 770.

MUCCIO, A.; PELOSI, P.; CAMONI, I.; BARBINI, D. A.; DOMMARCO, R.; GENERALI, T.; AUSILI, A. *J. Chromatogr. A*, 1996, 754, 497.

BOLLES, H. G.; DIXON-WHITE, H. E.; PETERSON, R. K.; TOMERLIN, J. R.; DAY JR, E. W.; OLIVER, G. R. *J. Agric. Food Chem.*, 1999, 47, 1817.

AHMED, H. F. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 2000, 65, 207.

CARDEAL, Z. L.; PAES, C. M. D. *J. Environ. Sci. Health Part B*, 2006, 41, 369.

PAGLIUCA, G.; SERRAINO, A.; GAZZOTTI, T.; ZIRONI, E.; BORSARI, A.; ROSMINI, R. *J. Dairy Res.*, v. 73, p. 340-344. 2006.

KLENZ, C.; ASSIS, H. C. S. *Revista Acadêmica*, 2005, 3, 51.

SALVO, L. M.; SINHORINI, I. L.; MALUCELLI, B. E.; KLENZ, C.; SANCHEZ, D. C. O.; NICARETTA, L.; MALUCELLI, M. I. C.; BACILA, M.; ASSIS, H. C. S. *Bras. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, 2008, 45, 87.

NICARETTA, L. *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal do Paraná, Brasil, 2004.

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 51, de 18 de setembro de 2002.

<http://www23.sede.embrapa.br:8080/aplic/rumos.nsf/b1bbbc852ee105718325680005ca0ab/a4384d023606f59c03256c25006826e3?OpenDocument>, acessada em junho 2008.

“Sempre superamos nossas tecnologias para que você possa superar as suas.”

Equipamentos para ensaios gerais na área de química analítica e controle de qualidade.

LINHA COMPLETA

**IKA**®  
CONSULTE-NOS.



### EVAPORADOR ROTATIVO RV10 CONTROL

- Único com controle de vácuo integrado
- Biblioteca integrada com informações de pressão e temperatura pré-programadas para cada tipo de solvente
- Controlador Micro-processado e display digital
- 10 anos de garantia.

### AGITADOR MAGNÉTICO COM AQUECIMENTO E PLACA AQUECEDORA MODELOS: HS E HP



- Placa em Vidrocerâmica sem similar nacional
- Único com temperatura de até 550°
- Robustez e Tecnologia
- 3 anos de garantia.

Capelas de Exaustão de Gases - disponíveis em varios tamanhos, Barriletes, Câmaras Assépticas, Deionizadores, Jarras Anaeróbicas, Mantas Aquecedoras, Fornos Mufla e Encapsuladeiras Manuais.

### LANÇAMENTOS LUCADEMA

→ Sistema de Osmose Reversa



→ Chuveiro Lava-Olhos



Rua Francisco Alves, 595  
Jd. Anhanguera  
Ribeirão Preto - SP  
Fone: (16) 3441-7200  
[www.lucadema.com.br](http://www.lucadema.com.br)

**LUCADEMA**  
CIENTÍFICA