

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS**

**UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE**

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA PARA DETERMINAÇÃO
DE DIGLUCONATO DE CLORHEXIDINA E 4-CLOROANILINA EM
CARCAÇAS DE FRANGO TRATADAS. AVALIAÇÃO DE RESÍDUOS
EM CARCAÇAS APÓS O PROCESSAMENTO TÉRMICO E
DURANTE O ARMAZENAMENTO.**

EDUARDO VICENTE

**TESE PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTOR EM CIÊNCIA DE
ALIMENTOS**

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por **Eduardo Vicente** aprovada pela Comissão Julgadora em 12 de julho de 2001.

ORIENTADOR

Campinas, 12 de julho de 2001

PROF. DR^a MARIA CECÍLIA DE FIGUEIREDO TOLEDO

Prof. Dra. Maria Cecília de F. Toledo

Profa. Dra. Maria Cecília de F. Toledo
Presidente da Banca

Campinas - 2001



UNIDADE BC
N.º CHAMADA: T/ UNICAMP
V662d
V. Ex.
TOMBO BC/ 46145
PROJ. 16-392/01
0
0.11.00
17-08-01
CPD

CM00158850-6

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. – UNICAMP

V662d Vicente, Eduardo
Desenvolvimento de metodologia para determinação de digluconato de clorhexidina e 4-cloroanilina em carcaças de frango tratadas. Avaliação de resíduos em carcaças após o processamento térmico e durante o armazenamento / Eduardo Vicente. –Campinas, SP: [s.n.], 2001.

Orientador: Maria Cecília de Figueiredo Toledo
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1.Frango. 2.Clorhexidina. 3.Cromatografia líquida.
4.Cromatografia de gás. 5.Espectrometria de massas.
6.Resíduos – Análise. 7.Aminas aromáticas. 8.*4-Cloroanilina.
I.Toledo, Maria Cecília de Figueiredo. II.Universidade Estadual
de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos. III.Título.

AGRADECIMENTOS

A Deus por me conceder o dom da vida, o privilégio de pensar e a inspiração nos momentos mais difíceis.

À minha esposa Marisa e filhos Victor e Mônica, que são o centro da minha existência e me apoiaram durante o longo percurso deste trabalho.

À Prof^a Maria Cecília de Figueiredo Toledo, pela orientação, incentivo e paciência.

Aos colegas do Centro de Química – ITAL, especialmente à Lurdes, Cláudio, Débora, Andréa, Melissa, Wandréa e José Antônio, que foram importantes colaboradores para execução deste trabalho.

Ao Katumi pela amizade e realização da avaliação estatística dos resultados.

Aos colegas do CTC - ITAL, em especial à Carmem, que me deram suporte na área tecnológica para viabilizar este trabalho.

À Silvia Helena pela amizade, presteza e momentos de descontração, que também foram muito valiosos.

Ao Laboratório Enila, em especial aos Srs. Cláudio Fioravante e Enio O. Schornst, que contribuíram com suporte e informações essenciais para o trabalho desenvolvido.

À Holambra, Sr. Érico Pozer, que nos cederam as amostras e nos deram oportunidade de utilizar as instalações do abatedouro.

BANCA EXAMINADORA

Maria Cecilia de Figueiredo Toledo

Profa. Dra. Maria Cecília de Figueiredo Toledo
(membro - orientador)

Adriana Z. Mercadante

Profa. Dra. Adriana Z. Mercadante
(membro)

Carmen Contreras Castillo

Profa. Dra. Carmen Contreras Castillo
(membro)

Edir Nepomuceno da Silva

Prof. Dr. Edir Nepomuceno da Silva
(membro)

Profa. Dra. Isa Beatriz Noll
(membro)

Profa. Dra. Lúcia Maria Valente Soares
(membro)

Neura Bragagnolo

Profa. Dra. Neura Bragagnolo
(membro)

ÍNDICE

RESUMO	xvii
SUMMARY	xviii
INTRODUÇÃO	1

CAPÍTULO 1

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
1. Processamento industrial de aves.....	7
2. Modificações químicas em carne de aves.....	7
3. Contaminação em aves e produtos derivados.....	8
4. Descontaminação de carcaças.....	10
4.1 Sanitizantes.....	11
4.2 Clorhexidina.....	12
4.2.1 Propriedades químicas e estabilidade.....	12
4.2.2 Atividade antimicrobiana e aplicações	13
4.2.3 Aspectos negativos.....	15
4.2.4 Utilização em alimentos.....	16
4.2.5 Aspectos toxicológicos.....	17

4.2.6 Métodos analíticos	19
Extração e limpeza.....	19
Análise instrumental.....	20
4.3 Produto de degradação da clorhexidina: 4-Cloroanilina.....	22
4.3.1 Propriedades físicas e químicas.....	22
4.3.2 Ocorrência e formação.....	22
4.3.3 Aspectos toxicológicos.....	23
4.3.4 Métodos analíticos.....	25
5. Referências Bibliográficas.....	28

CAPÍTULO 2

Desenvolvimento de metodologia para determinação de digluconato de clorhexidina em carcaças de frango utilizando cromatografia líquida – par iônico. Avaliação de resíduos durante a refrigeração e congelamento.....	43
Resumo	45
Summary	47
1. Introdução	49
2. Material e métodos.....	51
2.1 Reagentes	51

2.2 Instrumentação	52
2.3 Tratamento das amostras	52
2.4 Homogeneização das amostras	53
2.5 Armazenamento	53
2.5.1 Amostras refrigeradas	53
2.5.2 Amostras congeladas	54
2.6 Método analítico	54
2.7 Avaliação do desempenho do método	55
2.8 Limites de detecção, quantificação e precisão do método	55
3. Resultados e Discussão	56
3.1 Desenvolvimento do método	56
3.2 Avaliação do desempenho do método	57
3.3 Análise das amostras tratadas no abatedouro	58
4. Conclusões	65
5. Referências Bibliográficas	66

CAPÍTULO 3

Desenvolvimento de metodologia para determinação de 4-cloroanilina em frangos por cromatografia gasosa -espectrometria de massas. Análise em tecidos tratados com digluconato de clorhexidina após o processamento térmico.....	71
Resumo	73
Summary	75
1. Introdução	77
2. Material e Métodos.....	79
2.1 Reagentes.....	79
2.2 Instrumentação	80
2.3 Tratamento e processamento das amostras	80
2.4 Método analítico	81
2.5 Limites de detecção, precisão e quantificação por CG-EM.....	82
2.6 Robustez do método.....	82
2.7 Confirmação de identidade	83
3. Resultados e Discussão	83
3.1 Desenvolvimento do método	83

3.2 Avaliação de desempenho do método	85
3.3 Determinação de 4-cloroanilina em amostras de pele.....	86
3.4 Confirmação de identidade	94
4. Conclusões	97
5. Referências Bibliográficas	98
CONCLUSÕES GERAIS	103
ANEXO 1 – referente ao capítulo 2	105
ANEXO 2 – referente ao capítulo 3	107
1. Robustez do método	108

LISTA DE FIGURAS**CAPÍTULO 1**

Figura 1 - Estrutura do digluconato de clorhexidina	13
Figura 2 - Estrutura da 4-cloroanilina	22

CAPÍTULO 2

Figura 1 - Cromatogramas por CLAE típicos de pele de frango	63
Figura 2 - Cromatogramas por CLAE típicos de carcaça de frango.....	64

CAPÍTULO 3

Figura 1 - Protonação reversível da 4-cloroanilina em meio ácido	84
Figura 2A - Cromatograma típico do padrão de 4-cloroanilina por CG-EM em modo SIM.....	90
Figura 2B - Cromatograma típico de pele tratada com digluconato de clorhexidina, não submetida a processamento térmico.....	91
Figura 3A - Cromatogramas típicos da análise de 4-cloroanilina em pele tratada com digluconato de clorhexidina e processada por cocção em forno convencional a gás.....	92
Figura 3B - Cromatogramas típicos de pele controle submetida a cocção em forno convencional a gás.....	92

Figura 4A - Cromatogramas típicos da análise de 4-cloroanilina em pele tratada com digluconato de clorhexidina e processada por fritura em óleo de girassol.....	93
Figura 4B –Cromatogramas típicos de pele controle submetida a fritura em óleo de girassol	93
Figura 5A - Cromatograma típico da análise de 4-cloroanilina em pele tratada com digluconato de clorhexidina e processada por fritura em óleo de girassol.....	95
Figura 5B - Espectro de massas (modo SCAN 70 eV) referente ao pico com t_R 7,26 min no cromatograma de pele tratada com DGCH e submetida a fritura em óleo de girassol, identificado como 4-cloroanilina após a comparação com o espectro da biblioteca NIST98.....	96
ANEXO 1	
Figura 1 – Curva padrão do digluconato de clorhexidina por CLAE-UV	106
ANEXO 2	
Figura 1 – Curva padrão da 4-cloroanilina por CG-EM em modo SIM	110

LISTA DE TABELAS**CAPÍTULO 2**

Tabela 1 – Recuperação de digluconato de clorhexidina adicionado a diferentes tecidos de frangos.....	58
Tabela 2 - Resíduos de digluconato de clorhexidina em carcaças armazenadas a 5°C	59
Tabela 3 - Resíduos de digluconato de clorhexidina em carcaças de frango armazenadas a -20°C	59
Tabela 4 - Resíduos de digluconato de clorhexidina em peles de frango armazenadas a 5°C	60

CAPÍTULO 3

Tabela 1 – Recuperação da 4-cloroanilina em pele fortificada com diferentes concentrações.....	85
Tabela 2 – Resíduos de 4-cloroanilina em amostras de pele tratadas com digluconato de clorhexidina, antes e após o processamento térmico.....	87
Tabela 3 – Resíduos de 4-cloroanilina em amostras de pele tratadas com digluconato de clorhexidina e homogeneizadas antes do processamento térmico	89

ANEXO 2

Tabela 1 – Variáveis avaliadas no teste de robustez do método.....108

Tabela 2 – Análise de 4-cloroanilina em pele fortificada com 200 ng/g –
combinação dos fatores alternativos.....109

Tabela 3 – Influência individual dos fatores calculada pela diferença entre a
somatória dos resultados obtidos em análises com o fator alternativo e nas
análises em que este não foi utilizado..... 109

RESUMO

O uso do digluconato de clorhexidina (DGCH) na higienização de equipamentos e instalações na indústria de alimentos e o interesse de aplicação deste produto para a descontaminação de carcaças de frango indicam a necessidade da avaliação de resíduos em alimentos. Um método por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em fase reversa, com par iônico e detecção no UV foi desenvolvido para quantificação de DGCH em frango. Também foi desenvolvido um método para a análise de 4-cloroanilina (CA), um dos produtos de degradação do DGCH, utilizando cromatografia gasosa-espectrometria de massas (CG-EM). A sensibilidade e repetibilidade constatadas para ambos métodos foram adequadas aos níveis encontrados nas amostras tratadas com DGCH. Para a avaliação dos procedimentos desenvolvidos foram efetuadas análises em carcaças e cortes de aves tratados antes e após o armazenamento ou processamento térmico. Os resíduos de DGCH tiveram um pequeno declínio durante o armazenamento a $5^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ou $-20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Análises da musculatura de carcaças tratadas e armazenadas sob refrigeração, mostraram que o DGCH praticamente não ultrapassou a barreira da pele. Baixos níveis de CA foram encontrados na pele de amostras tratadas com o sanitizante. Na avaliação do processamento térmico, constatou-se que a fritura deu origem a níveis mais elevados de CA, seguida por cocção em forno convencional. Os níveis de CA permaneceram praticamente iguais aos iniciais após a cocção em panela de pressão. Em vista dos resultados obtidos e, considerando o potencial tóxico da CA, sugere-se que os dados gerados por este estudo sejam considerados para a avaliação do uso do DGCH como sanitizante.

SUMMARY

The use of the antimicrobial agent chlorhexidine digluconate (CHDG) in the sanitization of food industry equipments and installations, and the interest on its application to the decontamination of poultry carcasses indicates the need to determine its residue in foods. An ion pairing HPLC - UV analytical method was developed to measure CHDG residues in poultry meat. Also a method using GC-MS was developed to quantify 4-chloroaniline (CA), one of the CHDG degradation products. The sensitivity and repetibility achieved by both methods were suitable to the levels founded in the samples. The analysis of treated carcasses showed a decrease of the residues of CHDG during storage at $5^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ or $-20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Analysis of the muscular tissue after refrigerated storage showed that CHDG practically did not cross the skin barrier. Low levels of CA were detected in the CHDG treated samples. Frying treated carcasses resulted in higher levels of CA in the skin, as compared with conventional oven cooking. Pressure-cooking had practically no effect on the initial CA level. In view of these results and considering the toxic potential of CA, the data generated in this study should be taken in to account in the evaluation of the use of CHDG as poultry carcasses sanitizing agent.

INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil figura entre os maiores produtores mundiais de carne de aves, com 5526 mil toneladas de carcaças produzidas no ano de 1999 e projeção de 5921 mil toneladas para o ano 2000. Estima-se que 84,7% desta produção serão destinados ao consumo interno e 15% destinados à exportação [76].

O controle da deterioração consiste num dos principais desafios para a indústria de aves no aspecto tecnológico. Condições específicas são necessárias para o armazenamento, transporte e distribuição de produtos altamente perecíveis. Produtos de origem animal podem conter microrganismos deterioradores e patogênicos, sendo que a contaminação pode acontecer ao longo de toda a cadeia produtiva, na etapa de industrialização e também na comercialização.

Problemas com a contaminação em avicultura podem ter início nas granjas que produzem matrizes e ovos destinados aos produtores. A criação com um maior adensamento populacional, adotada nas granjas que fornecem aves para o abate, reduz consideravelmente o custo de produção, mas também aumenta o risco do aparecimento e propagação de várias doenças.

A contaminação de carcaças, inclusive com microrganismos patogênicos, pode ocorrer durante o processamento das aves nos abatedouros. Bactérias presentes na pele, penas, trato respiratório e gastrintestinal podem ser disseminadas através dos equipamentos utilizados nas etapas de escaldamento, depenagem, evisceração, e resfriamento.

Os sanitizantes foram introduzidos com a finalidade de minimizar a contaminação das carcaças e, com isso, aumentar a vida útil do produto e a segurança dos consumidores. Dentre os agentes químicos utilizados em abatedouros de aves, destacam-se os produtos à base de cloro, iodóforos, ácidos orgânicos e a combinação de peróxido de hidrogênio com o ácido acético.

O digluconato de clorhexidina (DGCH), uma bi-guanida sintética amplamente utilizada na área médica e farmacêutica, tem sido avaliada como uma alternativa para os sanitizantes disponíveis no mercado. Resultados preliminares mostraram que carcaças de frango tratadas com DGCH e mantidas sob refrigeração tiveram um aumento significativo na vida-de-prateleira. A eficácia e o amplo espectro de ação podem ser comparados aos sanitizantes autorizados para o uso em abatedouros, como o cloro e os ácidos orgânicos. Excetuando-se estudos pioneiros realizados no Brasil, não foram localizados relatos da aplicação direta do DGCH em alimentos. Tendo em vista os resultados positivos em abatedouros de aves, o Ministério da Agricultura inicialmente autorizou o uso deste sanitizante para a pulverização de carcaças. Entretanto, esta permissão foi revogada posteriormente, tendo em vista a falta de informações toxicológicas e de dados referentes a possíveis resíduos no alimento. Com base nestas informações, estima-se que a população brasileira pode ter consumido carcaças tratadas com o DGCH por um período superior a dois anos.

Apesar da baixa toxicidade do produto, é imprescindível o conhecimento dos níveis residuais aos quais o consumidor será exposto. Além disso, sabe-se que, em condições adversas, a clorhexidina pode sofrer degradação, dando origem a diversos produtos com características diferentes da molécula original. Um dos produtos de degradação é a 4-cloroanilina (CA), que é potencialmente mais tóxica e apresenta evidências de mutagenicidade e carcinogenicidade. Não existem estudos a respeito da degradação da clorhexidina durante o processamento de um alimento tratado, onde diversos fatores como pH, temperatura e atividade de água podem interferir nas reações químicas. Também não se encontram disponíveis pesquisas quanto a possíveis interações da clorhexidina com componentes dos alimentos.

Em virtude dos empregos tradicionais do DGCH, a literatura descreve somente métodos para sua determinação em produtos farmacêuticos, sangue e urina. Não existem métodos analíticos apropriados para a identificação e quantificação do DGCH em alimentos para consumo humano ou animal. Além

disso, faltam informações sobre o comportamento deste sanitizante em diferentes condições de armazenamento.

Tendo em vista os pontos acima destacados, torna-se necessário o desenvolvimento de métodos para a determinação de resíduos do DGCH e de CA em carcaças de aves tratadas e posterior análise dos mesmos durante o armazenamento e após o processamento térmico dos alimentos.

O presente trabalho teve como objetivos o desenvolvimento de métodos analíticos para quantificar resíduos de DGCH e seu produto de degradação, CA, em amostras de tecidos de aves. Para a avaliação dos métodos foram feitas determinações de resíduos em aves tratadas com DGCH no abatedouro. Além disso foram efetuadas análises de DGCH em amostras de carne de frango durante o período de armazenamento sob refrigeração e congelamento. A degradação do DGCH foi avaliada pela determinação dos resíduos de CA após os processamentos térmicos normalmente empregados na preparação de carne de aves.

CAPÍTULO 1

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Processamento industrial de aves

As aves vivas chegam aos abatedouros e aguardam nas plataformas de recepção em galpões ventilados até a entrada na planta de processamento. O processo começa pelo abate, que consiste nas etapas de insensibilização ou atordoamento e sangria, que pode ser manual ou mecânica. A seguir é feita a escaldagem, que serve para completar o processo de liberação das penas. Utiliza-se água com temperatura entre 52 e 54°C e a imersão por 1,5 a 2,5 minutos. Na etapa de depenagem, um equipamento que possui um conjunto de cilindros com dedos de borracha faz a remoção mecânica das penas. O processo seguinte é a evisceração, que inclui a remoção de pés, pescoço e cabeça. Nesta etapa são feitas a extração da cloaca, a abertura do abdome, a eventração, a inspeção, a retirada das vísceras, extração dos pulmões e a toailete (remoção de papo, traquéia e esôfago remanescentes). A seguir, as carcaças são lavadas interna e externamente para a remoção de fragmentos de vísceras, membranas e sangue. Na seqüência a carcaça passa pelas etapas de pré-resfriamento (10 a 18°C) e resfriamento (0 a 1 °C) em tanques de imersão com água tratada com cloro. A temperatura das carcaças após o abate é reduzida lentamente no pré-resfriamento e rapidamente no resfriamento, que têm como objetivos a redução da temperatura, lavagem e a reidratação, evitando a proliferação de microrganismos e a deterioração das carcaças. Posteriormente, as carcaças passam pela etapa de gotejamento, seguindo penduradas pelas asas ou pescoço durante um tempo que varia de 2,5 a 4 minutos para a drenagem da água aderida. Após a classificação das carcaças, estas são encaminhadas para a separação em partes ou acondicionadas inteiras em embalagens plásticas [7,89].

2. Modificações químicas em carne de aves

Modificações químicas que ocorrem na carne de aves após o abate, durante o armazenamento ou processamento térmico podem alterar as propriedades tais como a absorção de água, coloração, rigidez muscular e ainda na interação entre os tecidos e produtos adicionados às carcaças [3].

O pH no músculo, que é praticamente neutro quando a ave está viva, diminui para valores entre 5,6 e 5,8, seis a oito horas após o abate [107].

A composição química de músculo, pele e músculo com pele obtidos de cortes de peito e coxas foi avaliada antes e imediatamente após o congelamento a -40°C e também durante o armazenamento a -18°C durante 6 meses. O processo de congelamento não afetou a umidade, mas levou a uma redução de 6,14% e 10,83% do teor de proteínas de coxa e peito, respectivamente. O pH e o índice do ácido tiobarbitúrico (TBA) não foram significativamente alterados [1].

Diferentes tipos de processamento térmico afetaram as nucleopurinas presentes na carne de aves. A perda dos componentes foram, em ordem decrescente, afetadas pela cocção com pressão, cocção simples, cocção com microondas, fritura e assado em forno [45].

3. Contaminação em aves e produtos derivados

A contaminação das aves e seus produtos pode acontecer em diferentes etapas, desde a granja até o consumidor. Os ovos que são incubados para gerar matrizes e as aves destinadas ao abate podem já conter microrganismos adquiridos nos ovários e ovidutos durante sua formação [55]. Microrganismos das fezes, solo, ar e dos equipamentos podem contaminar a casca, sendo importantes fontes de contaminação dos ovos, que podem persistir após sua eclosão e permanecer até a fase adulta das aves [62]. Após a eclosão dos ovos, outras fontes adicionais de contaminação devem ser consideradas, entre elas, a água, a ração e insetos [15, 63], tornando bastante difícil o controle em locais com área extensa e grande densidade populacional. Também o estresse que ocorre durante a criação e o transporte de animais pode ser um dos fatores responsáveis por elevada carga microbiana, cuja origem não é totalmente conhecida [74].

No processamento industrial de aves os riscos de contaminação ainda são bastante significativos. As aves chegam aos abatedouros e acabam trazendo microrganismos aderidos na superfície da pele, pés e penas, além daqueles

presentes no trato gastrintestinal [71]. Através da contaminação cruzada, conhecida também como disseminação carcaça-a-carcaça, um lote contaminado pode comprometer os demais [70,73]. Falhas na higienização de equipamentos e a manipulação inadequada das carcaças são fatores importantes que podem comprometer a qualidade do produto final [85, 100]. O desenvolvimento microbiano em aves e seus produtos é favorecido pela disponibilidade de nutrientes e água, pH e, freqüentemente, pela temperatura e demais condições de armazenamento [104].

A deterioração das carcaças pode ser promovida por um grande número de microrganismos. Os gêneros *Acinetobacter*, *Moraxella*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Corynebacterium*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Bacillus*, alguns representantes da família *Enterobacteriaceae*, além de certas espécies de bolores e leveduras, podem estar presentes nas aves vivas e ter acesso às plantas de processamento. A composição desta microbiota inicial vai sendo modificada nas diferentes etapas do processamento e durante o armazenamento, devido a alterações de temperatura, pH, modificações na estrutura das barreiras naturais e alterações bioquímicas dos tecidos [67].

Os alimentos de origem animal têm sido freqüentemente identificados como veículos de infecções e surtos de doenças em humanos [5,78]. As salmonelas, que também podem estar presentes durante a formação dos ovos, além de patógenos de outros gêneros como *Listeria*, *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Proteus*, *Pseudomonas* e *Campylobacter*, estão geralmente associados com a contaminação de aves e a disseminação durante o seu processamento [43, 67]. Estes microrganismos reconhecidamente podem comprometer a qualidade do alimento e a saúde do consumidor.

Tendo em vista o aumento dos relatos de infecções por *Salmonella* associados a aves e produtos derivados, SOCKETT [97] sugeriu que uma redução da contaminação das aves poderia diminuir indiretamente a ocorrência destas doenças em humanos. Segundo o autor, a incidência das salmoneloses está relacionada a fatores intrínsecos e extrínsecos. No primeiro grupo de fatores estão

a qualidade microbiológica dos alimentos e os modos de preparação dos mesmos. Os fatores extrínsecos são aqueles que podem aumentar os efeitos decorrentes dos intrínsecos, como é o caso do controle de temperatura.

A maioria das doenças de origem alimentar é causada por microrganismos que contaminam a planta ou animal nos estágios iniciais do cultivo/criação ou decorrem da recontaminação dos alimentos nas etapas de manipulação ou processamento. Medidas para o controle devem incluir a prevenção da contaminação dos alimentos pelos cuidados com a higiene nas diferentes etapas, aplicação de técnicas para prevenir o desenvolvimento dos microrganismos e a produção de toxinas, a eliminação dos microrganismos já instalados e a integração de sistemas para controle microbiológico e de higiene [96].

4. Descontaminação de carcaças

O problema da contaminação em aves e produtos derivados requer uma abordagem em vários níveis, que vão do aprimoramento das condições de higiene, educação das pessoas envolvidas com a manipulação de alimentos até a descontaminação das carcaças [78,110].

Várias estratégias tem sido empregadas para melhorar a qualidade das carcaças durante o processamento industrial, inclusive alterações em equipamentos e processos. O resfriamento de carcaças por imersão e por meio do ar foram avaliados por *GRAW et al.* [46]. Os resultados mostraram que o processo de imersão promoveu uma redução da contagem bacteriana nas partes externas das carcaças, mas ambas as técnicas foram ineficazes para descontaminação da cavidade visceral.

A lavagem das carcaças com água faz parte do processo industrial e visa a remoção física de restos de tecidos e órgãos, além dos microrganismos presentes nas partes externas. A utilização de imersão associada com o ultra-som tem sido uma alternativa para auxiliar a redução da microbiota aderida na cavidade abdominal e superfícies das carcaças [6].

O controle das bactérias patogênicas e deterioradoras e o aumento da vida-de-prateleira das carcaças podem ser conseguidos através do uso de irradiação. Embora eficiente, esta técnica requer investimentos significativos em equipamentos, treinamento de pessoal e ainda encontra restrições na legislação de alguns países [112].

4.1 Sanitizantes

Produtos químicos com propriedades antimicrobianas, designados como sanitizantes, têm sido utilizados para aumentar a vida útil das carcaças, controlando microrganismos deterioradores e também os patogênicos. Segundo Marel *et al.* [68], os sanitizantes devem ser efetivos, sem alterar as características organolépticas da carne e não podem deixar resíduos que sejam prejudiciais à saúde do consumidor.

Além do cloro nas suas diferentes formas, incluindo o dióxido de cloro [66, 43], outros sanitizantes têm sido avaliados para utilização em abatedouros de aves. Neste grupo podem ser destacados o fosfato trissódico [74], iodóforos, quaternários de amônia [53], ácido peracético [30] e ácidos orgânicos como o acético e láctico [112].

Uma redução significativa da contagem de mesófilos e psicotróficos foi conseguida com a utilização de 18 a 25 ppm de cloro ativo na água utilizada na lavagem das carcaças e no “chiller” [69].

Em um estudo comparativo foram testadas diferentes concentrações de ác. benzóico, ácido p-hidroxibenzóico, glucono-delta-lactona, glutaraldeído, ácido succínico, sulfito de sódio, peróxido de hidrogênio, sorbato potássio + ácido cítrico, cloro e ozônio. Após tratamento por imersão durante 15 a 20 minutos as carcaças foram avaliadas quanto à eliminação das salmonelas e alterações na aparência, odor e sabor. Apenas o sulfito de sódio foi eficiente para eliminar as salmonelas sem promover alterações organolépticas adversas [30].

Os ácidos orgânicos e seus sais, utilizados para a descontaminação superficial, podem promover um aumento significativo na vida-de-prateleira da carne de aves. Entretanto, a eficiência é dependente da natureza e concentração do ácido, bem como da temperatura de armazenamento [108].

Produtos à base de iodo, cloro, peróxido de hidrogênio combinado com ác. acético, digluconato de clorhexidina e biguanidas poliméricas foram avaliados comparativamente quanto à capacidade de redução dos microrganismos deterioradores. Constatou-se que o DGCH foi um dos produtos que teve maior efetividade, ao lado dos compostos clorado e iodóforo, aumentando a vida útil de carcaças para 9 dias a $5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Os demais sanificantes permitiram o armazenamento refrigerado por um período entre 6 e 8 dias [67].

4.2 Clorhexidina

4.2.1 Propriedades químicas e estabilidade

A clorhexidina, uma bis-biguanida (Figura 1), é quimicamente conhecida como 1,1'-hexametileno-bis[5-(4-clorofenil)biguanida] e tem sido utilizada como antisséptico de pele e superfícies (material cirúrgico, mesas e equipamentos hospitalares) desde 1953 [14].

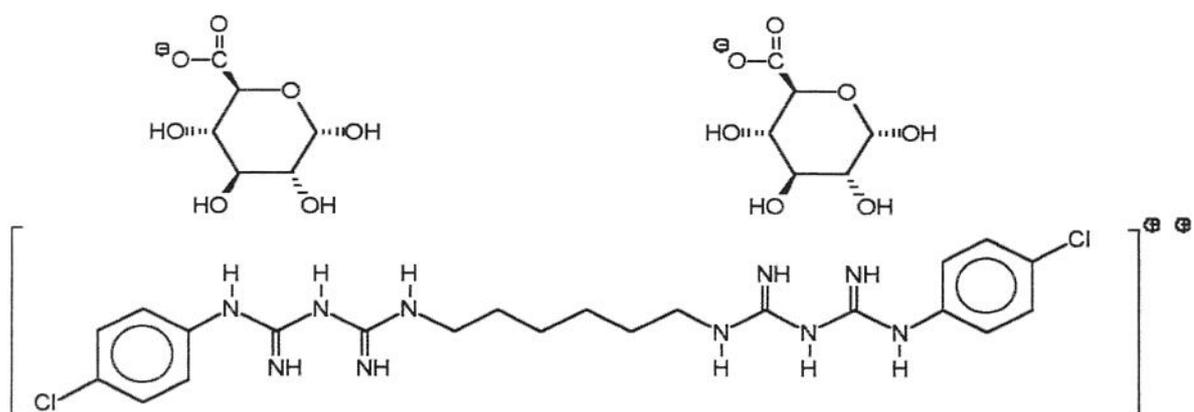


Figura 1 - Estrutura do digluconato de clorhexidina

É uma base forte que forma sais com facilidade, os quais tem sido utilizados na formulação de vários produtos farmacêuticos. Em ácido forte pode suportar até quatro cargas positivas; entretanto, só foram determinados dois valores para pK_a , 2,2 e 10,3.

Segundo a BRITISH PHARMACOPOEIA [13] são reconhecidos oficialmente três sais da clorhexidina: o dihidrocloreto, o diacetato e o digluconato, embora também sejam relatados na literatura produtos formulados com o fosfanilato de clorhexidina [38]. O sal mais utilizado é o digluconato, extremamente solúvel em água, comercializado em forma de solução aquosa 20%.

A degradação do DGCH durante a autoclavagem de solução 0,02% foi menor em pH 4,7 (0,13%) do que em pH 9,0 (1,56%) [56]. A formação da CA foi observada quando soluções de acetato de clorhexidina a 0,01% foram autoclavadas a 115°C/30 min, mas não sob aquecimento a 100°C/30 min. (NORTON, citado por REYNOLDS & PRASAD [86]).

Soluções de clorhexidina autoclavadas escureceram quando expostas à luz solar acondicionadas em polietileno ou polipropileno, mas não quando armazenadas em vidro. O DGCH mostrou-se mais susceptível à decomposição do que o acetato correspondente [29]. KOHLBECKER [60] detectou resíduos de CA em soluções comerciais de clorhexidina (0,2%) após armazenamento por 6 meses sob diferentes condições de luz e temperatura, sendo que o último fator mostrou ter maior influência na degradação.

4.2.2 Atividade antimicrobiana e aplicações

Os resultados obtidos por DAVIES *et al.* [23] evidenciaram a atividade bactericida e bacteriostática dos sais diacetato e dihidrocloreto de clorhexidina. Os produtos foram eficientes contra as formas vegetativas de bactérias gram-positivas e negativas, mas não tão eficiente contra esporos bacterianos. Também foi constatada a baixa toxicidade por via oral em animais de laboratório e não foi observado o desenvolvimento de resistência nos microrganismos avaliados. Sua

ação bacteriostática é atribuída a danos na membrana, com perda de constituintes celulares e inativação enzimática.

Embora a atividade antimicrobiana da clorhexidina contra bactérias gram-negativas tenha sido observada em soluções bastante diluídas, para estafilococos e anaeróbios esta atividade somente foi satisfatória em diluições moderadas [64]. Em altas concentrações a clorhexidina promove a precipitação das proteínas celulares e ácidos nucleicos, resultando na ação bactericida [54]. A inativação do vírus HIV “*in vitro*” [48] é um dos exemplos que demonstra o amplo espectro de ação do DGCH, apesar de outro estudo ter evidenciado pouca eficiência como preventivo para infecções ligadas ao parto [90].

Produtos veterinários contendo DGCH tem sido aplicados para higienização de tetas de vacas leiteiras. A contagem dos esporos de *Clostridium* teve uma redução de até 22% em relação ao grupo controle quando foi utilizada solução de clorhexidina para a higienização antes da ordenha [20, 32]. A adição de clorhexidina em produtos mastigáveis para auxiliar a higiene bucal de cães foi relatada por RAWLINGS *et al.* [84]. Estudos desenvolvidos com *Streptococcus bovis* e microrganismos responsáveis pela fermentação ruminal mostraram que o diacetato de clorhexidina pode ser utilizado como aditivo de rações destinadas a ruminantes [4].

As aplicações da clorhexidina na área médica e farmacêutica têm sido bastante diversificadas e incluem, por exemplo, a descontaminação de superfícies em salas cirúrgicas [54], a formulação de produtos para higienização das mãos [16], pomadas para queimaduras [14], soluções oftálmicas e para lentes de contato [87]. As propriedades antimicrobianas também foram utilizadas no tratamento de afecções oculares [61], como preventivo de infecções após introdução de dispositivo intra uterino (DIU) [40] e para a desinfecção da pele antes de intervenções cirúrgicas invasivas [102].

A clorhexidina tem sido destacada como referência entre os agentes anti-placa e produtos empregados para o tratamento de gengivites. Devido a sua

característica di-catiônica, pode ligar-se à superfície dos dentes levando à persistência de suas propriedades bactericida e bacteriostática [57]. Dentre as inúmeras aplicações em odontologia destaca-se o seu uso em dentifrícios [94], colutórios [47, 50, 51], soluções para a irrigação em tratamentos de canal [108] e produtos para o tratamento de infecções periodontais [91].

4.2.3 Aspectos negativos

Muitos dados foram gerados a partir da utilização da clorhexidina, iniciada na década de 50. Sem dúvida alguma os relatos de benefícios encontrados são muito maiores que os dos efeitos adversos associados à utilização dos diferentes sais desta biguanida. Apesar disso, todos os aspectos precisam ser considerados para a avaliação imparcial de um produto proposto como coadjuvante de tecnologia de fabricação.

A seleção de bactérias gram-negativas, promovida por biocidas catiônicos, pode estar associada à resistência a alguns antibióticos, devido a uma provável modificação na membrana. A resistência de estafilococos, mediada por plasmídios responsáveis pela resistência múltipla, também pode decorrer do uso de compostos quaternários de amônia e clorhexidina [92].

TATTAWASART *et al.* [99] constataram o desenvolvimento de resistência ao diacetato de clorhexidina e cloreto de cetilpiridinium em *Pseudomonas stutzeri*. Esta alteração foi decorrente de modificações ocorridas na membrana dos microrganismos. Também foi observado o aumento de resistência destas bactérias a alguns antibióticos, com variações dependentes das linhagens avaliadas.

Embora em número reduzido, relatos de anafilaxia após a exposição à clorhexidina através das mucosas ou pela utilização de catéteres tratados com o anti-séptico, foram descritos na literatura [81].

HASE *et al.* [50] avaliaram o uso de uma solução a 0,2% do DGCH para o combate da placa e gengivite. O teste mostrou uma redução de 38% e 22%, respectivamente, em relação ao teste com placebo. Entretanto, foram relatados casos de perda temporária da sensibilidade da mucosa oral e alterações no paladar após o uso da solução por sessenta segundos, duas vezes ao dia durante dois meses. Em outra avaliação do uso de colutório contendo 0,12% de DGCH por 4 dias constatou-se a diminuição da percepção do sabor salgado do cloreto de sódio; porém, o paladar para substâncias amargas, como quinino, não foi afetado [51].

O escurecimento dos dentes e mucosas notado após o uso de colutório contendo clorhexidina ocorre devido ao caráter catiônico da molécula, que pode precipitar ou ligar-se a cromógenos aniônicos presentes em alimentos e bebidas [2, 65].

4.2.4 Utilização em alimentos

Na indústria de alimentos a clorhexidina tem sido empregada principalmente como produto sanificante para instalações e máquinas [33].

O uso do DGCH foi avaliado para o controle de bactérias e mofos na salmoura e na casca de queijo curado [37]. Os resultados foram favoráveis ao uso, porém foi recomendada a introdução de intervalos regulares sem a aplicação do produto, para evitar a seleção da microbiota.

Um controle eficiente do fungo *Penicillium expansum*, causador da podridão em maçãs, foi conseguido pelo tratamento pós-colheita com soluções de DGCH [93].

MACHADO [67] concluiu que a ação antimicrobiana do DGCH foi maior que a de produtos à base de cloro ou biguanidas poliméricas, estendendo a vida útil de carcaças de frango para 9 dias em temperatura de $5^{\circ}\text{C} \pm 1$, apesar de 100% delas estarem contaminadas com coliformes fecais.

DELAZARI *et al.* [26] avaliaram a eficiência da lavagem com uma solução 0,1% de DGCH na descontaminação de carne bovina, previamente inoculada com *Escherichia coli* O 157:H7. Foi constatada uma redução da contaminação da ordem de 5 log UFC/cm² em relação ao grupo controle. A eficiência foi maior no tecido muscular e gordura do que nos tecidos conectivos.

Inicialmente, o DGCH foi utilizado apenas como desinfetante de instrumentos, instalações, equipamentos e superfícies. A Autorização de Uso de Produto (AUP) N° 184/93 [9] conferida pelo Ministério da Agricultura Abastecimento e Reforma Agrária, estendeu a aplicação para a pulverização direta de carcaças de frango, suínos e bovinos. Posteriormente, esta modalidade de aplicação foi revogada e o pedido de registro indeferido pela Portaria 264 de 13/10/95 [10]. Os motivos alegados foram a possibilidade de resíduos no produto final, ausência de informações toxicológicas e a possibilidade de mascarar falhas no processo tecnológico, no que se refere aos valores microbiológicos. A AUP N° 255/99 [11] regulamentou o uso do DGCH para desinfecção de equipamentos, instalações e braços/mãos de operadores em indústrias que manipulam produtos de origem animal (matadouros, laticínios, indústria de pescado e afins).

4.2.5 Aspectos toxicológicos

A baixa toxicidade da clorhexidina já foi destacada nos primeiros estudos realizados por DAVIES *et al.* [23]. A DL₅₀ oral em camundongos, segundo FOULKES [34], é de 1800 mg/kg p c.. A dose de 22 mg/kg p.c., por via endovenosa, foi estabelecida como a DL₅₀ correspondente. Nos testes de toxicidade com duração de 24 meses, foram administradas doses de 125 mg/kg p c. da base livre para machos ou 158 mg/kg p c. da base livre para fêmeas. Nenhuma manifestação de toxicidade ou aparecimento de tumores foi observado; apenas relatou-se o surgimento de células gigantes nos nódulos linfáticos abdominais.

PEREIRA [79] determinou a DL₅₀ de 550 mg/kg p.c. de DGCH por via oral para camundongos. A administração “*ad libitum*” de solução 0,02% em bebedouros, durante 14 semanas não prejudicou o desenvolvimento e a fecundidade de camundongos machos e fêmeas. Apesar do número de filhotes ter sido menor no grupo controle, não foram constatados efeitos teratogênicos nos filhotes até 20 dias depois do nascimento.

WINROW [111] efetuou estudos com clorhexidina marcada com ¹⁴C e concluiu que a absorção pelo trato gastrointestinal é pequena, tendo a molécula afinidade pelas mucosas. A clivagem metabólica foi considerada mínima, não tendo sido evidenciada a formação de CA.

DOUB *et al.* [31] identificaram 11 componentes resultantes da degradação da clorhexidina. Um destes produtos, a CA, tem sido apontada como responsável pela indução de anemia, devido à formação da metahemoglobina [18]. Efeitos carcinogênico e mutagênico também têm sido atribuídos à p-cloroanilina [19].

Em uma pesquisa realizada por van MAANEN *et al.* [106] foi constatada a redução na quantidade de nitrosaminas na saliva e urina após o uso de um colutório a base de clorhexidina. Neste estudo foi fornecida uma dieta composta de vegetais ricos em nitratos (alface ou espinafre) e derivados de peixes contendo altos níveis de aminas, 2 vezes ao dia, por um período de 4 dias. Voluntários utilizaram um colutório contendo clorhexidina após a alimentação, sendo que no grupo controle não havia componentes antissépticos no produto utilizado. O consumo destes alimentos resultou em aumento significativo das nitrosaminas excretadas, entretanto, a higienização da boca com o produto contendo clorhexidina levou à inibição da formação de nitrosaminas carcinogênicas.

4.2.6 Métodos analíticos

- Extração e limpeza

Tendo em vista as propriedades químicas específicas da clorhexidina, poucas variações foram propostas para sua extração.

GAFFNEY *et al.* [39] publicaram um procedimento para a análise de clorhexidina em amostras de urina, iniciando pela extração em cartucho de C₁₈, seguida da eluição do analito com metanol.

Na maior parte dos métodos, a extração da clorhexidina das diferentes matrizes é efetuada em meio alcalino, o que assegura que o analito vai estar nem sua forma neutra, solúvel em solventes orgânicos.

Para a determinação de clorhexidina em sangue e urina, HUSTON *et al.* [54] efetuaram a extração com éter etílico em meio alcalino (NaOH 1N). BROUGHAM *et al.* [14] optaram pela extração com clorofórmio contendo 2% isopropanol, após a alcalinização com NaOH 2M, seguido da partição reversa do clorofórmio com ácido sulfúrico 0,005M.

Ao desenvolverem um método para a análise do nível residual de clorhexidina em saliva, PESONEN *et al.* [80] efetuaram uma partição entre a saliva alcalinizada com NaOH 4,5 M e acetonitrila. A fração orgânica foi separada da aquosa após a centrifugação. Nenhuma etapa de limpeza adicional foi necessária e a amostra foi diluída com tampão fosfato de sódio pH 2,5, a fim de proporcionar uma composição bastante próxima à da fase móvel. TSUCHIYA *et al.* [103] também desenvolveram um procedimento para determinação de clorhexidina em saliva. A amostra inicialmente foi desproteïnizada pela adição de ácido e a seguir injetada em cromatógrafo líquido com detector de arranjo de diodos e fase móvel contendo pentanosulfonato como par iônico.

A composição da matriz não interferiu na quantificação do DGCH em soluções oftálmicas por CLAE em fase reversa. A interação do DGCH com componentes da coluna cromatográfica e dos recipientes onde foram armazenadas as soluções foi dependente dos íons presentes. As perdas do analito foram maiores em soluções contendo borato e menos acentuadas em soluções contendo cloretos, tiosulfato e edta [17].

- Análise instrumental

Devido à natureza polar e iônica da clorhexidina, os métodos para separação, identificação e quantificação utilizam com maior frequência a cromatografia líquida. Todavia, a análise de matrizes relativamente simples também foi efetuada por outras técnicas.

Para a determinação de pureza da clorhexidina base, assim como dos sais acetato, hidrocloreto e digluconato, a BRITISH PHARMACOPOEIA [13] indica a titulação em meio não aquoso. O método preconiza a solubilização da amostra em ácido acético glacial e a titulação com ácido perclórico 0,1 N, utilizando o cristal violeta como indicador. Para a determinação mais precisa do ponto final da titulação é indicada a titulação potenciométrica.

A análise da clorhexidina em preparações farmacêuticas utilizando método colorimétrico foi descrita por HOLBROOK [52]. Entretanto, a presença de outros componentes resultava em interferência nos resultados das análises.

A determinação de clorhexidina por cromatografia gasosa (CG) apresenta a desvantagem de ser indireta, pois necessita de hidrólise para formar a CA, o que impede a distinção entre a CA previamente existente na amostra [54].

Algumas opções de par iônico foram avaliadas para análises por CLAE em fase reversa de C₁₈ com detector UV (230 a 260 nm). Os ácidos heptanossulfônico, tolueno-4-sulfônico e pentadecafluorooctanóico foram considerados os mais eficientes; contudo, os sais contendo íons sódio tiveram

influência negativa na separação cromatográfica em coluna ODS 10 μ e fase móvel metanol-água [54]. RICHARD *et al.* [87] descreveram um método para determinação simultânea de clorhexidina e p-cloroanilina em formulações farmacêuticas utilizando uma coluna μ Bondapak 10 μ (30 cm x 3,9 mm di). Foram avaliadas fases móveis com diferentes proporções de metanol, tampão acetato de sódio pH 4 e heptanossulfonato de sódio como par iônico. GAFFNEY *et al.* [39] utilizaram coluna cromatográfica e composição de fase móvel semelhantes, mas empregando o ácido pentadecafluorooctanóico como par iônico e com pH 5. A fase móvel utilizada por PESONEN *et al.* [80] foi composta por uma mistura isocrática de acetonitrila e tampão fosfato 0,1 M pH 2,5, incluindo 0,05M de trietilamina e 0,005 M de ác. heptanossulfônico (35:65). A coluna empregada foi uma LiChrospher[®] 100 5 μ (125mm x 4 mm di).

STEVENS *et al.* [98] desenvolveram metodologia analítica para a determinação de clorhexidina e seus produtos de degradação (CA, fenilbiguanida e p-clorofenilbiguanida), em soluções para lentes de contato. O método utiliza CLAE-C₁₈ isocrática e detecção em UV em 220 nm. Foi ressaltada a necessidade de adicionar 0,7% de NaCl às soluções padrão de DGCH, a fim de compensar a interferência dos íons excipientes no mecanismo de associação e dissociação com o heptanossulfonato de sódio.

DOUB *et al.* [31] descreveram a determinação de 11 produtos de degradação da clorhexidina em soluções comerciais, utilizando CLAE, colunas Nucleosil[®] C₁₈ (3 μ m) e Zorbax[®] RX-C₈ (5 μ m) e um gradiente não linear de tampão acetato de amônio 0,1 M pH 5 e acetonitrila. A detecção foi feita em 230 nm.

HA & CHEUNG [47] estabeleceram um método para 6 produtos de degradação, utilizando coluna de fase reversa polimérica, que não apresenta os inconvenientes das colunas de fase reversa com suporte sólido de sílica, que favorecem o aparecimento de picos com cauda.

A utilização de uma coluna com fase estacionária de poliestireno com ligações cruzadas (5 μ , 250 mm x 4,6 mm di) permitiu a avaliação do efeito do pH

da fase móvel (acetonitrila - acetato de sódio ou ácido trifluoroacético) na separação dos picos da clorhexidina e CA. O emprego do detector de arranjo de diodos também possibilitou constatar que a modificação do espectro de absorção foi dependente do pH [41].

A eletroforese capilar em meio não aquoso foi utilizada na determinação da clorhexidina em preparações farmacêuticas [8], tendo sido escolhido o metanol para solubilizar a amostra de creme contendo o antisséptico. Segundo os autores, análises em alimentos e fluidos biológicos também podem ser viabilizadas pela mesma técnica.

4.3 Produto de degradação da clorhexidina: 4-cloroanilina

4.3.1 Propriedades físicas e químicas

Pertencente à classe das aminas aromáticas substituídas (Figura 2), a CA (CA) é insolúvel em água fria, tem ponto de ebulição de 232°C e pressão de vapor a 20°C de 0,02 hPa [72].

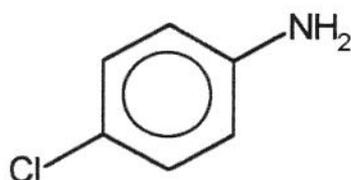


Figura 2 - Estrutura da 4-cloroanilina

4.3.2 Ocorrência e formação

Aminas monocíclicas aromáticas, ou derivados de anilina, são intermediários na produção de borrachas, plásticos, espuma de poliuretano, pigmentos, pesticidas e produtos farmacêuticos [25].

A clorhexidina, produto antimicrobiano amplamente utilizado na indústria farmacêutica, pode dar origem à CA durante o armazenamento e o processamento térmico [29, 57].

A CA foi identificada como produto de degradação de pesticidas dos grupos fenil uréia e fenil carbamatos [59]. O diflubenzuron injetado em cromatógrafo gasoso pode dar origem ao p-clorofenil isocianato, p-cloroanilina e 2,6-difluorobenzamida. O p-clorofenil isocianato por sua vez, também sofre degradação e forma a p-cloroanilina [109].

A degradação do buturon, herbicida considerado como não persistente no solo, foi acompanhada durante sete estações climáticas, tendo sido encontrados durante este período resíduos de seu produto de degradação, a CA [21].

FREITAG *et al.* [35] aplicaram ^{14}C 4-cloroanilina no solo e monitoraram níveis residuais neste e nas plantas durante 3 anos. A radioatividade detectada após hidrólise na fração do solo insolúvel em clorofórmio foi identificada como CA.

Resíduos de CA foram extraídos do solo 16 anos após a aplicação do herbicida buturon (fenil uréia), utilizando extração supercrítica com metanol. Segundo SCHEUNERT *et al.* [95], esta persistência poderia ser explicada pela formação de ligações covalentes com precursores dos ácidos húmicos presentes no solo.

4.3.3 Aspectos toxicológicos

As aminas aromáticas, classe à qual pertence a CA, têm sido alvo de pesquisas na área de contaminantes ambientais e saúde ocupacional. Estes compostos e seus derivados substituídos são considerados perigosos devido à sua toxicidade e carcinogenicidade ou pela possibilidade de conversão em compostos N-nitroso [19, 75].

Devido a sua importância toxicológica, a CA e outras aminas substituídas foram incluídas, pela Comunidade Européia, na lista de poluentes prioritários que devem ser monitoradas em águas ambientais [22].

Estudos toxicológicos da CA em peixes (“zebrafish” *Brachydanio rerio*) evidenciaram alterações celulares importantes. Foram observados distúrbios na compartimentalização dos hepatócitos, decréscimo do número de peroxissomas e fracionamento do retículo endoplasmático rugoso. Em trutas também foi promovido o aparecimento de inclusões nucleares, vesiculação e aumento das mitocôndrias [12]. A CA inibiu fortemente a síntese de DNA do *Bacillus subtilis* e prolongou o processo de replicação do DNA, pela inativação da enzima DNA polimerase I [77].

O sistema hematopoiético é o alvo da toxicidade da CA, que é considerada carcinogênica para ratos e camundongos machos [18, 19]. Também foram constatados os efeitos tóxico e imunotóxico, dependentes da dose aplicada [58].

Após avaliações toxicológicas o Instituto Nacional do Cancer e o Grupo de Avaliação do Cancer da Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA) classificaram a CA como mutagênica [24].

A legislação americana estabelece a tolerância de resíduos do inseticida diflubenzuron em arroz e inclui seus metabólitos 4- clorofenil uréia e CA. Os limites estabelecidos para CA foram 0,02 µg/g para o arroz e 0,8 µg/g para arroz em casca [105]. Estes limites foram baseados em informações toxicológicas e nas evidências de carcinogenicidade obtidas em estudos desse composto.

Contrariando algumas evidências citadas, testes efetuados com *S. typhimurium* TA98 e TA100 não constataram evidências de mutagenicidade ou promutagenicidade da CA [82].

O risco associado ao consumo de CA pode estar relacionado à oxidação das aminas na presença de hemoglobina. As hemácias podem ser o sítio de

bioativação de aminas aromáticas, levando à formação de produtos N-oxi, que são potentes mutágenos e carcinógenos [44].

4.3.4 Métodos analíticos

Em virtude das cloroanilinas serem poluentes ambientais resultantes da atividade industrial, diversas metodologias são descritas para sua análise em água. A determinação de 3-cloroanilina, 4-cloroanilina, 4-bromoanilina e 3-cloro-4-metilanilina em matriz aquosa, incluindo urina, foi efetuada por CG. A análise foi possível após a acetilação das amostras com anidrido acético em meio básico. A seguir, uma segunda reação foi feita com o anidrido trifluoroacético, para a obtenção dos diacil-derivados. Para esta análise foi selecionada a benzilamina como padrão interno [49].

A análise de aminas aromáticas (o-toluidina, p-cloroanilina, e outras anilinas) em águas foi efetuada pela técnica de microextração em fase sólida (SPME) e cromatografia gasosa – espectrometria de massas (CG-EM). Uma fibra de 65 mm, com fase estacionária carbowax divinilbenzeno, foi utilizada para a adsorção do analito. Alterações de parâmetros como pH e concentração de sal também foram avaliadas [75].

A extração seletiva de pequenas quantidades de aminas presentes em água foi feita em armadilha composta de carbono grafitizado, ligada em série com uma resina de troca catiônica. Posteriormente a eluição dos analitos, a determinação foi feita por CLAE em coluna C₁₈-DB 5 μ (250 x 4,6 mm di), fase móvel tampão fosfato - acetonitrila (64:36) e detector UV fixado a 240 nm [27].

COQUART & HENNION [22] desenvolveram um método onde a retenção das cloroanilinas, na sua forma neutra, foi feita pela passagem da água em pré-colunas de polímero apolar (PRP-1) conectado em série com outra pré-coluna com resina de troca catiônica (BC-X8). As cloroanilinas foram a seguir eluídas da coluna de troca catiônica e injetadas em cromatógrafo líquido. A eluição da

coluna de fase reversa foi efetuada com um gradiente água-acetonitrila. Foram utilizados detectores UV e eletroquímico para a quantificação dos analitos.

DJOSAN & FARAJ-ZADAH [28] descreveram um método para a determinação de cloroanilina em água utilizando derivação pré-coluna com fluorescamina. O isolamento e a pré-concentração dos derivados foram efetuados em coluna de extração em fase sólida de C₁₈ e a determinação por CLAE-detector de fluorescência (excitação a 395 nm e emissão 495 nm). A coluna empregada foi uma Spherisorb C₈ e a fase móvel tetrahidrofurano-água-ácido fórmico (42:56:2).

A formação da CA e outras amins aromáticas a partir do metabolismo ou degradação de alguns pesticidas levaram ao desenvolvimento de métodos para análises em alimentos e amostras de origem biológica. DE BALUGERA *et al.* [24] descrevem uma técnica para análise da CA em mel utilizando extração sólido/líquido prévia e CLAE-C₁₈ com detecção amperométrica. A fase móvel foi acetonitrila- tampão citrato de sódio hidrogenofosfato pH 7 (30:70), com fluxo de 1mL/ min .

A extração de CA, originada da degradação do agrotóxico diflubenzuron em matrizes vegetais, foi feita com acetonitrila. A seguir, para a eliminação de possíveis interferentes, o extrato foi percolado através de um cartucho de aminopropil. A determinação foi feita por CLAE com coluna C₁₈, com fase móvel composta de acetonitrila, metanol e água (50:2:48) e detector de arranjo de diodos [88].

RASMUSSEN *et al.* [83] fizeram a determinação de cloroanilinas em sabões bactericidas utilizando cromatografia de troca iônica e detecção em UV.

As técnicas "head space" - SPME e CG-EM foram associadas para a determinação de amins aromáticas (anilina, o-toluidina, 2-cloroanilina, 2,6-dimetilanilina, 2,4,6-trimetilanilina) em urina, sangue e leite. Para cada tipo de amostra foi necessário estabelecer condições específicas de temperatura, tempo e

força iônica da matriz a fim de otimizar a eficiência da adsorção dos analitos na fibra de SPME [25].

A metodologia para análise de cloroanilinas e nitroanilinas em solo, desenvolvida por FROMBERG *et al.* [36], também utilizou as técnicas “head space”-SPME” e CG-EM. Neste procedimento, foram empregadas fibras de poliacrilato ao invés de polimetilsiloxano, descritas anteriormente nos métodos para análise de água. Foram relatados problemas de interferência do conteúdo de carbono orgânico da matriz, que impediu a quantificação dos analitos.

TRAINOR & VOROUS [101] descreveram um método para determinação de CA por CG-EM, com ionização química negativa após derivatização.

A determinação de CA em esponja de uso cirúrgico contendo DGCH alcoólico foi feita por CG com detector de ionização de chama. A simples extração da amostra com 1-butanol promoveu a precipitação da clorhexidina e solubilização do material da esponja, permitindo a análise da cloroanilina [42].

5. Referências Bibliográficas

- [1] ABD, E.L.; RAHMAN, N.R.; ABOU-ARAB, A.A.; RIZK, IRS; IBRAHIM, M.T. Some quality parameters of chicken as affected by freezing and frozen storage. **Annals of Agricultural Science, Ain Shams University**, v. 34, n. 2, p. 1089-1101, 1989.
- [2] ADDY, M; MORAN, J.; NEWCOMBE, R.; WARREN, P. An in vitro study on the cytotoxicity of chlorhexidine digluconate to human gingival cells. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 22, n. 12, p. 923-928, 1995.
- [3] AHN, D.U.; MAURER, A.J. Poultry meat color: pH and the heme-complex forming reaction. **Poultry Science**, v. 69, n. 11, p. 2040-2050, 1990.
- [4] ATTIA-ISMAIL, S.A. ; MARTIN, S.A.; CALLAWAY, T.R. Effects of chlorhexidine diacetate on ruminal microorganisms. **Current Microbiology**, v. 36, n. 6, p. 348-352, 1998.
- [5] BEAN, N.H. & GRIFFIN, P.M. Foodborne disease outbreak in United States, 1973-1987: Pathogens, vehicles, and trends. **Journal of Food Protection**, v. 53, p. 804-817, 1990.
- [6] BENEDITO, J.; BON, J.; SANJUAN, N.; FRAU, M. Utilization of ultrasound in the food industry. II. Applications. **Alimentacion Equipos y Tecnologia**: v. 15, n. 1, p. 113-120, 1996.
- [7] BERAQUET, N.J. Abate e evisceração. In: FUNDAÇÃO APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS. **Abate e processamento de frangos**. Campinas, Fundação APINCO C. T. A., 1994. p. 19-24.
- [8] BJORNSDOTTIR, I.; TJORNELUND, J.; HANSEN, S.H. Nonaqueous capillary electrophoresis—its applicability in the analysis of food, pharmaceuticals and biological fluids. **Electrophoresis**, v. 19. n. 12, p. 2179-2186 1998.

- [9] BRASIL . Ministério da Agricultura, Abastecimento e Reforma Agrária DOI/DIPOA. **Autorização de uso de produto (AUP) N° 184/93**. Brasília, 25.08.1993.
- [10] BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento DOI/DIPOA. Portaria 264 de 13 de Outubro de 1995. **Diário Oficial da União**. Número 201, outubro de 1995.
- [11] BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento DOI/DIPOA. **Autorização de uso de produto (AUP) N° 255/99**. Brasília, 07.07.1999.
- [12] BRAUNBECK, T.; STORCH, V.; BRESCH, H. Spécies-specific reaction of liver ultrastructure in zebrafish (*Brachydanio rerio*) and trout (*Salmo gairdneri*) after prolonged exposure to 4-chloroaniline. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 19, n. 3, p. 405-418, 1990.
- [13] BRITISH PHARMACOPOEIA. Office of the British Pharmacopoeia. London, Her Majesty's Stationery Office. 1993. v.1.
- [14] BROUGHAM, L.R.; CHENG, H.; PITTMAN, K.A. Sensitive high-performance liquid chromatographic method for the determination of chlorhexidine in human serum and urine. **Journal of Chromatography**, v. 383, p. 365-373, 1986.
- [15] BRYAN, F.L., Poultry and poultry meat products. In: **Microbial Ecology of Foods**, ICMFeds., v. 2, Academic Press, New York, 1980, p. 410-458.
- [16] CARRET, L.; REVERDY, M.E.; LAFFORGUE,C.; FALSON, F.; FLEURETTE, J.; FRENEY, J. Kinetics of chlorhexidine on intact skin following a single application. **Pathologie Biologie**, v. 45, n. 9, p. 737-740, 1997.

- [17] CHEUNG, A.P.; MAVAR R; CARLSON C; CHIANG WK. Problems affecting the liquid chromatographic quantitation of chlorhexidine digluconate in ophthalmic solutions. **Journal Pharmaceutical Biomedical Analysis**, v. 9, p. 41-45, 1991.
- [18] CHHABRA, R.S.; THOMPSON, M.; ELWELL, M.R.; GERKEN, D.K. Toxicity of p-chloroaniline in rats and mice. **Food and Chemical Toxicology**, v. 28, n. 10, p. 717-722, 1990.
- [19] CHHABRA, R.S.; HUFF, J.E.; HASEMAN, J.K.; ELWELL, M.R.; PETERS, A.C. Carcinogenicity of p-chloroaniline in rats and mice. **Food and Chemical Toxicology**, v. 29, n. 2, p. 119-24, 1991.
- [20] COLOMBARI, G.; MELANI, D.; NEGRINI, A.; CAUZZI, C. Effect of in-stall teat cleaning on the spore count of milk. **Latte**, v. 17, n. 7, p. 650-653, 1992.
- [21] CONSTENLA, M.A.; MOZA, P.; SCHEUNERT, I.; HAQUE, A.; KLEIN, W. Fate of buturon, ^{14}C in soil during seven seasons of exposure under outdoor conditions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 32, n. 2, p. 208-211, 1984.
- [22] COQUART, V.; HENNION, M.C. Trace-level monitoring of chloroanilines in environmental waters using online trace-enrichment and liquid chromatography with UV and electrochemical detection. **Chromatographia**, v. 37, n. 7-8, p. 392-398, 1993.
- [23] DAVIES, G.E., FRANCIS, J., MARTIN, A.R., ROSE, F.L., SWAIN, G. 1:6-di-4'-chlorophenyldiguanidohexane ("Hibitane"). Laboratory investigation of a new antibacterial agent of high potency. **British Journal of Pharmacology**, v. 9, p. 192-196, 1954.

- [24] DE BALUGERA, Z.G.; GOICOLEA, M.A.; BARRIO, R.J. Determination of 4-chloroaniline and 4-chlorophenyl urea in honey by liquid chromatography with electrochemical detection. **Journal of Liquid Chromatography Related Technol.**, v. 20, n. 10, p. 1591-1603, 1997.
- [25] De BRUIN, L.S.; JOSEPHY, P.D.; PAWLISZYN, J.B. Solid phase microextraction of monocyclic aromatic amines from biological fluids. **Analytical Chemistry**, v. 70, n. 9, p. 1986-1992, 1998.
- [26] DELAZARI, I.; IARIA, S.T.; RIEMANN, H.P.; CLIVER, D.O.; MORI, T. Decontaminating beef for *Escherichia coli* O157:H7. **Journal of Food Protection**, v. 61, n. 5, p. 547-550, 1998.
- [27] DI CORCIA, A.; SAMPERI R. Determination of chloroaniline traces in environmental waters by selective extraction with two traps in tandem and liquid chromatography. **Analytical Chemistry**, v. 62, n. 14, p. 1490-1494, 1990.
- [28] DJOSAN, D.; FARAJ-ZADAH, M.A. Liquid chromatographic determination of aniline and derivatives in environmental waters at nanogram per litre levels using fluorescamine pre-column derivatization. **Chromatographia**, v. 41, n. 9-10, p. 568-572, 1995.
- [29] DOLBY, J.; GUNNARSSON, B.; KRONBERG, L.; WIKNER, H. Stability of chlorhexidine when autoclaving. **Pharmaceutica Acta Helvetiae**, v. 47, p. 615-620, 1972.
- [30] DORN, P.; KRABISCH, P.; GEHRA, H. Studies on Salmonella decontamination of broiler carcasses. Untersuchungen zur Salmonellen Dekontamination geschlachteter Masthaenchen. **Archiv fuer Gefluegelkunde**, v. 53, n. 3, p. 123-134, 1989.

- [31] DOUB, W.H.; RUHL, D.D.; HART, B.; MEHELIC, P.R.; REVELLE, L.K. Gradient liquid chromatographic method for the determination of chlorhexidine and its degradation products in bulk material. **Journal of Association of Official Analytical Chemists International**, v. 79, n. 3, p. 636-639, 1996.
- [32] DRECHSLER P.A.; O'NEIL, J.K.; MURDOUGH, P.A.; LAFAYETTE, A.R.; WILDMAN, E.E.; PANKEY, J.W. Efficacy evaluations on five chlorhexidine teat dip formulations. **Journal of Dairy Science**, v. 76, p. 2783-2788, 1993.
- [33] FINZI, M; COSTA, C. Microbiological contamination in food processing plants. Preventive measures. **Rivista della Societa Italiana di Scienza dell Alimentazione**, v. 8 , n. 4, p. 258-261, 1979 .
- [34] FOULKES, D.M., , Some toxicological observations on chlorhexidine. **Journal Periodontal Research**, v. 8, p. 55-60, 1973.
- [35] FREITAG, D.; SCHEUNERT, I.; KLEIN, W.; KORTE, F. Long-term fate of 4-chloroaniline ^{14}C in soil and plants under outdoor conditions. A contribution to terrestrial ecotoxicology of chemicals. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 32, n. 2, p. 203-207, 1984.
- [36] FROMBERG, A.; NILSSON,T.; LARSEN,B.R.; MONTANARELLA, L.; FACCHETTI, S.; MADSEN, J.O. Analysis of chloro- and nitroanilines and benzenes in soils by headspace solid-phase microextraction. **Journal of Chromatography A**, v. 746, n. 1, p. 71-81, 1996.
- [37] FURTADO, M.M.; SAMPAIO, M.H.D.; NUNES, L.G. Avaliação do uso da clorhexidina no tratamento da salmoura e da casca do queijo curado. Viçosa, 1989 10p. Relatório Técnico – Departamento de Tecnologia de Alimentos – Universidade Federal de Viçosa.

- [38] GADDE, R.R.; McNIFF, E.F.; PEER, M.M. High-performance liquid chromatographic analysis of chlorhexidine phosphanilate, a new antimicrobial agent. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 9, p. 1031-1036, 1991.
- [39] GAFFNEY, M.; COOKE, M.; SIMPSON, R. Improved method for the determination of chlorhexidine in urine. **Journal of Chromatography**, v. 306, p. 303-313, 1984.
- [40] GARD, P.R.; REYNOLDS, J.P.; HANLON, G.W. Use of chlorhexidine-releasing nylon fibres to reduce device-related uterine infections. **Gynecology and Obstetric Investigation**, v. 49, n. 4, p. 261-265, 2000.
- [41] GAVLICK, W.K. High performance liquid chromatographic analysis of chlorhexidine and p-chloroaniline using a specificity column and a photodiode-array detector. **Journal of Chromatography**, v. 623, n. 2, p. 375-80, 1992.
- [42] GAVLICK, W.K.; DAVIS, P.K. Gas chromatographic determination of p-chloroaniline in a chlorhexidine digluconate-containing alcohol foam surgical scrub product. **Journal of Association of Official Analytical Chemists International**, v. 77, n. 3, p. 583-6, 1994.
- [43] GEORNARAS, G.; von HOLY, A. Bacterial contamination in poultry processing. **Food Industries**, v. 47, n. 9, p. 31-34, 1994.
- [44] GOLLY, I.; HLAVICA, P. The role of hemoglobin in the N-oxidation of 4-chloroaniline. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 760, n. 1, p. 69-76, 1983.

- [45] GOSCH, B.; MONTAG, A. The status of nucleocompounds and its variability in meat of poultry. III. Study about the influence of thermic treatment on the distribution of nucleopurines. **Deutsche Lebensmittel Rundschau**, v. 93, n. 1, p. 4-6, 1997.
- [46] GRAW, C.; KOBE, A., FRIES, R. Air chilling and evaporation technique in poultry meat production – a microbiological survey. I . Total germ count. **Fleischwirtschaft**, v. 77, n. 1, p. 78-80, 1997.
- [47] HA, Y.; CHEUNG, A.P. New stability-indicating high performance liquid chromatography assay and proposed hydrolytic pathways of clorhexidine. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 14, p. 1327-1334, 1996.
- [48] HARBISON, M.; HAMMER, S.M. Inactivation of human immunodeficiency virus by betadine products and chlorhexidine. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes**, v. 2, p. 16-20, 1989.
- [49] HARGESHEIMER, E.E.; COUTTS, R.T.; PASUTTO, F.M. Gas-liquid chromatographic determination of aniline metabolites of substituted urea and carbamate herbicides in aqueous solution. **Journal of Association of Official Analytical Chemists International**, v. 64, p. 833-840, 1981.
- [50] HASE, J.C.; ATTSTROM, R.; EDWARDSSON, S.; KELTY, E.; KISCH, J. 6-month use of 0.2% delmopinol hydrochloride in comparison with 0.2% chlorhexidine digluconate and placebo. (I). Effect on plaque formation and gingivitis. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 25, p. 746-753, 1998.
- [51] HELMS, J.A.; DELLA-FERA M.A.; MOTT A.E.; FRANK M.E. Effects of chlorhexidine on human taste perception. **Archives of Oral Biology**, v. 40, p. 913-920, 1995.

- [52] HOLBROOK, A. The determination of small quantities of chlorhexidine in pharmaceuticals preparations. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.10, p. 370-374, 1958.
- [53] HUDSON, W.R.; MEAD, G.C. Factors affecting the survival of *Campylobacter jejuni* in relation to immersion scalding poultry. **Veterinary Record**, v. 121, n. 10, p. 225-227, 1987.
- [54] HUSTON, C.E.; WAINWRIGHT, P.; COOKE, M.; SIMPSON, R. High-performance liquid chromatographic method for the determination of chlorhexidine. **Journal of Chromatography**, v. 237, p. 457-464, 1982.
- [55] HUMPHREY, T.J. Contamination of eggs shell and contents with *Salmonella enteritidis* : a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 21 , n. 1/2, p. 31-40, 1994.
- [56] JAMINET, F. DELATTRE, L.; DELPORTE, J.P.; MOES, A. Effect of temperature of sterilization and pH on stability of chlorhexidine in solution. **Pharmaceutica Acta Helvetiae**, v. 45, p. 60-63 , 1970.
- [57] JONES, C.G. Chlorhexidine: is still the gold standard? **Periodontology** **2000**, v. 15, n. 56, p. 55-62, 1997.
- [58] KACMAR, P.; PISTL, J.; MIKULA, I. The effect of p-chloroaniline on leukocytes of sheep peripheral blood under the migration-inhibition test conditions. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, v. 17, n. 3, p. 577-584, 1995.
- [59] KATAOKA, H. Derivatization reactions for the determination of amines by gas chromatography and their applications in environmental analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 733, p. 19-34, 1996 .

- [60] KOHLBECKER, G. Toxic contaminants in chlorhexidine digluconate. **Deutsche Zahnärztliche Zeitschrift**, v. 44, n. 4, p. 273-276, 1989.
- [61] KOSRIRUKVONGS, P.; WANACHIWANAWIN, D.; VISVESVARA, G.S. Treatment of *Achantomoeba keratitis* with chlorhexidine. **Ophthalmology**, v. 106, n. 4, p. 798-802, 1999.
- [62] KURIHARA, K; IMAI, C.; GOTOH,K.; KONUMA, H.; SHINAGAWA, K. Bacterial contamination on the shell surface of hen eggs and the source of contamination. **Japanese Journal of Food Microbiology**, v. 13, n. 3, p. 11-116, 1996.
- [63] LACEY, R.W. *Salmonella enteritidis* and eggs: The position at the end of 1988. **British Food Journal**, v. 91, p. 5-8, 1989.
- [64] LAWRENCE, C.A. Antimicrobial activity, *in vitro*, of chlorhexidine. **Journal of American Pharmaceutical Association**, v. 49, n. 11, p. 731-734, 1960.
- [65] LEARD, A.; ADDY, M. The propensity of different brands of tea and coffee to cause staining associated with chlorhexidine. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 24, p. 115-118, 1997.
- [66] LILLARD, H.S. Effect on broiler carcasses and water of teating chiller water with chlorine or chlorine dioxide. **Poultry Science**, v. 59, n. 8, 1761-1766, 1980.
- [67] MACHADO, R.A. Microbiota bacteriana no processamento industrial de frangos e sua influência na vida útil de carcaças refrigeradas. São Paulo, 1992. 166p. Dissertação de Doutorado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo (USP).

- [68] MAREL, G.M. VAN DER, LOGTESTIJN, J.G. VAN, MOSSEL, D.A.A. Bacteriological quality of broiler carcasses as affected by in-plant lactic acid decontamination. **International Journal of Food Microbiology**, v. 6, p. 31-42, 1988.
- [69] MAY, K.N. Changes in microbial numbers during final washing and chilling of commercially slaughtered broilers. **Poultry Science**, v. 53, p. 1282-1285, 1974.
- [70] MEAD, G. C. Food poisoning salmonellas in the poultry meat industry. **British Food Journal**, v. 92, p. 4-12, 1990.
- [71] MEAD, G.C.; GIBSON, C.; THINKER, D.B. A model for study of microbial colonization in poultry defeathering machines. **Letter in Applied Microbiology**, v. 20 , n. 2, p. 134-136, 1995.
- [72] MERCK . **Reactivos diagnostica produtos químicos**. Merck, Darmstadt, 1992.
- [73] MULDER, R.W.A.W. Concentrating in hygiene and environmental control. **Misset World Poultry**, v.10, n. 7, p. 41-45, 1994.
- [74] MULDER, R.W.A.W. Decontamination of broiler carcasses. **Misset World Poultry**, v.11 , n. 3, p. 39-40, 1995.
- [75] MULLER, L.; FATTORE, E.; BENFENATI, E. Determination of aromatic amines by solid Phase Microextraction and gas chromatography-mass spectrometry in water samples. **Journal of Chromatography A.**, v. 791, n. 1+2, p. 221-230, 1997.
- [76] NHEMI, I. M.D.; NHEMI FILHO, V.A.; FERRAZ, J.V. **Anualpec: Anuário da Pecuária Brasileira**. São Paulo, Ed. Argos, 2000.

- [77] OGAWA, T.; HIROSE, Y.; YATOME, C. Effect of monochlorophenols and p-chloroaniline on nucleic acid synthesis in microbial growth process. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v.47, n. 1, p. 8-14, 1991.
- [78] OOSTEROM, J. Epidemiological studies and proposed preventative measures in the fight against human salmonellosis. **International Journal of Food Microbiology**, v. 12 , n. 1, p. 41-52, 1991.
- [79] PEREIRA, N.A. Contribuição para conhecimento da toxicidade aguda e crônica do digluconato de clorhexidina administrados por via oral em camundongos. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. Janeiro-Junho, 1985.
- [80] PESONEN, T.; HOLMALAHTI J; POHJOLA J. Determination of chlorhexidine in saliva using high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography B Biomedical Appl.**, v. 10, p. 222-225, 1995.
- [81] PHAM, N.H.; WEINER, J.M.; REISNER, J.S.; BALDO, B.A. Anaphylaxis to chlorhexidine. Case report. Implication of immunoglobulin antibodies and identification of allergenic determinant. **Clinical Experimental Allergy**, v. 30, n. 7, p. 1001-1007, 2000.
- [82] RASHID, K.A.; ARJMAND, M.; SANDERMANN,H.; MUMA, R.O. Mutagenicity of chloroaniline/lignin metabolites in the Salmonella/microsome assay. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, 22, n. 6, p. 721-729, 1987.
- [83] RASMUSSEN, H.T.; OMELCZENKO, N.; FRIEDMAN, S.K.; McPHERSON, B.P. Determination of chloroanilines in bacterial soaps using cation-exchange chromatography with UV detection. **Journal of Chromatography A**, 719, n. 2, p. 434-437, 1996.

- [84] RAWLINGS, J.M.; GORREL,C.; MARKWELL, P.J. Effect on canine oral health of adding chlorhexidine to a dental hygiene chew. **Journal of Veterinary Dentistry**, 15, n. 3, p. 129-34, 1998.
- [85] REED, G.H. Foodborne illness. I. Staphylococcal ('Staph') food poisoning. **Dairy, Food and Environmental Sanitation**, 13, n. 11, p. 642, 1993.
- [86] REYNOLDS, J.E.F.; PRASAD, A.B. (Ed.), **Martindale**. The Extra Pharmacopoeia. London, The Pharmaceutical Press, 1982.
- [87] RICHARD, A.; ELBAZ, M.; ANDERMANN, G. Determination of 4-chloroaniline and chlorhexidine digluconate by ion-pair reversed-phase high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, v. CHROM 16.870, p. 356-359, 1984.
- [88] RODRIGUEZ, E.; DE BALUGERA, Z.G.; GOICOLEA, M.A.; BARRIO, R.J. HPLC/diode-array method for the determination of the pesticide diflubenzuron and its major metabolites 2,6-difluorobenzamide, 4-chlorophenylurea, and 4-chloroaniline in forestry matrixes. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technol.**, 21, n. 12, p. 1857-1870, 1998.
- [89] ROQUE, V.F. **Aproveitamento de Resíduos de carne de frango: Uma análise exploratória**. Florianópolis, 1996. 31 p. Dissertação de Mestrado, Pós-Graduação em Engenharia de Produção, Universidade Federal de Santa Catarina, <http://www.eps.ufsc.br/disserta96/vania/intro/intro.htm>
- [90] ROUSE, D.J.; HAUTH, J.C.; ANDREWS, W.W.; MILLS, B.B.; MAHER, J.E. Chlorhexidine vaginal irrigation for the prevention of peripartal infection: a placebo-controlled randomized clinical trial. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, 176, n. 3, p. 617-22, 1997.

- [91] RUDIGER, S.; PETERSILKA, G.; FLEMMIG, T.F. Combined systemic and local antimicrobial therapy of periodontal disease in Papillon-Lefevre syndrome. A report of 4 cases. **Journal of Clinical Perodontology**, v. 26, n. 12, p. 847-854, 1999.
- [92] RUSSEL, A.D. Plasmids and bacterial resistance to biocides. **Journal of Applied Microbiology**, v. 83, n. 2, p. 155-165, 1997.
- [93] SANHUEZA, R.M.V. Efeito do digluconato de clorhexidina e tiabendazólio no controle da podridão causada por *Penicillium expansum* em maçãs CV. Fuji e Golden Delicious. Embrapa-CNPFT. Pelotas, 1991.
- [94] SANZ M. ; VALLCORBA N. ; FABREGUES S. ; MULLER I. ; HERKSTROTER F. The effect of a dentifrice containing chlorhexidine and zinc on plaque, gingivitis, calculus and tooth staining. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 2, n. 6, p. 431-437, 1994.
- [95] SCHEUNERT, I.; MANSOUR, M.; ANDREUX, F. Binding of organic polutants to soil organic matter. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, v. 46, n. 1-3, p. 189-199, 1992.
- [96] SINELL, H.J. Control of food-borne infections and intoxications. **International Journal of Food Microbiology**, v. 25, n. 3, p.209-217, 1995.
- [97] SOCKETT, P.N. The epidemiology and costs of diseases of public health significance, in relation to meat anmeatproducts. **Journal of Food Safety**, v. 15, n. 2, p. 91-112, 1995.

- [98] STEVENS, L.E.; DURRWACHTER, J.R.; HELTON, D.O. Analysis of chlorhexidine sorption in soft contact lenses by catalytic oxidation of [¹⁴C] chlorhexidine and by liquid chromatography. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 75, n. 1, p. 83-86, 1986.
- [99] TATTAWASART, U.; MAULLARD, J.Y.; FURR, J.R.; RUSSEL, A.D. Development of resistance to chlorhexidine diacetate and cetylpyridinium chloride in *Pseudomonas stutzeri* and changes in antibiotic susceptibility. **Journal of Hospitalar Infection**, v. 42, n. 3, p. 219-229, 1999.
- [100] TINKER, D.B.; GIBSON, C.; HINTON, M.H.; ALLEN, V.M.; WATHES, C.M. Reduction of cross-contamination in defeathering machinery. **Misset World Poultry**, v. 12, n. 9, p. 13-16, 1996.
- [101] TRAINOR, T.M.; VOUIROS, P. Electron capture negative ion chemical ionization mass spectrometry of derivatized chlorophenols and chloroanilines. **Analytical Chemistry**, v. 59, n. 4, p. 601-610, 1987.
- [102] TRAORÉ, O.; ALLAERT, F.A.; FOURNET-FAYARD, S.; VERRIÈRE, J.L.; LAVERAN, H. Comparison of *in-vivo* antibacterial activity of two skin disinfecting procedures for insertion of peripheral catheters: povidone iodine and chlorhexidine. **Journal of Hospitalar Infection**, v. 44, n. 2, p. 147-150, 2000.
- [103] TSUCHIYA, H.; MIYAZAKI, T.; OHMOTO, S. High-performance liquid chromatographic analysis of chlorhexidine in saliva after mouthrinsing. **Caries Research**, v. 33, p. 156-163, 1999.
- [104] UPTON, M. Relationships between pathogen growth and the general microbiota on raw and processed meat and poultry. **Journal of Food Safety**, v. 15, n. 2, p. 133-144, 1995.

- [105] USEPA - United States Environmental Protection Agency, **Diflubenzuron, tolerances for residues** § 180.377. (As of 4/19/99), 1999, <http://www.epa.gov/Fedrgstr/EPA-PEST/1999/April/Day-19/377.pdf>.
- [106] Van MAANEN, J.M.; PACHEN, D.M.; DALLINGA, J.W.; KLEINJANS, J.C. Formation of nitrosamines during consumption of nitrate- and amine-rich foods, and the influence of the use of mouthwashes. **Cancer Detection and Prevention**, v. 22, n. 3, p. 204-212, 1998.
- [107] YOUNG, LL.; LYON, C.E. Effect of calcium marination on biochemical and textural properties of peri-rigor chicken breast meat. **Poultry Science**, v. 76, p. 197-201, 1997.
- [108] YESILSOY, C.; WHITAKER, E.; CLEVELAND, D.; PHILLIPS, E.; TROPE, M. Antimicrobial and toxic effects of established and potential root canal irrigants. **Journal of Endodontology**, v. 21, n. 10, p. 513-535, 1995.
- [109] WIMMER, M.J.; SMITH, R.R.; JONES, J.P. Analysis of diflubenzuron by gas chromatography/mass spectrometry using deuterated diflubenzuron as internal standard. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 39, n. 2, p. 280-286, 1991.
- [110] WALDROUP, A.L. Chemical treatments for decontamination of poultry. **Journal of Food Protection**, v. 58, n. 57, 1995.
- [111] WINROW, M.J. Metabolic studies with radiolabelled chlorhexidine in animals and man. **Journal of Periodontal Research**, 8, n. 12, p. 45-48, 1973.
- [112] XAVIER, C.V.A.; BERAQUET, N.J. Shelf-life of refrigerated chicken meat: technological alternatives. II. Decontamination methods. **Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos**, 24, n. 2, p. 121-128, 1994.

CAPÍTULO 2

**Artigo a ser publicado na revista Ciência e Tecnologia de Alimentos editada
pela Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**

DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA PARA DETERMINAÇÃO DE DIGLUCONATO DE CLORHEXIDINA EM CARÇAÇAS DE FRANGO UTILIZANDO CLAE - PAR IÔNICO. AVALIAÇÃO DE RESÍDUOS DURANTE A REFRIGERAÇÃO E CONGELAMENTO.

Eduardo Vicente

Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas, Brasil.

Maria Cecília de Figueiredo Toledo

Universidade Estadual de Campinas, Campinas Brasil.

Palavras-chave: digluconato de clorhexidina, cromatografia líquida, carcaças, frangos.

RESUMO

O uso do digluconato de clorhexidina (DGCH) na higienização de equipamentos e instalações na indústria de alimentos e o interesse de aplicação deste produto como sanitizante em carcaças de frango indicam a necessidade da avaliação de resíduos no alimento. Um método por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com pareamento de íons, incluindo extração com éter etílico em meio alcalino, foi desenvolvido para determinação de clorhexidina em carne de frango. A sensibilidade e recuperação média do DGCH em carcaça (75% - CV 10%), em pele (72% - CV 7%) e na musculatura (82% - CV 8%) foram considerados adequadas aos propósitos do método. As análises de carcaças e pele tratadas, mantidas refrigeradas ou congeladas, permitiu constatar que ocorreu uma pequena redução nos níveis residuais de DGCH durante o período de armazenamento. Como prováveis causas desta diminuição devem ser considerados a interação com componentes polares da matriz, a perda juntamente com os fluidos liberados dos tecidos durante o armazenamento refrigerado ou no descongelamento de carcaças inteiras e a degradação da clorhexidina. A ausência deste sanitizante na musculatura após o armazenamento refrigerado indica que nas condições empregadas, o DGCH não atravessa a barreira da pele.

**HPLC - ION PAIRING DETERMINATION OF CHLORHEXIDINE
DIGLUCONATE IN TREATED POULTRY CARCASSES. ANALYSIS DURING
REFIGERATION AND FREEZING.**

Key words: chlorhexidine digluconate, HPLC, poultry, carcasses.

SUMMARY

The use of the antimicrobial agent chlorhexidine digluconate in the sanitization of food industry equipment and installations, and the interest on its application to decontaminate poultry carcasses indicates the need to determine its residue in food. An ion pairing HPLC - UV analytical method including an ethyl ether extraction in alkaline medium was developed to measure chlorhexidine residue in poultry meat. The recoveries in carcasses (75% - CV 10%), skin (72% - CV 7%), and muscular tissue (82% - CV 8%) were appropriate to the purposes of the method application. The analysis of treated carcasses and skin, maintained refrigerated or frozen showed a slight decrease of the initial levels during storage. The interaction with polar components of matrix, the elimination with tissues fluid during refrigerated storage, the unfreezing step of the whole carcasses, and the degradation of the added chlorhexidine can be considered as the most probable cause for the decrease. The absence of residue in muscular tissue after refrigerated storage showed that the molecule practically did not cross the skin barrier.

1. INTRODUÇÃO

Carcaças de aves carregam microrganismos provenientes, na sua maioria, da ave viva: penas, tegumentos cutâneos e trato digestivo [1, 8]. A redução da carga microbiana das carcaças é feita com lavagens com água clorada ao longo da linha de abate [23]. O resfriamento das carcaças em água fria reduz a taxa de multiplicação microbiana [25]. A utilização de sanitizantes químicos na água de resfriamento é um processo tecnológico adicional para a diminuição da contaminação microbiana das carcaças, aumentando sua vida de prateleira e preservando a saúde dos consumidores [23, 24]. Além do cloro, o único produto atualmente aprovado no Brasil como coadjuvante de tecnologia para carcaças de aves, é o fosfato trissódico dodecahidratado [2]. Outros compostos com propriedades sanitizantes citados na literatura são os iodóforos, compostos quaternários de amônia, peróxido de hidrogênio, ácido peracético, ácido acético, ácido benzóico, ácido cítrico, ácido lático e ácido ascórbico [11, 13, 14, 26, 34].

A clorhexidina, uma bis-guanida com propriedades antisépticas desenvolvida na década de 50, pode ser encontrada na forma de sais de digluconato, diacetato e dihidroclorato e tem várias aplicações na área médica, veterinária e farmacêutica [6, 19, 20, 28]. Resultados preliminares foram promissores quanto ao emprego do digluconato de clorhexidina (DGCH) como sanitizante para alimentos em geral [9, 14, 16, 23] e carcaças de frangos em particular [31, 33].

Inicialmente, o DGCH foi utilizado apenas como desinfetante de instrumentos, instalações, equipamentos e superfícies. A Autorização de Uso de Produto (AUP) N° 184/93 [3] conferida pelo Ministério da Agricultura Abastecimento e Reforma Agrária, estendeu a aplicação para a pulverização direta de carcaças de frango, suínos e bovinos. Posteriormente, esta modalidade de aplicação foi revogada e o pedido de registro indeferido [4], tendo em vista a possibilidade de resíduos no produto final, ausência de informações toxicológicas e a possibilidade de mascarar falhas no processo tecnológico, no que se refere aos valores microbiológicos. A AUP N° 255/99 [5] regulamentou o uso do DGCH

para desinfecção de equipamentos, instalações e braços/mãos de operadores em indústrias que manipulam produtos de origem animal (matadouros, laticínios, indústria de pescado e afins).

FOULKES [15] determinou a toxicidade aguda (DL_{50}) da clorhexidina administrada por via oral em camundongos, encontrando um valor de 1800 mg/kg de peso corpóreo. RINDOM-SCHIOTT *et al.* [30] avaliaram os efeitos decorrentes da utilização diária de um colutório contendo 0,2% de digluconato de clorhexidina (DGCH), durante um período de 2 anos. Não foram constatados efeitos sistêmicos ou locais nos voluntários, para uma ingestão diária de 4 a 6 mg de DGCH por indivíduo.

As evidências da baixa toxicidade, aliadas à eficiência antimicrobiana, levaram ao desenvolvimento de estudos para avaliar a aplicação do DGCH no controle de microrganismos em diferentes alimentos. Resultados preliminares mostraram que o uso de DGCH aumentou em 35% a vida de prateleira de frangos resfriados [33].

Em um estudo comparativo entre produtos utilizados para descontaminação de carcaças, constatou-se que o DGCH e outro produto à base de iodo foram os mais eficientes, aumentando a vida útil de carcaças refrigeradas ($5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) para 9 dias. Compostos contendo cloro, biguanidas poliméricas e peróxido de hidrogênio combinado com ácido acético possibilitaram o armazenamento por no máximo 8 dias [23].

O DGCH, quando empregado na salmoura para o tratamento de queijos curados, também foi eficiente na redução da contagem de coliformes, fungos e leveduras [16]. A utilização de DGCH permitiu um controle eficiente do fungo *Penicillium expansum*, responsável pela deterioração em maçãs [31].

Diversas metodologias foram desenvolvidas para análise de DGCH em produtos farmacêuticos [12, 19, 32]. HUSTON *et al.* [20] efetuaram análises em sangue e urina fazendo a extração com éter etílico em meio alcalino. BROUGHAM

et al. [7] optaram pela partição com clorofórmio-2% isopropanol em meio alcalino, seguido da extração para um meio aquoso fracamente ácido. No procedimento para análise em urina, publicado por GAFFNEY *et al.* [17], a amostra foi percolada em cartucho de C₁₈ e o DGCH eluído com metanol. Um método para a análise do nível residual de clorhexidina em saliva foi desenvolvido por PESONEN *et al.* [27], onde pequenos volumes de saliva alcalinizada foram extraídos com acetonitrila, que posteriormente foi separada da fração aquosa por centrifugação. Devido ao caráter fortemente iônico do DGCH, a maioria dos métodos utilizou cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em fase reversa, com par iônico. Foram avaliadas fases móveis contendo os ácidos pentadecafluorooctanóico, tolueno-4-sulfônico, heptanossulfônico ou o heptanossulfonato de sódio como contra-íon [20]. A detecção foi feita em comprimento de onda de 260 nm, ou em 220-230 nm quando o DGCH foi determinado simultaneamente com o produto de degradação, 4-cloroanilina [17, 27, 29, 32].

A possibilidade da introdução do DGCH na descontaminação de carcaças torna necessário o estudo dos níveis residuais deste sanitizante no alimento. Apesar das informações disponíveis indicarem a baixa toxicidade do DGCH, é importante conhecer a contribuição desta fonte adicional do xenobiótico e obter informações para uma adequada avaliação toxicológica da segurança de uso do produto. Todavia, não existem métodos apropriados para a determinação de DGCH em tecidos animais.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Reagentes

Hexano, acetonitrila, metanol grau CLAE (Mallinckodt), éter etílico P.A. estabilizado com BHT (Carlo Erba), trietilamina, heptanossulfonato de sódio (Aldrich), ácido fosfórico 85%, hidrogeno fosfato de dissódico, ácido fórmico 98% PA (Merck) e água desmineralizada em sistema Milli Q (Millipore). Digluconato de clorhexidina solução comercial a 20 % (Laboratório Enila) e solução padrão 20% (Aldrich).

2.2 Instrumentação

O equipamento utilizado foi um cromatógrafo líquido (Varian LC Star), equipado com bomba isocrática (9002), detector UV variável (9050) e injetor Rheodyne com loop de 120 μ L. As separações foram efetuadas em uma coluna Rainin Microsorb MV RP18 (250 mm x 4,6 mm di; com partículas de 5 μ m, silanizada), sendo a temperatura mantida a 30°C com o auxílio do aquecedor de coluna (Pharmacia s 5/20). A fase móvel foi constituída de acetonitrila-tampão (0,1 M Na₂HPO₄-0,005M heptanossulfonato de sódio-0,05M trietilamina-ácido fosfórico pH 2,5), na proporção 33:67, com vazão de 1,0 mL/min.

2.3 Tratamento das amostras

Para conhecimento dos níveis residuais de clorhexidina após tratamento nas condições reais de operação nos abatedouros, desenvolveu-se um experimento sob condições controladas. Utilizando uma solução comercial do DGCH a 20%, foi preparada uma diluição aquosa na proporção 1:500, resultando numa concentração final de 0,4g/L. Um volume total de 350L dessa solução foi utilizado para tratar 38 carcaças, com um peso unitário médio de 1501g \pm 20g. As carcaças utilizadas foram separadas da linha de produção antes da etapa de embalagem. O tratamento foi feito pela imersão total das mesmas na solução, por cerca de 2 segundos. A seguir, estas foram colocadas em caixas plásticas vazadas, ali permanecendo durante 20 minutos, para que o excesso da solução fosse eliminado. As carcaças foram aleatoriamente reunidas em grupos compostos por cinco unidades, cujos pesos variaram entre 7380 a 7680g e depois embaladas em sacos plásticos. Paralelamente, cinco carcaças sem qualquer tratamento foram embaladas da mesma forma para servir como amostra controle.

Para a avaliação dos níveis residuais de clorhexidina em pele, foram separados da linha de produção vinte e um cortes de peito com pele. As amostras foram, a seguir, tratadas com a mesma solução de clorhexidina 0,4g/L, também utilizando imersão por 2 segundos. Destes cortes foram separadas as peles,

incluindo seus anexos lipídicos, cujo peso unitário médio era de $92 \pm 9\text{g}$. A seguir, as peles foram embalados em sacos plásticos, formando grupos de três unidades, que apresentaram pesos na faixa de 240g a 314g. As peles de outros três cortes de peito, sem qualquer tratamento, foram embaladas da mesma forma, para utilização como amostra testemunha.

2.4 Homogeneização das amostras

Anteriormente à homogeneização das carcaças foi efetuada a remoção manual dos ossos e, apenas, a parte muscular e pele foram mantidas. Na etapa seguinte a amostra foi passada duas vezes em moedor de carne e processada por 10 minutos em “cutter” (Hobart), até a obtenção de um pasta homogênea.

2.5 Armazenamento

2.5.1 Amostras refrigeradas

Parte das amostras de carcaças e peles foram tratadas no abatedouro e a seguir homogeneizadas. O acompanhamento dos resíduos foi feito após 0, 2, 4, 6, 8 e 12 dias, a contar do dia do tratamento. Durante este período as amostras foram mantidas em temperatura de $5 \pm 2^\circ\text{C}$. As análises em carcaça foram efetuadas em triplicata e na pele em duplicata, utilizando o método desenvolvido.

Amostras de carcaça e pele tratadas foram armazenadas inteiras e analisadas após 6 e 11 dias de refrigeração ($5^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$). A homogeneização ocorreu somente no momento da análise. Outras 3 carcaças tratadas foram armazenadas inteiras por 12 dias a $5^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$. A seguir, a musculatura do peito foi separada da pele e dos ossos, homogeneizada e analisada em triplicata, a fim de verificar a migração da clorhexidina aplicada na superfície.

2.5.2 Amostras congeladas

As amostras de carcaça tratadas foram congeladas ($-20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$) inteiras no mesmo dia do tratamento e analisadas após 15, 30, 60 e 90 dias. As amostras correspondentes a 15 dias de armazenamento foram mantidas congeladas depois da homogeneização, para posterior análise após 30, 60 e 90 dias. As demais amostras permaneceram inteiras até o momento da análise.

2.6 Método analítico

Foram pesados 5g de amostra homogeneizada em um tubo de centrifuga com capacidade para 50 mL e com tampa de polietileno. Adicionaram-se sobre a amostra 200 μL de alcalase, mantendo-se o tubo a 45°C por 30 min, com agitação intermitente. Após a digestão enzimática foram acrescentados 2g de cloreto de sódio, 15 mL de hidróxido de sódio 1N e 25 mL de éter etílico. O tubo foi mantido sob agitação por 1h, em agitador modelo Wagner (30 ciclos/min). A seguir, foi feita a centrifugação a 2000 rpm/10min e a fração superior foi recolhida em outro tubo de 50 mL. Seqüencialmente, foram adicionados outros 20 mL de éter etílico ao primeiro tubo, que foi agitado por 1 minuto e centrifugado a 2000 rpm/10min. A fração superior foi então separada e reunida com a anterior, descartando-se o tubo com a fração aquosa inferior. O éter recolhido nas duas centrifugações foi totalmente evaporado em fluxo de ar comprimido/ $50\text{ }^{\circ}\text{C}$, permanecendo apenas o extrato lipídico. Ao tubo foram adicionados 20 mL de hexano, 30 mL de metanol e 200 μL de ácido fórmico. O tubo foi vigorosamente agitado por 1 minuto e deixado em repouso durante 10 minutos em freezer ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$). O hexano que permaneceu na fase superior foi descartado e a fração inferior mantida. Este processo foi repetido outras 2 vezes, utilizando 10 mL de hexano em cada partição. A fração inferior foi evaporada até a secura, com fluxo de ar comprimido/ 50°C . O resíduo foi dissolvido em 5 mL de fase móvel, filtrado em membrana de 0,45 μm e a seguir injetado em cromatógrafo líquido com detector UV (260 nm). Para amostras de pele, cujo teor de proteína é baixo e o conteúdo lipídico elevado, não foi necessária a digestão com alcalase. O éter etílico, cloreto de sódio e o hidróxido de sódio foram diretamente adicionados à amostra e o procedimento seguido sem

qualquer outra modificação. A separação cromatográfica foi efetuada em coluna de fase reversa C₁₈ silanizada (partículas de 5 μ , 250mm x 4mm di), com fase móvel composta de acetonitrila-tampão (0,1 M Na₂HPO₄-0,005M heptanossulfonato de sódio-0,05M trietilamina - pH 2,5 corrigido com ácido ortofosfórico P.A.), na proporção 33:67, com vazão de 1,0 mL/min.

A confirmação da identidade foi possível pela análise por CLAE – detector de arranjo de diodos (bomba LC10AD, forno de colunas CTO 10 A, detector SPD M10A fabricados pela Shimadzu), através da comparação dos espectros de absorvância (190–400 nm) de picos com tempo de retenção equivalente ao padrão de clorhexidina.

2.7 Avaliação do desempenho do método

Para avaliação da metodologia foram feitas fortificações de amostras não tratadas, utilizando-se soluções aquosas de DGCH. Amostras homogeneizadas de musculatura do peito foram fortificadas com 1, 2, 4, 6, 8 e 10 μ g/g de clorhexidina. Amostras de carcaças inteiras homogeneizadas (musculatura e pele) foram fortificadas com 1, 2, 4, 5, 10 e 20 μ g/g de clorhexidina. A avaliação do método em pele do peito foi feita com fortificações de 2, 4, 8, 10, 20, 40 e 80 μ g/g de clorhexidina. Para a avaliação estatística dos dados foram utilizados análise de variância e o teste de Tukey - Diferença Mínima Significativa, ao nível de significância 5%.

2.8 Limites de detecção, quantificação e precisão do método

O limite de detecção do método (LD) foi determinado pela análise de 8 repetições de amostras fortificadas com 1,0 μ g/g de DGCH, de acordo com procedimento descrito por DE BRUIN *et al.* [10]. O desvio-padrão da média dos resultados foi multiplicado pelo valor de *t* de Student para uma confiabilidade de 99% segundo os graus de liberdade apropriados. Para 8 repetições e sete graus de liberdade o valor *t* de Student tabelado é de 2,998. O limite de quantificação do método (LQM) foi estabelecido com base em KEITH *et al.* [21] e LONG &

WINEFORDNER [22], que o definem como 10 vezes o valor do desvio padrão. A precisão do método foi calculada pelo coeficiente de variação (CV%), calculado a partir das determinações de amostras de pele, carcaça homogeneizada ou musculatura do peito, fortificadas em diferentes níveis com quatro repetições em cada nível. A quantificação foi feita por calibração externa.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Desenvolvimento do método

Um dos maiores obstáculos para o desenvolvimento de um método apropriado para analisar resíduos de DGCH em tecidos animais é o fato dos mesmos serem sólidos e ricos em lipídios. As diversas metodologias que são descritas na literatura foram desenvolvidas em matrizes líquidas ou fluidas, onde a extração se inicia com uma partição líquido-líquido em meio alcalino.

Devido ao caráter iônico da clorhexidina, que interage com estruturas polares da amostra sólida, a extração da molécula na forma de digluconato exigiu o emprego de solventes aquosos. A digestão com a alcalase, uma endopeptidase, foi capaz de promover a desnaturação das proteínas, tornando a amostra mais fluida e com uma pequena quantidade de sólidos de tamanho reduzido. Esta enzima foi selecionada por sua eficiência, atividade em ampla faixa de pH e temperatura, além de ser disponível comercialmente. Na etapa seguinte, a utilização de hidróxido de sódio 1N, elevando o pH acima do valor de pK_a 10,3, [20], converteu a clorhexidina à sua forma neutra, solúvel em solventes orgânicos. Para a extração da amostra digerida e alcalinizada foram avaliados o clorofórmio, cloreto de metileno, acetato de etila e o éter etílico, sendo que apenas o último favoreceu a partição e a evaporação que seria necessária na etapa posterior. A centrifugação foi imprescindível para separar as partículas sólidas da amostra e quebrar a emulsão formada durante a agitação. O cloreto de sódio adicionado nesta etapa teve como função auxiliar a quebra da emulsão e diminuir a afinidade do éter etílico pela água. A estabilidade da clorhexidina permitiu a evaporação do solvente com aquecimento e com fluxo de ar comprimido. Os componentes

lipídicos dos tecidos foram extraídos pelo éter e permaneceram após a evaporação. A partição metanol/hexano foi introduzida para a remoção desta gordura. Foi necessário empregar a baixa temperatura para reduzir a miscibilidade do hexano no metanol. Os lipídios foram eliminados juntamente com o hexano, permanecendo a clorhexidina na fase metanólica. O ácido fórmico nesta etapa teve a função de eliminar possíveis resíduos de hidróxido de sódio transferidos juntamente com o éter. Após a evaporação do metanol, o extrato foi solubilizado na fase móvel, onde o pH 2,5 permitiu que a molécula retornasse à sua forma ionizada. O heptanossulfonato de sódio presente na fase móvel atuou como contra-íon e permitiu a separação cromatográfica em coluna de fase reversa C₁₈.

3.2 Avaliação do desempenho do método

A resposta do detector ao DGCH foi linear na faixa de 0,5 a 20 µg/mL, resultando na equação:

$$Y = 12978,10 X - 685,67 \quad (1),$$

onde : Y = área do pico;

X = concentração em µg/g;

$$R^2 = 0,999$$

O LD calculado foi de 0,2 µg/g, enquanto o LQM foi de 0,6 µg/g. As recuperações de amostras de pele, carcaça total e musculatura fortificadas são apresentadas na Tabela 1. Os resultados indicaram que não houve diferença significativa nas recuperações entre os diferentes níveis adicionados à pele, com média de 72% e CV de 7,38%. Em carcaças, a diferença somente foi significativa entre os níveis de 1 µg/g e 10 µg/g, com valor médio de 75% e CV 10,08%. Nas análises em musculatura ocorreu diferença significativa entre os níveis mais baixos (1,2,4 e 6 µg/g) e os níveis mais altos (8 e 10µg/g), com recuperação média de 83% e CV 8,0%.

Tabela 1 – Recuperação de digluconato de clorhexidina adicionado a diferentes tecidos de frangos.

Musculatura ¹		Pele ²		Carcça total ¹	
Nível de Fortificação (µg/g)	Recuperação (%)	Nível de Fortificação (µg/g)	Recuperação (%)	Nível de Fortificação (µg/g)	Recuperação (%)
1	80± 1	2	66± 6	1	67± 6
2	73±8	4	67± 8	2	75± 10
4	79±3	8	73± 3	4	73± 9
6	83±1	10	76± 4	5	74± 5
8	90±2	20	72± 7	10	79± 5
10	90±4	40	75± 1	20	80± 4
—	—	80	75± 2	—	—

¹Análise de amostras pelo método desenvolvido incluindo a digestão enzimática. Média de 4 repetições.

²Análise de amostras pelo método desenvolvido sem a digestão enzimática. Média de 4 repetições I.

3.3 Análises em amostras tratadas no abatedouro

Os resíduos de clorhexidina foram determinados nas carcaças e peles tratadas com DGCH, armazenadas inteiras ou previamente homogeneizadas, sob refrigeração ($5 \pm 2^\circ\text{C}$) ou congelamento (-20°C). As Tabelas 2 e 3 apresentam os resultados das análises efetuadas durante 12 dias nas amostras refrigeradas e as tabelas 4 e 5 mostram os níveis de DGCH encontrados nas amostras congeladas durante os 90 dias de armazenamento.

Os resultados da Tabela 2 indicam que tanto nas carcaças inteiras como nas amostras homogeneizadas os resíduos de DGCH diminuíram durante o armazenamento a 5°C . No caso das carcaças inteiras a redução foi bem mais acentuada, chegando a cerca de 50% no final dos 12 dias.

Tabela 2 – Resíduos de digluconato de clorhexidina em carcaças armazenadas a 5°C.

Dias após o tratamento	Clorhexidina (µg/g)	
	Homogeneizadas	Inteiras
	Média ¹	Média ¹
0	14,2±0,9	14,2±0,9
2	14,9±0,7	NR ²
4	14,1±0,9	NR
6	14,1±0,4	8,0±0,5
8	13,2±0,5	NR
12	12,3±0,7	7,0±0,7

¹ Média de 3 determinações² Não Realizado

Em relação às carcaças congeladas (Tabela 3), as variações observadas nos teores de DGCH não indicam uma tendência definida e podem ter ocorrido devido à homogeneização irregular das amostras e/ou à heterogeneidade das carcaças inteiras em relação ao nível residual de clorhexidina. Os resultados obtidos sugerem que não houve diminuição dos níveis residuais de DGCH durante o armazenamento, pelo menos para as amostras homogeneizadas.

Tabela 3 – Resíduos de digluconato de clorhexidina em carcaças de frango armazenadas a -20°C.

Dias após o tratamento	Clorhexidina (µg/g)	
	Homogeneizadas	Inteiras
	Média ¹	Média ¹
15	6,6±0,1	6,6±0,1
30	6,8±0,3	6,7±0,2
60	8,3±0,2	7,7±0,5
90	6,9±0,2	5,0±0,5

¹ Média de 3 determinações

Um teor relativamente maior de DGCH foi determinado em peles de frango (Tabela 4) relativamente às carcaças inteiras, o que era esperado tendo em vista a aplicação superficial do sanitizante. Tanto nas amostras homogeneizadas quanto nas peles inteiras a quantidade de resíduos diminuiu gradualmente durante o armazenamento refrigerado.

Tabela 4 – Resíduos de digluconato de clorhexidina em peles de frango armazenadas a 5°C.

Dias após tratamento	Clorhexidina (µg/g)	
	Homogeneizadas	Inteiras
	Média ¹	Média ¹
0	32,1±0,8	32,1±0,8
2	27,4±0,4	NR ²
4	29,9±0,0	NR
6	28,3±1,0	29,8±3,0
8	27,4±1,2	NR
12	24,2±0,4	20,0±0,5

¹ Média de 2 determinações

² Não Realizado

A redução dos níveis do sanitizante nos tecidos armazenados inteiros ou homogeneizados pode ser atribuída, entre outros, a interações irreversíveis do DGCH com grupos polares e/ou iônicos da matriz e/ou sua solubilização nos fluidos liberados pelos tecidos durante o armazenamento a 5°C ou descongelamento.

Uma possível degradação do composto também não deve ser descartada, muito embora acredite-se que esta seja pequena, tendo em vista a estabilidade do DGCH e as baixas temperaturas empregadas.

É importante ressaltar que a perda de líquidos durante o processo de descongelamento das carcaças foi visivelmente menor que a observada durante o período de armazenamento sob refrigeração, o que pode explicar a maior redução dos níveis de DGCH nas amostras refrigeradas relativamente àquelas mantidas congeladas.

A possibilidade de ocorrência de interações entre o DGCH e estruturas dos tecidos está de acordo com resultados relatados por GELINAS & GOULET [18]. Estes autores avaliaram a neutralização de desinfetantes por matéria orgânica e constataram que a atividade do acetato de clorhexidina era moderadamente afetada na presença de leite em pó, sangue bovino desidratado e farinha de peixe.

Em todas as situações avaliadas, é importante considerar que apesar de as amostras terem apresentado pesos semelhantes, as quantidades de DGCH que foram retidas nas mesmas podem ter variado em função de características peculiares a cada unidade utilizada para compor a amostra. Este fato pode ter sido parcialmente responsável pela inconsistência de alguns resultados, impedindo uma melhor caracterização do comportamento dos resíduos durante o armazenamento de carcaças e peles inteiras. A análise seqüencial de alíquotas da mesma amostra previamente homogeneizada minimizou esta variável, permitindo uma melhor avaliação dos resultados.

Através da análise da musculatura do peito (n=3), separada de carcaças tratadas após o armazenamento por 12 dias a 5 °C, constatou-se que os níveis residuais de DGCH estavam abaixo do limite de quantificação do método (0,6 µg/g), o que indica que a migração do sanitizante através da pele foi mínima.

O método desenvolvido permitiu a quantificação dos resíduos nos diferentes tecidos. Os cromatogramas característicos de amostras de pele (Figura 1) e carcaça (Figura 2) tratadas com DGCH, assim como os respectivos controles, mostram que existem poucos interferentes com tempo de retenção próximo à clorhexidina.

A partir do 8º dia de armazenamento sob refrigeração, percebeu-se nas amostras não tratadas o desenvolvimento de odores decorrentes de decomposição. Nas amostras tratadas, nenhum odor estranho foi notado até o final do experimento, o que é um indicativo da eficiência do sanitizante, muito embora a avaliação microbiológica não tenha sido objeto deste estudo.

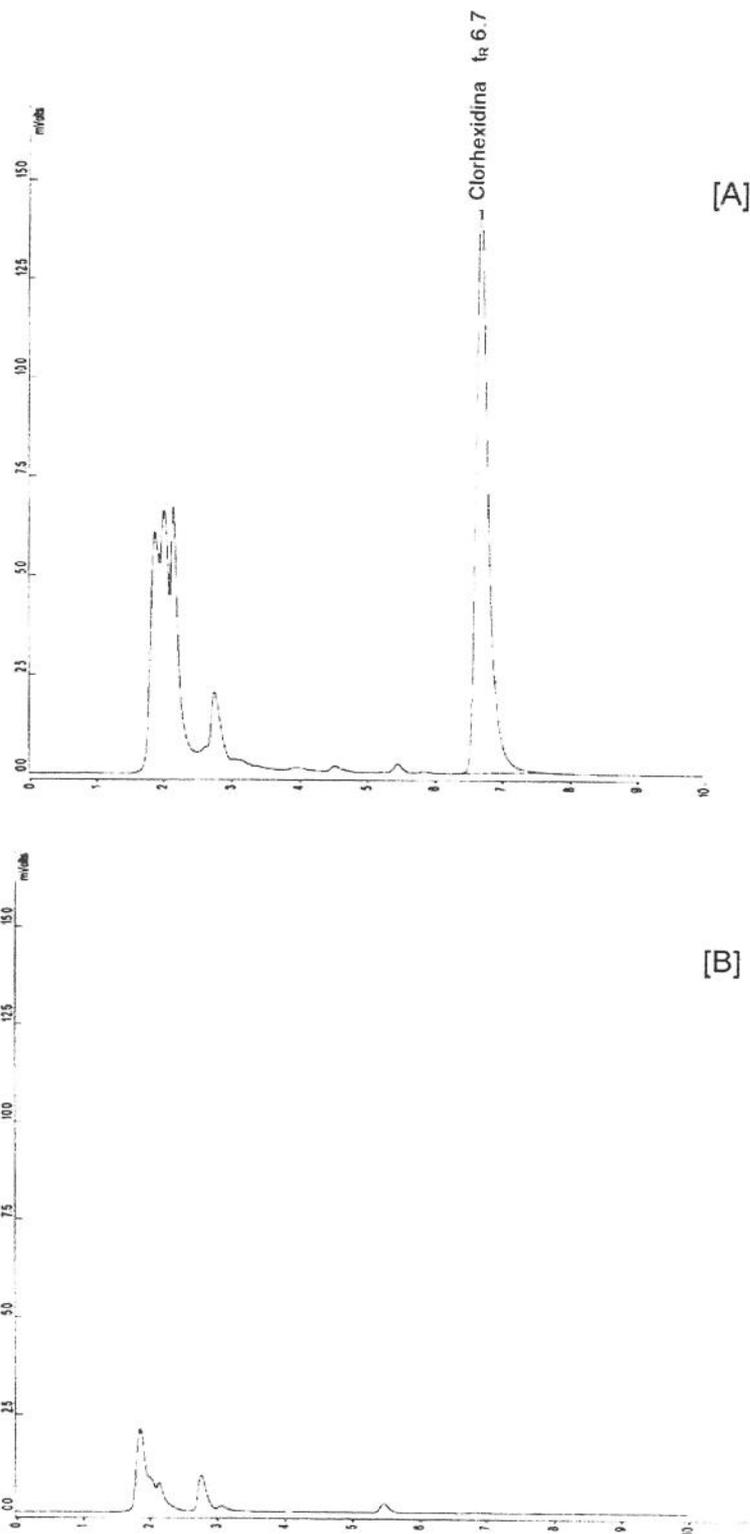


Figura 1 – Cromatogramas por CLAE típicos de pele de frango. Diluição final das amostras 5g/10mL. Condições cromatográficas: coluna C₁₈ silanizada (250 mm x 4,6mm di); vazão 1,0 mL/min; fase móvel acetonitrila-tampão fosfato(0,1 M Na₂HPO₄-0,005M heptanossulfonato de sódio-0,05M trietilamina-ác. fosfórico pH 2,5) na proporção 67:33. [A] Amostra tratada com solução de digluconato de clorhexidina. [B] Amostra não tratada.

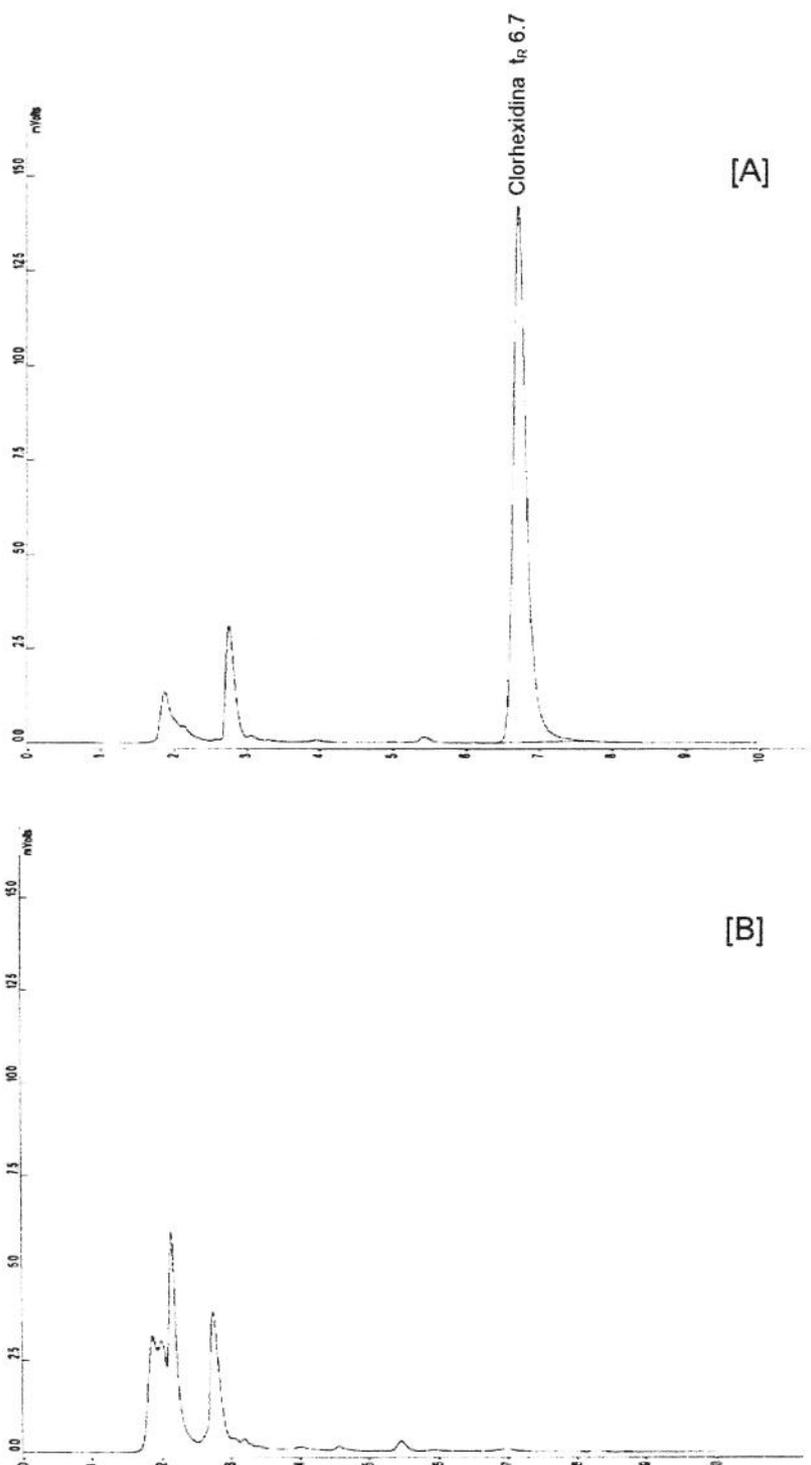


Figura 2 – Cromatogramas por CLAE típicos de carcaça de frango. Diluição final das amostras 5g/5mL. Condições cromatográficas: coluna C₁₈ silanizada (250 mm x 4,6mm di); vazão 1,0 mL/min; fase móvel acetonitrila-tampão fosfato (0,1 M Na₂HPO₄-0,005M heptanossulfonato de sódio-0,05M trietilamina-ác. fosfórico pH 2,5) na proporção 67:33. [A] Amostra tratada com solução de digluconato de clorhexidina. [B] Amostra não tratada.

4. CONCLUSÕES

A proposta inicial de desenvolvimento de método analítico para determinação do DGCH foi plenamente atingida. O procedimento desenvolvido proporcionou recuperação e sensibilidade adequadas aos níveis encontrados nas amostras e permitiu analisar resíduos em tecidos com diferentes teores de gordura. O consumo de solventes e reagentes é pequeno e os equipamentos exigidos são relativamente simples. Tendo em vista a simplicidade da vidraria utilizada, várias extrações podem ser feitas simultaneamente.

Foi possível constatar que o tratamento de carcaças de frangos com DGCH resulta na presença de resíduos deste sanitizante no produto final. Devido à forma de aplicação do produto e ao caráter polar da molécula, as maiores concentrações de DGCH são encontradas na pele do frango, havendo pouco ou nenhuma migração para a musculatura do peito.

O armazenamento de carcaças inteiras sob refrigeração por 12 dias resulta em redução gradual dos resíduos, não sendo possível estabelecer com segurança os mecanismos envolvidos nesta redução.

Tendo em vista que os resíduos de DGCH permanecem nas carcaças após a refrigeração ou congelamento e que a degradação térmica do sanitizante forma a 4-cloroanilina, potencialmente carcinogênica, sugere-se que sejam feitos estudos complementares para a determinação do produto de degradação em carcaças tratadas com DGCH e submetidas a processamento térmico.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] BARNES, E.M., MEAD, G.C., IMPEY, C.S., ADAMS, B.W. Spoilage organisms of refrigerated poultry meat. In: Russel, A.D. **Cold Tolerant Microbes in Spoilage and the Environmental**. New York, Academic Press, 1979. p. 101-116.
- [2] BRASIL. Ministério da Agricultura, Abastecimento e Reforma Agrária – SDA/DIPOA. **Autorização de uso de produto (AUP) N° 305/95**. <http://www.agricultura.gov.br/das/dipoa/OfDOI95.html> . copiado em 14/05/01 14:30 hs.
- [3] BRASIL. Ministério da Agricultura, Abastecimento e Reforma Agrária DOI/DIPOA. **Autorização de uso de produto (AUP) N° 184/93**. Brasília, 25.08.1993.
- [4] BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Portaria 264 de 13 de Outubro de 1995. **Diário Oficial da União**. Número 201, outubro de 1995.
- [5] BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento DOI/DIPOA. **Autorização de uso de produto (AUP) N° 255/99**. Brasília, 07.07.1999.
- [6] BRITISH PHARMACOPOEIA. Office of the British Pharmacopoeia.. London, Her Majesty's Stationery Office. 1993. v.1.
- [7] BROUGHAM, L.R.; CHENG, H.; PITTMAN, K.A. Sensitive high-performance liquid chromatographic method for the determination of chlorhexidine in human serum and urine. **Journal of Chromatography**, v. 383, p. 365-373, 1986.
- [8] BRYAN, F.L., Poultry and poultry meat products. In: **Microbial Ecology of Foods**, ICMFeds, Academic press, New York, 1980. v. 2. p.410-458.

- [9] DAVIES, G.E., FRANCIS, J., MARTIN, A.R., ROSE, F.L., SWAIN, G. 1:6-di-4'-chlorophenyldiguanidohexane ("Hibitane"). Laboratory investigation of a new antibacterial agent of high potency. **British Journal of Pharmacology** v. 9, p. 192-196, 1954.
- [10] De BRUIN, L.S.; JOSEPHY, P.D.; PAWLISZYN, J.B. Solid Phase Microextraction of monocyclic Aromatic Amines from Biological Fluids. **Analytical Chemistry**, v. 70, n. 9, p. 1986-1992, 1998.
- [11] DORN, P., KRABISCH, P., GEHRA, H. Studies on Salmonella-decontamination of broiler carcasses. **Archives Gefluegelkunde**, v. 53, p. 123-134, 1989.
- [12] DOUB, W.H.; RUHL, D.D.; HART, B.; MEHELIC, P.R.; REVELLE, L.K. Gradient liquid chromatographic method for the determination of chlorhexidine and its degradation products in bulk material. **Journal of Association of Official Analytical Chemists International**, v. 79, n. 3, p. 636-639, 1996.
- [13] DRESSEL, J., LEISTNER, L. Inhibition of *Salmonella* on chicken carcasses by treatment with edible acids. **Mitteilungsblatt der Bundesanstalt für Fleischforschung, Kulmbach**, n. 185, p. 6040-6046, 1984.
- [14] FINZI, M; COSTA, C. Microbiological contamination in food processing plants. Preventive measures. **Rivista della Societa Italiana di Scienza dell Alimentazione**, v. 8, n. 4, p. 258-261, 1979 .
- [15] FOULKES, D.M., Some toxicological observations on chlorhexidine. **Journal of Periodontal Research**, v. 8, p. 55-60, 1973.
- [16] FURTADO, M.M.; SAMPAIO, M.H.D.; NUNES, L.G. Avaliação do uso da clorhexidina no tratamento da salmoura e da casca do queijo curado. Viçosa, 1989. 10p. **Relatório Técnico**. Departamento de Tecnologia de Alimentos – Universidade Federal de Viçosa.

- [17] GAFFNEY, M.; COOKE, M.; SIMPSON, R. Improved method for the determination of chlorhexidine in urine. **Journal of Chromatography**, v. 306, p. 303-313, 1984.
- [18] GELINAS, P., GOULET, J. , Neutralization of the activity of eight didinfectants by organic matter. **Journal of Applied Microbiology**, v. 54, p. 243-247, 1983.
- [19] HARBISON, M.; HAMMER, S.M. Inactivation of human immunodeficiency virus by betadine products and chlorhexidine. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndomes**, v. 2, p. 16-20, 1989.
- [20] HUSTON, C.E.; WAINWRIGHT, P.; COOKE, M.; SIMPSON, R. High-performance liquid chromatographic method for the determination of chlorhexidine. **Journal of Chromatography**, v. 237, p. 457-464, 1982.
- [21] KEITH, L.H., CRUMMETT, W., DEEGAN JR., J., LIBBY, R.A., TAYLOR, J.K., WENTLER, G., , Principles of environmental analysis. **Analytical Chemistry**, v. 55, p. 2210-2218, 1983.
- [22] LONG, G.L., WINEFORDNER, J.D. Limit of detection. A closer look at the IUPAC definition. **Analytical Chemistry**, v. 55, p. 712A-724A, 1983.
- [23] MACHADO, R.A. Microbiota bacteriana no processamento industrial de frangos e sua influência na vida útil de carcaças refrigeradas. São Paulo, 1992. 166p. Dissertação de Doutorado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo (USP).
- [24] MAREL, G.M. VAN DER, LOGTESTIJN, J.G. VAN, MOSSEL, D.A.A. Bacteriological quality of broiler carcasses as affected by in-plant latic acid decontamination. **International Journal of Food Microbiology**, v. 6, p. 31-42, 1988.

- [25] MEAD, G. C. Food poisoning salmonellas in the poultry meat industry. **British Food Journal**, v. 92, p. 4-12, 1990.
- [26] MULDER, R.W.A.W. Concentrating in hygiene and environmental control. **Misset World Poultry**, v. 10, n. 7, p. 41-45, 1994.
- [27] PESONEN, T.; HOLMALAHTI, J.; POHJOLA, J. Determination of chlorhexidine in saliva using high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography B Biomedical Applications**, v. 10, p. 222-225, 1995.
- [28] REYNOLDS, J.E.F.; PRASAD, A.B. (Ed.), **Martindale. The Extra Pharmacopoeia**. London, The Pharmaceutical Press, 1982. 555p.
- [29] RICHARD, A.; ELBAZ, M.; ANDERMANN, G. Determination of 4-chloroaniline and chlorhexidine digluconate by ion-pair reversed-phase high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography CHROM** 16.870, p. 356-359, 1984.
- [30] RINDOM-SCHIOTT, LOE, H., BRINER, W.W. Two year oral use of chlorhexidine in man. IV. Effect on various medical parameters. **Journal of Periodontal Research**, v. 11, p. 158-164, 1976.
- [31] SANHUEZA, R.M.V. Efeito do digluconato de clorhexidina e tiabendazólio no controle da podridão causada por *Penicillium expansum* em maçãs CV. Fuji e Golden Delicious. **Relatório técnico**. Pelotas, 1991. Embrapa-CNPFT.
- [32] STEVENS, L.E.; DURRWACHTER, J.R.; HELTON, D.O. Analysis of chlorhexidine sorption in soft contact lenses by catalytic oxidation of [¹⁴C] chlorhexidine and by liquid chromatography. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 75, n. 1, p. 83-86, 1986.

- [33] TERRA, N. N.; LENZ, G.; GARCIA, S. Avaliação do uso do digluconato de clorhexidina na conservação de carcaças resfriadas de frango. Relatório Técnico Confidencial. Santa Maria, 1989. 8p. Centro de Ciências Rurais- Universidade Federal de Santa Maria.
- [34] XAVIER, C.V.A.; BERAQUET, N.J. Shelf-life of refrigerated chicken meat: technological alternatives. II. Decontamination methods. **Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos**, 24 , n. 2, p. 121-128, 1994 .

CAPÍTULO 3

**Artigo a ser publicado na revista Ciência e Tecnologia de Alimentos editada
pela Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**

DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA PARA DETERMINAÇÃO DE 4-CLOROANILINA EM FRANGOS POR CROMATOGRAFIA GASOSA – ESPECTROMETRIA DE MASSAS. ANÁLISE EM TECIDOS TRATADOS COM DIGLUCONATO DE CLORHEXIDINA APÓS O PROCESSAMENTO TÉRMICO.

Eduardo Vicente

Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas, Brasil.

Maria Cecília de Figueiredo Toledo

Universidade Estadual de Campinas, Campinas Brasil.

Palavras-chave: 4-cloroanilina*, digluconato de clorhexidina, cromatografia de gás, espectrometria de massas, frango, aminas aromáticas.

RESUMO

A degradação do antimicrobiano digluconato de clorhexidina (DGCH) durante armazenamento ou processamento térmico pode formar a 4-cloroanilina (CA), um composto potencialmente carcinogênico. Conseqüentemente, o uso deste sanitizante para descontaminação de carcaças de frangos representa uma fonte de risco para o consumidor, devendo ser avaliada a presença da CA no produto tratado. Um método foi desenvolvido para determinação de resíduos de CA em tecidos de frangos. Após a extração com diclorometano, foi feita a limpeza do extrato em cartucho C₁₈ e quantificação por cromatografia gasosa–espectrometria de massas (CG-EM), sem derivação. A recuperação média (89,2% - CV 9,9%) e o limite de detecção (1,8 ng/g) foram considerados satisfatórios para os propósitos do estudo. Em amostras tratadas com DGCH e não submetidas a processamento térmico, a quantidade de CA detectada foi relativamente baixa, e provavelmente se originou da solução de tratamento. A fritura e a cocção em forno convencional resultaram em níveis elevados de CA, enquanto que a cocção em panela de pressão não alterou os níveis de CA presentes na amostra cruas. Em vista destes resultados e, considerando-se o potencial tóxico da CA, recomenda-se que estes dados sejam levados em consideração quando da

METHODOLOGY FOR 4-CHLOROANILINE DETERMINATION IN POULTRY BY GC-MS. ANALYSIS IN CHLORHEXIDINE DIGLUCONATE TREATED TISSUES AFTER THERMAL PROCESSING.

Keywords: 4-chloroaniline*, gas chromatography, mass spectrometry, chlorhexidine digluconate, poultry, aromatic amines.

SUMMARY

The degradation of the antimicrobial agent chlorhexidine digluconate (CHDG) during storage or thermal process originates 4-chloroaniline (CA), a compound which is potentially carcinogenic. As the use of this sanitizing agent to decontaminate poultry carcasses in processing plants may represent a risk to the consumers, it is important to search for the presence of CA residues in the treated products. A method was developed to quantify CA in poultry tissues. After dichloromethane extraction, the extract was cleaned on a C₁₈ cartridge and the quantitation was performed, without derivatization, by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). The mean recovery (89.2% - CV 9.9%) and detection limit (1.8 ng/g), were satisfactory for the purposes of the study. Analysis of samples treated with CHDG, before thermal processing, resulted in low CA levels, which probably originated from the treating solution. Frying and cooking in conventional oven resulted in relatively higher levels of CA, while cooking under pressure did not change the residual levels when compared to the raw samples. In view of these results and taking into consideration the toxic potential of CA, the data generated by this study should be considered in the case of use of chlorhexidine as poultry carcasses sanitizing agent.

1. INTRODUÇÃO

A contaminação microbiana no processamento industrial de aves é um problema tecnológico mas também uma preocupação de saúde pública. Ao longo de uma linha de processamento, são efetuadas lavagens das carcaças com água clorada com o objetivo de reduzir a contaminação microbiana [21]. Posteriormente a diminuição da temperatura das carcaças em água fria reduz a taxa de multiplicação microbiana [23]. A utilização de sanitizantes químicos é um processo tecnológico complementar, que tem sido empregado para o controle de microrganismos deterioradores e patogênicos, visando o aumento da vida de prateleira das carcaças, sem prejudicar a saúde dos consumidores [21, 22].

O digluconato de clorhexidina (DGCH), uma bis-biguanida com propriedades bactericida, bacteriostática [6] e fungicida [30], vem sendo utilizada como desinfetante desde a década de 50. Este antimicrobiano tem sido aplicado em produtos para higienização de mãos e equipamentos na indústria de alimentos, colutórios, soluções para lentes de contato e pomadas para queimaduras, entre outros [2, 28, 29]. As evidências da baixa toxicidade, aliadas à eficiência antimicrobiana, levaram ao desenvolvimento de estudos para avaliar a aplicação do DGCH no controle de microrganismos em carcaças de frango [21, 32]. Entretanto, apesar do benefício tecnológico conseguido, não é conhecido o comportamento deste antimicrobiano durante o armazenamento e processamento de carcaças tratadas.

Os dados existentes restringem-se à estabilidade do DGCH em medicamentos e soluções comerciais. DOUB *et al.* [11] desenvolveram metodologia para analisar produtos resultantes da degradação do DGCH em solução a 20% armazenada por 2,5 a 3 anos no escuro e em temperatura ambiente (20-25°C). O método foi eficiente na quantificação de 9 dos 11 compostos previamente identificados, entre os quais a 4-cloroanilina (CA), 4-clorofenilguanidina e a 4-clorofeniluréia. A decomposição da DGCH pode ocorrer em função da luz e, principalmente, da temperatura [19]. JAMINET *et al.* [15]

constatarem que o pH influencia esta degradação, tendo observado uma maior formação de CA em soluções autoclavadas a 130°C/30 min em pH 9 do que em pH 6,0.

A aplicação de DGCH em alimentos desperta uma preocupação adicional, já que as aminas aromáticas e seus derivados substituídos são tóxicos, além de existirem suspeitas de carcinogenicidade e mutagenicidade [17]. Esta suspeita decorre da possibilidade de conversão destas aminas, na presença de hemoglobina, em compostos N-nitroso [13, 25]. Evidências de estudos toxicológicos indicam a toxicidade, imunotoxicidade e carcinogenicidade da CA [3, 4, 16]. O Programa Nacional de Toxicologia da Agência de Proteção Ambiental (EPA) dos Estados Unidos [38] classificou a CA como mutagênica e como provável carcinógeno humano – grupo B2. O Q_1^* determinado (unidade de risco estimado), baseado em taxa de sarcomas de baço em ratos machos, foi de $6,38 \times 10^{-2}$ mg/kg/dia em equivalentes humanos.

Em vista do potencial carcinogênico da CA, ela tem sido monitorada em sangue e urina de pacientes tratados com medicamentos à base de DGCH [2]. Os derivados de anilina também são compostos ligados à atividade industrial, como intermediários na produção de borrachas, plásticos, espuma de poliuretano, pigmentos e produtos farmacêuticos [9]. A CA foi identificada como produto de degradação de pesticidas dos grupos fenil uréia e fenil carbamatos [17]. Devido a sua importância toxicológica, a CA e outras aminas substituídas foram incluídas pela Comunidade Européia na lista de poluentes industriais que devem ser monitorados em águas ambientais [5]. A legislação Norte Americana, publicada no “Federal Register § 180.377”, estabeleceu tolerâncias para diflubenzuron e seus metabólitos 4-clorofeniluréia e CA em arroz (0,02 µg/g) e arroz em casca (0,8 µg/g) [34].

Métodos analíticos para a determinação de CA em água utilizaram cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) após uma ou mais etapas de pré-concentração em coluna [5, 9, 10]. A microextração em fase sólida e

quantificação por cromatografia gasosa (CG)- espectrometria de massas (EM) ou detector de ionização de chama (DIC) também foram empregadas para análises em água [25] e fluidos biológicos [8]. Foram descritas análises por CLAE UV ou detector de arranjo de diodos (DAD) [12, 3] e por GC-FID [12] para determinação da CA em produtos cirúrgicos e desinfetantes formulados com DGCH ou triclocarban. Métodos de análise de CA por CLAE-DAD ou detector eletroquímico foram desenvolvidos em amostras de origem vegetal [31] e mel [7]. No "Pesticide Analytical Manual" do FDA - EUA [26], foram descritos métodos para determinação de diflubenzuron e os produtos de degradação 4-feniluréia e CA em amostras de origem vegetal e animal, empregando GC- detector de captura de elétrons (DCE) com derivação ou CLAE-UV.

Tendo em vista a possibilidade de utilização da DGCH para o tratamento de carcaças de frango em abatedouros, torna-se importante, do ponto de vista toxicológico, a determinação de resíduos de CA nas aves tratadas. Considerando que a velocidade de degradação da DGCH e conseqüente formação da CA são dependentes da temperatura e pH, é evidenciada a necessidade do controle de resíduos antes e após o processamento térmico do alimento. Estudos anteriores evidenciaram que após o tratamento de carcaças de aves com DGCH a maior concentração do sanitizante foi encontrada na pele (VICENTE & TOLEDO, 2001 – artigo enviado para publicação). Uma vez que estes tecidos são direta e intensamente afetados pelo processamento térmico, optou-se por desenvolver um método para análise de CA em frangos e investigar sua presença na pele tratada com DGCH, antes e após tratamentos térmicos convencionais.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Reagentes

Os reagentes empregados na etapa de extração foram o diclorometano e sulfato de sódio anidro (PR Mallinckodt). Na limpeza do extrato foram utilizados ácido clorídrico P.A (Merck), hidróxido de sódio P.A. (Merck) e água desmineralizada

em sistema Milli Q (Millipore), além dos solventes hexano, acetonitrila e metanol, todos grau resíduos de pesticidas (Mallinckodt). Também foram empregados cartuchos de extração em fase sólida (SPE) 3 mL C₁₈ 500 mg (JT Baker) e uma solução comercial 20% de digluconato de clorhexidina (Laboratório Enila) para o tratamento das amostras. A 4-cloroanilina 98% (Aldrich) foi utilizada como padrão para quantificação na cromatografia.

2.2 Instrumentação

O equipamento utilizado foi um cromatógrafo gasoso (HP 6890), equipado com amostrador automático (HP 7683) e espectrômetro de massas (HP 5973), operando com energia de ionização de 70 eV em modo íon seletivo (SIM). As temperaturas foram fixadas em 230° C para a fonte de íons e 150°C no quadrupolo. A coluna empregada para as análises foi a HP5-MS, 30m x 0,25 mm di e filme de 0,25µ e o gás de arraste foi o He, com vazão constante de 1,0 mL/min. As injeções foram feitas no injetor de temperatura programável (PTV), com “liner” silanizado “open baffled” em modo “splitless”. O injetor foi mantido à 55°C por 0,05 min e programado até 260°C com uma razão de 700 °C/min, permanecendo nesta temperatura por 0,75 min. A seguir, a temperatura foi elevada até 320 °C a razão de 500 °C/min e mantida por 5 minutos. Decorridos 0,75 minutos da injeção, foi aberta a válvula de purga do injetor, com vazão de 200 mL/min. O volume injetado foi de 1µL. A coluna foi mantida a 70°C por 1 minuto após a injeção e programada até 170°C na razão de 10°C/min. Atingida esta temperatura foi iniciada a segunda programação até 260°C na razão de 50°C/min e a temperatura final mantida por 5 minutos. A temperatura da interface com o detector de massas foi mantida em 300°C.

2.3 Tratamento e processamento das amostras

Doze cortes de peito com pele, com peso médio de 886g±54g, foram imersos por 1-2 segundos em uma solução aquosa de DGCH a 0,4g/L, permanecendo em caixas plásticas perfuradas para a remoção do excesso de

solução. Amostras formadas por três unidades cada foram submetidas aos seguintes processamentos térmicos convencionais: cocção em panela de pressão/1h, cocção em forno doméstico a gás 1,5h (temperatura indicada no forno 200 °C) e fritura em óleo de girassol/15 min. (temperatura medida no óleo 180 °C). Após o processamento térmico somente as peles foram separadas e homogeneizadas. Também foram separadas as peles de uma amostra tratada, que não foi submetida a processamento térmico.

Paralelamente, seis porções de 10g de pele tratada e homogeneizada foram pesadas em erlemeyers de 250 mL. Três amostras foram submetidas à autoclavagem, , à 120 ° C/1atm/30 min e outra três à cocção em forno de microondas doméstico de 700W (50% da potência), durante 10 minutos. A CA foi analisada, pelo método desenvolvido, após o processamento térmico. Paralelamente, amostras controle, não tratadas com DGCH, foram submetidas aos mesmos processamentos térmicos estudados, para verificar a existência de outras fontes de CA na matriz.

2.4 Método analítico

Foram pesados 10g de amostra, previamente homogeneizada, em um erlenmeyer de 250 mL com tampa de polietileno. Adicionaram-se 100 mL de diclorometano e 20g de sulfato de sódio anidro, permanecendo a mistura em agitador orbital 300 ciclos/min durante 30 min. O extrato foi filtrado em papel de filtro Whatmann 31 com auxílio de um funil de Büchner. A seguir o diclorometano foi totalmente evaporado em evaporador rotativo (40°C), até cerca de 1mL de resíduo oleoso, evitando-se que a amostra secasse completamente. O resíduo foi dissolvido em 50 mL de hexano e transferido para um funil de separação de 125 mL. O balão de evaporação foi novamente lavado com 15 mL de ácido clorídrico 0,1N, e a solução transferida para o mesmo funil. Efetuou-se a partição, com agitação moderada por 1 min., sendo a fase inferior (ácido) recolhida em um becker de 150 mL. Este procedimento foi repetido com outras 2 porções de 15mL de ácido clorídrico 0,1N e as fases ácidas reunidas no mesmo becker. Foram

adicionados cerca de 4 mL de hidróxido de sódio 1N ao extrato ácido e o pH ajustado para 10. Um cartucho de C₁₈ (SPE) foi condicionado com 5mL de acetonitrila e 10 mL de água destilada. A amostra já alcalinizada foi percolada pelo cartucho (1gota/segundo), que em seguida foi lavado com 20mL de água. Posteriormente, a água remanescente entre as partículas do suporte sólido foi completamente eliminada com o auxílio de fluxo de ar comprimido. Todo o eluato aquoso foi descartado e a CA eluída com 5mL de acetonitrila, recolhidos em um balão volumétrico de 5mL. Após o ajuste do volume final com acetonitrila, uma alíquota de 1 µL foi injetada em cromatógrafo gasoso acoplado ao espectrômetro de massas (CG-EM).

2.5 Limites de detecção, precisão e quantificação por CG-EM

O limite de detecção do método (LDM) foi determinado pela análise de 8 repetições com amostras fortificadas, de acordo com procedimento descrito por De BRUIN *et al.* [8]. O desvio-padrão da média dos resultados foi multiplicado pelo valor de *t* de Student para uma confiabilidade de 99% e graus de liberdade apropriados. Para 8 replicatas e sete graus de liberdade o valor de *t* de Student é de 2,998. O LDM foi estabelecido em amostras fortificadas com 10,7 ng/g de CA. O limite de quantificação do método (LQM) foi estabelecido com base em KEITH *et al.* [18] e LONG & WINEFORDNER [20], que o definem como 10 vezes o valor do desvio padrão. A precisão do método foi calculada pelo coeficiente de variação (CV) calculado a partir das determinações de amostras fortificadas em 6 diferentes níveis (10,7; 53,5; 107,0; 214,0; 535,0 e 4280 ng/g), com cinco repetições em cada nível. A quantificação foi feita por curva de calibração externa.

2.6 Robustez do método

O comportamento do método frente a pequenas modificações nas condições de trabalho foi testado de acordo com o procedimento descrito por YODEN [35]. Neste teste foram avaliadas sete variáveis em 8 determinações, efetuadas em amostras de pele fortificadas com 200ng/g de CA. As condições

alternativas avaliadas foram: duas de partições com ácido clorídrico 0,1 N; evaporação parcial do diclorometano; pH = 7 no extrato aquoso percolado pelo cartucho de C₁₈; eliminação da etapa de lavagem do cartucho de C₁₈ com água; eluição da CA com 4mL de acetonitrila e utilização de cartucho de C₁₈ recondicionado.

2.7 Confirmação de identidade

Para a confirmação da identidade da CA, os extratos foram injetados nas mesmas condições cromatográficas, porém com o detector de massas programado para o modo de varredura, denominado SCAN (70eV). Foram comparados os espectros dos picos obtidos a partir de amostras tratadas, amostras fortificadas e padrões analíticos. Adicionalmente, avaliou-se a coincidência com os espectros da biblioteca NIST 98.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Desenvolvimento do método

Entre os solventes testados, o diclorometano foi o que possibilitou uma extração eficiente do analito, permitindo a solubilização adequada da matriz, com maior facilidade para evaporação. Outros solventes avaliados, como a acetonitrila e o metanol, permitiram a extração, mas dificultaram a evaporação devido às pressões de vapor elevadas e miscibilidade com a água. As recuperações foram baixas utilizando-se estes solventes, provavelmente devido a perdas por volatilização.

Outro aspecto positivo alcançado pela extração com o diclorometano foi a exclusão da possibilidade de extração da clorhexidina presente na matriz. Em meio aquoso a clorhexidina encontra-se na forma ionizada, com pouca afinidade por solventes orgânicos. A eliminação dos componentes lipídicos da matriz foi conseguida com a partição com solvente orgânico em meio ácido, pois a CA

protonada (Figura 1) permaneceu solúvel no meio aquoso enquanto os componentes menos polares foram eliminados com o solvente.

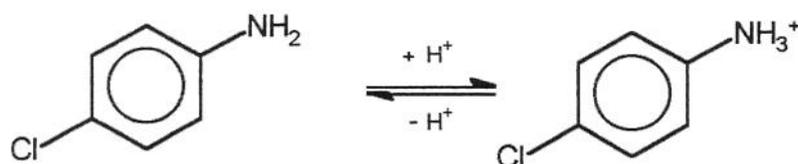


Figura 1 - Protonação reversível da 4-cloroanilina em meio ácido

O diclorometano e o hexano foram os solventes avaliados para esta partição. A densidade elevada do diclorometano tornou necessário o uso de vidraria adicional para a separação das fases, além de propiciar a formação de emulsão. Já o hexano não apresentou estes inconvenientes, permitindo a remoção eficiente dos co-extrativos. A estrutura neutra da molécula foi restabelecida com a alcalinização do extrato aquoso, permitindo a retenção da CA no C₁₈. Considerando o pK_a 4,15 determinado para a CA [5], em pH próximo de 7 a molécula deveria estar em sua forma neutra. Entretanto, foi constatado que as recuperações neste pH eram um pouco menores que em pH alcalino, o que pode ser atribuído à presença de resíduos ácidos no suporte do C₁₈, permitindo a eluição precoce da CA. Notou-se, ainda, que quando a eluição era feita imediatamente após a passagem da solução alcalina, a acetonitrila apresentava turbidez. Este problema foi solucionado pela lavagem da coluna com 20 mL de água destilada, para eliminar o excesso de hidróxido de sódio e outros possíveis compostos polares introduzidos juntamente com a amostra. A eluição do analito com 5 mL de acetonitrila proporcionou uma boa recuperação e sensibilidade, sem a necessidade de evaporação da amostra. Caso a evaporação da acetonitrila venha a ser feita para melhorar a sensibilidade, devem ser tomadas precauções para evitar a volatilização da CA. O aumento da massa inicial de amostra também é uma alternativa para aumentar a sensibilidade do método.

3.2 Avaliação de desempenho do método

O limite de detecção do método foi calculado em 1,8 ng/g e o limite para a quantificação foi 8,0 ng/g. Em concentrações inferiores ao LQM foi possível detectar os picos, mas a razão entre o íon alvo (127) e o qualificador (129) ficava fora da tolerância relativa de 20%, comprometendo a confiabilidade da quantificação. A sensibilidade do método proposto pode ser aumentada, se necessário, pela introdução da derivação e pela concentração do extrato final. Entretanto, serão necessários estudos adicionais para estabelecer estes procedimentos. A recuperação média das determinações em amostras fortificadas (Tabela 1) foi de 89,2% e o CV foi 9,94%.

Tabela 1 – Recuperação da 4-cloroanilina em pele fortificada com diferentes concentrações.

Nível de Fortificação (ng/g)	4-cloroanilina ¹	
	Recuperação média (%)	CV(%) ²
10,7	103 ± 4	3,6
53,5	89 ± 7	8,3
107,0	91 ± 6	6,1
214,0	89 ± 5	6,0
535,0	83 ± 3	3,8
4280,0	80 ± 4	5,0

¹ Análises com 5 repetições em cada nível

² CV(%) – Coeficiente de variação %

A análise de variância e o teste de Tukey permitiram constatar que houve diferença significativa entre as recuperações de 10,7 ng/g e 21,4 ng/g, ao nível de erro de 5%. Entretanto, não houve diferença estatística entre os demais níveis de fortificação. Foi constatado que a recuperação nas amostras fortificadas com 10,7 ng/g foi maior do que nos demais níveis. Não houve diferença significativa entre as repetições dentro de cada um dos seis níveis de fortificação, sendo o CV inferior a 10%, o que indica que a repetibilidade do método foi satisfatória. Estes resultados estão em concordância com os critérios publicados por HORWITZ *et al.* [14], considerando aceitável um CV de até 20% em determinações onde a concentração dos analitos esteja na faixa de ng/g (ppb).

O teste de robustez mostrou que a recuperação da CA sofreu influência, em ordem decrescente de importância, do pH do extrato aquoso, da evaporação do diclorometano, do número de partições com ácido clorídrico 0,1N, do volume da acetonitrila empregado para a eluição do analito, da lavagem do cartucho de C₁₈ com água, da utilização de cartucho de C₁₈ novo e da utilização do sulfato de sódio anidro na extração. Estes resultados indicaram que as condições estabelecidas no procedimento analítico precisam ser seguidas, mas existe uma margem de segurança no volume da acetonitrila definido e a reutilização do cartucho de C₁₈ pode ser adotada para redução do custo da análise.

3.3 Determinação de 4-cloroanilina em amostras de pele

Foi possível detectar resíduos de CA nas amostras de pele tratadas com DGCH, sendo que os resíduos foram maiores nas amostras submetidas a fritura e cocção em forno a gás (Tabela 2).

Tabela 2 - Resíduos de 4-cloroanilina em amostras de pele tratadas com digluconato de clorhexidina, antes e após o processamento térmico.

Tipo de processamento	4-Cloroanilina (ng/g)	
	Média ¹	CV(%) ²
Não processada termicamente	20± 2	9,6
Cocção em forno a gás convencional 200°C/2h	133 ± 14	10,2
Cozimento em panela de pressão/ 1h	19 ± 1	4,6
Fritura em óleo de girassol 180°C/15 min.	1628 ± 108	6,6

¹ Análises com 3 repetições

² CV(%) – Coeficiente de variação %

Os níveis determinados em amostras cozidas em panela de pressão não diferiram estatisticamente daqueles obtidos em amostra não processada termicamente. Em amostras assadas (cocção em forno a gás convencional) e fritas os níveis foram bem maiores, provavelmente em virtude das temperaturas mais elevadas às quais a pele foi submetida. Em vista da CA possuir propriedades físico-químicas que favorecem sua volatilização quando aquecida, deve ser considerado que parte da CA, gerada pela degradação do DGCH, pode ter sido eliminada durante o processamento térmico. Este fato significa que a quantidade de CA formada pode ter sido maior que a encontrada nas análises efetuadas. Este raciocínio está de acordo com o observado por NAGAYAMA & KIKUGAWA [25], onde a 2-cloroanilina, formada a partir da degradação do agrotóxico clorprophan, foi reduzida durante a cocção e fritura de batatas contaminadas. Na amostra cozida em panela de pressão, deve ainda ser

considerada a solubilização da CA, já que a amostra ficou em contato direto com a água aquecida.

Nas amostras controle, sem tratamento com o DGCH, não foi encontrada CA antes ou após os diferentes processamentos térmicos, descartando-se assim a possibilidade de formação de CA a partir de componentes da matriz.

Pequenas quantidades de CA foram encontradas em amostras tratadas mas não submetidas a processamento térmico. A origem destes resíduos foi, provavelmente, a solução de DGCH utilizada para o tratamento. Em análise feita pelo fabricante do DGCH 20%, utilizado no presente estudo, foram determinados 78,7 mg/L de CA. A presença de CA é decorrente do processo de fabricação do produto e/ou da degradação do mesmo. Segundo a BRITISH PHARMACOPOEIA [1], são tolerados até 500 mg/L de CA em soluções comerciais de DGCH 20%.

Tendo em vista que as amostras foram tomadas após o processamento, foi estabelecida a perda de massa decorrente de cada um deles. A cocção em panela de pressão levou a uma redução de 42%, da massa inicial, enquanto a cocção em forno a gás e o processo de fritura resultaram em reduções de 62% e de 76%, respectivamente. A evaporação da água e solubilização das gorduras devem ser os principais fatores para estas perdas de massa. Esta hipótese deve ser considerada, já que 10g da amostra processada seria equivalente a uma quantidade maior da amostra crua, o que pode ser interpretado como um fator de concentração da CA detectada inicialmente.

O processamento térmico de porções definidas de amostra (10g) permitiu a constatação de que o aumento das quantidades de CA ocorreu devido à degradação da DGCH e não somente pela concentração da CA introduzida como contaminante da solução de tratamento (Tabela 3). A comparação dos resultados pode ser feita sem considerar a perda de água durante o aquecimento ou solubilização da CA., tendo em vista que foram analisadas quantidades iguais de uma mesma amostra previamente homogeneizada.

Tabela 3 - Resíduos de 4-cloroanilina em amostras de pele tratadas com digluconato de clorhexidina e homogeneizadas¹ antes do processamento térmico.

Tipo de processamento	4-Cloroanilina (ng/g) ²	
	média	CV(%) ³
Não processada termicamente	9 ± 0	4,6
Forno de microondas 700W potência	51 ± 14	27,2
Autoclave 121°C/1 atmosfera/30 min.	64 ± 8	11,8

¹utilizadas alíquotas de 10g para o processamento

² Análises com 3 repetições

³ CV(%) – Coeficiente de variação %

A autoclavagem de amostras tratadas com o DGCH levou a um aumento dos níveis residuais de CA em relação à amostra não processada. A diferença entre este resultado e os níveis encontrados após a cocção em panela de pressão pode ser atribuída ao fato de que, durante a autoclavagem, a amostra não ficou diretamente imersa em água e a temperatura atingida na autoclave pode ter sido ligeiramente maior. Estes resultados estão também em concordância com dados apontados por REYNOLDS & PRASAD [28], que constataram a formação de CA em soluções de clorhexidina 0,01% autoclavadas a 115 °C/30 min, mas não sob aquecimento a 100°C/30 min. Entretanto, deve ser considerado que neste experimento foi utilizado o acetato de clorhexidina além do que a matriz aquosa pode interagir de maneira diferente que a matriz lipo-protéica do presente estudo.

Nas Figuras 2, 3 e 4 podem ser observados cromatogramas típicos do padrão de CA, amostras de pele tratadas com DGCH antes e após o processamento térmico, assim como os respectivos controles sem tratamento com o sanitizante.

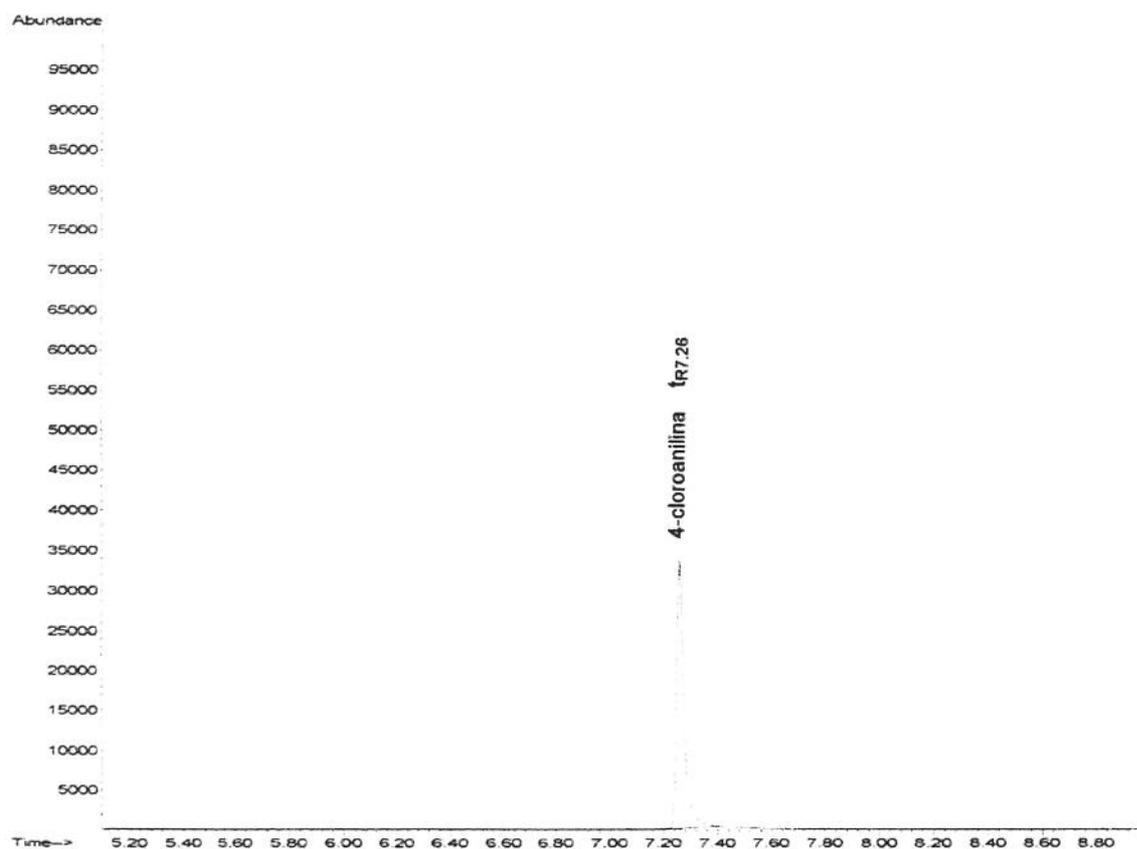


Figura 2A - Cromatograma típico de padrão de 4-cloroanilina 0,214 $\mu\text{g/mL}$ por CG-EM. Condições cromatográficas: coluna HP5-MS, 30m x 0,25 mm di e filme de 0,25 μ ; gás de arraste He com vazão constante de 1,0 mL/min; com programação de temperatura no injetor e no forno. Espectrômetro de massas operado em modo SIM – 70 eV, monitorando os íons m/z 127 e 129.

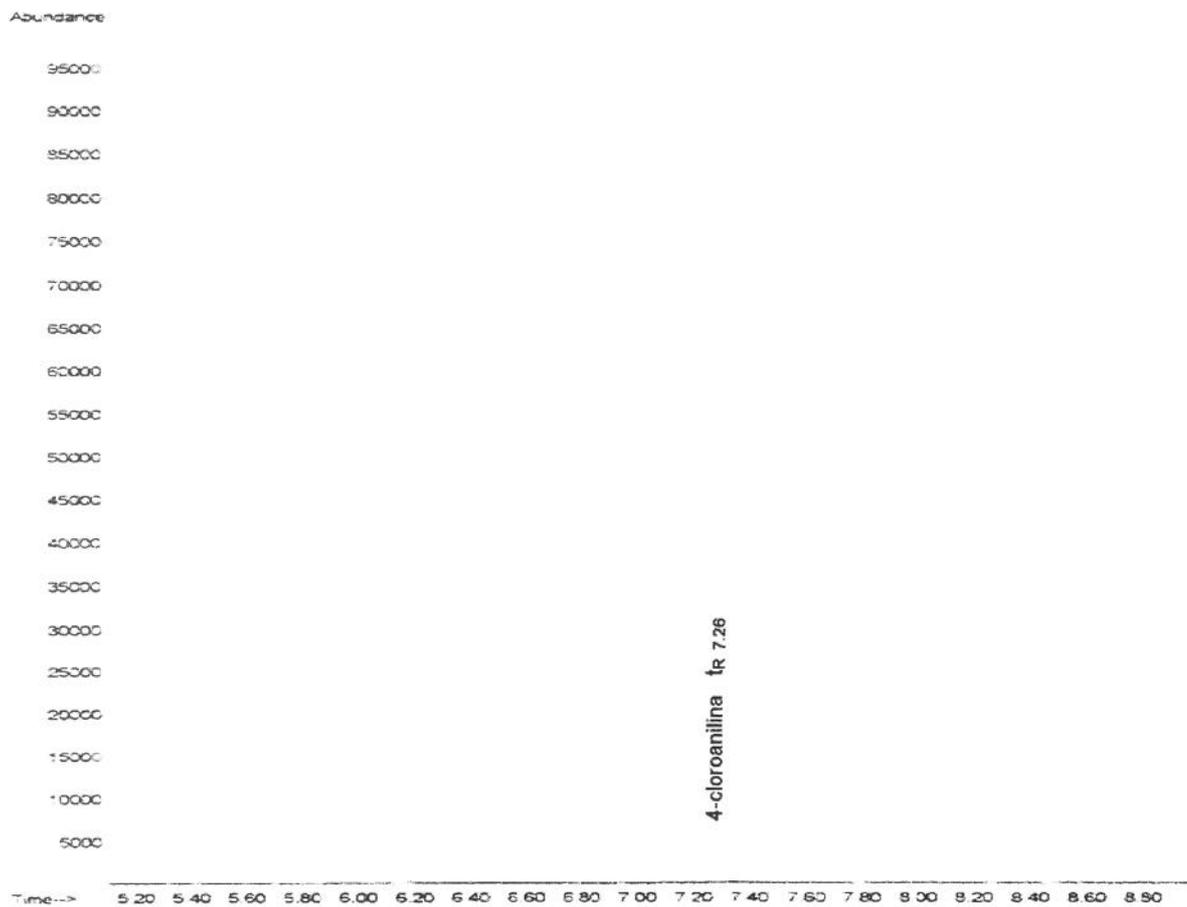


Figura 2B – Cromatograma típico de pele tratada com digluconato de clorhexidina, não submetida a processamento térmico e analisada por CG-EM. Diluição final da amostra 10g/5mL. Condições cromatográficas: coluna HP5-MS, 30m x 0,25 mm di e filme de 0,25 μ ; gás de arraste He com vazão constante de 1,0 mL/min; programação de temperatura no injetor e no forno. Espectrômetro de massas operado em modo SIM – 70 eV, monitorando os íons m/z 127 e 129..

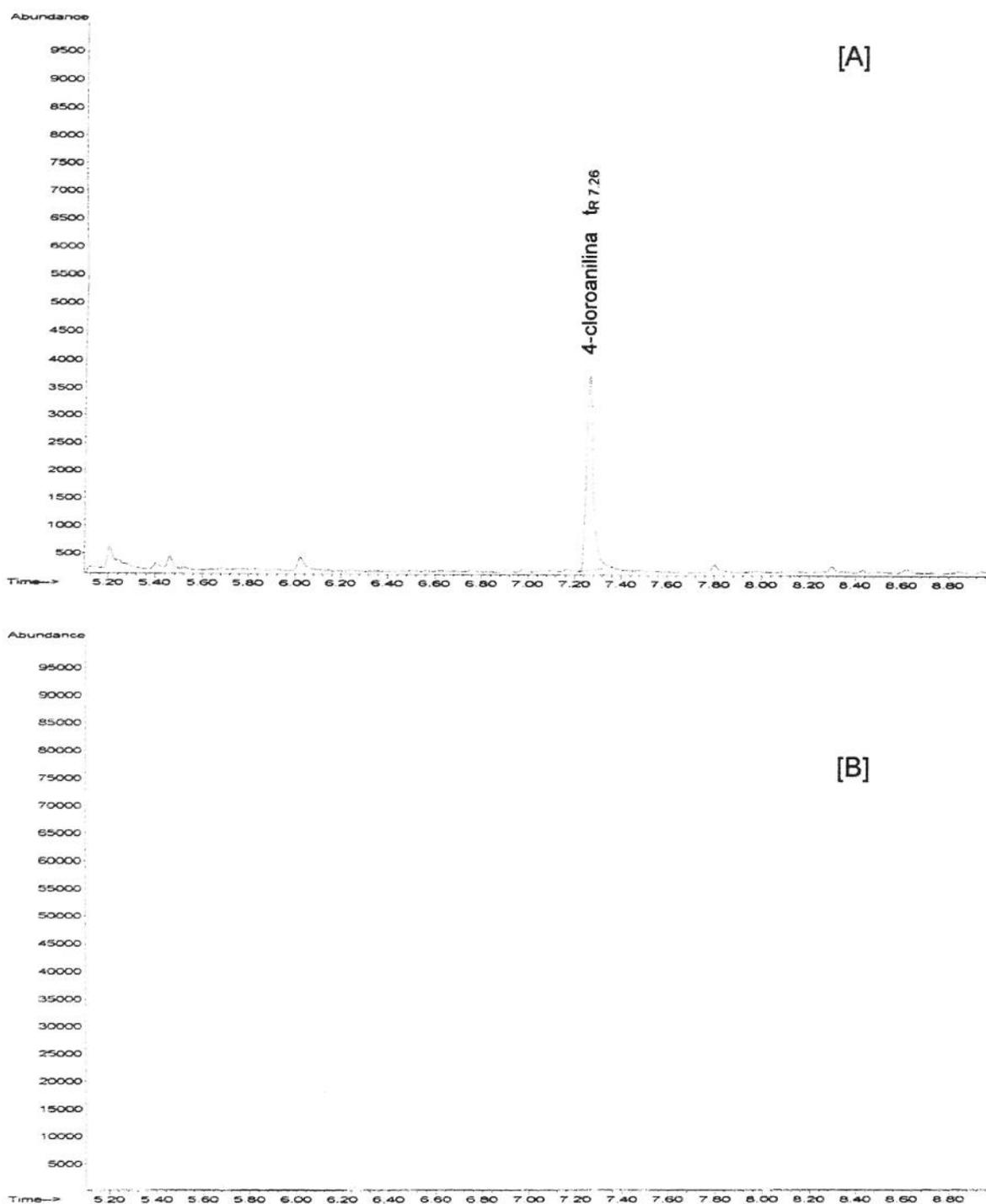


Figura 3 - Cromatogramas típicos da análise de 4-cloroanilina em pele por CG-EM (SIM – 70 eV). Condições cromatográficas: coluna HP5-MS, (30m x 0,25 mm di e filme de 0,25 μ), gás de arraste He com vazão de 1,0 mL/min, programação de temperatura no injetor e no forno, monitorados os íons m/z 127 e 129. [A] Pele tratada com digluconato de clorhexidina processada por cocção em forno convencional a gás 200⁰C/ 2 h térmico. [B] Pele controle submetida ao mesmo processamento térmico. Diluição final das amostras 10g/5mL.

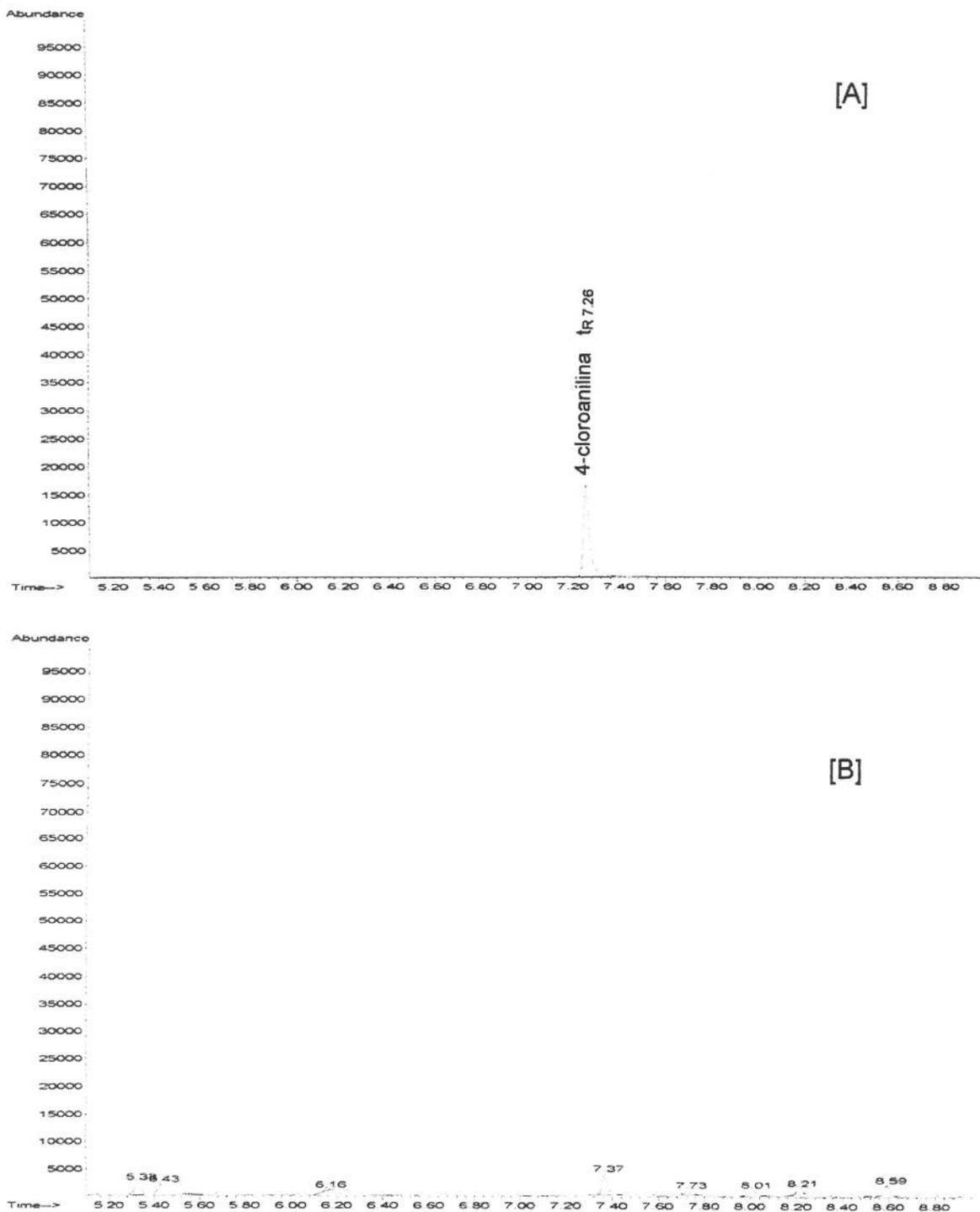


Figura 4 - Cromatogramas típicos da análise de 4-cloroanilina em pele por CG-EM (SIM – 70 eV). Condições cromatográficas: coluna HP5-MS (30m x 0,25 mm di e filme de 0,25 μ), gás de arraste He com vazão de 1,0 mL/min, programação de temperatura no injetor e forno, monitorados os íons m/z 127 e 129. [A] Pele tratada com digluconato de clorhexidina processada por fritura em óleo de girassol 180^oC/15 min. Diluição final da amostra 10g/125mL. [B] Pele controle submetida ao mesmo processamento térmico. Diluição final da amostra 10g/5mL.

3.4 Confirmação de identidade

A comparação dos espectros de massas permitiram a identificação dos picos nos cromatogramas das amostras, cujos tempos de retenção coincidiam com o da CA. Foi confirmada a presença da CA nas amostras tratadas com DGCH antes e após processamento térmico. Nas amostras controle não foram encontrados picos com tempo de retenção equivalentes à CA.

Um cromatograma típico de amostra tratada com DGCH e submetida ao processamento térmico (fritura em óleo de girassol 180 °C/15 minutos) é apresentado na figura 5A. O espectro de massas referente ao pico com tempo de retenção equivalente à CA e o respectivo espectro da biblioteca NIST98 podem ser observados na Figura 5B.

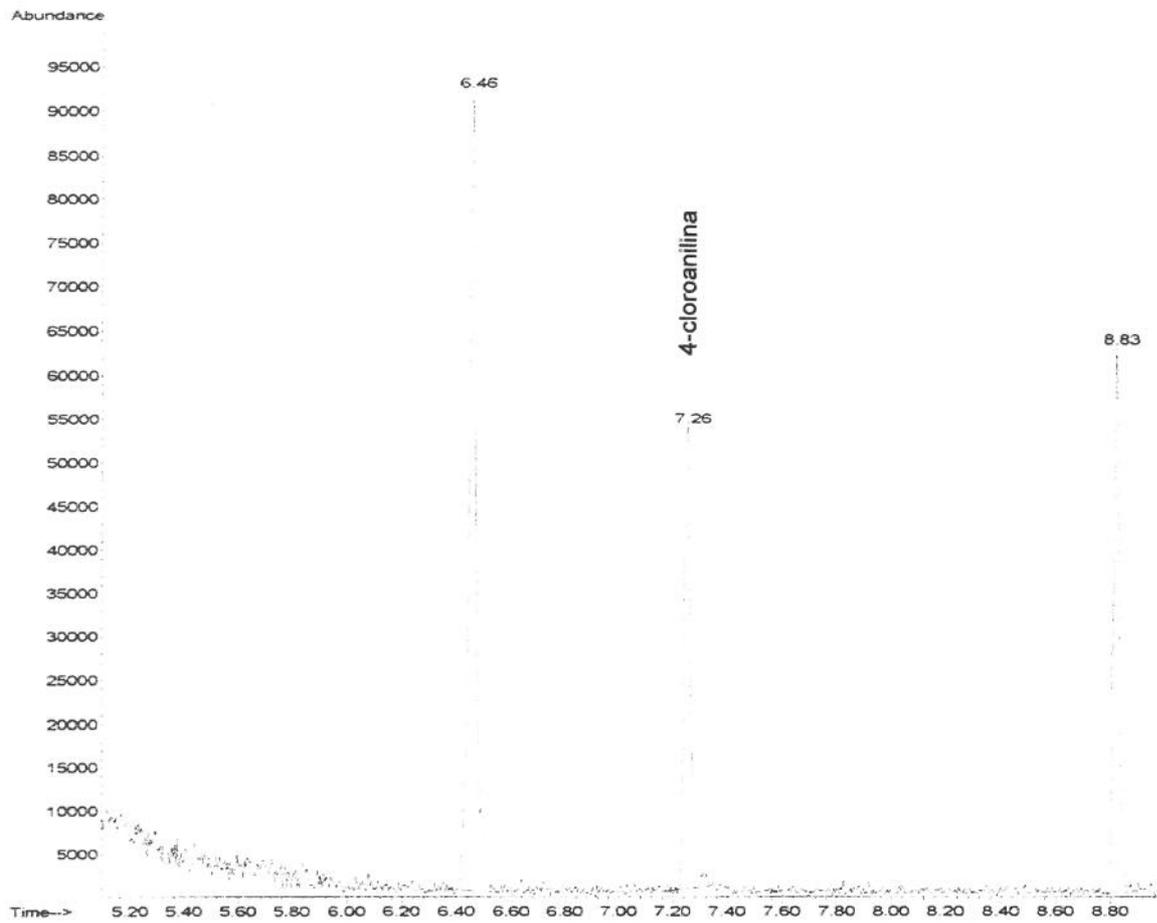


Figura 5A - Cromatograma típico da análise de 4-cloroanilina em pele tratada com digluconato de clorhexidina e processada por fritura em óleo de girassol 180°C/ 15 min., por CG-EM (SCAN – 70 eV), coluna HP5-MS (30m x 0,25 mm di ; filme de 0,25 μ), gás de arraste He com vazão constante de 1,0 mL/min, programação de temperatura no injetor e no forno.

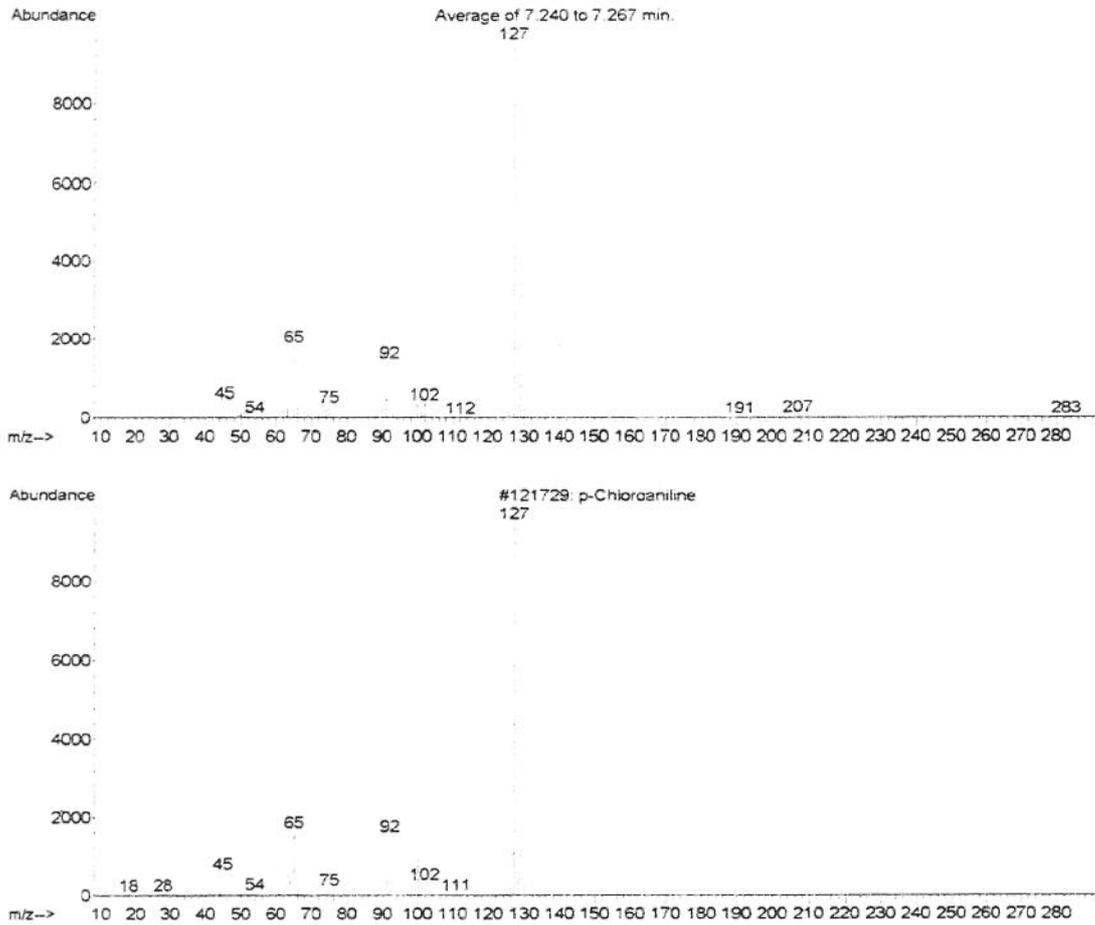


Figura 5B - Espectro de massas (modo SCAN 70 eV) referente ao pico com t_R 7,26 min do cromatograma de pele tratada com DGCH e submetida a fritura em óleo de girassol, identificado como 4-cloroanilina em comparação com espectro da biblioteca NIST98.

4. CONCLUSÕES

O método desenvolvido apresentou eficiência, sensibilidade e repetibilidade adequados para a análise de CA em amostras de pele de frango. O procedimento pode ser considerado robusto, devendo ser tomadas precauções nas etapas de correção de pH do extrato aquoso e evaporação do diclorometano.

Tendo em vista a presença de resíduos de CA em amostras de pele de frango crua após o tratamento com o sanitizante, recomenda-se um controle rigoroso dos níveis deste composto nas soluções de DGCH, caso estas venham a ser utilizadas diretamente nos alimentos.

O processamento térmico de frangos pode resultar na decomposição do DGCH, formando a CA, ou promover a concentração de resíduos de CA presentes na amostra crua, possivelmente oriundos da solução utilizada para o tratamento das carcaças.

Considerando-se o potencial tóxico da CA e a possibilidade de sua presença em frangos após tratamento térmico, recomenda-se que as informações geradas no presente estudo sejam levadas em consideração quando da avaliação da utilização do DGCH como sanitizante de carcaças em abatedouros de aves.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] BRITISH PHARMACOPOEIA. Her Majesty's Stationery Office, Edinburgh Press, London, 1993. v. 1.
- [2] BROUGHAM, L.R.; CHENG, H.; PITTMAN, K.A. Sensitive high-performance liquid chromatographic method for the determination of chlorhexidine in human serum and urine. **Journal of Chromatography**, v. 383, p. 365-373, 1986.
- [3] CHHABRA, R.S.; THOMPSON, M.; ELWELL, M.R.; GERKEN, D.K. Toxicity of p-chloroaniline in rats and mice. **Food and Chemical Toxicology**, v. 28, n. 10, p. 717-722, 1990.
- [4] CHHABRA, R.S.; HUFF, J.E.; HASEMAN, J.K.; ELWELL, M.R.; PETERS, A.C. Carcinogenicity of p-chloroaniline in rats and mice. **Food Chemical Toxicology**, v. 29, n. 2, p. 119-24, 1991.
- [5] COQUART, V.; HENNION, M.C. Trace-level monitoring of chloroanilines in environmental waters using online trace-enrichment and liquid chromatography with UV and electrochemical detection. **Chromatographia**, v. 37, n. 7-8, p. 392-398, 1993.
- [6] DAVIES, G.E., FRANCIS, J., MARTIN, A.R., ROSE, F.L., SWAIN, G., , 1:6-di-4'-chlorophenyldiguanidohexane ("Hibitane"). Laboratory investigation of a new antibacterial agent of high potency. **British Journal of Pharmacology**, v. 9, p. 192-196, 1954.
- [7] De BALUGERA, Z.G.; GOICOLEA, M.A.; BARRIO, R.J. Determination of 4-chloroaniline and 4-chlorophenyl urea in honey by liquid chromatography with electrochemical detection. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technol.**, v. 20, n. 10, p. 1591-1603, 1997.

- [8] De BRUIN, L.S.; JOSEPHY, P.D.; PAWLISZYN, J.B. Solid Phase Microextraction of monocyclic Aromatic Amines from Biological Fluids. **Analytical Chemistry**, v. 70, n. 9, p. 1986-1992, 1998.
- [9] DI CORCIA, A.; SAMPERI R. Determination of chloroaniline traces in environmental waters by selective extraction with two traps in tandem and liquid chromatography. **Analytical Chemistry**, v. 62, n. 14, p. 1490-1494, 1990.
- [10] DJOSAN, D.; FARAJ-ZADAH, M.A. Liquid chromatographic determination of aniline and derivatives in environmental waters at nanogram per litre levels using fluorescamine pre-column derivatization. **Chromatographia**, v. 41, n. 9-10, p. 568-572, 1995.
- [11] DOUB, W.H.; RUHL, D.D.; HART, B.; MEHELIC, P.R.; REVELLE, L.K. Gradient liquid chromatographic method for the determination of chlorhexidine and its degradation products in bulk material. **Journal of Association of Official Analytical Chemists International**, v. 79, n.3, p. 636-639, 1996.
- [12] GAVLICK, W.K.; DAVIS, P.K. Gas chromatographic determination of p-chloroaniline in a chlorhexidine digluconate-containing alcohol foam surgical scrub product. **Journal of Association of Official Analytical Chemists International**, v. 77, n. 3, p. 583-586, 1994.
- [13] GOLLY, I.; HLAVICA, P. The role of hemoglobin in the N-oxidation of 4-chloroaniline. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 760, n. 1, p. 69-76, 1983.
- [14] HORWITZ, W. Evaluation of analytical methods used for regulation of foods and drugs. **Analytical Chemistry**, v. 54, n. 1, p. 67A-74A, 1982.

- [15] JAMINET, F. DELATTRE, L.; DELPORTE, J.P.; MOES, A. Effect of temperature of sterilization and pH on stability of chlorhexidine in solution. **Pharmaceutica Acta Helvetiae**, v. 45, p. 60-630 , 1970.
- [16] KACMAR, P.; PISTL, J.; MIKULA, I. The effect of p-chloroaniline on leukocytes of sheep peripheral blood under the migration-inhibition test conditions. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, v. 17, n. 3, p. 577-84, 1995.
- [17] KATAOKA, H. Derivatization reactions for the determination of amines by gas chromatography and their applications in environmental analysis. **Journal of Chromatography A** v. 733, p.: 19-34, 1996 .
- [18] KEITH, L.H., CRUMMETT, W., DEEGAN JR., J., LIBBY, R.A., TAYLOR, J.K., WENTLER, G., , Principles of environmental analysis. **Analytical Chemistry**, v. 55, p. 2210-2218, 1983.
- [19] KOHLBECKER, G. Toxic contaminants in chlorhexidine digluconate. **Deutsche Zahnärztliche Zeitschrift**, v. 44, n. 4, p. 273-6, 1989.
- [20] LONG, G.L., WINEFORDNER, J.D, Limit of detection. A closer look at the IUPAC definition. **Analytical Chemistry**, v. 55, p. 712A-724A, 1983.
- [21] MACHADO, R.A. Microbiota bacteriana no processamento industrial de frangos e sua influência na vida útil de carcaças refrigeradas. São Paulo, 1992. 166p. Dissertação de Doutorado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo (USP).
- [22] MAREL, G.M. VAN DER, LOGTESTIJN, J.G. VAN, MOSSEL, D.A.A. Bacteriological quality of broiler carcasses as affected by in-plant latic acid decontamination. **International Journal of Food Microbiology**, v. 6, p. 31-42, 1988.

- [23] MEAD, G. C. Food poisoning salmonellas in the poultry meat industry. **British Food Journal** , v. 92, p. 4-12, 1990.
- [24] MULLER, L.; FATTORE, E.; BENFENATI, E. Determination of aromatic amines by solid Phase Microextraction and gas chromatography-mass spectrometry in water samples. **Journal of Chromatography A.**, v. 791, n. 1+2, p. 221-230, 1997.
- [25] NAGAYAMA, T.; KIKUGAWA, K. Influence of frying and baking on chlorpropham residue. **Japanese Journal of Toxicology**, v.38, n. 1, p. 78-83, 1992.
- [26] PESTICIDE ANALYTICAL MANUAL. **Diflubenzuron** (180.377, 186.2000). 12/82. Food and Drug Administration. USEPA Headquarters, Washington, 2000. v.2
- [27] RASMUSSEN, H.T.; OMELCZENKO, N.; FRIEDMAN, S.K.; McPHERSON, B.P. Determination of chloroanilines in bacterial soaps using cation-exchange chromatography with UV detection. **Journal of Chromatography A**, v. 719, n. 2, p. 434-7, 1996.
- [28] REYNOLDS, J.E.F.; PRASAD, A.B. (editor), **Martindale. The Extra Pharmacopoeia**. London, The Pharmaceutical Press, 1982.
- [29] RICHARD, A.; ELBAZ, M.; ANDERMANN, G. Determination of 4-chloroaniline and chlorhexidine digluconate by ion-pair reversed-phase high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography CHROM 16.870**, p. 356-359, 1984.

- [30] SANHUEZA, R.M.V. Efeito do digluconato de clorhexidina e tiabendazólio no controle da podridão causada por *Penicillium expansum* em maçãs CV. Fuji e Golden Delicious. Relatório Técnico. Pelotas, 1991. Embrapa-CNPFT.
- [31] RODRIGUEZ, E.; DE BALUGERA, Z.G.; GOICOLEA, M.A.; BARRIO, R.J. HPLC/diode-array method for the determination of the pesticide diflubenzuron and its major metabolites 2,6-difluorobenzamide, 4-chlorophenylurea, and 4-chloroaniline in forestry matrixes. **Journal of Liquid Chromatography and Related Technol.**, v. 21, n.12, p. 1857-1870, 1998.
- [32] TERRA, N. N.; LENZ, G.; GARCIA, S. Avaliação do uso do digluconato de clorhexidina na conservação de carcaças resfriadas de frango. Santa Maria, 1989. 8p. Relatório Técnico Confidencial – Centro de Ciências Rurais -Universidade Federal de Santa Maria.
- [33] USEPA - United States Environmental Protection Agency, **Reregistration Eligibility Decision - Diflubenzuron**. EPA 738-R-97-008, August, 1997. 199 p.
- [34] USEPA - United States Environmental Protection Agency, **Diflubenzuron, tolerances for residues § 180.377**. (As of 4/19/99), 1999, <http://www.epa.gov/Fedrgstr/EPA-PEST/1999/April/Day-19/377.pdf>.
- [35] YODEN, W. J. Statistical methods for Chemists. In: WERNIMONT, G.T. **Use of Statistics to develop and evaluate analytical methods**. Arlington, Association of Official Analytical Chemists, 1985. p. 78-86.

CONCLUSÕES GERAIS

Foram desenvolvidas metodologias para determinação de DGCH e CA em tecidos de frango. As sensibilidades dos procedimentos descritos são compatíveis com os níveis de resíduos esperados no caso de carcaças submetidas ao tratamento com o digluconato de clorhexidina.

O tratamento de carcaças e cortes de frango, por imersão em solução 0,4 g/L de DGCH, resultou em resíduos do sanitizante nos tecidos. Conforme o esperado, tendo em vista a modalidade de aplicação, as maiores concentrações do sanitizante foram encontradas na pele. Uma queda dos níveis residuais foi observada durante a refrigeração e o congelamento. A solubilização do DGCH nos fluidos liberados dos tecidos durante o armazenamento refrigerado e o descongelamento podem ter contribuído para esta redução. Interações do sanitizante com estruturas da matriz também podem ter sido responsáveis pelos fatos observados. Apesar da estabilidade do DGCH relatada na literatura, não pode ser totalmente descartada a degradação.

Foram detectadas pequenas quantidades de CA nas amostras tratadas com DGCH não submetidas a processamento térmico, possivelmente oriundas da solução utilizada para fazer o tratamento. O aumento da quantidade de CA nos tecidos submetidos ao processamento térmico não foi devida exclusivamente à concentração dos níveis iniciais presentes nas amostras cruas. Os resíduos de DGCH na pele tratada deram origem à CA durante o processamento térmico. A fritura em óleo foi o processo que levou à formação das maiores quantidades de CA, seguido pela cocção em forno convencional.

Os resultados apresentados podem ser úteis na avaliação dos riscos associados ao uso do DGCH como sanitizante em carcaças de frango.

ANEXO 1

REFERENTE AO CAPÍTULO 2

1. Curva padrão do digluconato de clorhexidina por CLAE -UV

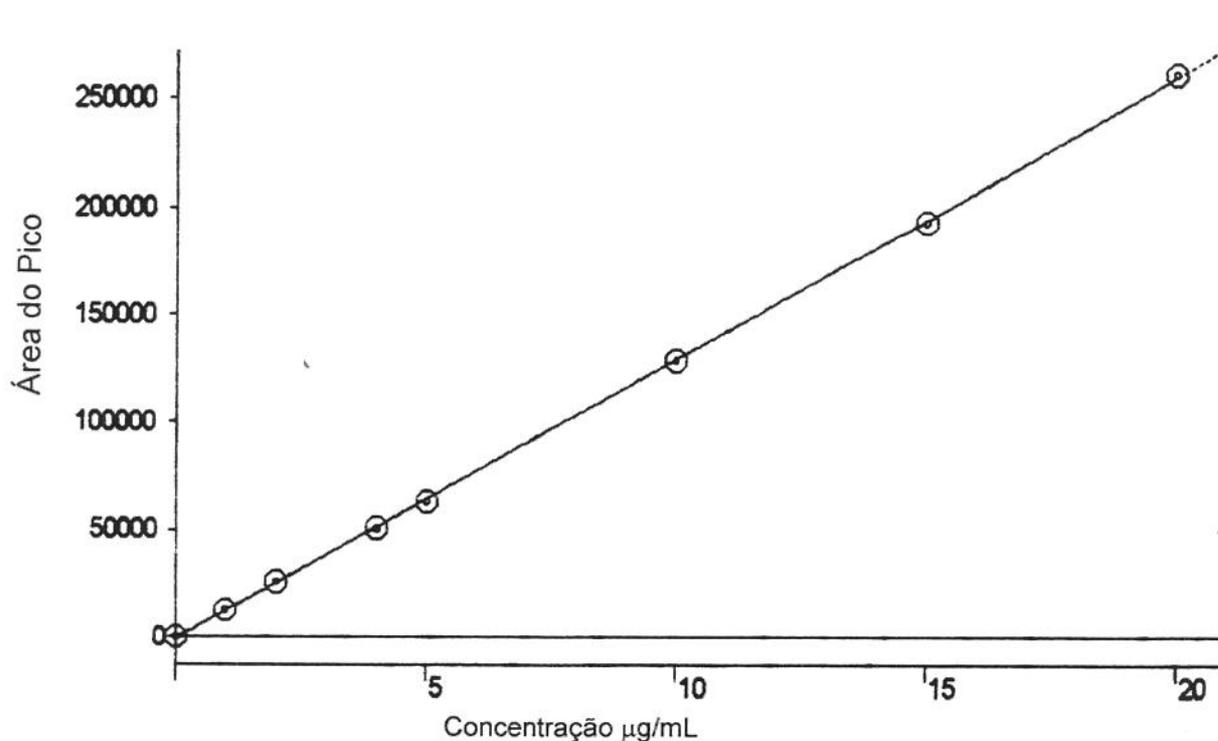


Figura 1 – Curva padrão do digluconato de clorhexidina. Diluições em fase móvel. Condições cromatográficas: coluna C₁₈ silanizada (250 mm x 4,6mm di) fluxo 1,0 mL/min, fase móvel: acetonitrila - tampão fosfato (0,1 M Na₂HPO₄-0,005M-heptanossulfonato de sódio-0,05M-trietilamina- pH 2,5 corrigido com ácido fosfórico), na proporção 67:33.

ANEXO 2
REFERENTE AO CAPÍTULO 3

1. Robustez do método

O comportamento do método frente a pequenas modificações nas condições de trabalho foi testado, de acordo com o procedimento descrito por Youden (1955). Em oito análises efetuadas, sete variáveis foram combinadas em grupos de quatro. A contribuição individual de cada fator foi isolada fazendo-se a subtração do valor médio obtido nas análises que incluíam uma determinada modificação, dos valores médios das análises onde não foi feita a modificação daquele mesmo fator. Os fatores básicos e alternativos são descritos na Tabela 1. As amostras fortificadas com 200 ng/g de 4-cloroanilina foram analisadas pelo método desenvolvido, seguido em sua íntegra ou com as modificações dos fatores escolhidos. Os resultados das análises estão resumidos na Tabela 2. Na Tabela 3 pode ser constatado que a recuperação da 4-cloroanilina foi afetada, na respectiva ordem decrescente de importância, pelo pH do extrato aquoso, evaporação do diclorometano, número de partições com HCl 0,1N, volume da acetonitrila na eluição, lavagem do cartucho de C₁₈ com água, utilização de cartucho de C₁₈ novo e utilização do Na₂SO₄ na extração.

Tabela 1 – Variáveis avaliadas no teste de robustez do método

Variáveis estudadas	Fatores	
	Básico	Alternativo
Adição de Na ₂ SO ₄ na extração	20g	0g
B- Número de partições com 15 mL de HCl 0,1 N	3	2
Evaporação do diclorometano	Total	Parcial (até ~5 mL)
D- pH do extrato aquoso percolado pelo cartucho C ₁₈	10	7
E- Lavagem do cartucho C ₁₈ com 20 mL de água após percolada a amostra.	Sim	Não
F- Volume de acetonitrila utilizado para eluição da 4-cloroanilina	5 mL	4 mL
G- Cartucho de C ₁₈	Novo	Recondicionado

Tabela 2 – Análise de 4-cloroanilina em pele fortificada com 200 ng/g – combinação dos fatores alternativos.

Combinação dos fatores	4-cloroanilina (ng/g)
Básico	196,1
A B C F	243,4
A C D G	212,8
A D F G	190,4
A E C G	147,8
B C E F	227,5
B D E F	221,6
B D E G	150,8

Tabela 3 – Influência individual dos fatores calculada pela diferença entre a somatória dos resultados obtidos em análises com o fator alternativo e nas análises em que este não foi utilizado.

Fator alternativo	Diferença calculada
A	6,13
B	-20,37
C	22,09
D	-35,40
E	-14,34
F	-20,20
G	-14,12

2. Curva padrão da 4-cloroanilina por CG-EM em modo SIM

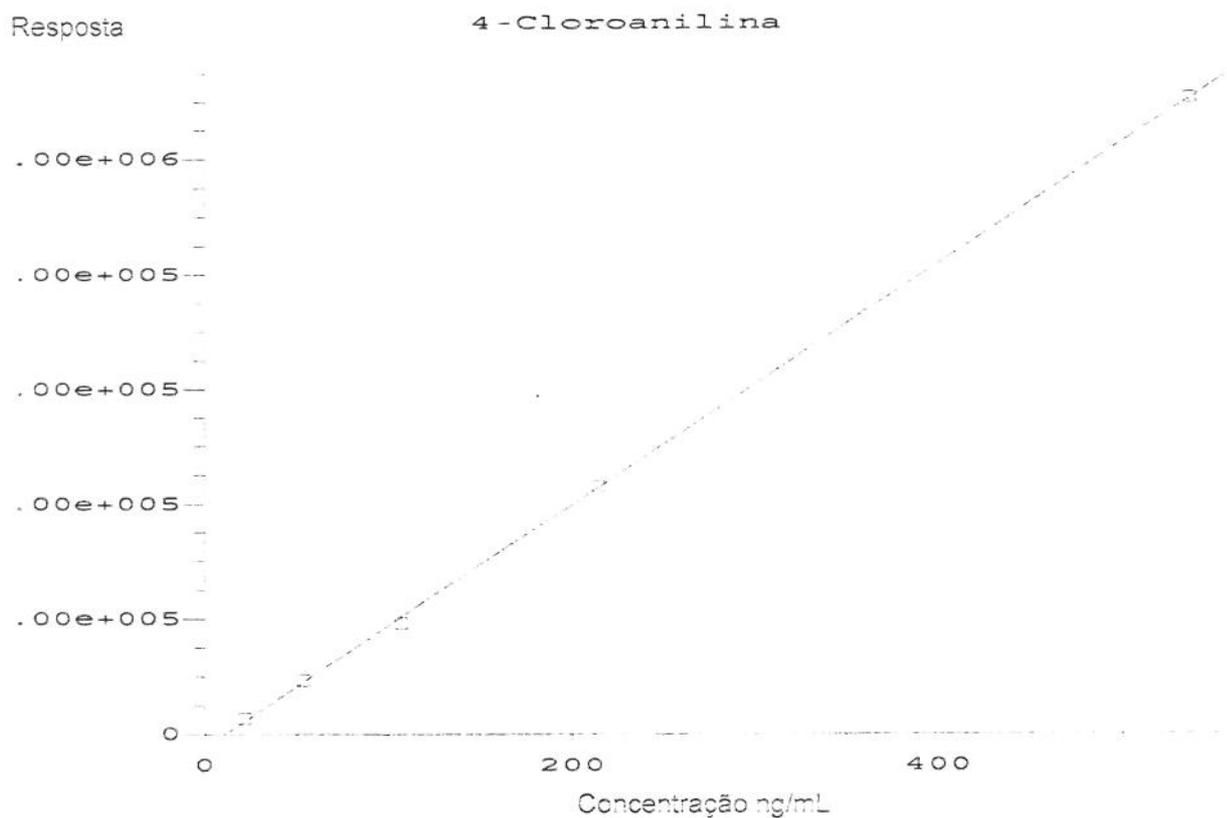


Figura 1 – Curva padrão de 4-cloroanilina. Diluições em acetonitrila. Análises por CG-EM, coluna HP5-MS, 30m x 0,25 mm di e filme de 0,25 μ , gás de arraste He com fluxo constante de 1,0 mL/min, com programação de temperatura no injetor e no forno. Espectrômetro de massas operado em modo SIM – 70 eV, monitorando os íons m/z 127 e 129.