

DETERMINAÇÃO DE BIFENILOS POLICLORADOS EM MILHO ATRAVÉS DE EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA SEGUIDA DE CROMATOGRAFIA A GÁS ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS

Thiago Guilherme Schwanz e Susana Mohr

Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima, 1000, Prédio 42, 97119-900 Santa Maria – RS, Brasil

Liliane Medianeira Favero Porte, Nilo Zanatta, Helio Gauze Bonacorso e Marcos Antônio Pinto Martins

Departamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima, 1000, Prédio 15A, 97105-900 Santa Maria – RS, Brasil

Ijoni Hilda Costabeber*

Departamento de Morfologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima, 1000, Prédio 19, 97105-900 Santa Maria – RS, Brasil

Recebido em 28/6/11; aceito em 21/9/11; publicado na web em 6/12/11

DETERMINATION OF POLYCHLORINATED BIPHENYLS IN CORN BY SOLID PHASE EXTRACTION FOLLOWED BY GAS CHROMATOGRAPHY-MASS SPECTROMETRY. This paper describes an analytical method for analyzing polychlorinated biphenyls in corn samples using solid phase extraction (SPE) followed by determination by GC-MS. All calibration curves proved linear ($r > 0.99$). Recoveries ranged between 74.1 and 110.6% with relative standard deviation lower than 20% for all compounds. The limits of quantitation for the method were between 0.025 and 0.1 ng g⁻¹. Of the 51 samples analyzed, PCB 180 showed the highest frequency, being detected in more than 39%, followed by PCB 138, detected in more than 33% of samples.

Keywords: PCB; corn; GC/MS.

INTRODUÇÃO

Os bifenilos policlorados (PCBs) são compostos organoclorados sintéticos, pertencentes à classe dos poluentes orgânicos persistentes (POPs). Estes foram amplamente utilizados na indústria a partir de 1930 devido à sua resistência a ácidos, altas temperaturas e correntes elétricas, além de serem substâncias não inflamáveis.^{1,2} Sua utilização em diversos processos industriais originou uma ampla contaminação do meio ambiente e, conseqüentemente, de todos os alimentos que fazem parte da cadeia alimentar. Devido ao fato destes compostos possuírem grande afinidade pela matéria orgânica do solo, os PCBs são adsorvidos facilmente pela superfície de partículas, o que faz com que sejam levados até rios, mares e oceanos, contaminando animais, vegetais e seres humanos.^{3,4} O transporte atmosférico caracteriza-se no principal mecanismo para dispersão global desses compostos, influenciando o ecossistema de uma maneira preocupante e permanente.^{5,6} As proporções da dispersão e da transferência destes compostos para os animais, vegetais e seres humanos são difíceis de serem estimadas.

Diversos estudos demonstram que os PCBs podem causar danos à saúde dos seres humanos e animais, além do grande impacto ao ambiente. Em consequência disso, seu uso e produção foi severamente restrito ou banido em muitos países. No Japão, a sua produção e uso foram proibidos em 1972. No mesmo ano, a Suécia restringiu a sua utilização e produção, os Estados Unidos o fizeram em 1977, a Noruega em 1980, a Finlândia em 1985 e a Dinamarca em 1986.¹ Em nosso país, sua proibição ocorreu em 1981, embora ainda seja permitido o seu uso em equipamentos eletroeletrônicos antigos, até sua substituição por produto isento de PCBs. Seu descarte e destinação correta, porém, ainda tem sido o maior problema nos últimos anos. Como consequência disso, casos de armazenamento incorreto têm sido noticiados pelos meios de comunicação. Recentemente, em vistoria de rotina realizada pelo IBAMA nas dependências do porto de

Rio Grande/RS, foram encontradas, dentro de um armazém, 21 toneladas do óleo Ascarel® (denominação comercial no Brasil) em tonéis e transformadores desativados. Além dos grandes riscos à saúde, os impactos ambientais que o óleo pode causar são a contaminação do solo e da água, os quais ameaçam, em especial, os lençóis freáticos.⁷ Sendo assim, os seres vivos em geral encontram-se expostos aos PCBs tanto diretamente, através da contaminação do ar, sedimentos e água, como indiretamente, através da dieta.

A maior concentração de PCBs, por serem compostos altamente lipofílicos e apolares, é encontrada em alimentos gordurosos. Concentrações menores podem estar presentes em verduras, cereais e frutas.^{8,9} Entretanto, as plantas são o primeiro elo na cadeia alimentar e, portanto, o acúmulo desses compostos pelos vegetais é uma etapa importante para a transferência dos mesmos ao corpo humano.¹⁰ Neste contexto, encontra-se o milho, cereal mais consumido no mundo, e o segundo mais produzido no Brasil. Do total produzido, cerca de 70% são destinados à alimentação animal, utilizados principalmente para a fabricação de ração e 15% para a alimentação humana. É comumente consumido como milho verde *in natura*, produto farináceo e que constitui ingrediente básico de uma série de produtos industrializados formulados.¹¹ A farinha de milho é muito utilizada na culinária brasileira em várias formas, sendo seu sabor bem aceito pelos consumidores. É um produto de baixo custo e amplamente disponível no mercado.¹² Por ser um dos cereais de maior importância econômica no mundo, o milho é uma das espécies vegetais mais estudadas. Constantemente, programas de melhoramento estão buscando novos procedimentos para a obtenção de variedades mais produtivas e economicamente rentáveis. Além disso, têm sido realizados muitos esforços para se entender sua origem e evolução. No entanto, o mesmo não se pode dizer em relação a estudos de contaminação. Apesar do uso intensivo de pesticidas no Brasil, há poucos trabalhos publicados na literatura sobre a ocorrência de poluentes orgânicos persistentes em plantas,¹³ tais como o milho. A bioacumulação dos compostos lipofílicos é outro fator de elevada relevância para a pesquisa. Por estas razões,

*e-mail: ijonicostabeber@gmail.com

o desenvolvimento de métodos analíticos confiáveis para análise de PCBs em milho é necessário.

A determinação dos PCBs normalmente é realizada empregando-se cromatografia a gás acoplada aos detectores de captura de elétrons, espectrometria de massas, ou ambos. A espectrometria de massas com impacto de elétrons (EI = *Electron Impact*) tem sido utilizada em estudos recentes, tanto para identificar os compostos individuais, como para sua quantificação. Já a espectrometria de massas com ionização química negativa (NCI = *Negative Chemical Ionization*) tem sua utilização justificada por apresentar elevada sensibilidade, quando comparada ao modo EI, para a análise de compostos que apresentam grupos capturadores de elétrons. Outros fatores importantes levados em consideração na escolha do método analítico são os baixos níveis de detecção exigidos e a natureza complexa das matrizes em que os compostos estão presentes, o que exige uma preparação eficiente da amostra, assim como a detecção e identificação, em nível de traços.¹⁴

A crescente preocupação sobre a segurança alimentar exige procedimentos mais rápidos, exatos, precisos e baratos. Para isso, a validação do método analítico é de extrema importância para garantir que gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra,¹⁵ oferecendo às agências reguladoras evidências objetivas de que os métodos e sistemas são adequados para o uso proposto.¹⁶ Os parâmetros a serem validados variam em função do tipo de procedimento, de acordo com as características a serem estudadas e o método a aplicar. Os conceitos mais importantes para validação do método analítico, em geral, são linearidade, sensibilidade, precisão, exatidão, recuperação, repetibilidade, reprodutibilidade, especificidade, limite de detecção e limite de quantificação.¹⁷

O objetivo do presente estudo foi validar um método de extração, envolvendo a utilização de ultrassom e a extração em fase sólida (EFS), seguida de cromatografia a gás (CG) acoplada à espectrometria de massas (EM) nos modos EI e NCI, para determinar a concentração de PCBs indicadores de contaminação ambiental em amostras de milho coletadas no estado do Rio Grande do Sul, Brasil.

PARTE EXPERIMENTAL

Materiais

Amostras

Foram utilizadas 51 amostras de milho em grão, coletadas em diferentes cidades do Rio Grande do Sul entre janeiro de 2009 e setembro de 2010. Todas as amostras foram trituradas com auxílio de moinho A11 Basic IKA e ultra-turrax T15 Basic IKA e, posteriormente, peneiradas em malha 60 mesh. Logo após, foram armazenadas e mantidas em freezer à temperatura de -18 °C, até a realização das análises. Para os estudos de validação do método analítico foram adquiridas, junto ao comércio local, amostras de milho para consumo humano.

Padrões

Uma solução estoque de PCBs, contendo 10 µg mL⁻¹, e uma solução de trabalho, contendo 1 µg mL⁻¹ dos congêneres 10 (2,6-diclorobifenil), 28 (2,4,4'-triclorobifenil), 52 (2,2',5,5'-tetraclorobifenil), 138 (2,2',3,4,4',5'-hexaclorobifenil), 153 (2,2',4,4',5,5'-hexaclorobifenil) e 180 (2,2',3,4,4',5,5'-heptaclorobifenil) foram utilizadas nas etapas de validação da metodologia e na identificação e quantificação dos compostos. Os padrões foram adquiridos de Supelco (Bellefonte, PA, USA) com certificado de pureza superior a 99%.

Reagentes

Os solventes e reagentes utilizados nas extrações e ensaios cromatográficos foram *n*-hexano Nanograde® com certificação para

análises de resíduos de pesticidas (Mallinckrodt Baker, Inc., NJ, USA), acetona grau resíduo, *iso*-octano grau resíduo e ácido clorídrico PA (Vetec Química Fina Ltda, Duque de Caxias, RJ, Brasil), além de cartuchos SPE contendo 1 g de Florisil (Agilent Technologies).

Métodos

Extração dos PCBs

As amostras foram pesadas (20,00 ± 0,05 g) utilizando um Erlenmeyer. Em seguida, foram adicionados os padrões dos PCBs 10, 28, 52, 138, 153 e 180. A extração dos PCBs foi resultante da adição de 50 mL de uma mistura *n*-hexano/acetona (1:1) e aplicação de banho de ultrassom, por 20 min. Logo após o extrato foi filtrado a vácuo, utilizando-se filtro GFA, e transferido para um tubo de ensaio. A amostra foi reduzida até um volume de 5 mL, utilizando-se aparelho N-EVAP™ (Organomation Associate, Inc., Berlin, MA, USA) com auxílio de gás nitrogênio. Este volume sofreu adição de 3 mL de uma solução de ácido clorídrico 1 M e foi agitado em vortex por 30 s. Da fase orgânica foram retirados 2 mL que, por sua vez, foram limpos através da eluição por cartucho SPE contendo Florisil pré-ativado com *n*-hexano. Após a eluição com mais 10 mL de *n*-hexano e adição de 1 mL de *iso*-octano, as amostras foram novamente levadas à evaporação com N₂ até atingirem aproximadamente 2 mL, transferidas para balão volumétrico de 2 mL e aferidas com *iso*-octano. Logo após, foram transferidas para vials e, então, submetidas à análise cromatográfica.

Análise cromatográfica

As análises foram efetuadas em um cromatógrafo a gás Agilent Technologies 6890N acoplado com espectrômetro de massas modelo 5975B inert XL CI/EI MSD. Um microlitro dos extratos foi injetado usando-se injetor automático *split/splitless* 7683 Agilent Technologies, no modo *splitless*. A temperatura do mesmo permaneceu constante a 280 °C. A separação dos PCBs foi realizada em uma coluna capilar de sílica fundida DB-5MS (J&W Scientific), com 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura de fase estacionária. Hélio foi utilizado como gás de arraste, sob pressão inicial de 10,39 psi. O fluxo, mantido constante, foi de 1,2 mL min⁻¹. A programação da temperatura do forno foi: 60 °C, permanecendo por 1 min, taxa de aquecimento a 15 °C min⁻¹ até 220 °C, seguida de taxa de 20 °C min⁻¹ até 300 °C, permanecendo por 4,33 min nesta temperatura. A temperatura da linha de transferência permaneceu a 310 °C. Para os PCBs 10, 28 e 52 os espectros e cromatogramas foram obtidos através de EI, com energia de 70 eV. As temperaturas da fonte e do quadrupolo foram de 230 e 150 °C, respectivamente. Para as análises dos congêneres 138, 152 e 180 utilizou-se o modo NCI. Como gás ionizante usou-se metano a um fluxo otimizado de 40%. Para a fonte de íons e o quadrupolo a temperatura foi de 150 °C. Ambos os métodos operaram em modo de monitoramento do íon selecionado (SIM = *Single Ion Monitoring*). A identificação e quantificação dos compostos foram realizadas pela comparação dos tempos de retenção dos picos encontrados nas amostras com os tempos de retenção individuais dos padrões de bifenilos policlorados em estudo, sob as mesmas condições de trabalho, bem como pela comparação da abundância dos íons majoritários de cada um dos seis congêneres, obtidos a partir dos padrões de referência, com os íons encontrados na amostra. Na Tabela 1S, material suplementar, encontram-se os parâmetros dos PCBs analisados por CG/EM no modo de aquisição SIM (massa molar, modos de ionização, tempos de retenção, íons monitorados, tempo de janela e *dwel time*).

Validação do método analítico

Com o objetivo de confirmar a validade dos métodos de extração e das análises dos PCBs nas amostras, foram avaliados os seguintes

parâmetros: seletividade, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão e exatidão.

Para o estudo de seletividade foram comparadas amostras testemunhas, que corresponderam à matriz analisada, porém sem a contaminação dos analitos em questão, e amostras fortificadas com os padrões dos PCBs. A faixa linear foi obtida através da preparação de uma série de 12 brancos das amostras com adição de uma concentração variada dos bifenilos analisados. Avaliou-se uma curva preparada com extratos de milho e a solução de trabalho dos PCBs. As concentrações utilizadas foram 0,025; 0,05; 0,1; 0,2; 0,5; 1,0; 2,0; 5,0; 10,0; 20,0; 50,0 e 100,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ sendo injetados em triplicata a concentração de cada ponto da curva. Para obter os dados da faixa de trabalho foi preparada uma curva analítica com 9 brancos da amostra, usando a solução de trabalho contendo 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$, dentro da faixa linear. Considerou-se como faixa linear os pontos cujos valores da razão entre o sinal (S) e a concentração (Q) estão no intervalo de $100 \pm 5\%$, ou seja, pontos cujas razões sinal/concentração não diferem mais de 5% do coeficiente angular da reta (a). Para verificar se os pontos se encontravam dentro da região linear da curva, foi utilizado o teste da razão entre o sinal (S) e a concentração (Q),¹⁸ definida por:

$$(S_i/Q_i)\% = (S_i - b/Q_i) \times 100/a$$

onde b é a interseção da reta no eixo y quando x é igual a zero. Os valores de S e Q foram obtidos na construção da curva analítica, através dos parâmetros de área do pico e concentração do analito.¹⁹ Em seguida, construiu-se a representação gráfica das respostas relativas (área do sinal/concentração) pelo logaritmo da concentração, que foi examinada para a investigação de desvios da linearidade, sendo indicados como *outliers* (valores extremos) os pontos com variação acima de 20%.

O valor designado como limite de detecção (LD) para todos os PCBs foi determinado visualmente pela razão sinal/ruído ≥ 3 , a partir de ensaios com amostras brancas da matriz adicionadas em concentrações decrescentes a partir de 0,2 $\mu\text{g L}^{-1}$. Por sua vez, o limite de quantificação (LQ) foi obtido através da preparação de 7 brancos das amostras com adição de concentrações variadas dos PCBs próximas ao limite de detecção. Considerou-se o valor verdadeiro de LQ como sendo a menor concentração que, ao ser fortificada na matriz, apresentar recuperações entre 70 e 120%, com coeficiente de variação (CV) menor ou igual a 20%. O valor encontrado para o LQ de todos os PCBs foi incluído como o menor ponto da curva de calibração.

A precisão e a exatidão foram avaliadas através das injeções em triplicata de um total de 18 amostras fortificadas em três níveis conhecidos de concentrações para cada analito (*spikes*), os pontos extremos da curva e um ponto intermediário, e 6 amostras sem adição de padrão. Para este estudo, as extrações e análises foram realizadas em dois dias distintos, com intervalo de uma semana entre eles. A precisão foi avaliada utilizando-se a estimativa do CV para a repetibilidade (intradia) e precisão intermediária (interdia). A exatidão foi avaliada através dos estudos de recuperação, definido como:

$$\text{Recuperação (\%)} = (C_1 - C_2/C_3) \times 100$$

sendo C_1 a concentração do analito na amostra fortificada, C_2 a concentração do analito na amostra não fortificada e C_3 a concentração do analito adicionada à amostra fortificada.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Extração

A extração dos PCBs seguiu os procedimentos convencionais utilizados para analitos orgânicos em amostras de alimentos, começando

por uma etapa de homogeneização, seguida por extração líquida com uma ou várias etapas de limpeza e purificação do extrato, a fim de remover coextratores que possam interferir na análise final.²⁰ Durante o desenvolvimento do método, diferentes solventes foram testados para a extração dos compostos, buscando-se as melhores porcentagens de recuperação. A Tabela 2S, material suplementar, mostra a média das porcentagens de recuperação dos PCBs nestes testes, onde 9 brancos da amostra foram fortificados com 3 concentrações diferentes (10, 20 e 50 $\mu\text{g L}^{-1}$) e extraídos com 3 diferentes solventes ($n = 3 \times 3$) (*n*-hexano, *n*-hexano e acetona (1:1) e *n*-hexano e acetato de etila (1:1)). A escolha do solvente mais adequado foi baseada em três critérios: percentuais de recuperação, menor desvio padrão e menor interferência da matriz no sinal dos compostos visualizados no cromatograma. Os melhores resultados foram obtidos com a mistura *n*-hexano e acetona, com recuperações que variaram entre 87,26 e 95,35%.

Após a escolha do melhor solvente para a extração, foram avaliados diferentes tempos de sonicação da amostra, que variaram de 20 min a 1 h. A extração com uso de ultrassom é uma técnica que tem sido amplamente aplicada para a extração de pesticidas e PCBs em várias amostras ambientais.²¹ A principal razão para a aplicação da energia acústica é que ela aumenta a lavagem dos alimentos. O mecanismo predominante para esta lavagem é mecânico e inclui a abrasão das partículas alimentares suspensas no solvente, levando à remoção de contaminantes superficiais, assim como à melhora na lixiviação dos contaminantes do interior das partículas.²² Os resultados dos testes demonstraram que a variação do tempo não interfere na extração dos analitos. Tais resultados se encontram de acordo com os obtidos anteriormente por outros autores, que utilizaram métodos semelhantes ao do presente estudo.^{23,24}

Foram realizados testes para a limpeza da amostra utilizando diferentes solventes, eluídos em colunas de extração em fase sólida constituídas de Florisil. Para a análise de alimentos, existem no comércio diversos tipos de sorventes, porém, o material mais empregado é a sílica, por ser reativo o suficiente para permitir a modificação de sua superfície por meio de reações químicas, além de ser suficientemente estável para utilização em uma vasta gama de soluções.¹⁴ Com o auxílio de SPE, várias amostras podem ser tratadas, em paralelo, com quantidades relativamente pequenas de solvente. Permite ainda a remoção simultânea de substâncias interferentes e a concentração dos analitos. Para este estudo foram utilizadas 12 amostras brancas, fortificadas com 3 diferentes concentrações (10, 20 e 50 $\mu\text{g L}^{-1}$) dos PCBs de interesse ($n = 3 \times 4$). Estas amostras foram divididas em 4 grupos, e os resultados encontram-se na Tabela 3S, material suplementar. Conforme podemos observar, as eluições com *n*-hexano (Testes C e D) demonstraram ser mais eficientes, levando em consideração os critérios acima citados. A quantidade de *n*-hexano utilizada nestes testes não interferiu na porcentagem de recuperação, sendo o volume de 10 mL escolhido para o método proposto.

Validação do método

Seletividade

O método proposto apresentou boa seletividade. A Figura 1S, material suplementar, apresenta cromatogramas de amostras testemunha (amostras correspondentes à matriz analisada, isentas de contaminação pelos analitos em estudo), sobrepostos com os cromatogramas dos brancos das amostras fortificadas com os PCBs. Pode-se observar que não existem picos cromatográficos nas amostras testemunha no mesmo tempo de retenção dos cromatogramas das amostras contendo os bifenilos policlorados.

Linearidade, limites de detecção e de quantificação

A linearidade foi determinada através de curvas analíticas, e os

Tabela 1. Resultados obtidos nas provas de linearidade

PCB	Faixa de trabalho ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Coefficiente de correlação (r)	Equação da curva
PCB 10	0,099 – 2,475	0,996	$y = 63388,8x - 16,959$
	2,475 – 49,50	0,999	$y = 5601,2x + 2291,1$
PCB 28	0,100 – 2,498	0,999	$y = 4504,6x + 243,27$
	2,498 – 49,95	0,999	$y = 3984,6x + 1613,2$
PCB 52	0,099 – 2,475	0,997	$y = 3153x + 300,7$
	2,475 – 49,500	0,999	$y = 3182,5x + 341,04$
PCB 153	0,100 – 2,498	0,998	$y = 62286x - 1295$
	2,498 – 49,950	0,997	$y = 54011x + 57897$
PCB 138	0,099 – 2,475	0,999	$y = 38292x + 738,16$
	2,475 – 49,500	0,999	$y = 30762x + 39308$
PCB 180	0,099 – 2,478	0,999	$y = 104091x + 3111,6$
	2,478 – 49,550	0,994	$y = 80569x + 131533$

resultados encontram-se na Tabela 1. Primeiramente, foi determinada a faixa linear, definida como sendo a faixa de concentração na qual a sensibilidade pode ser considerada constante.²⁵ Para os estudos de linearidade propostos a curva não se comportou de forma linear por toda a sua extensão, apesar de apresentar um coeficiente de correlação maior que 0,99. Os valores de S/Q% apresentaram variação maior que 5% do coeficiente angular da reta. Devido a esse fato, foram escolhidas duas faixas de trabalho, uma de 0,10 a 2,5 e outra de 2,5 a 50,0 $\mu\text{g L}^{-1}$. As duas curvas analíticas separadas apresentaram valores de S/Q% satisfatórios. Os estudos de linearidade do método analítico também foram realizados mediante o coeficiente de correlação das retas obtidas. O coeficiente de correlação informa o grau de relação entre as variáveis, de como as trocas de uma produzem efeitos diretos sobre a outra.²⁶ Neste caso, uma das variáveis é a concentração de cada um dos compostos e a outra, a resposta instrumental, em forma de área do sinal cromatográfico. Para todos os compostos, os coeficientes de correlação foram superiores a 0,99, dentro dos padrões recomendados pela ANVISA²⁷ e INMETRO.²⁵

Os limites de detecção (LD) do método validado foram de 0,02 ng g^{-1} para o PCB 10, de 0,01 ng g^{-1} para os PCBs 28 e 52 e de 0,005 ng g^{-1} para os PCBs 138, 153 e 180. Já os limites de quantificação (LQ) foram de 0,10 ng g^{-1} para o PCB 10, de 0,05 ng g^{-1} para os PCBs 28 e 52, e de 0,025 ng g^{-1} para os PCBs 138, 153 e 180.

Precisão e exatidão

A precisão do método analítico foi medida pelo grau de concordância entre os resultados obtidos de uma mesma amostra,¹⁷ utilizando-se o coeficiente de variação (CV). Para o presente estudo avaliou-se a precisão em condições de repetibilidade (intradia) e de precisão intermediária (interdia). Os resultados para os valores de coeficiente de variação ficaram entre 0,51 e 17,02% para a repetibilidade, enquanto para a precisão intermediária os valores variaram de 2,14 a 19,28%. Os resultados obtidos são aceitáveis, pois para métodos de análise de traços, como é o caso da análise de resíduos de PCBs, são aceitos coeficientes de variação de até 20%, dependendo da complexidade da amostra.¹⁵

Para a exatidão do método analítico foi calculada a porcentagem de recuperação, que reflete a quantidade de determinado analito que foi recuperada no processo, em relação à quantidade real presente na amostra. Três níveis de fortificação foram usados. No método proposto, as recuperações variaram entre 74,1 e 110,6% (Tabela 2), valores dentro dos intervalos aceitáveis de recuperação para análise de resíduos,¹⁵ que estão entre 70 e 120%.

Tabela 2. Resultados obtidos para as provas de recuperação ($n = 18$)

Composto	Níveis de fortificação ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recuperação (%)	CV (%)
PCB 10	0,990	74,10	8,68
	9,900	81,84	2,61
	49,500	82,63	2,63
PCB 28	0,999	97,07	17,02
	9,990	78,96	2,40
	49,950	80,51	2,14
PCB 52	0,990	110,60	19,28
	9,900	109,10	2,19
	49,500	106,06	3,35
PCB 138	0,999	89,65	11,84
	9,990	81,46	3,51
	49,950	93,76	11,83
PCB 153	0,990	90,07	2,67
	9,900	84,34	1,69
	49,500	97,60	4,27
PCB 180	0,991	89,60	4,85
	9,910	81,28	4,75
	49,550	91,39	2,83

CV: Coeficiente de variação.

Determinação de PCBs nas amostras de milho

Após a validação do método, o mesmo foi aplicado para analisar os congêneres de PCBs em 51 amostras de milho, obtidas de diferentes cidades do estado do Rio Grande do Sul, Brasil. As Figuras 1 e 2 apresentam cromatogramas de CG/EM nos modos EI e NCI, respectivamente, de uma amostra de milho contaminada.

Na Tabela 3 apresentam-se os resultados obtidos. O PCB 180 foi o que obteve a maior frequência dentre os compostos analisados, sendo detectado acima do LQ em mais de 39% das amostras, seguido do PCB 138, detectado em mais de 33%. Os PCBs 153 e 52 vieram logo a seguir, presentes em mais de 31 e 21% das amostras, respectivamente. Já os PCBs 28 e 10 foram os menos detectados, com frequências de 13,72% (PCB 28) e de 1,96% (PCB 10). As

Tabela 3. Frequência de determinação e concentrações dos PCBs em ng mL⁻¹ (média ± desvio-padrão, mediana, mínimo e máximo) em milho (*n* = 51)

PCB	<i>n</i> > LQ (%)	Média ± DP	Mediana	Mínimo	Máximo
PCB 10	1 (1,96)	0,00 ± 0,02	0,00	0,00	0,16
PCB 28	7 (13,72)	0,03 ± 0,07	0,00	0,00	0,30
PCB 52	11 (21,56)	0,05 ± 0,11	0,00	0,00	0,53
PCB 153	16 (31,37)	0,07 ± 0,13	0,00	0,00	0,62
PCB 138	17 (33,33)	0,13 ± 0,38	0,00	0,00	2,54
PCB 180	20 (39,21)	0,11 ± 0,24	0,00	0,00	1,37

n: Número de amostras. DP: Desvio-padrão. Valores abaixo do LD foram considerados como zero e valores entre o LD e LQ foram considerados como LOQ/2 para o cálculo da média e mediana. LD: 0,02 ng g⁻¹ (PCB 10), 0,01 ng g⁻¹ (PCBs 28 e 52), 0,005 ng g⁻¹ (PCBs 138, 153 e 180). LQ: 0,1 ng g⁻¹ (PCB 10), 0,05 ng g⁻¹ (PCBs 28 e 52), 0,025 ng g⁻¹ (PCBs 138, 153 e 180).

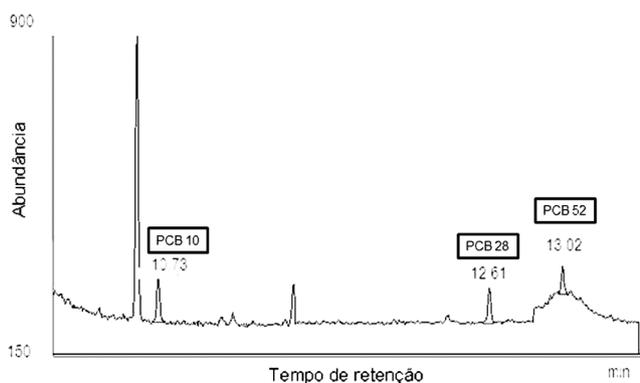


Figura 1. Cromatograma (CG/EM no modo EI) de uma amostra de milho contaminada, onde: $t_R = 10,73$ min: PCB 10, $t_R = 12,61$ min: PCB 28, $t_R = 13,02$ min: PCB 52

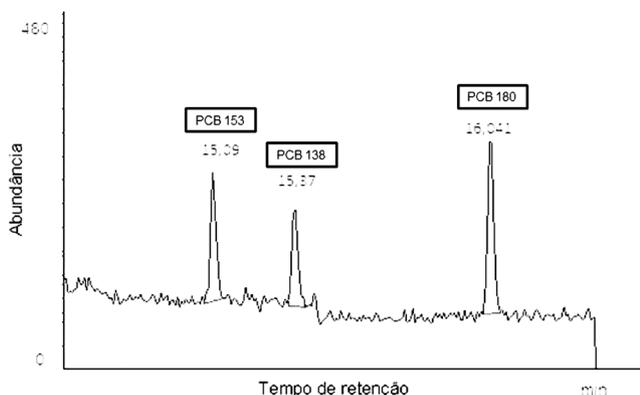


Figura 2. Cromatograma (CG/EM no modo NCI) de uma amostra de milho contaminada, onde: $t_R = 15,09$ min: PCB 153, $t_R = 15,37$ min: PCB 138, $t_R = 16,04$ min: PCB 180

médias tiveram comportamentos semelhantes aos das frequências, apresentando-se como segue: PCB 138 > PCB 180 > PCB 153 > PCB 52 > PCB 28 > PCB 10.

A legislação brasileira determina limites máximos de resíduos somente para alimentos de origem animal, mais especificamente para carne, leite e pescados (Brasil, 2010).²⁸ Para alimentos de origem vegetal, como é o caso do milho, não há limites estabelecidos.

Dentre a bibliografia consultada, não foram encontrados estudos que reportassem diretamente a contaminação de milho por PCBs. Porém, estudos investigando a contaminação de alimentos de origem animal provenientes do mesmo Estado foram realizados anteriormente, constatando a presença de PCBs em leite, queijo e produtos cárneos.²⁹⁻³¹ Embora os valores encontrados nestes estudos tenham

se apresentado abaixo do limite máximo permitido pela legislação, a contaminação nos alimentos desta região é evidente. Em outro estudo recente, realizado com amostras de soro de cordão umbilical de bebês nascidos do estado do Rio Grande do Sul, uma elevada contaminação foi detectada,³² confirmando que ainda existem fontes importantes de contaminação na região estudada.

CONCLUSÕES

O método de extração envolvendo a utilização de ultrassom e a extração em fase sólida, seguida de cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas nos modos EI e NCI foi validado, demonstrando ser sensível, linear, preciso e exato, podendo ser utilizado em análises de rotina. Adicionalmente, a determinação dos PCBs em amostras reais de milho demonstrou a conformidade do método proposto. Os níveis de PCBs detectados nas 51 amostras analisadas demonstraram a presença de contaminação em alimentos de origem vegetal do estado do Rio Grande do Sul, a exemplo do que já foi demonstrado em estudos anteriores em alimentos de origem animal do mesmo estado. Como este é o primeiro estudo realizado envolvendo a contaminação de milho por PCBs, novos estudos são necessários para que se possam determinar as causas desta contaminação, bem como estabelecer parâmetros para a elaboração de uma legislação que estabeleça limites máximos de resíduos para alimentos de origem vegetal.

MATERIAL SUPLEMENTAR

As Tabelas 1S, 2S e 3S, bem como a Figura 1S, estão disponíveis gratuitamente em <http://quimicanova.sbgq.org.br>, na forma de arquivo PDF.

AGRADECIMENTOS

Ao NAPO (Núcleo de Análises e Pesquisas Orgânicas) pelo apoio e cedência de suas instalações para a realização das análises. S. Mohr agradece à CAPES, pela bolsa de doutorado. N. Zanatta, H. Bonacorso, M. Martins e I. Costabeber agradecem ao CNPq, pelas bolsas de produtividade em pesquisa (PQ). L. Porte agradece à CAPES, pela bolsa de pós-doutorado. Os autores agradecem também à EMATER/RS-ASCAR, escritório regional de Santa Maria, através do Engenheiro Agrônomo L. A. R. Barcellos, pela coleta das amostras para a realização desta pesquisa.

REFERÊNCIAS

1. <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc140.htm>, acessada em Abril 2011.

2. Omaye, S. T.; *Food and Nutritional Toxicology*, CRC Press: Boca Ranton, 2004.
3. Colborn, T.; Meyers, J. P.; Dumanoski, D.; *Nuestro Futuro Robado*, Ecoespaña Editorial: Madrid, 1997.
4. Costabeber, I.; Emanuelli, T.; *Bol. SBCTA* **2003**, 37, 1.
5. Lang, V.; *J. Chromatogr. A* **1992**, 595, 1.
6. Tanabe, S.; Kannan, N.; Subramanian, A.; Watanabe, S.; Mitsuhiro, O.; Tatsukawa, R.; *Chemosphere* **1987**, 16, 1965.
7. <http://www.ecodebate.com.br/2010/04/19>, acessada em Abril 2011.
8. Ahmed, F. E.; *Environ. Contam. Food* **1999**, 13, 500.
9. Wells, D. E.; Boer J.; *Environ. Contam. Food* **1999**, 9, 305.
10. Zhang, H.; Chen, J.; Ni, Y.; Zhang, Q.; Zhao, L.; *Chemosphere* **2009**, 76, 740.
11. Alessi, M. O.; Raupp, D. S.; Gardingo, J. R.; *Ciências Exatas da Terra, Ciências Agrárias e Engenharias* **2003**, 9, 31.
12. Alvim, I. D.; Sgarbiere, V. C.; Chang, Y. K.; *Ciênc. Tecnol. Aliment.* **2002**, 22, 170.
13. Felix, F. F.; Navickiene, S.; Dórea, H. S.; *Revista da Fapese* **2007**, 2, 39.
14. Beyer, A.; Biaziuk, M.; *Food Chem.* **2008**, 108, 669.
15. Ribani, M.; Bottoli, C. B. G.; Collins, C. H.; Jardim, I. C. S. F.; Melo, L. F. C.; *Quim. Nova* **2004**, 27, 771.
16. Freire, M. T.; Bottoli, C. B. G.; Fabris, S.; Reyes, F. G. R.; *Quim. Nova* **2008**, 6, 1522.
17. Lanças, F. M.; *Validação de métodos cromatográficos de análise*, Rima: São Carlos, 2004.
18. Prestes, O. D.; Presta, M. A.; Kolberg, D. I. S.; Zanella, R.; Rossato, S. B.; Penna, N. G.; Hecktheuer, L. H. R.; *Quim. Nova* **2007**, 30, 18.
19. Chasin, A. A. M.; Nascimento, E. S.; Ribeiro Neto, L. M.; Siqueira, M. E. P. B.; Andraus, M. H.; Salvatori, M. C.; Fernícola, N. A. G.; Gorni, R.; Salcedo, S.; *Rev. Bras. Toxicologia* **1998**, 11, 1.
20. Carabias, R. M.; Rodriguez, E. G.; Paniagua, P. H. M.; Hernandez, J. M.; *J. Chromatogr. A* **2000**, 869, 427.
21. Ahmed, F. E.; *Trends Anal. Chem.* **2003**, 22, 170.
22. Mason, T.; Collings, A.; Sumel, A.; *Ultrason. Sonochem.* **2004**, 11, 205.
23. Simonelli, A.; Basilicata, P.; Miraglia, N.; Castiglia, L.; Guadagni, R.; Acampora, A.; Sannolo, N.; *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2007**, 860, 26.
24. Rocco, G.; Toledo, C.; Ahumada, I.; Sepúlveda, B.; Cañete, A.; Richter, P.; *J. Chromatogr. A* **2008**, 1193, 32.
25. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO); *Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos*, DOQ-CGCRE-008, 2003.
26. Domenech, J. M.; Riba, M. D.; *Una síntesis de los métodos estadísticos bivariantes*, Editora Herder, Barcelona, 1989.
27. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA); *Resolução RE nº 899*, de 29/05/2003.
28. http://www.agricultura.gov.br/pls/portal/docs/PAGE/MAPA/LEGISLACAO/PUBLICA_COES_DOU/PUBLICACOES_DOU_2010/MAIO_2010/DO1_03-05_0.PDF, acessada em Abril 2011.
29. Heck, M. C.; Sifuentes dos Santos, J.; Bogusz Junior, S.; Costabeber, I.; Emanuelli, T.; *Food Chem.* **2007**, 102, 288.
30. Santos, J. S.; Xavier, A. A. O.; Ries, E. F.; Costabeber, I.; Emanuelli, T.; *Chemosphere* **2006**, 65, 1544.
31. Costabeber, I.; Santos, J. S.; Xavier, A. A. O.; Weber, J.; Leães, F. L.; Bogusz Junior, S.; Emanuelli, T.; *Food Chem. Toxicol.* **2006**, 44, 1.
32. Mohr, S.; Schwanz, T. G.; Wagner, R.; Soldatelli, L.; Costabeber, I.; *Quim. Nova* **2011**, 34, 444.

DETERMINAÇÃO DE BIFENILOS POLICLORADOS EM MILHO ATRAVÉS DE EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA SEGUIDA DE CROMATOGRAFIA A GÁS ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS

Thiago Guilherme Schwanz e Susana Mohr

Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima, 1000, Prédio 42, 97119-900 Santa Maria – RS, Brasil

Liliane Medianeira Favero Porte, Nilo Zanatta, Helio Gauze Bonacorso e Marcos Antônio Pinto Martins

Departamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima, 1000, Prédio 15A, 97105-900 Santa Maria – RS, Brasil

Ijoni Hilda Costabeber*

Departamento de Morfologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima, 1000, Prédio 19, 97105-900 Santa Maria – RS, Brasil

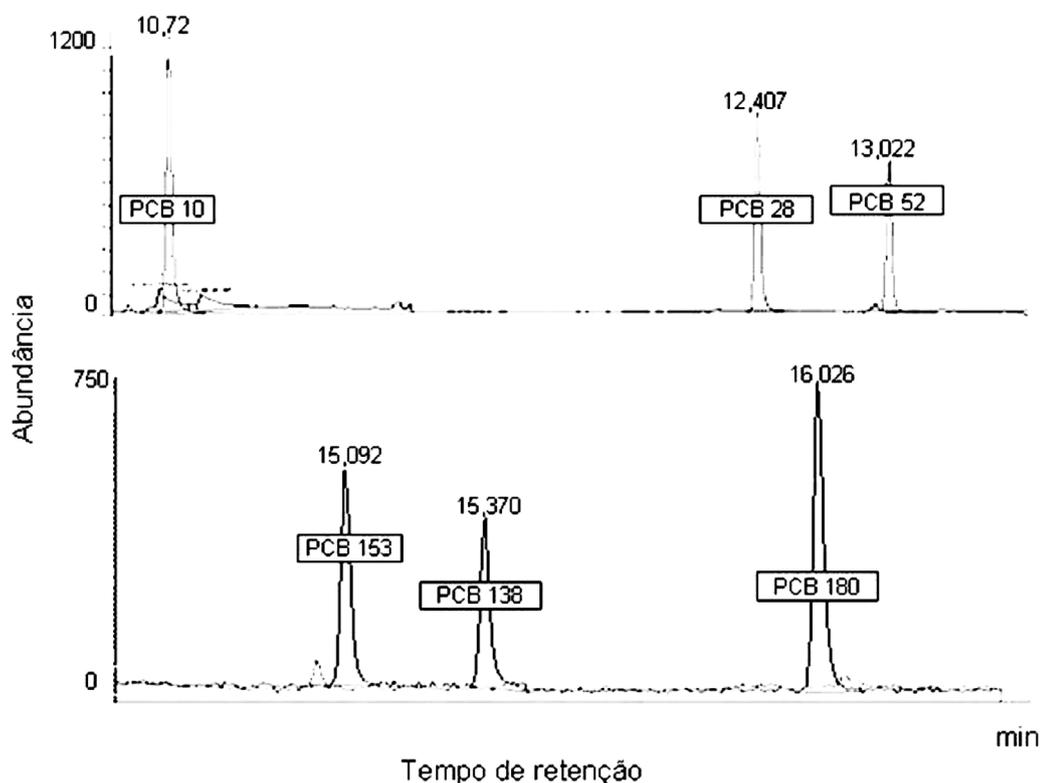


Figura 1S. Sobreposição dos cromatogramas de amostra testemunha e amostra fortificada com 1 ng g⁻¹ dos padrões de PCBs

Tabela 1S. Parâmetros dos PCBs analisados por CG/EM no modo de aquisição SIM (massa molar, modos de ionização, tempos de retenção, íons monitorados, tempo de janela e dwell time)

Composto	Massa molar	Modo de ionização	t _R (min)	Íon para quantificação (m/z)	Íons característicos ou diagnósticos (m/z)	Tempo de janela (min)	Dwell time
PCB 10	222		10,73	222	152,1; 224	10,0 – 11,5	100
PCB 28	256	EI	12,61	256	186; 258; 260	11,5 – 12,9	100
PCB 52	290		13,02	291,9	220; 222; 289,9	12,9 – 13,5	100
PCB 153	358		15,05	359,8	357,8; 361,8; 363,8	14,5 – 15,2	100
PCB 138	358	CI	15,33	359,8	357,8; 361,8; 363,8	15,2 – 15,5	100
PCB 180	392		15,99	393,8	359,8; 361,8; 395,8	15,5 – 16,5	100

t_R: tempo de retenção.

*e-mail: ijonicostabeber@gmail.com

Tabela 2S. Porcentagens de recuperação dos PCBs extraídos em testes com diferentes solventes

PCBs	Recuperação (%) \pm DP		
	<i>n</i> -Hexano	<i>n</i> -Hexano + Acetona (1:1)	<i>n</i> -Hexano + Acetato de Etila (1:1)
PCB 10	84,69 \pm 4,19	90,03 \pm 2,66	73,75 \pm 3,99
PCB 28	81,50 \pm 3,17	90,71 \pm 1,14	74,72 \pm 4,98
PCB 52	80,48 \pm 2,90	93,43 \pm 2,92	74,92 \pm 6,40
PCB 153	78,38 \pm 1,55	87,26 \pm 7,03	66,68 \pm 2,32
PCB 138	82,47 \pm 3,20	95,35 \pm 0,91	64,92 \pm 3,46
PCB 180	83,33 \pm 2,45	90,18 \pm 0,85	63,43 \pm 2,32

DP: desvio-padrão.

Tabela 3S. Porcentagens de recuperação dos PCBs após testes de eluição com diferentes solventes

PCBs	Recuperação (%) \pm DP			
	Teste A	Teste B	Teste C	Teste D
PCB 10	70,58 \pm 3,39	70,25 \pm 2,58	78,15 \pm 2,58	85,26 \pm 2,10
PCB 28	65,00 \pm 1,36	77,77 \pm 4,85	88,58 \pm 3,02	90,23 \pm 3,12
PCB 52	77,25 \pm 3,48	83,99 \pm 5,53	105,54 \pm 2,74	113,77 \pm 3,11
PCB 153	57,25 \pm 3,06	65,63 \pm 6,32	90,63 \pm 3,58	84,12 \pm 2,89
PCB 138	60,12 \pm 4,25	69,25 \pm 3,27	88,20 \pm 1,58	83,25 \pm 4,01
PCB 180	55,21 \pm 2,91	65,24 \pm 4,88	84,56 \pm 2,07	89,27 \pm 1,09

DP: desvio-padrão. Teste A: 5 mL (Éter Etfílico 6% em Éter de Petróleo) + 7 mL (Éter Etfílico 15% em Éter de Petróleo). Teste B: 10 mL (Éter Etfílico 50% em Éter de Petróleo). Teste C: 10 mL *n*-Hexano. Teste D: 15 mL *n*-Hexano.