

5 Experimental

5.1. Reagentes

Foram usados padrões analíticos para garantir a qualidade das análises, solventes, com finalidades de extrair os analitos das matrizes biológicas e diluir os padrões analíticos, e produtos químicos inorgânicos com funções de reagentes, anti-emulsionantes e adsorventes. Para cada caso adquiriram-se produtos com qualidades apropriadas, e, cada um recebeu, quando necessário, o tratamento adequado ao respectivo propósito.

5.1.1. Solventes

Todos os solventes foram previamente analisados em cromatógrafo com detector de captura de elétrons para teste de pureza. Foram usados os seguintes solventes:

n-hexano 95% para análise de resíduos orgânicos, J.T.Baker (9262-03) ou 95 % grau pesticida Tédia (HG-2820)

Acetona para análise de resíduos orgânicos, J.T.Baker (9254-03).

Isooctano (2,2,4-trimetilpentano) grau pesticida Tédia (TP-2173).

Álcool etílico (etanol absoluto) Reagem (10033).

5.1.2. Produtos químicos e adsorventes

Além de uma inspeção visual nenhuma análise química prévia específica foi realizada para os reagentes inorgânicos e adsorventes utilizados, porém, o teste em branco, realizado para o controle de qualidade analítico, demonstrou a ausência de

contaminantes interferentes nas análises. Foram usados os seguintes reagentes inorgânicos:

Hidróxido de potássio – KOH p.a. Reagem (10108).

Cloreto de sódio – NaCl p.a. ACS Merck (106404).

Alumina neutra – Al₂O₃, Aluminium Oxide 90 active, neutral (activity I) for column chromatography, tamanho de partícula 0,063 – 0,200 mm (70 – 230 mesh ASTM) Merck (1.01077.1000).

Ácido sulfúrico – H₂SO₄ p.a. Merck (112080).

5.1.3.

Padrões

O uso de padrões de qualidade confere aos resultados analíticos elevada confiabilidade metrológica, rastreabilidade e, principalmente, atendimento as normas de qualidade. Utilizaram-se os seguintes padrões de referência:

Padrão de referência certificado: Mistura de PBDEs, nove componentes, (Bromodiphenyl Ethers Lake Michigan Study), AccuStandard, BDE-LMS, contendo 10 µg/mL de cada um dos seguintes PBDEs dissolvidos em isooctano, utilizada no preparo de soluções padrão para construção das curvas analíticas e determinação dos tempos de retenção nas determinações de PBDEs por cromatografia com fase gasosa, bem como para confirmação dos modelos de fragmentação na análise por espectrometria de massas.

Solução do padrão individual de PCB-209 (2,2',3,3',4,4',5,5',6,6' decaclorobifenila), AccuStandard: C-209S, contendo 35 µg/mL em isooctano. Foi usada para o controle da qualidade das recuperações das extrações.

Solução do padrão individual de PCB-53 (2,2',5,6'- tetraclorobifenila), AccuStandard: C-053S, contendo 35 µg/mL em isooctano. Foi utilizada como padrão interno das análises cromatográficas de PBDEs.

Padrão de referência certificado: Mistura de PCBs, 24 componentes, (PCB Congener Mix for West Coast Fish Studies), AccuStandard, C-WCFS, contendo

25 µg/mL de cada um dos seguintes PCBs dissolvidos em isooctano utilizada nas determinações de PCBs para o preparo de soluções padrão, para construção das curvas analíticas, na determinação dos tempos de retenção nas análises por cromatografia com fase gasosa, e para confirmação dos modelos de fragmentação na análise por espectrometria de massas.

Padrão de referência certificado: Mistura de PCBs, 28 componentes, (WHO/NIST/NOAA Congener List), AccuStandard, C-WNN, contendo 10µg/mL de cada um dos seguintes PCBs dissolvidos em isooctano, também utilizada nas determinações de PCBs, no preparo de soluções padrão, para construção das curvas analíticas, na determinação dos tempos de retenção nas análises por cromatografia com fase gasosa, e para confirmação dos modelos de fragmentação na análise por espectrometria de massas:

A composição de cada solução dos Padrões de referência certificados, utilizados neste trabalho está apresentada no anexo três.

Material de Referência Certificado (Standad Reference Material) – SRM 2977, National Institute of Standards and Tecnology (NIST) – Tecido de Mexilhões. O padrão SRM 2977 foi desenvolvido para ser utilizado na avaliação de metodologias para determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), bifenilas policloradas (PCBs), pesticidas clorados, éteres difenílicos polibromados (PBDEs), metilmercúrio e constituintes inorgânicos em tecidos de moluscos bivalves e outras matrizes semelhantes (Wise, 2008). Neste trabalho o SRM 2977 foi empregado com a finalidade de avaliar a metodologia analítica desenvolvida para as determinações dos PBDEs e PCBs. O Certificado de Análise deste Material traz os valores de concentrações para 5 PBDEs e 19 PCBs (Wise, 2008) apresentados nas tabelas 8 e 9. A utilização de materiais de referência como forma de validação de medições em química analítica garante a qualidade e a rastreabilidade dos resultados analíticos, e permite a sua comparação com os dados obtidos por outros laboratórios.

5.2. Equipamentos

Liofilizador Edward Micro Modulyo CE96 F10503000

A liofilização é um processo de desidratação realizado em temperatura baixa e sob pressão reduzida que estende o período de conservação das amostras. Outros processos de desidratação envolvem a adição de reagentes, o que aumenta o risco de contaminação.

Homogeneizador Ultra Turrax[®] T18 Basic, com dispersor S18N-19G, fabricado pela Ika[®].

De Boer (2001) demonstrou que as várias alternativas para extração de PBDEs em matrizes biológicas fornecem resultados semelhantes. Escolheu-se fazer uso do homogeneizador Ultra Turrax[®] para a extração, pois, a trituração das fibras dos tecidos biológicos aumenta muito a eficiência do processo e torna, portanto, o tempo de extração muito menor. Esse procedimento extrai simultaneamente PBDEs e PCBs que possuem similaridades de estruturas químicas, portanto se comportam de modo semelhante frente aos diversos solventes e técnicas de extração.

Centrifuga Fanen Excelsa

A agitação vigorosa com o ácido sulfúrico na última etapa de limpeza do extrato orgânico produz uma emulsão que demora cerca de 48 horas para separação das fases. A centrifugação reduz o tempo de separação das fases para 2 horas.

Cromatógrafo a gás Perkin Elmer AutoSystem com detector de captura de elétrons (GC-ECD) e coluna capilar de fase estacionária 5% fenil, 95% metil siloxano (DB-5) da J&W Scientific (91 Blue Ravine Rd Folsom, CA 95630-4720, United States) com 50 metros de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura de filme.

Cromatógrafo a gás ligado ao espectrômetro de massas (GC-MS) 6890/5973N e com injetor automático 7683 da Agilent Technologies, com coluna capilar de fase estacionária 5% fenil 95% metil siloxano (HP-5MS) da J&W Scientific, 30 metros de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura de filme.

5.3. Materiais

Foram usados vidraria e materiais metálicos clássicos dos laboratórios de química que receberam o tratamento recomendado pela Agência de Proteção Ambiental Americana (EPA, 2003) conforme descrito a seguir.

Todo o material que teve contato direto com as amostras depois de lavados com detergente (Extran[®] 5%/24h.) foi descontaminado em mufla a 450°C por 24h. A vidraria teve ainda a superfície desativada por água ultrapura (MILLI Q[®]) e secada em estufa (75 – 85°C).

O material metálico e a vidraria volumétrica aferida foram descontaminados por etanol (grau comercial), lavados com detergente (Extran[®] 5%/24h.), enxaguados com água ultrapura (MILLI Q[®]) e secados em estufa (75 – 85°C).

5.4. Coleta, amostragem, tratamento e preservação das amostras

Os procedimentos de coleta, amostragem, tratamento e preservação das amostras estão de acordo com as recomendações da FAO (FAO/SIDA, 1983).

Com o objetivo de acompanhar a variação sazonal das concentrações dos analitos foram realizadas três campanhas de coleta, tanto para os mexilhões como para os peixes: duas em estações secas (inverno) e uma na estação chuvosa (verão).

5.4.1.

Mexilhões

Os mexilhões foram coletados em 30 de agosto de 2006 (final da estação seca), 27 de fevereiro de 2007 (final da estação chuvosa) e 15 de agosto de 2007 (final da estação seca).

As amostras de mexilhões foram coletadas em cinco estações de amostragem. Estas estações estão situadas em áreas, indicadas por trabalhos anteriores (AZEVEDO et al., 2004 ; AZEVEDO, 1998; BRITO, 1998; LIMA, 2001; LOUREIRO, 2002), onde o índice de contaminação por hidrocarbonetos, pesticidas organoclorados, metais e ftalatos (AZEVEDO, 1998; BRITO, 1998; LIMA, 2001; LOUREIRO, 2002) é elevado e onde as comunidades de marisqueiros da Baía de Guanabara fazem coletas de mexilhões para consumo e revenda. A figura 19 mostra as localizações exatas das estações de coleta de mexilhões no mapa da Baía de Guanabara.

A estação 1 se localiza no cultivo da Cooperativa Independente dos Catadores de Mexilhões de Jurujuba. Neste local, os mexilhões juvenis (sementes) são enfardados em espinhéis até atingirem tamanho comercial, sendo, então, retirados e vendidos ao público ou consumidos pela população de marisqueiros.

A estação 2 está localizada na entrada do canal de acesso à Marina da Glória.

A estação 3 e a estação 4 estão localizadas nos pilares centrais da Ponte Rio-Niteroi (Ponte Presidente Costa e Silva). A estação 3 encontra-se, mais especificamente no pilar anterior ao pilar central e a estação 4 encontra-se no pilar seguinte ao pilar central (considerando o sentido Rio-Niteroi). No entorno desses pilares dá-se intenso tráfego de embarcações de várias naturezas e tamanhos. Na primeira campanha de coleta não foram encontrados mexilhões nestas duas estações de coleta.

A estação 5 fica localizada na ilha de Boa Viagem, na frente voltada para a entrada da baía.

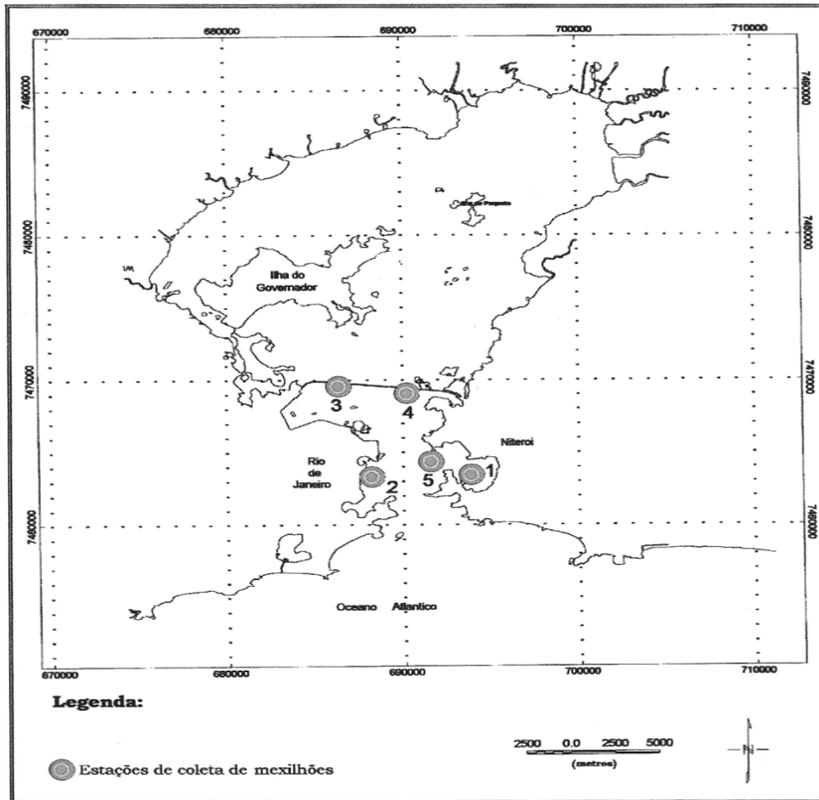


Figura 19 – Mapa da Baía de Guanabara com as estações de coletas de mexilhões numeradas

As amostras de mexilhões foram coletadas manualmente, com auxílio de um estilete de aço inoxidável. Em seguida, na própria embarcação, foram retirados toda a flora, a fauna e os materiais sólidos residuais que acompanham a concha do molusco. Feito isto, os mexilhões foram lavados com a água do próprio ponto de coleta.

Os espécimes foram separados por classes de tamanho, sendo trazidos para o laboratório apenas os indivíduos de maiores de 6 centímetros de comprimento total. Após esta triagem, os mexilhões foram acondicionados em embalagens de alumínio previamente descontaminadas, e mantidos resfriados em gelo até a sua chegada ao laboratório.

Para favorecer a homogeneidade das amostras os mexilhões coletados em cada estação foram medidos e aqueles com tamanhos entre 6 e 8 cm foram

abertos, e seus músculos separados em grupos de 10 indivíduos. Cada grupo formou, então, uma amostra.

A seguir as amostras foram congeladas (-18° C) e liofilizadas por 48 horas. Uma vez secadas, elas foram então trituradas e homogeneizadas em um gral de porcelana ou em um liquidificador de vidro com hélice de aço inoxidável, acondicionadas em frasco de vidro com tampa metálica protegidas por papel alumínio descontaminado (450° C / 24 horas) e então congeladas a - 18 °C até a extração dos PBDEs e dos PCBs.

5.4.2.

Peixes

Os peixes foram coletados em 01 de setembro de 2006 (final da estação seca), 06 de março de 2007 (final da estação chuvosa) e 28 de setembro de 2007 (final da estação seca).

Os peixes (corvinas e tainhas) foram adquiridos na Cooperativa de Pescadores de Gradim, São Gonçalo. Depois de adquiridos cada indivíduo foi embalado em papel de alumínio previamente descontaminado, e mantido resfriado em gelo até a sua chegada ao laboratório.

No laboratório eles foram pesados e medidos para que se pudesse estimar a homogeneidade dos grupos de cada espécie e verificar a existência de alguma correlação entre esses dados biométricos e os teores dos analitos pesquisados. Depois de medidos, os indivíduos tiveram parte de seus músculos e os fígados (somente fígados das tainhas) retirados e congelados (-18°C) para serem liofilizados, individualmente, por 48 horas.

Depois de liofilizadas, as amostras foram então trituradas e homogeneizadas em um gral de porcelana ou em um liquidificador de vidro com hélice de aço inoxidável, acondicionadas em frascos de vidro com tampa metálica e protegida por papel alumínio descontaminado e então congeladas a - 18 °C até a extração dos PBDEs e dos PCBs.

Na primeira campanha foram adquiridas 15 corvinas e 14 tainhas, na segunda 15 corvinas e seis tainhas e na terceira cinco indivíduos de cada espécie.

De todas as campanhas de Amostragens foram analisados músculos de cinco corvinas e músculos de cinco tainhas com características biométricas semelhantes entre si. As semelhanças foram atestadas pelo teste Kruskal-Wallis (ANOVA, $p > 0,05$) (KRUSKAL, 1952).

As tabelas 4 e 5, no capítulo de resultados, apresentam os dados de biometria das espécies de peixes coletadas no presente estudo e a indicação dos indivíduos escolhidos para serem analisados.

5.5. Metodologia analítica

Foram identificados e quantificados os seguintes PBDEs:

BDE-28, BDE-47, BDE-66, BDE-85, BDE-99, BDE-100, BDE-138,
BDE-153 e BDE-154.

e os seguintes PCBs:

PCB-8, PCB-18, PCB-28, PCB-31, PCB-33, PCB-52, PCB-49, PCB-44,
PCB-74, PCB-70, PCB-66, PCB-95, PCB-56, PCB-60, PCB-101, PCB-99,
PCB-97, PCB-81, PCB-87, PCB-77, PCB-110, PCB-151, PCB-123,
PCB-149, PCB-118, PCB-114, PCB-153, PCB-132, PCB-105, PCB-141,
PCB-138, PCB-158, PCB-126, PCB-187, PCB-183, PCB-128, PCB-167,
PCB-174, PCB-177, PCB-156, PCB-157, PCB-180, PCB-169, PCB-170,
PCB-199, PCB-203, PCB-189, PCB-195, PCB-194, PCB-206.

São diversos os métodos encontrados na literatura para determinação de PBDEs e PCBs. Escolheu-se desenvolver e adaptar uma metodologia baseada, principalmente, nos trabalhos de Allchin (ALLCHIN et al., 1999) e Zhu (ZHU et al., 2003), sabendo-se que já foi comprovado que as diversas alternativas de

extração e limpeza fornecem resultados similares (DE BOER et al., 2001; ZHU et al., 2003).

O método assim otimizado (adaptado) é passível de ser realizado no Laboratório Especializado em Meio Ambiente – LEMA da PUC–Rio. Consiste em extrair simultaneamente PBDEs e PCBs em matrizes biológicas, e compreende basicamente 4 etapas: saponificação, extração, limpeza, e análise cromatográfica. O fluxograma da figura 20 fornece uma visão geral do protocolo seguido.

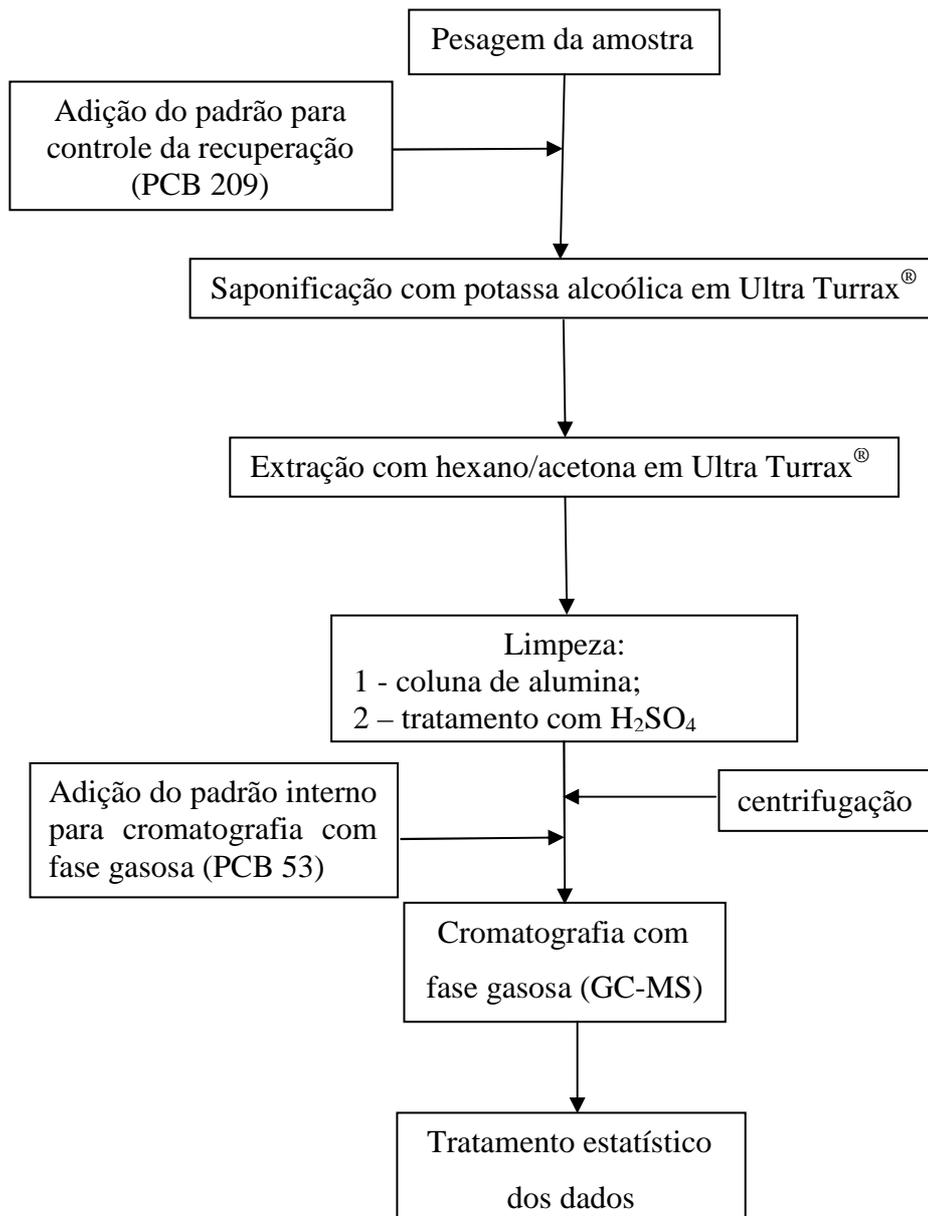


Figura 20 – Fluxograma representativo das etapas da metodologia utilizada

5.5.1.

Saponificação

A saponificação transforma os lipídios presentes na matriz biológica em substâncias mais hidrofílicas que ficam retidas na fase aquosa no final da extração (VANDERVALK et al., 1988; XIONG et al., 2000).

É freqüente a prática da saponificação como pré-tratamento de amostras nas determinações de PBDEs e PCBs (BOHM et al., 1991; DEBOER et al., 1992; XIONG et al., 2000; NUMATA et al., 2005; NAVARRO et al., 2006; FAJAR et al., 2008) independentemente da metodologia utilizada para extração e de limpezas posteriores que se façam necessárias. A saponificação prévia aumenta a eficiência da extração e diminui o teor de interferentes nos cromatogramas, melhorando a separação e a detecção dos analitos (LLOMPART et al., 2001; FUJITA et al., 2009). Vandervalk e Xiong (VANDERVALK et al., 1988; XIONG et al., 2000) observaram a eliminação de pesticidas organoclorados, eventualmente presentes, também por meio da saponificação.

Foi pesado cerca de 1,00g de cada amostra e a esta massa adicionou-se 3,0µL de solução 3,5ng/µL (10,5ng) de 2,2',3,3',4,4',5,5',6,6' decacloro bifenila (PCB – 209) para avaliação das perdas inerente aos procedimentos de extração. Acrescentou-se 20 mL de solução 1mol/L de KOH em etanol e ligou-se o Ultra Turrax® em 14000 rpm por 60s, deixando-se repousar por 30 minutos, tempo suficiente para promover a saponificação das gorduras presentes nos tecidos biológicos.

5.5.2.

Extração

O solvente empregado na extração foi hexano/acetona 1:1, pois De Boer (2001) demonstrou, em um exercício interlaboratorial, que esta mistura extrai, satisfatoriamente, os analitos de interesse.

Foram acrescentados 20 mL de acetona, ligou-se o Ultra Turrax[®] em 14000 rpm por 60s. Acrescentou-se 20 mL de n-hexano, ligou-se o Ultra Turrax[®] em 14000 rpm por 60s. Acrescentou-se 20 mL de água ultrapura (MILLI-Q[®]) ligou-se o Ultra Turrax[®] em 22000 rpm por 60s. Esperou-se decantar por cerca de uma hora.

Transferiu-se, quantitativamente, o máximo da fase orgânica sobrenadante usando-se uma pipeta Pasteur recheada com sulfato de sódio anidro para um béquer. Evaporou-se o n-hexano em banho maria (40°C) e fluxo de N₂. O extrato foi dissolvido em 1,0 mL de solução 1:1 n-hexano/acetona e conduzido para etapa de limpeza.

5.5.3.

Limpeza (“clean – up”)

O extrato orgânico, mesmo após a saponificação, ainda se apresentou amarelado, indicando a presença de impurezas não saponificáveis que exigiram remoção por tratamentos posteriores de limpeza, tais como percolação em coluna de alumina e tratamento com ácido sulfúrico.

5.5.3.1.

Limpeza com alumina

A limpeza foi realizada em uma coluna de vidro de 1,5 cm de diâmetro interno contendo 6,00g de alumina (ativada a 450° C por 6 horas, 5% desativada por água ultrapura/MILLI-Q[®] e deixada em repouso por 24 horas antes da utilização) e 0,5 grama de sulfato de sódio anidro.

Procedeu-se a eluição com n-hexano. Foram recolhidas 2 frações de 4mL. A análise cromatográfica qualitativa, do Material de Referência Certificado (Standad Reference Material) – SRM 2977 puro e adicionado com Padrão de referência certificado (mistura de PBDEs, 9 componentes, Bromodiphenyl Ethers Lake Michigan Study) usando-se o cromatógrafo com detector de captura de

elétrons, mostrou que os analitos de interesse estavam presentes na segunda fração de 4 mL. O volume n-hexano foi, então, reduzido para cerca de 1mL, em fluxo de nitrogênio e banho maria (40°C) e procedeu-se ao tratamento com ácido sulfúrico concentrado.

5.5.3.2.

Limpeza com ácido sulfúrico

Dissolveu-se o extrato (secado em banho maria e fluxo de N₂), oriundo da limpeza com alumina, em 1mL de n-hexano e acrescentou-se 2 mL de ácido sulfúrico concentrado. Com auxílio de um agitador “Vortex” submeteu-se esta mistura a agitação por 5 minutos. A emulsão resultante foi centrifugada por 2 horas até a separação das fases. A fase orgânica sobrenadante (extrato em n-hexano) transferida quantitativamente com pipeta Pasteur foi lavada duas vezes com água ultrapura/MILLI-Q[®] (purificada cinco vezes por 20 ml de n-hexano para cada dois litros de água). O n-hexano do extrato orgânico, agora já limpo, foi evaporado em fluxo de nitrogênio e banho maria (40°C). Acrescentou-se, então o 10 µL de solução 3,5ng/µL (35 ng) de PCB-53 (2,2',5,6' tetracloro bifenila), padrão interno para análise cromatográfica, e 100uL de isooctano. Esta solução resultante foi analisada por GC-MS.

5.5.4.

Análise por cromatografia com fase gasosa

Para avaliação da pureza dos solventes, e acompanhamento qualitativo das frações geradas na etapa de limpeza através da percolação em alumina usou-se o cromatógrafo a gás equipado com detector de captura de elétrons (GC-ECD) e coluna capilar de fase estacionária 5% fenil, 95% metil siloxano (DB-5) da J&W Scientific (91 Blue Ravine Rd Folsom, CA 95630-4720, United States) com 50 metros de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura de filme, nas seguintes condições:

Gás carreador: nitrogênio, vazão de 1,3 cm³/min

Gás complementar para o ECD: nitrogênio, vazão de 32 cm³/min

Injeção de 3µL com divisão de fluxo (split) 6 cm³/min

Injetor capilar a 270°C

Detector a 300°C

O forno seguiu a seguinte programação de temperatura:

Temperatura inicial: 110°C durante 1,9 minutos

Velocidade de aquecimento de 15°C por minuto de 110°C até 180°C

1,8°C/min de 180°C até 285°C

Temperatura final: 285°C por 34,4 minutos

Tempo total da corrida: 90 minutos.

As determinações de PBDEs e PCBs foram realizadas no cromatógrafo a gás equipado com espectrômetro de massas (GC-MS) e a coluna cromatográfica utilizada foi a HP-5MS da J&W Scientific com 30 metros de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura de filme de 5% fenilmetilsiloxana nas seguintes condições:

Para determinação de PBDEs

Gás de arraste: hélio ultra puro, vazão de 1,3 ml min⁻¹

Injeção de 1 µl do extrato, sem divisão de fluxo (splitless)

Aquisição dos dados: modo SIM (single ion monitoring)

Injetor 280 °C

Interface 280 °C

Fonte de íons 300°C

O forno seguiu a seguinte programação de temperatura:

Temperatura inicial: 70°C durante 1 minuto

Velocidade de aquecimento de 12°C por minuto de 70°C até 154°C

2°C/min de 154°C até 210°C

3°C/min de 210°C até 300°C

Temperatura final: 300°C por 5 minutos

Tempo total da corrida: 70 minutos.

Para determinação de PCBs

Gás de arraste: hélio ultra puro, vazão de 1,1 ml min⁻¹

Injeção de 1 µl do extrato, sem divisão de fluxo (splitless)

Aquisição dos dados: modo SIM (single ion monitoring)

Injetor 270 °C

Interface 280 °C

Fonte de íons 300°C

O forno seguiu a seguinte programação de temperatura:

Temperatura inicial: 75°C durante 3 minutos

Velocidade de aquecimento de 15°C por minuto de 75°C até 150°C

2°C/min de 150°C até 260°C

20°C/min de 260°C até 300°C

Temperatura final: 300°C por 1 minuto

Tempo total da corrida: 66 minutos.

5.5.5.

Determinação de lipídios

Por sua natureza lipofílica os PBDEs e PCBs biomagnificam e bioacumulam principalmente no tecido adiposo dos organismos. Determinou-se o teor de lipídios das espécies estudadas com o objetivo de correlacioná-lo com os teores dos analitos em questão.

Utilizou-se uma adaptação da metodologia clássica de extração com solvente a frio, conhecida como Método de Bligh-Dyer (BLIGH et al., 1959) considerando os aspectos relatados por Honeycutt (HONEYCUTT et al., 1995).

Bligh (BLIGH et al., 1959) utiliza uma mistura de clorofórmio e metanol. Honeycutt (HONEYCUTT et al., 1995) entretanto, mostrou que o uso da mistura hexano/acetona ou de diclorometano também apresentam resultados satisfatórios. A amostra é misturada aos solventes numa proporção que formam uma só fase com a amostra. Adiciona-se água promovendo a formação de duas fases distintas, uma orgânica, contendo os lipídios, e outra aquosa, contendo as substâncias não lipídicas. A fase orgânica é isolada e, após a evaporação do solvente, obtém-se o teor de lipídios por pesagem.

Pesou-se cerca de 1,00g de cada amostra liofilizada. Foram adicionados 30 mL de acetona, ligou-se o Ultra Turrax® em 14000 rpm por 60s. Acrescentaram-se 30 ml de n-hexano, ligou-se o Ultra Turrax® em 14000 rpm por 60s. Acrescentaram-se 30 ml de solução saturada de NaCl preparada com água ultrapura (MILLI Q®) ligou-se o Ultra Turrax™ em 22000 rpm por 60s. Esperou-se decantar por cerca de uma hora.

A fase orgânica sobrenadante foi transferida, quantitativamente, usando-se uma pipeta Pasteur recheada com sulfato de sódio anidro, para um béquer tarado.

Evaporou-se o solvente em banho maria (45-50°C) e sob fluxo de N₂. O extrato foi mantido em estufa (75-85°C) por 48 horas e até peso constante.

5.5.6.

Construção das curvas analíticas

A calibração dos equipamentos foi feita com a utilização dos padrões certificados e solventes de pureza garantida.

As soluções para construção das curvas analítica da determinação de PBDEs foram preparadas a partir da diluição por isooctano da solução do padrão de referência certificado contendo uma mistura de PBDEs com 10 µg/mL de cada um dos 9 componentes (BDE-28, BDE-47, BDE-66, BDE-85, BDE-99, BDE-100, BDE-138, BDE-153 e BDE-154). Foram preparadas soluções de PBDEs com as seguintes concentrações: 5,0; 10,0; 20,0; 40,0; 50,0 e 100,0 pg/µL. A cada solução foi incluído o padrão de controle da recuperação da extração (PCB-209), de forma que a concentração resultante foi 105 pg/µL e o padrão interno da análise cromatográfica (PCB-53), de forma que a concentração resultante foi 350 pg/µL.

Para os PCBs as curvas analíticas foram preparadas a partir da diluição em n-hexano da solução do padrão de referência certificado C-WCFS (AccuStandard) contendo 25 µg/mL de uma mistura com 24 componentes e, da solução do padrão de referência certificado C-WNN (AccuStandard) contendo 10 µg/mL de uma mistura com 28 componentes. Foram preparadas soluções de PCBs com as

seguintes concentrações: 1,0; 5,0; 10,0; 20,0; 50,0; 80,0; 100,0; 150,0 e 200 pg/ μ L.

Os gráficos das curvas analíticas usados nas determinações dos PBDEs estão no anexo 1 , e os das curvas analíticas usados nas determinações do PCB-153 e PCB-180, no anexo 2.

5.5.7.

Controle de qualidade

5.5.7.1.

Análise de brancos, limites de detecção e de quantificação

A metodologia analítica desenvolvida foi testada quanto à presença de contaminantes interferentes através de análises de brancos. Os limites de detecção e de quantificação foram determinados de acordo com normas aceitas internacionalmente e praticadas por vários pesquisadores (CURRIE, 1968; LONG et al., 1983; Recommendations for the Definition, Estimation and Use of the Detection Limit, 1987; CURRIE et al., 1994; CURRIE, 1999a; 1999b), o que em linhas gerais seguem as seguintes definições e regras:

O Limite de detecção (LD) é a menor concentração de um analito que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, sob condições experimentais estabelecidas. Definem-se Limites de Detecção em termos do desvio-padrão de medidas do branco. Porém, sendo o branco constituído de todos os reagentes, exceto da amostra e do analito, ele não reproduz as mesmas condições a que o analito estará sujeito durante a análise . O LD determinado dessa forma pode avaliar mudanças ocorridas durante o desenvolvimento do método, ou para comparação de instrumentos. Entretanto, em relação à análise prática, esses valores são extremamente baixos e não representam perfeitamente a realidade.

O limite de detecção pode ser determinado mediante o sinal/ruído, o desvio-padrão da resposta e do coeficiente angular ou por processos estatísticos.

A determinação da razão sinal/ruído é realizada comparando-se os sinais medidos da amostra com baixas concentrações do analito com as do branco, estabelecendo-se a concentração mínima na qual o analito pode ser detectado. A razão sinal/ruído com valor 3 é considerada aceitável para estimar o limite de detecção (Recommendations for the Definition, Estimation and Use of the Detection Limit, 1987). O limite de detecção pode, então, ser expresso pela seguinte equação:

$$LD = \frac{3.s}{S}$$

Onde:

s = desvio-padrão da resposta;

S = o coeficiente angular do gráfico de calibração (sensibilidade do aparelho).

O limite de quantificação (LQ) é definido como a menor concentração do analito, que pode ser quantificada na amostra, com exatidão e precisão aceitáveis, sob as condições experimentais em questão. Da mesma forma que o limite de detecção pode ser estimado por meio do sinal/ruído, do desvio-padrão e por processos estatísticos.

Efetua-se a determinação da razão sinal/ruído por meio da comparação dos sinais medidos da amostra com baixas concentrações conhecidas do analito com as do branco, estabelecendo-se a concentração mínima na qual o analito pode ser quantificado. Um exemplo de razão sinal/ruído típica é 10:1.

O limite de quantificação (LQ) pode ser expresso pela equação abaixo:

$$LQ = \frac{10.s}{S}$$

Onde:

s = desvio-padrão da resposta;

S = o coeficiente angular do gráfico de calibração (sensibilidade do método).

Diferenciam-se limites de detecção e de quantificação do instrumento (LDI e LQI) dos limites de detecção e de quantificação do método (LDM e LQM). Para o instrumento o LDI é a menor concentração de uma substância que não se

confunde com o ruído do equipamento, enquanto o LDM é a menor concentração de uma substância que pode ser medida com a confiança definida de que a concentração do analito é maior que zero. O LDM e o LQM incluem as variáveis relacionadas ao procedimento no qual as amostras são submetidas e não somente variações inerentes às respostas do instrumento.

5.5.7.2.

Análise do material de referência certificado

Para o controle da qualidade das determinações foi analisado o Material de Referência Certificado (Standard Reference Material) – SRM 2977, tecido de Mexilhões, seguindo a metodologia analítica desenvolvida para esta pesquisa.

5.5.7.3.

Ensaio de recuperação

Os ensaios de recuperação foram realizados para verificação da precisão e exatidão do método. O ensaio de recuperação é um procedimento utilizado para validação de processos analíticos. A recuperação retrata a quantidade de determinado analito, recuperado no processo, em relação à quantidade real adicionado na amostra, portanto, diz respeito à exatidão. A exatidão é expressa como erro sistemático percentual, inerente ao processo. O erro sistemático ocorre pela perda da substância devido à baixa recuperação da extração, medidas volumétricas imprecisas ou substâncias interferentes na amostra. A recuperação é calculada da seguinte forma:

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

onde:

C1 = concentração determinada na amostra fortificada;

C2 = concentração determinada na amostra não fortificada;

C3 = concentração fortificada.

A precisão e a exatidão foram avaliadas fortificando-se com o PCB-209 (2,2'3,3'4,4'5,5',6,6' decaclorobifenila) as 58 amostras analisadas (peixes e mexilhões) os brancos e as amostras do SRM 2977.

5.5.8.

Tratamento estatístico dos dados

Todas as análises estatísticas e os gráficos apresentados nesta pesquisa foram realizados com a utilização do pacote estatístico PASW Statistics, versão 17, da SPSS Inc.

Foram realizados testes de Shapiro-Wilk, teste W, (SHAPIRO et al., 1965) para análise das distribuições dos dados. As diferenças entre grupos foram testadas através da análise de variância não-paramétrica de Kruskal-Wallis (ANOVA) para k amostras independentes (KRUSKAL, 1952). O teste de Mann-Whitney, teste U, (MANN et al., 1947) foi utilizado para verificação das significâncias das diferenças encontradas pelo teste Kruskal-Wallis (ANOVA).

Para todos os testes estatísticos, foi considerado $p < 0,05$ como estatisticamente significativa.