

Validação de método para determinação de bifenilas policloradas em águas por GC-MS

Autor: Antônio Henrique Pizzatto

Orientador: Nilo Sérgio Medeiros Cardozo

PORTO ALEGRE

2018

Agradecimentos

Agradeço a minha mãe Audrei Lemos pela paciência e motivação oferecidas durante toda a trajetória acadêmica;

Agradeço a empresa NSF BIOENSAIOS por proporcionar o material e local para realização do estudo;

Agradeço ao Diretor de Estudo Vinicius Praia pela orientação nos fundamentos da cromatografia e na utilização dos equipamentos;

Agradeço ao Professor Nilo Sérgio pela orientação deste trabalho.

Sumário

Agradecimentos.....	ii
Sumário.....	iii
Resumo.....	v
Lista de Figuras.....	vi
Lista de Tabelas.....	vii
Lista de Símbolos.....	viii
Lista de Abreviaturas e Siglas.....	ix
1 Introdução.....	1
2 Revisão Bibliográfica e Conceitos Fundamentais.....	2
2.1 Características gerais da Bifenilas Policloradas.....	2
2.2 Toxicidade das PCBs.....	3
2.2.1 Mecanismo de ação.....	4
2.2.2 Formas de exposição.....	4
2.3 Impacto ambiental.....	5
2.4 Legislação voltada para PCBs.....	7
2.5 Métodos de determinação de PCBs.....	8
2.5.1 Análise por Imunoensaio.....	10
2.5.2 Análise por Cromatografia Gasosa.....	11
3 Materiais e Métodos.....	14
3.1 Reagentes.....	14
3.2 Instrumentação.....	14
3.3 Condições do equipamento.....	15
3.4 Programação da metodologia de análise do equipamento.....	15
3.5 Proposta de validação do método de análise.....	17
3.5.1 Seletividade.....	18
3.5.2 Linearidade.....	18
3.5.3 Faixa de trabalho e faixa linear.....	19
3.5.4 Limite de Detecção.....	20
3.5.5 Limite de Quantificação.....	21
3.5.6 Tendência/recuperação.....	21
3.5.7 Precisão.....	23
3.5.7.1 Repetitividade.....	23
3.5.7.2 Precisão Intermediária.....	24
3.5.7.3 Reprodutibilidade.....	24
3.5.8 Robustez.....	25
4 Resultados.....	26

4.1	Seletividade.....	26
4.2	Curva de Calibração.....	27
4.3	Limites de Quantificação e Detecção.....	29
4.4	Recuperação.....	30
4.5	Repetitividade.....	31
4.6	Precisão Intermediária.....	31
4.7	Robustez.....	32
5	Conclusões e Trabalhos Futuros.....	34
6	Referências Bibliográficas.....	35
7	Apêndice.....	39

Resumo

Dentre o grupo de 12 substâncias tóxicas definidas pela Convenção de Estocolmo em 2001, as Bifenilas Policloradas representam uma classe de compostos de origem antropogênica amplamente difundida desde o final da década de 30 nos EUA quando sua aplicação como óleo isolante para transformadores começou através de uma mistura comercial de nome Ascarel. Uma série de relatos na literatura indicam seus efeitos toxicológicos uma vez que apresentam caráter bioacumulativo. Alterações neurocomportamentais de recém-nascidos, hepatotoxicidade, bronquite e edemas são alguns dos sintomas relatados por exposição humana a estas substâncias. Uma das medidas de controle das PCBs em território nacional ocorre através da resolução 396 da CONAMA de 2008 que estabelece um valor máximo permitido de $0,5 \mu\text{L}^{-1}$ para estes compostos em água de consumo humano. No entanto, os métodos de análise de PCBs para quantidades tão pequenas como as da referida resolução ainda não estão bem estabelecidas. Neste contexto, o presente trabalho apresenta um estudo de validação para determinação destas substâncias em matriz aquosa através da técnica de Cromatografia Gasosa com Espectrometria de Massas. Para tal objetivo, configurou-se uma corrida cromatográfica de aproximadamente 8,5 minutos utilizando uma coluna de 10 metros. O método programado para monitorar íons referentes a 21 congêneres de PCBs oriundos de uma solução de referência certificada, baseou-se nos espectros do banco de dados do NIST. A curva de calibração foi elaborada a partir da análise de soluções cujas concentrações encontram-se em uma faixa de trabalho que visa o atendimento a resolução 396 e sua linearidade verificada por gráficos de faixa linear. Os limites de detecção e quantificação do método atestados por 10 medidas do branco e a recuperação do método avaliada na etapa de preparo da amostra através da extração líquida. A precisão foi verificada a partir de medições do ponto intermediário da curva de forma sequencial e em dias diferentes e a robustez analisada pela mudança deliberada de um dos parâmetros do método. O método mostrou-se capaz de permitir a determinação de compostos PCBs em amostras de águas com limite de quantificação que atende às especificações legais. Os espectros de massa demonstraram a boa seletividade da técnica quanto a análise dos parâmetros de interesse e a curva de calibração retornou valores para o coeficiente de determinação todos acima de 0,99. Obteve-se dados satisfatórios com relação a análise de precisão, uma vez avaliada pela dispersão das medições da solução de 4 ppb, e a recuperação apresentou valores para todos os congêneres dentro da faixa de aceitação. Por fim, a robustez apresentou uma dispersão máxima de 7,8% nas medições dos padrões, apesar da queda na sensibilidade do método.

Lista de Figuras

Figura 1 – Estrutura química das Bifenilas Policloradas.....	2
Figura 2 – Estrutura química das dibenzo-p-dioxinas policloradas (PCDDs) e dibenzofuranos policlorados (PCDFs).....	6
Figura 3 – Cromatógrafo GC-2010 Plus com espectrômetro de massas QP2010 ULTRA.....	14
Figura 4 – Solução mãe de 1 mg L ⁻¹ do padrão de curva de PCBs.....	19
Figura 5 – Extração em fase líquida para análise de recuperação da validação.....	22
Figura 6 – Copos de vidro para uso no equipamento Syncore.....	22
Figura 7 – Sistema de concentração do equipamento Syncore.....	23
Figura 8 – Comparativo entre alguns espectros de massa de padrão de 0,1 ppm (esquerda) e amostra em matriz aquosa (direita).....	26
Figura 9 – Gráficos de indicação da faixa linear da curva de alguns congêneres.....	28

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Toxicidade de PCBs descrito em termos do T.E.F.....	3
Tabela 2 – Limites de quantificação para PCBs monitorados da análise feita por GC-ECD em amostras originadas de reatores anaeróbios.....	9
Tabela 3 – Programa de temperatura utilizado para análise no cromatógrafo gasoso GCMS-QP2010 ULTRA.....	15
Tabela 4 – Condições do equipamento para corrida cromatográfica.....	15
Tabela 5 – Lista de congêneres analisados, seus respectivos íons monitorados e tempos de retenção.....	16
Tabela 6 – Condições de alteração do método para análise de robustez.....	25
Tabela 7 – Parâmetros e coeficiente de determinação das curvas de calibração ($y = a x + b$) dos congêneres analisados.....	27
Tabela 8 – Limites de detecção e quantificação obtidos na validação proposta.....	29
Tabela 9 – Valores de recuperação média obtidos para cada parâmetro após análise do extrato resultante da ELL.....	30
Tabela 10 – Análise da repetitividade do método desenvolvido através da medição sequencial do padrão de 4 ppb.....	31
Tabela 11 – Análise da precisão intermediária do método desenvolvido através da medição do padrão de 4 ppb em dias diferentes.....	32
Tabela 12 – Análise de robustez do método através da medição de três padrões e comparadas suas áreas obtidas em duas condições distintas.....	32

Lista de Símbolos

%	Porcentagem
ppm	Partes por milhão (10^{-6})
ppb	Partes por bilhão (10^{-9})
g	Unidade de massa em gramas
°C	Unidade de temperatura na escala celsius
L	Unidade de volume em litros
Pa	Unidade de pressão em pascal
s	Unidade de tempo em segundos
min	Unidade de tempo em minutos
m	Prefixo mili (10^{-3})
μ	Prefixo micro (10^{-6})
n	Prefixo nano (10^{-9})
p	Prefixo pico (10^{-12})
k	Prefixo quilo (10^3)
m/z	Razão massa e carga
α	Nível de confiança do teste t de Student

Lista de Abreviaturas e Siglas

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
AG	Sociedade Anônima (do Alemão: <i>Aktiengesellschaft</i>)
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CGCRE	Coordenação Geral de Acreditação
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
CRF	Código de Regulações Federais (do Inglês: <i>Code of Federal Regulations</i>)
DDT	Diclorodifeniltricloroetano
DNA	Ácido Desoxirribonucleico (do Inglês: <i>Deoxyribonucleic Acid</i>)
EA	Environment Agency (do Inglês: Agência Ambiental)
ELL	Extração Líquido-líquido
ELISA	Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (do Inglês: <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>)
EUA	Estados Unidos da América
GC	<i>Gas Chromatography, Gas Chromatograph</i>
GC-MS	Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas
GC-ECD	Cromatografia Gasosa acoplada com Detector de Captura de Elétrons
HRGC	<i>High Resolution Gas Chromatography</i>
ICH	Conferência Internacional de Harmonização (do Inglês: <i>International Conference on Harmonisation</i>)
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
MI	Ministério do Interior
MIC	Ministério da Indústria e Comércio
MMA	Ministério do Meio Ambiente
MME	Ministério de Minas e Energia
MS	Espectrômetro de Massas (do Inglês: <i>Mass Spectrometer</i>)
NBR	Norma Brasileira

NIST	Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia (do Inglês: <i>National Institute of Standards and Technology</i>)
NRC	Conselho Nacional de Pesquisa (do Inglês: <i>National Research Council</i>)
NTP	Programa Nacional de Tecnologia (do Inglês: <i>National Technology Program</i>)
PCB	Bifenilas Policloradas (do Inglês: <i>Polychlorinated Biphenyls</i>)
PCDD	Dibenzo-p-dioxinas Policloradas (do Inglês: <i>Polychlorodibenzodioxin</i>)
PCDF	Dibenzofuranos Policlorados (do Inglês: <i>Polychlorodibenzofurane</i>)
POP	Poluente Orgânico Persistente, Procedimento Operacional Padrão
RNA	Ácido Ribonucleico (do Inglês: <i>Ribonucleic Acid</i>)
RSD	Desvio Padrão Relativo (do Inglês: <i>Relative Standard Deviation</i>)
SCAN	Escaneamento (do Inglês: <i>Scanning</i>)
SEMA	Secretaria Especial do Meio Ambiente
SIM	Monitoramento Seletivo de Íons (do Inglês: <i>Selected Ion Monitoring</i>)
SPE	Extração em fase sólida (do Inglês: <i>Solid Phase Extraction</i>)
TCB	Triclorobenzeno
TCDD	Tetraclorodibenzodioxina
TEF	Fator de Equivalência Toxicológica (do Inglês: <i>Toxic Equivalent Factor</i>)
TSCA	Lei de Controle de Substâncias Tóxicas (do Inglês: <i>Toxic Substances Control Act</i>)
TSDF	Instalação de tratamento, estocagem e eliminação (do Inglês: <i>Treatment, Storage, and Disposal Facilities</i>)
USEPA	Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (do Inglês: <i>United States Environmental Protection Agency</i>)
VMP	Valor Máximo Permitido
WHO	Organização Mundial da Saúde (do Inglês: <i>World Health Organization</i>)

1 Introdução

Em 22 de maio de 2001, na cidade de Estocolmo (Suécia), 152 países assinaram um tratado internacional conhecido como Convenção de Estocolmo sobre Poluentes Orgânicos Persistentes. Este tratado auspiciado pelo Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente objetivou a total eliminação de uma classe de substâncias tóxicas produzidas pelo homem. O Brasil, como signatário deste tratado, uma vez que o texto estabelece pelo decreto nº 5.472 de 20 de junho de 2005 o banimento destas substâncias, assumiu o compromisso de promover a gestão e disposição final destes poluentes em data prevista pelo mesmo até 2025.

Os Poluentes Orgânicos Persistentes, também conhecidos pela sigla POPs, somam um total de 12 grupos de substâncias listadas pela Convenção de Estocolmo que prevê em seu texto o banimento e eliminação destes compostos. Por serem altamente estáveis e lipossolúveis, apresentam elevada toxicidade visto que são capazes de acumular-se em tecidos gordurosos de organismos vivos. Em se tratando dos POPs, alguns compostos como as Bifenilas Policloradas, também conhecidas pela sigla PCBs, surgem como um desafio internacional quanto a sua disposição, tendo em vista que sua utilização já fora consolidada em diversos produtos e que se encontra disseminada na natureza em vários níveis.

Diante do potencial toxicológico das PCBs e por estarem submetidas a Valores Máximos Permitidos (VMP) definidos em resoluções e normas presentes na legislação nacional e internacional, o estudo em questão visa atender a um controle fino desta substância no que tange a uma quantidade na ordem de microgramas por litro. Em um cenário ambiental onde a legislação busca limitar cada vez mais as cargas poluidoras dispensadas na natureza, tornam-se necessárias análises capazes de identificar os mais variados compostos em diferentes matrizes.

Assim, este estudo tem a motivação de encontrar, através de uma técnica de análise apurada, uma resolução capaz de detectar pequenas quantidades destas substâncias nocivas. Desta forma, buscou-se na análise química pela técnica de Cromatografia Gasosa e Espectrometria de Massa implementar um método capaz de quantificar pequenas quantidades de elementos PCBs utilizando um padrão de referência.

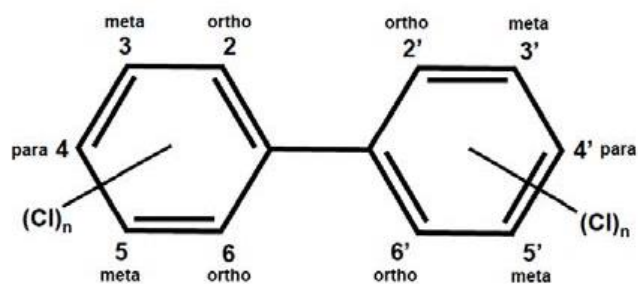
O escopo do estudo envolve a validação de um ensaio analítico de alta sensibilidade para determinação dessas substâncias de forma a quantificar uma pequena faixa de concentração do composto estudado.

2 Revisão Bibliográfica e Conceitos Fundamentais

2.1 Características gerais da Bifenilas Policloradas

As bifenilas policloradas são compostos organoclorados de origem antropogênica produzidos a partir da cloração catalítica de bifenilas. São constituídos por dois anéis benzênicos unidos por uma ligação entre carbonos e podem apresentar até 10 ligações com átomos de cloro, conforme ilustrado na Figura 1. Dependendo da posição e da quantidade de ligações com os átomos de cloro, origina-se uma estrutura diferente, num total de 209 congêneres assim numerados (VALENTE, 2011; MILLS III et al., 2007). São substâncias de elevada massa molar, densidade e viscosidade, além de apresentar como principais características a não biodegradabilidade, a bacteriostaticidade e a bioacumulação em tecidos animais e vegetais.

Figura 1. Estrutura química das Bifenilas Policloradas.



Fonte: HORWART et al. (2015).

Sua principal aplicação comercial envolveu a produção de um líquido isolante elétrico denominado “Ascarel”, composto por uma mistura de Triclorobenzeno (TCB) a uma proporção de 60 a 75% de PCBs. Essa mistura começou a ser produzida industrialmente na década de 30 nos EUA pela empresa Monsanto sendo utilizada como óleo para transformadores, uma vez que a regulamentação pública americana exigia a utilização de formulações isolantes e não inflamáveis nas subestações de energia. Visto que os óleos minerais anteriormente utilizados propiciavam altos riscos de incêndio, as formulações à base de PCBs foram amplamente difundidas pelo mundo. Atualmente diversos setores industriais utilizam-se das bifenilas policloradas: transformadores, capacitores, bombas de vácuo, turbinas de transmissão de gás, fluidos hidráulicos, resinas plastificantes, adesivos, plastificantes para borracha, líquidos de sistemas de transferência de calor, óleos de corte, lubrificantes, pesticidas e papel carbono são exemplos de aplicações destes compostos.

Devido ao grande emprego dessas substâncias, estima-se uma produção mundial acumulada em 1.200.000 toneladas dos quais 60% são utilizados em transformadores e capacitores, 15% como fluidos de transferência de calor e 25% como aditivos na formulação de plastificantes, tintas, adesivos e pesticidas (PENTEADO e VAZ, 2001).

2.2 Toxicidade das PCBs

Alguns trabalhos na literatura relatam que mesmo pequenas quantidades desta substância sendo transferidas ao feto humano pela placenta, já seria o suficiente para provocar danos neurológicos permanentes. Estudos realizados em seres humanos que consumiram grandes quantidades de peixes em lagos contaminados forneceram evidências de que as PCBs são contribuintes importantes em sutis alterações neurocomportamentais de recém-nascidos (FAROON et al., 2000). Dados publicados no relatório do Programa Nacional de Toxicologia (NTP, 2006) trazem conclusões acerca do PCB 153 que o associa com surgimento de colangioma no fígado de ratos que tiveram administradas doses de aproximadamente 3000 µg por kg de peso corporal.

No acidente ocorrido na cidade de Yusho (Japão) em 1968, o líquido refrigerante (a base de PCBs) de um dos trocadores de calor utilizados na refrigeração de óleo de farelo de arroz acidentalmente vazou, misturando-se ao óleo comestível que fora embalado e comercializado à população local. As concentrações sanguíneas dos pacientes expostos a altos níveis desta substância apontaram valores entre 1,5 a 80 µg por grama de gordura corporal. Aqueles expostos a maiores quantidades dessa substância apresentaram um conjunto de sintomas denominados “Mal de Yusho”, que incluíam cloracne, hiperqueratose, bronquite, edema e entorpecimento dos membros (MASUDA, 2009).

De forma geral a toxicidade das bifenilas policloradas é mensurada através de uma escala conhecida como Fator de Equivalência Toxicológica (TEF). O critério adotado para utilização desta escala baseia-se na similaridade estrutural das PCBs com um padrão de referência toxicológica conhecido por tetraclorodibenzodioxina cujo valor na escala é 1. Este composto aromático halogenado apresenta o maior potencial toxicológico dentre essas estruturas, induzindo sintomas como perda de peso, atrofia tímica, deterioração de respostas imunológicas, hepatotoxicidade, porfiria, lesões dérmicas e toxicidade reprodutiva (SAFE, 1990). Alguns congêneres, de bifenilas coplanares e planares, estão descritos conforme Tabela 1.

Tabela 1. Toxicidade de PCBs descrito em termos do TEF.

PCB	Classificação	Toxicidade/Ocorrência	T.E.F.
126	C	A/F	0,1
169	C	A/F	0,01
77	C	A/F	0,0005
180	P	M/F	0,0001

P = Planar; C = Coplanar; A = Altamente Tóxico; M = Muito Tóxico;
F = Ocorre Frequentemente;

Fonte: PENTEADO e VAZ (2001).

2.2.1 Mecanismo de ação

Alguns sintomas induzidos por misturas comerciais de PCBs em mamíferos incluem hepatotoxicidade, imunotoxicidade e toxicidade reprodutiva (SAFE, 1984). Os compostos aromáticos halogenados coplanares, cujos congêneres não têm substituição de cloro na posição orto, são os que apresentam maior toxicidade na mistura. O mecanismo de ação destas substâncias no organismo inicia com a ligação no receptor citozoico de hidrocarbonetos de arilo, uma proteína cuja ligação com estes compostos promove a ação tóxica. No organismo de muitas espécies animais esses compostos geralmente são transformados em epóxidos ou metabólitos hidroxilados pela ação do citocromo P-450. Esses metabólitos ao sofrerem múltiplas reações de oxidação geram uma estrutura com mais de uma hidroxila substituinte, podendo levar à formação de catecóis e hidroquinonas, espécies que promovem o *stress* oxidativo no organismo uma vez que são capazes de ligar-se com sítios nucleofílicos de macromoléculas. Outra rota possível para esses compostos epóxidos ocasiona a formação de metil sulfonas e ácidos mercaptúricos através da ação de enzimas glucationas S-transferases (JAMES, 2001).

Quando testadas a capacidade de algumas bifenilas, numa faixa de mono até hexacloradas, em formar adutos no DNA através da bioativação em microsossomos hepáticos de camundongos, ratos e humanos, verificou-se que apenas os congêneres com baixo teor de cloro foram capazes de o fazer (PEREG et al., 2002). Estudos *in vitro* demonstram a formação de adutos por PCBs e seus metabólitos, em especial as quinonas, por serem capazes de ligar-se em proteínas, no RNA e DNA e em lipídeos (ROBERTSON e GUPTA, 2000; MORCK et al., 2002; ZHAO et al., 2004). De fato, alguns estudos *in vivo* demonstram a capacidade das quinonas reativas de formar adutos no fígado e no cérebro de ratos quando expostos ao PCB 52 (LIN et al., 2000).

2.2.2 Formas de exposição

A contaminação humana por essas substâncias ocorre principalmente devido ao seu caráter de bioconcentração e biomagnificação. A bioconcentração ocorre quando há aumento imediato da densidade de um poluente no meio ambiente. Seu mecanismo basicamente envolve a absorção e eliminação simultâneas do contaminante pela espécie presente no meio (GRISONI et al., 2016). O processo de biomagnificação resulta no acúmulo do contaminante nos tecidos dos organismos vivos. Em referência às PCBs, uma vez que estão presentes nos alimentos em concentrações 100 vezes maior do que a encontrada em águas (DROUILLARD, 2008), faz com que o homem, que está no mais alto nível trófico da cadeia alimentar, se torne a espécie que mais está sujeita a exposição destes poluentes.

Comumente a população humana tem sido exposta aos componentes menos voláteis das bifenilas, ou seja, os que contêm maior teor de cloro, por ingestão. Isto porque essas espécies concentram-se com maior facilidade em alimentos, geralmente de origem animal. Estudos epidemiológicos correlacionam o consumo de peixes como principal fonte de contaminação humana por PCBs, sendo identificadas na fração lipídica do soro sanguíneo. WEINTRAUB e BIRNBAUM (2008) citam no levantamento realizado em seu estudo que o tecido do peixe bagre foi o que apresentou maiores níveis destes compostos chegando a concentrações na faixa de 2 a 140 ppm em amostras coletadas por volta dos anos 70 no Lago Hartwell, localizado no Parque Nacional da Carolina do Sul (EUA). Após a proibição da produção de bifenilas em território nacional pela Agência de Proteção Ambiental dos EUA (USEPA) no ano de 1979, os níveis divulgados em seus relatórios (USEPA, 2005) indicaram valores em tecidos de peixe bagre numa faixa média de 0,1 a 0,01 ppm nas amostras coletadas de lagos e reservatórios de todo o país entre os anos de 2000 e 2003.

A contaminação humana pelos componentes voláteis das bifenilas, com menor teor de cloro, ocorre principalmente pela inalação. Relatos na literatura registram altas concentrações de PCBs dispersos no ar em regiões industriais e densamente povoadas como as cidades de Chicago, Filadélfia e Nova Iorque (HU et al., 2010; DU et al., 2009; PALMER et al., 2008). Esses compostos voláteis ficam dispersos na atmosfera em função da temperatura, os quais geralmente são liberados na natureza por vazamentos, resíduos industriais ou até mesmo por materiais de construção contaminados. Um estudo feito na Alemanha em escolas construídas entre 1960 e 1980 com material selante contendo uma mistura de PCBs, indicou maiores concentrações dos congêneres 28 e 53 nos níveis sanguíneos de seus professores (GABRIO et al., 2000). Um dos relatórios da agência ambiental norte-americana (USEPA, 1998) identifica em inventário nacional acerca das potenciais fontes de emissão de PCBs com origem em TSDFs (Instalações de tratamento, estocagem e eliminação), aterros sanitários, lançamentos acidentais (vazamentos e incêndios de transformadores) e locais contaminados (Projeto Superfund).

2.3 Impacto ambiental

A poluição ambiental associada às bifenilas policloradas costuma ser dividida em dois tipos: a frio ou a quente.

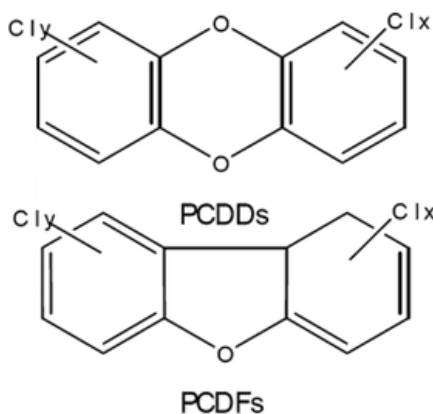
A contaminação de corpos hídricos por estes compostos expondo o ambiente aquático a uma série de espécies químicas hidrofóbicas que se acumularam ao longo de anos é denominada poluição a frio. A incorporação das PCBs neste ambiente sucede tanto por vazamentos de fluidos contendo estas espécies como transformadores, capacitores, depósitos

de lixo e aterros sem proteção, quanto por descarga de efluentes industriais e urbanos em rios e lagos. Devido a ação das correntezas, há registro de que estes poluentes já ingressaram em regiões remotas do globo, disseminando-se em vários ambientes contaminando várias biotas.

Estima-se que a concentração de PCBs na atmosfera de países de clima tropical varie entre 74 e 46000 pg m^{-3} quando próximos às fontes emissoras (IWATA, 1994) e que da produção mundial de 1,2 milhões de toneladas ainda 783 mil ainda se encontram acumulados em equipamentos elétricos e outros produtos depositados em aterros e lixões, sendo que apenas 43 mil já foram degradados ou incinerados para um total de 374 mil ainda acumulado na natureza (TANABE, 1988). No atual contexto brasileiro, de acordo com o Inventário Nacional de PCBs publicado pelo Ministério do Meio Ambiente (MMA) no ano de 2015, estima-se que haja entre 20 e 30 mil toneladas de resíduos a base de PCBs, das quais cerca de 40% carecem de tratamento adequado (MMA, 2015a).

Por outro lado, quando submetidas a temperaturas superiores a 400 °C, em presença de oxigênio, ocorre a formação de compostos tóxicos denominados furanos e dioxinas, dando origem a chamada poluição a quente. Estes compostos também classificados como POPs, acumulam-se no meio ambiente dando origem a um local de alto risco para os seres vivos uma vez que apresentam natureza lipofílica e se depositam em alimentos de origem animal. Conhecidas como dibenzo-p-dioxinas policloradas (PCDD) e dibenzofuranos policlorados (PCDF), estas espécies podem apresentar diferentes ligações com átomos de cloro e, tal como as PCBs, apresentar uma certa quantidade de congêneres que caracterizam sua estabilidade e toxicidade. A Figura 2 apresenta a estrutura química destes compostos que podem ter origem em produtos químicos ou em processos de combustão de acordo com relatório da Organização Mundial da Saúde (WHO, 1987).

Figura 2. Estrutura química das dibenzo-p-dioxinas policloradas (PCDDs) e dibenzofuranos policlorados (PCDFs).



Fonte: EA (2009).

2.4 Legislação voltada para PCBs

O interesse nos malefícios causados por compostos organoclorados surgiu na década de 60, muito a partir do amplo uso de pesticidas à base de DDT (Diclorodifeniltricloroetano). Em 1966 o pesquisador sueco Soren Jensen encontrou compostos desconhecidos ao analisar a presença de pesticidas em amostras biológicas. Estes compostos foram identificados como sendo bifenilas policloradas originadas de uma mistura comercial (JENSEN, 1966). Desta forma, novos trabalhos começaram a ser realizados com o intuito de identificar esses compostos na natureza, contudo o interesse público nas PCBs é despertado somente a partir de 1968 com o acidente na cidade de Yusho no Japão.

Em 1971 a Monsanto, maior produtor mundial de produtos químicos à base de PCBs, limita voluntariamente a venda de misturas comerciais destas substâncias a equipamentos elétricos fechados, também recomendando outras restrições de uso como a troca dos fluidos refrigerantes dos sistemas de troca térmica por outros livre de PCBs.

A USEPA, em 1975, envia ao congresso norte americano o projeto de Lei de Controle de Substâncias Tóxicas (TSCA) incluindo as PCBs. Aprovado em 1976, o texto sofre uma série de alterações, resultado de ações judiciais contestando prazos para eliminação dos equipamentos com tal conteúdo, entre outros motivos. Os EUA dispõem de uma normativa que estabelece regras gerais com alto grau de detalhamento e abrangência acerca das PCBs. É possível encontrar no Registro Federal série 40 parte 761 (CRF-40/761, 1990) o texto que estabelece uma classificação para contaminação a partir do uso de transformadores e capacitores, com base no teor de PCBs, bem como procedimentos para utilização, registro e descarte desses equipamentos com base no seu grau de contaminação.

Em 29 de janeiro de 1981 é promulgada no Brasil a Portaria Interministerial 019 cujo texto estabelece regras para uso, produção, comercialização e aquisição de equipamentos contendo PCBs (óleo Ascarel). O texto proíbe a fabricação, comercialização e uso de PCBs em todo o território nacional, bem como seu descarte em aterros sanitários e cursos de água, permitindo assim apenas o armazenamento ou a eliminação desses produtos. Com relação aos transformadores em operação apenas permite o uso do fluido Ascarel enquanto não for necessário seu esvaziamento, caso o seja feito, o mesmo deve ser substituído por outro livre de PCBs (MIC/MI/MME, 1981). Com o início da política de restrição dessas substâncias em território nacional, surgem com o passar do tempo novas regras que estabelecem cuidados com o seu uso. Em junho de 1983 a Secretaria Especial do Meio Ambiente (SEMA) resolve na Instrução Normativa nº 1 (STC/CRS-001) regras e procedimentos para manuseio,

armazenamento e transporte de materiais ou resíduos contendo bifenilas policloradas (SEMA, 1983).

Uma série de resoluções e decretos tem sido publicados em território nacional desde 1981, visto que o Brasil como um signatário do protocolo de Estocolmo em 2005 (ESTOCOLMO, 2005) selou compromisso em gerir e dispor de produtos à base de PCBs até data preestabelecida. Como rota de ação, o Ministério do Meio Ambiente estabelece em 2015 o Plano Nacional de Implementação da Convenção de Estocolmo (MMA, 2015b) que surge como uma base de orientação para ação pública e privada, visando à eliminação dos POPs em território nacional. Atualmente, o Brasil dispõe de um manual de gestão de equipamentos e resíduos contaminados com PCBs publicado pelo Ministério do Meio Ambiente (MMA, 2015c), que auxilia de forma técnica os detentores dessas substâncias a promoverem corretamente a operação de manuseio, armazenamento, controle, transporte e destinação final de itens contaminados a fim de minimizar quaisquer riscos inerentes. Com isso visa atender ao plano de total eliminação dessas substâncias até 2025.

Algumas diretrizes legais visam minimizar a presença destas substâncias em território nacional. Vale aqui ressaltar a resolução de número 396 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA, 2008), que trata da classificação e das diretrizes ambientais para enquadramento de águas subterrâneas. Visando buscar a conservação dos recursos hídricos do país, a resolução estabelece valores máximos permitidos de cargas inorgânicas e orgânicas em corpos d' água, sendo que para bifenilas policloradas os limites estabelecidos são de $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$ para água de consumo humano e $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$ para seu uso em recreação. A resolução estabelece a somatória das concentrações dos PCBs 28, 52, 101, 118, 138, 153 e 180 como valor a ser atendido. Conhecidos como congêneres indicadores, estes 7 compostos, utilizados como referência na resolução, são aqueles mais facilmente encontrados em misturas comerciais de PCBs e responsáveis por mais de 90% da contaminação mundial por bifenilas policloradas (COCCO, 2011).

2.5 Métodos de determinação de PCBs

Atualmente dispõe-se de uma série de métodos disponíveis para quantificação de PCBs em diferentes matrizes. Por não haver um único procedimento que sirva como referência ou seja recomendado como padrão, cada método de análise apresenta suas peculiaridades assim como equipamento utilizado, metodologia de extração, espécies de congêneres analisadas, entre outros. Pesquisas são realizadas para o desenvolvimento destes métodos, tal como são utilizados na forma de rotina em laboratório credenciados de análise. A metodologia de análise destes laboratórios é operacionalizada através do Procedimento

Operacional Padrão (POP) o qual sistematiza um método com as etapas a serem seguidas para determinação de um dado analito e promovem sua validação para garantir a credibilidade da estratégia analítica implementada (RIBANI et al., 2004).

No trabalho de ADORNO (2013) há o desenvolvimento de um método de extração e determinação de PCBs provenientes de 3 diferentes matrizes: óleo Ascarel, amostras de reatores anaeróbios em batelada e solo. Neste estudo foram testadas extrações em fase sólida, cromatografia em coluna de sílica e extração líquido-líquido com n-hexano, sendo que as duas primeiras apresentaram maior eficiência. A análise feita por Cromatografia Gasosa com detector por captura de elétrons (GC-ECD) apresentou diferentes valores de limite de quantificação (LQ) para cada PCB monitorado, os quais estão ilustrados na Tabela 2. A extração por sílica gel e em fase sólida apresentaram maior eficiência.

Tabela 2. Limites de quantificação para PCBs monitorados da análise feita por GC-ECD em amostras originadas de reatores anaeróbios.

PCB	LQ (mg L ⁻¹)
10	0,902
28	0,348
52	0,375
138	0,192
153	0,181

Fonte: ADORNO (2013).

Métodos para análise em alimentos também foram estudados por alguns autores. SCHWANZ et al. (2012) trabalharam no desenvolvimento de um método para determinação de PCBs em amostras de milho. Neste estudo as amostras foram submetidas a uma extração em fase sólida e analisadas por Cromatografia Gasosa com espectrometria de massas.

Uma análise feita sobre a quantidade de bifenilas totais no sangue humano demonstrou que os principais congêneres presentes nesta matriz são os PCBs 138, 153 e 180. Este estudo realizado por KRAFT et al. (2017) promoveu uma amostragem em dois grupos de pessoas originárias de duas regiões diferentes da Alemanha, ambas expostas a locais com maior concentração destas substâncias no ar. As amostras foram submetidas a uma extração líquida e analisadas por cromatografia gasosa com espectrometria de massas. Obteve-se um cromatograma com aproximadamente 171 resultados (espécies identificadas) e seu limite de quantificação avaliado em uma faixa de 30 a 950 pg g⁻¹ de conteúdo lipídico.

Outros métodos desenvolvidos para determinação de bifenilas policloradas utilizaram a técnica de imunensaio. LAMBERT et al. (1997) realizaram um estudo para determinação de PCBs por imunensaio em amostras de rejeito de óleo. A extração realizada neste estudo envolveu a adição de acetonitrila à amostra e posterior centrifugação. Após,

realizou-se a oxidação do extrato o qual percorreu uma fita cromatográfica cuja região de eluição dos PCBs foi separada, tratada com metanol e utilizada para a análise por imunoenensaio. A faixa de sensibilidade do teste ficou entre 5 e 50 ppm.

Esta técnica de imunoenensaio (ELISA) é melhorada por KIM et al. (2000) que trabalhou tanto na concentração de antígeno e anticorpo utilizado quanto no tempo de incubação da técnica. Desta forma, ao realizar a análise de cinco amostras de óleo para isolamento elétrico, alcançou maior sensibilidade quando comparada a dos kits de ensaio comercial. Foram feitos alguns testes com diluição direta, extração líquida, extração ácida e em fase sólida, obtendo-se melhor recuperação nesta última. Desta forma obteve-se maiores valores nas medições da quantidade total de PCBs tanto na amostra quanto no padrão.

Os trabalhos mencionados lidam com diferentes matrizes, objetivando um tipo de análise feita sobre diferentes formas de extração ou quantidade de congêneres. Grande parte das análises são realizadas sob a ótica das técnicas de Imunoenensaio e Cromatografia Gasosa (NRC, 2011), ainda que apareçam alguns estudos que fazem esta determinação por potenciometria. ANTONELLO et al. (2007) promoveram um estudo para determinação de PCBs em óleos minerais isolantes através da técnica potenciométrica com eletrodo seletivo para cloreto. O trabalho encontrou resultados satisfatórios quando comparados com os obtidos por análise cromatográfica e propôs o método avaliado como uma solução econômica para uma análise de fácil operação, apesar de estar limitado ao monitoramento em faixas de contaminação próximas a $50 \mu\text{g mL}^{-1}$.

2.5.1 Análise por Imunoenensaio

A técnica de imunoenensaio utilizada para determinação de bifenilas policloradas é conhecida como Ensaio Imunológico com Absorção Enzimática (ELISA). Esta técnica descrita por ENGVALL e PERLMANN (1971) baseia-se na interação antígeno-anticorpo na qual uma enzima é ligada de forma covalente a um anticorpo específico formando um complexo que irá ligar-se com o antígeno (espécie de interesse) e originar um produto colorido que indica a presença do mesmo. Para quantificação dos dados torna-se necessário a utilização de um fotômetro diferencial que irá reproduzir os valores de concentração. Sua aplicação para determinação de bifenilas policloradas foi patenteada em 1994 como um método para quantificar com precisão estas substâncias através da utilização de reagentes concorrentes que competem com as PCBs presentes na amostra para ligar-se em sítios ativos de anticorpos que reconhecem e tem afinidade por estes congêneres (CARLSON e SWANSON, 1994). Disponível como um kit de análise conhecido como EnviroGard PCB Test Kit[®] desenvolvido pela Milipore Inc. (atual Merck Milipore), é utilizado para

verificação de amostras ambientais permitindo apenas uma análise de matrizes com maior grau de contaminação, pois a técnica apresenta, de acordo com a fabricante, um limite de detecção de $3,3 \text{ mg kg}^{-1}$. Sua utilização em campo com a análise de amostras de solo e tecido de peixe, coletados na região dos Grandes Lagos da América do Norte, apresentou uma sensibilidade na ordem de $0,83$ a $1,1 \text{ mg kg}^{-1}$ para sedimentos e de $1,6$ a $1,7 \text{ mg kg}^{-1}$ para tecidos de peixe (RITCHER et al., 1994).

Em termos de custo este tipo de análise torna-se menos dispendiosa do que outras técnicas clássicas além de ser capaz de realizar uma verificação mais rápida, contudo apresenta apenas resultados relativos à quantidade total de PCBs não sendo possível resolvê-los separadamente, além de apresentar menor sensibilidade quando comparada a cromatografia gasosa.

2.5.2 Análise por Cromatografia Gasosa

Atual técnica difundida para análise de bifenilas policloradas e utilizada no escopo deste trabalho, a cromatografia, segundo LANÇAS e MCNAIR (1983), trata-se de um método físico de separação que basicamente envolve a partição de alguns componentes através de duas fases: uma delas fixa e composta por uma grande área superficial denominada *fase estacionária*, e outra contendo os componentes a serem separados que percola através da fase estacionária denominada *fase móvel*. Quando classificada como cromatografia gasosa (GC), esta, por sua vez, utiliza a fase móvel no estado gasoso a qual é composta por uma alíquota da amostra vaporizada contendo as espécies de interesse e o gás de arraste, constituído por um componente inerte de alta pureza cujo propósito é transportar as moléculas através da coluna de separação.

Componente chave para a separação e resolução das espécies de interesse, a coluna de separação é o item que comporta a fase estacionária podendo ser utilizada de diferentes formas de acordo com sua aplicação. Atualmente a coluna capilar com recobrimento interno (fase estacionária) é o tipo de coluna mais utilizada nas análises cromatográficas. Recobertas geralmente com polissiloxanas possuindo hidroxilas terminais, permite a utilização de maiores temperaturas e análise de compostos com maiores massas molares (PEREIRA et al., 1996). Este tipo de coluna apresenta normalmente diâmetros na ordem de $0,15$ a $0,75 \text{ mm}$ com comprimentos que vão de 10 a 100 m . Além disso, devido seu grande poder de resolução permitiu que a técnica evoluísse para uma nova nomenclatura: Cromatografia Gasosa de Alta Resolução (HRGC).

O procedimento de preparo da amostra para posterior análise no equipamento é uma etapa de extrema importância na análise por cromatografia gasosa. Ela tem como objetivo a

separação dos compostos de interesse de outros que são interferentes oriundos da matriz. A extração constitui uma operação determinante para segregação das substâncias de interesse o que, no caso das PCBs, fundamenta-se no seu caráter apolar. Quando se promove a análise destas substâncias e a amostra tem sua matriz no estado líquido é possível tanto solubilizá-la através de um solvente orgânico em uma extração líquido-líquido, quanto retê-la em um filme sorvente (fase sólida) em uma extração em fase sólida. O trabalho de PENTEADO e VAZ (2001) cita que para solos e sedimentos as extrações mais utilizadas são por ultrassom, centrifugação e por extrator soxhlet. No caso de amostras sólidas também é necessária a etapa de *cleanup* que utiliza basicamente a adsorção em fase sólida para que ocorra a “limpeza” do extrato da matriz pela eliminação de qualquer interferente (CAVALCANTE et al., 2008). Um procedimento comum para a adsorção é a cromatografia de coluna, na qual se preenche a mesma com uma fase estacionária (solvente) na presença do material adsorvente, geralmente sílica e/ou alumina, sobre o qual circula uma fase móvel líquida contendo o extrato da matriz (DEGANI et al., 1998). Na saída da coluna utiliza-se ainda um microfiltro de forma a evitar a passagem de qualquer partícula sólida no extrato final.

Na quantificação do teor de PCBs em amostras ambientais, a cromatografia gasosa pode ser utilizada por meio de dois modos de operação: um método baseado na comparação com misturas técnicas e outro baseado na quantificação individual de congêneres. No método comparativo há na amostra a quantificação de um subconjunto de PCBs, os quais estão presentes em misturas técnicas, comparando seus perfis cromatográficos para obter-se uma estimativa da concentração destes congêneres. Por outro lado, no método de quantificação individual a análise é feita sobre cada congêneres, resultando em um cromatograma mais preciso que descreve o perfil de PCBs presentes na amostra.

O método 1668B (USEPA, 2008), publicado pela agência de proteção ambiental norte americana, é um exemplo de guia que serve de orientação para as práticas de análise baseada nos dois modos de operação. Nele há recomendações do aparato para preparo e análise da amostra. Para extração em fase líquida, cita a utilização de funil de separação e para extração em fase sólida a utilização de cartuchos SPE (Solid Phase Extraction). Recomenda a utilização de evaporador rotatório, concentrador Kuderna-Danish ou evaporador com nitrogênio para secagem do solvente e *vials* de vidro para acondicionar a amostra concentrada. Também especifica condições para análise por cromatografia gasosa tais como modo de injeção *splitless* (toda amostra injetada entra na coluna) e programa de temperatura.

A norma brasileira NBR 13882 (ABNT, 2005) expressa dois métodos para determinação de PCBs oriundas de líquidos isolantes elétricos não halogenados. Nela é apresentada a cromatografia gasosa com detecção por captura de elétrons como um método de análise do teor e do tipo de PCB. Estabelece uma recomendação quanto às condições cromatográficas a serem utilizadas e também acerca do tratamento para purificação da amostra, sendo este feito em uma coluna de extração em fase sólida. Informa que a quantificação é feita sobre curva de calibração construída a partir de soluções padrão Aroclor e que o limite de detecção do método é apreciado em 2 mg L^{-1} .

A metodologia de análise deste trabalho guiou-se em algumas instruções previstas no método 1668B da USEPA, apresentando diferenças no que tange a etapa de concentração e condições cromatográficas. Desta forma buscou-se desenvolver uma metodologia de trabalho rápida o suficiente para permitir seu uso de forma rotineira em um laboratório de análise, sendo capaz de lidar com um maior volume de amostras. Enquanto o programa de temperatura proposto pelo método 1668B resulta numa análise cromatográfica de aproximadamente 1 hora, será enfoque do método proposto reduzir este tempo, para permitir maior rotatividade no número de amostras analisadas, porém mantendo um limite de quantificação capaz de atender a CONAMA 396.

O sistema de detecção que apresenta atualmente uma série de vantagens para identificação de congêneres de PCBs é o detector seletivo de massas ou Espectrômetro de massas (MS). Este tipo de detector oferece maior seletividade na aquisição de dados em uma operação rotineira uma vez que trabalha na detecção dos íons específicos de cada analito de interesse. Acoplado ao cromatógrafo gasoso (GC), origina a técnica de enfoque do presente trabalho, a Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (GC-MS).

3 Materiais e Métodos

3.1 Reagentes

Para validar o estudo, soluções padrão foram preparadas a partir de uma solução padrão de PCBs contendo 21 compostos na concentração de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ certificada pelo nome *PCB Calibration Check Solution* da AccuStandard® Inc. As diluições realizadas a partir desta solução foram feitas utilizando acetona de alta pureza (100%), obtida em garrafa de 4 L e comercializada pela Honeywell®. Diclorometano grau pesticida (Honeywell®) obtido em garrafa de 4 L e sulfato de sódio anidro em frasco de 1 kg (Dinâmica® Química Contemporânea Ltda). foram utilizados nas extrações em fase líquida. Extran (Merck®) em fase líquida foi utilizado no preparo dos banhos de imersão para limpeza de vidraria.

3.2 Instrumentação

O equipamento utilizado para a análise dos compostos de interesse foi um cromatógrafo gasoso modelo GC-2010 Plus equipado a sua esquerda com um espectrômetro de massas modelo QP2010 ULTRA fabricado pela Shimadzu Corp. (Kyoto, Japão) o qual é ilustrado na Figura 3. Para injeção de amostras no equipamento utilizou-se um autoinjeter AOC-5000 da Shimadzu Corp. com capacidade para operar no modo *headspace* e injeção líquida, equipado com seringa de $10 \mu\text{L}$ para recolhimento das alíquotas. A coluna cromatográfica utilizada foi uma ZB-5ms (Zebron) comercializada pela Phenomenex® com 10 metros de comprimento e 0,10 mm de diâmetro, cujo recheio contém uma camada interna de $0,10 \mu\text{m}$ de espessura composto de 5% difenil e 95% dimetilpolisiloxano. O programa de temperatura utilizado para a corrida cromatográfica está descrito na Tabela 3, contemplando um tempo total de aproximadamente 8,5 minutos. O gás de arraste utilizado foi Hélio com pureza de 99,999% fornecido em cilindro de 200 bar comercializado pela empresa Linde (Linde AG, Alemanha). Uma bomba de vácuo com palhetas rotativas Edwards E2M 1.5 (BOC Edwards, Reino Unido) foi utilizada para atingir uma pressão abaixo de 1.10^{-4} Pa nas corridas cromatográficas.

Figura 3. Cromatógrafo GC-2010 Plus com espectrômetro de massas QP2010 ULTRA.



Tabela 3. Programa de temperatura utilizado para análise no cromatógrafo gasoso GCMS-QP2010 ULTRA.

Etapa	Temperatura (°C)	Rampa (°C/s)	Patamar (s)
1	60	-	0,5
2	300	40	2

3.3 Condições do equipamento

As condições que estabelecem a injeção de amostra, pressão do gás de arraste, vazões utilizadas e temperatura na fonte estão descritas na Tabela 4. Estes parâmetros são fixados através do software do equipamento GCMS Real Time Analysis.

Tabela 4. Condições do equipamento para corrida cromatográfica.

Item	Parâmetro	Modo Configurado
FONTE	Temperatura da fonte (°C)	300
	Temperatura da interface (°C)	300
INJEÇÃO	Modo de injeção	<i>Splitless</i>
	Volume injetado (µL)	1
	Temperatura de injeção (°C)	300
	Gás de arraste	Hélio
PRESSÃO E VAZÃO	Pressão primária (kPa)	550
	Pressão (kPa)	291,4
	Vazão total (mL min ⁻¹)	10,5
	Vazão na coluna (mL min ⁻¹)	0,47
	Vazão de purga (mL min ⁻¹)	3

Sendo o local de realização do estudo um laboratório de análises, o mesmo forneceu um controle da temperatura e umidade da sala do equipamento, juntamente com linhas de gás que não indicaram nenhuma espécie de vazamento; considerou-se essas condições constantes ao longo do estudo.

3.4 Programação da metodologia de análise do equipamento

No software do equipamento são fixadas as condições de temperatura, injeção e vazão do cromatógrafo, estabelecendo assim um método de análise que irá ser conduzido toda vez que a corrida cromatográfica for realizada. Neste método também são estabelecidas as condições do espectrômetro de massas, sendo elas, a temperatura da fonte de íons e o modo de operação. Este tipo de detector permite trabalhar com dois modos de operação: modo SCAN e modo SIM. Em ambos necessita-se explicitar o intervalo de tempo em que ocorrerá a varredura de massas pelo detector a contar do início do programa de temperatura. O presente estudo ponderou intervalo de 1 a 8 minutos da corrida cromatográfica para varredura tendo em vista que os congêneres de interesse aparecem nessa faixa.

O modo SCAN que fornece uma varredura não seletiva de massas pelo espectrômetro foi utilizado, pois possui menor sensibilidade, para averiguar a possibilidade de identificação dos congêneres presentes na solução padrão utilizada. O modo SIM (Monitoramento

Seletivo de Íons), utilizado para o desenvolvimento do estudo, apresenta maior seletividade, uma vez que monitora especificamente apenas as espécies de íons selecionados dentro da janela analítica especificada.

Apesar dos congêneres apresentarem muitas semelhanças estruturais sendo em grande parte isômeros, cada um apresenta um conjunto de íons característicos quando submetidos a análise por espectrometria de massas. Desta forma, quando o método SIM é selecionado, abre-se a possibilidade de monitorar para cada congêneres o íon principal de interesse e alguns mais, denominados íons de referência, os quais foram especificados com base nas bibliotecas do NIST (Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia). Assim, foi possível programar o método para que houvesse a varredura dos íons referentes a cada congêneres presente no padrão analisado. Os valores expressos na forma de razão massa/carga foram retirados do arquivo de biblioteca NIST que acompanha a base de dados do software do equipamento e inseridos no método desenvolvido. A Tabela 5 apresenta os íons inseridos no programa para análise de cada congêneres presente no padrão analisado e o seu respectivo tempo de retenção.

Tabela 5. Lista de congêneres analisados, seus respectivos íons monitorados e tempos de retenção.

<i>PCB Calibration Check Solution</i>	Íon principal	Íons de referência	t_r
Congêneres		m/z	minutos
<i>PCB 8</i>	152	222, 224	4,365
<i>PCB 18</i>	186	256, 258	4,605
<i>PCB 28</i>	186	256, 258	4,88
<i>PCB 44</i>	220	222, 292	5,165
<i>PCB 52</i>	292	220, 290	5,06
<i>PCB 66</i>	292	220, 290	5,4
<i>PCB 77</i>	292	220, 290	5,725
<i>PCB 101</i>	326	254, 328	5,51
<i>PCB 105</i>	326	324, 328	5,97
<i>PCB 118</i>	326	324, 328	5,842
<i>PCB 126</i>	326	324, 328	6,145
<i>PCB 128</i>	360	362, 145	6,215
<i>PCB 138</i>	290	360, 145	6,075
<i>PCB 153</i>	360	362, 145	5,94
<i>PCB 170</i>	394	396, 324	6,55
<i>PCB 180</i>	394	396, 324	6,405
<i>PCB 187</i>	394	396, 162, 324	6,145
<i>PCB 195</i>	430	428, 358	6,77
<i>PCB 201</i>	430	428, 358	6,34
<i>PCB 206</i>	464	462, 394, 196	7,1
<i>PCB 209</i>	498	214, 500, 496	7,305

Apesar de alguns congêneres apresentarem os mesmos íons monitorados, estes aparecem em tempos de retenção diferentes para cada composto, devido às diferenças de seu ponto de ebulição e de interação destes compostos com a fase estacionária. A verificação do tempo de retenção de cada congênere foi realizada através da injeção da solução padrão com os 21 parâmetros na concentração de 0,1 ppm, possibilitando a identificação de cada pico.

Como no cromatograma aparecem picos referentes a íons idênticos em tempos diferentes, identificá-los não é uma tarefa intuitiva sem conhecer sua ordem de eluição. O método 1668B da USEPA apesar de apresentar dados de uma análise realizada em coluna DB-1 (100% dimetilpolisiloxano), foi utilizado como referência para verificar o tempo de retenção de alguns congêneres com os mesmos íons monitorados. Para identificação de todos os componentes do presente estudo, utilizou-se outros textos da literatura que promovem a determinação dos 209 congêneres.

No trabalho descrito por MATSUMURA et al. (2002) caracterizou-se todos os 209 congêneres a partir de soluções padrão utilizando uma coluna HT8 (8% difenil) obtendo-se a ordem de eluição de todos os compostos. O mesmo ocorreu no trabalho de MYDLOVÁ-MEMERSHEIMEROVÁ et al. (2009) os quais trabalharam com a separação dos 209 congêneres em uma coluna capilar DB-5. Desta forma configurou-se o método pela ordem de aparição destes compostos, uma vez que as condições das colunas sejam próximas às utilizadas neste estudo

3.5 Proposta de validação do método de análise

A análise da adequação do método foi feita com base nos parâmetros analíticos propostos, em caráter de orientação, pelo Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO), no documento DOQ-CGCRE-008 (INMETRO, 2010) para a validação de ensaios laboratoriais, que são:

- Seletividade
- Linearidade
- Faixa de trabalho e Faixa linear
- Limite de Detecção
- Limite de Quantificação
- Tendência/recuperação
- Precisão
 - Repetitividade
 - Precisão Intermediária
 - Reprodutibilidade
- Robustez

3.5.1 Seletividade

Para verificar a seletividade do método utilizou-se as configurações programadas no software do equipamento para monitorar cada íon referente aos parâmetros presentes na solução padrão, que foi injetada a concentração de 0,1 mg L⁻¹. Os dados obtidos serviram para verificar o poder de resolução da técnica e confirmar o tempo de retenção de cada parâmetro.

O trabalho de revisão de RIBANI (2004) cita que é possível avaliar a seletividade através da comparação do espectro de picos obtidos na análise de um padrão em comparação com o de uma amostra. Desta forma realizou-se testes comparando dados obtidos de duas injeções, uma delas da amostra contendo a matriz de interesse, e a outra da solução padrão. A amostra obtida de uma empresa petroquímica e utilizada como água para consumo humano foi escolhida visando atendimento da CONAMA 396. O cromatograma obtido pela injeção da amostra após extração líquida foi comparado com aquele referente à solução padrão. Os picos provenientes da análise do padrão tiveram seus espectros de massas comparados com os obtidos no cromatograma da amostra ao mesmo tempo de retenção.

3.5.2 Linearidade

A linearidade representa a capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância analisada, dentro de uma faixa de aplicação (ICH, 1995). Como a relação entre a concentração das substâncias de interesse e o sinal obtido no método não é previamente conhecida, torna-se necessária a utilização de padronização interna ou externa para obter-se esta relação (INMETRO, 2010).

A relação entre a concentração dos congêneres e o sinal da análise cromatográfica foi obtida através de padronização externa, analisando-se diferentes concentrações da solução padrão. Assim construiu-se a curva de calibração, a qual correlaciona a concentração do analito com a área integrada do pico correspondente ao congênere identificado, através da Equação 1:

$$y = ax + b \quad (1)$$

Sendo:

y = área sob o pico;

a = inclinação da curva (sensibilidade);

x = concentração do analito;

b = intersecção com o eixo *y* quando *x* = 0.

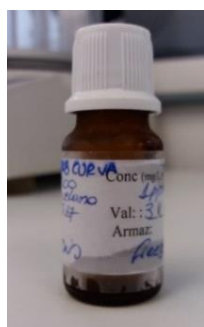
3.5.3 Faixa de trabalho e faixa linear

Para implementação de um ensaio há uma faixa de concentrações na qual é possível realizar a análise. De acordo com o documento DOQ-CGCRE-008 (INMENTRO, 2008) a faixa de trabalho deve cobrir o intervalo de aplicação do ensaio e conter a quantidade de interesse ao centro desta faixa juntamente com o limite de quantificação próximo ao limite inferior.

A validação do ensaio proposto para determinação de PBCs envolveu uma faixa de trabalho com o objetivo de cobrir a quantidade alvo dos parâmetros de interesse em função da resolução 396 da CONAMA que coloca como valor máximo permitido (VMP) a quantidade de $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$ de bifenilas policloradas para água de consumo humano e um limite de quantificação de $0,01 \mu\text{g L}^{-1}$. Para atender este requisito utilizando um equipamento com limite de detecção mais elevado, utilizou-se a concentração prévia da amostra. Desta forma, foi proposto um ensaio com etapa de preparo que, ao receber 1 L de amostra, a concentra para um volume final de 1 mL. Devido a esta etapa de concentração, se a resolução atendida indica uma tolerância de até $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$, este valor ao final do ensaio é equivalente a $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ou $500 \mu\text{g L}^{-1}$. Desta forma optou-se por trabalhar em quantidades menores que o VMP de forma apresentar uma validação criteriosa.

Diluições necessárias para aplicação da faixa de trabalho foram realizadas a partir da solução mãe de 1 mg L^{-1} ilustrada na Figura 4, a qual foi preparada a partir do padrão certificado. A faixa de concentrações coberta pela curva de calibração foi de $0,7$ a $10 \mu\text{g L}^{-1}$ (ppb) num total de 5 pontos avaliados em duplicata.

Figura 4. Solução mãe de 1 mg L^{-1} do padrão de curva de PCBs.



A análise da faixa de linearidade da curva de calibração foi realizada no software Microsoft Excel® 2016, avaliando-se os resíduos de interpolação e as razões sinal/massa, conforme sugerido por AUGUSTO et al. (2000).

Em relação aos resíduos de interpolação, definidos como a diferença entre o valor da área do pico obtido experimentalmente e o previsto pela Equação 1, foi analisada a

aleatoriedade destes em um gráfico de resíduos por concentração do analito. Nesta análise, assume-se comportamento linear para um dado componente quando a distribuição obtida não apresenta indícios de um erro sistemático.

Adicionalmente, sabe-se que quando uma curva analítica não apresenta erros indeterminados e está dentro de uma faixa linear, a razão sinal/massa de cada ponto experimental corresponde exatamente ao coeficiente angular da equação da reta (AUGUSTO et al, 2000). Desta forma, considerou-se uma faixa de erro aceitável entre 95 e 105% do valor correspondente ao coeficiente angular da equação da reta obtida e calculou-se a razão sinal/massa de cada ponto experimental da curva dos PCBs analisados. Assim, como uma verificação adicional da faixa linear, plotou-se o gráfico de razão sinal/massa por concentração de analito e foi avaliado se todos os pontos obtidos corresponderam a um valor do coeficiente angular inserido dentro da faixa de erro aceitável.

3.5.4 Limite de Detecção

O limite de detecção (LD) corresponde à menor concentração da substância de interesse que pode ser detectada, não sendo necessariamente quantificável neste valor. De acordo com o trabalho de RIBANI et al. (2004) há três maneiras distintas de calcular-se o LD, sendo elas: método visual, método relação sinal-ruído e método baseado em parâmetros da curva analítica. O método aqui utilizado envolveu os parâmetros da curva analítica, uma vez que estes dados já estavam disponíveis. A expressão que representa o cálculo do LD está representada na Equação 2 abaixo:

$$LD = 3,3 * \frac{s}{S} \quad (2)$$

onde s corresponde à estimativa do desvio padrão amostral da resposta obtida na análise do branco e S o valor do coeficiente angular da curva analítica da substância de interesse.

Realizou-se a análise de 10 medidas do branco através do método desenvolvido. Para simulação da matriz aquosa utilizou-se água deionizada obtida do sistema Milli-Q fornecido pela Millipore Corporation e foi realizada extração líquido-líquido utilizando diclorometano como solvente. Em cada branco analisado integrou-se o pico correspondente ao tempo de retenção estabelecido para cada PCB avaliado no método desenvolvido e suas respectivas áreas foram compiladas para uma planilha do software Microsoft Excel® 2016, na qual realizou-se o tratamento estatístico para determinação dos valores de desvio padrão. O coeficiente angular utilizado foi obtido das curvas analíticas de cada PCB.

3.5.5 Limite de Quantificação

O limite de quantificação (LQ) corresponde à menor concentração da substância que pode ser mensurada e geralmente corresponde ao padrão de calibração de menor valor (INMENTRO, 2008). O trabalho de revisão sobre validação de RIBANI et al. (2004) informa que os mesmos critérios adotados para o cálculo do LD podem ser utilizados, contudo recomenda que no caso de técnicas analíticas baseadas em separação como a cromatografia este parâmetro seja calculado através dos parâmetros da curva analítica, uma vez que esta é estatisticamente mais confiável. A expressão utilizada para cálculo do LQ está apresentada na Equação 3:

$$LQ = 10 * \frac{S}{S} \quad (3)$$

Os valores de desvio padrão e coeficiente angular são os mesmos utilizados na Equação 2 e, portanto, obtidos das mesmas medidas dos brancos empregadas no cálculo do LD. Os valores do LQ foram expressos em termos de concentração, conforme descrito pela curva analítica.

3.5.6 Tendência/recuperação

Um dos parâmetros para avaliar-se a exatidão da validação de um ensaio é a recuperação dos analitos de interesse. De acordo com THOMPSON et al. (1999), a recuperação é definida como a proporção da substância de interesse presente ou adicionada na porção analítica do material teste, que é extraída e passível de ser quantificada. O boletim informativo descrito por PEREZ (2010) cita em tabela que o intervalo de recuperação aceito varia de acordo com a concentração do analito. Para o presente estudo, ao trabalhar com quantidades na ordem de partes por bilhão, aceitou-se uma faixa de recuperação entre 80 a 110%.

Realizou-se a extração líquido-líquido (ELL) como método para avaliação da recuperação dos congêneres após a análise cromatográfica. Iniciou-se esta etapa com o preenchimento de funis de separação de teflon comercializados pela Thermo Scientific com 1 litro de água ultrapura conforme ilustrado na Figura 5. Cada amostra aquosa foi fortificada em duplicata com 1 mL da solução de PCBs a concentração equivalente a um ponto da curva de calibração. Realizou-se a análise de recuperação nas concentrações de 1, 4 e 10 µg L⁻¹, cujas soluções foram preparadas no mesmo dia da extração. Abaixo de cada funil alocou-se um frasco de vidro de 250 mL fabricado pela Schott sobre o qual foi posicionado um funil de vidro coberto com papel microfiltro. Preencheu-se cada papel filtro com 30 g de sulfato de sódio de forma a evitar a passagem de água para o frasco de vidro.

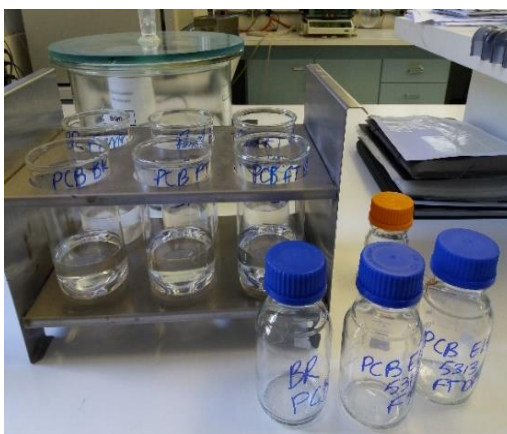
Após os funis de separação estarem preenchidos com a matriz fortificada, avolumou-se em uma proveta de 100 mL aproximadamente 60 mL de diclorometano para sua adição em cada funil. Com a separação das duas fases promoveu-se a homogeneização das mesmas através de agitação manual por 2 minutos. Ao final do tempo de mistura, aguardou-se a decantação das fases (Figura 5) para que fossem abertas as torneiras havendo o recolhimento da fase orgânica.

Figura 5. Extração em fase líquida para análise de recuperação da validação.



O procedimento de adição de solvente com posterior agitação foi realizado três vezes, recolhendo o volume total de 180 mL da fase orgânica. Este volume por fim foi levado para etapa de concentração no equipamento Syncore. Para tal, a fase orgânica é transferida para um copo de vidro (Figura 6) contendo um dedal inferior com marcação calibrada em 1 mL, previamente lavado com diclorometano para retirada de impurezas.

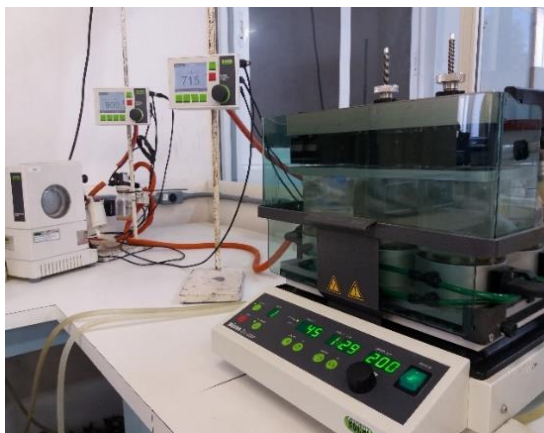
Figura 6. Copos de vidro para uso no equipamento Syncore.



Posteriormente, os copos preenchidos foram inseridos no equipamento Syncore cujo sistema, ilustrado na Figura 7, foi configurado para promover a concentração à vácuo da fase orgânica na temperatura de 45 °C durante 1h e 40 minutos sob agitação de 200 rpm e uma pressão de aproximadamente 700 mbar. O tempo de secagem do solvente mostrou-se

propício para alcançar a marca de 1 mL do copo, volume que, após esta etapa, foi inserido em *vial* de vidro de 2 mL utilizando uma pipeta de pasteur.

Figura 7. Sistema de concentração do equipamento Syncore.



Os *vials* contendo o extrato utilizado para avaliar a recuperação dos congêneres foram analisados pela técnica GC-MS juntamente com a injeção do padrão puro na mesma concentração, ou seja, injetou-se no equipamento o padrão logo antes da análise dos extratos de mesma concentração, desta forma realizou-se a comparação entre áreas para o cálculo de recuperação. Antes das análises injetou-se diclorometano puro no equipamento para retirada de quaisquer interferentes na coluna.

3.5.7 Precisão

A precisão representa a dispersão de resultados obtidos no ensaio de determinação. O documento DOQ-CGCRE-008 (INMENTRO, 2008) relata que este parâmetro é usualmente avaliado pelo desvio padrão relativo sendo que as formas mais comuns de o expressar são: por meio da repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade.

3.5.7.1 Repetitividade

A repetitividade foi avaliada a partir da concordância entre resultados obtidos de medições sucessivas. O documento DOQ-CGCRE-008 (INMENTRO, 2008) informa que este parâmetro pode ser expresso a partir da análise de um padrão em um mesmo instrumento utilizado sob iguais condições.

Esta análise foi realizada ao preparar-se uma solução contendo o padrão de curva a uma concentração de $4 \mu\text{g L}^{-1}$ a qual foi injetada 7 vezes consecutivas no equipamento. O desvio padrão relativo da concentração obtida de cada parâmetro foi calculado pela Equação 4:

$$RSD(\%) = \frac{SD}{M} * 100 \quad (4)$$

onde SD é o desvio padrão obtido da dispersão dos valores de concentração obtidos da análise do padrão e M a média das concentrações obtidas destas análises.

A verificação da confiabilidade dos dados obtidos foi realizada a partir da aplicação do teste t de Student bilateral para média de uma amostra através da Equação 5:

$$T_{observado} = \frac{\bar{x} - \mu_o}{\frac{s}{\sqrt{n}}} \quad (5)$$

onde o valor de \bar{x} representa a média dos valores de concentração medidos, μ_o o valor fixo de concentração para comparação com a média da amostra, s o desvio padrão das concentrações medidas e n o tamanho da amostra. Utilizando um valor de $\alpha = 0,05$ e assumindo o conjunto de hipóteses que indicam se as médias são ou não estatisticamente iguais, temos abaixo:

1. Hipótese Nula: não existe diferença estatisticamente significativa entre a média calculada e o valor de interesse, neste caso $\bar{x} = \mu_o$;
2. Hipótese Alternativa: existe uma diferença estatisticamente significativa entre a média calculada e o valor de interesse, neste caso $\bar{x} \neq \mu_o$;

3.5.7.2 Precisão Intermediária

Este parâmetro tem como objetivo promover a verificação das variações que sofre uma análise laboratorial de uma amostra ou padrão por um mesmo método devido a eventos como: diferentes analistas, diferentes instrumentos ou diferentes dias de análise (ICH, 1995). Avaliou-se a precisão intermediária através da análise de uma solução contendo padrão de curva a concentração de $4 \mu\text{g L}^{-1}$, a qual foi injetada 7 vezes, sendo todas as injeções realizadas em dias diferentes. Os valores de concentração obtidos após análise de área de todos os picos de cada parâmetro foram compilados para o software Excel e analisadas pelo RSD e teste t de Student conforme equações 4 e 5 utilizadas na verificação da repetitividade.

3.5.7.3 Reprodutibilidade

A verificação da reprodutibilidade é realizada através de resultados colaborativos entre mais de um laboratório com competências similares ao do que propõe a validação. Este item não foi utilizado para computar a análise de precisão, pois a IUPAC recomenda o envolvimento de diferentes laboratórios em seu guia (THOMPSON et al., 1999), sendo impraticável devido ao tempo proposto para realização deste estudo.

3.5.8 Robustez

A robustez representa a capacidade do método de estabelecer os mesmos resultados frente a variações deliberadas ou não de seus parâmetros, sejam eles concentração de solvente, natureza do gás de arraste, programa de temperatura, entre outros (ICH, 1995).

Na análise deste parâmetro verificou-se as variações ocasionadas na área dos picos referentes a cada congênere alterando o patamar de temperatura do programa para maiores e menores valores na ordem de 15 °C e 20 °C. Para tal, modificou-se algumas condições no método conforme expressado na Tabela 6. A partir de cada alteração injetou-se soluções com padrão de curva em concentrações referentes aos pontos de concentrações 1, 4 e 10 µg L⁻¹ da curva analítica.

Tabela 6. Condições de alteração do método para análise de robustez.

CONDIÇÃO 1		CONDIÇÃO 2	
Patamar de Temperatura Final	315 °C	Patamar de Temperatura Final	280 °C
Temperatura da Fonte de Íons	300 °C	Temperatura da Fonte de Íons	280 °C
Temperatura da Interface	315 °C	Temperatura da Interface	280 °C

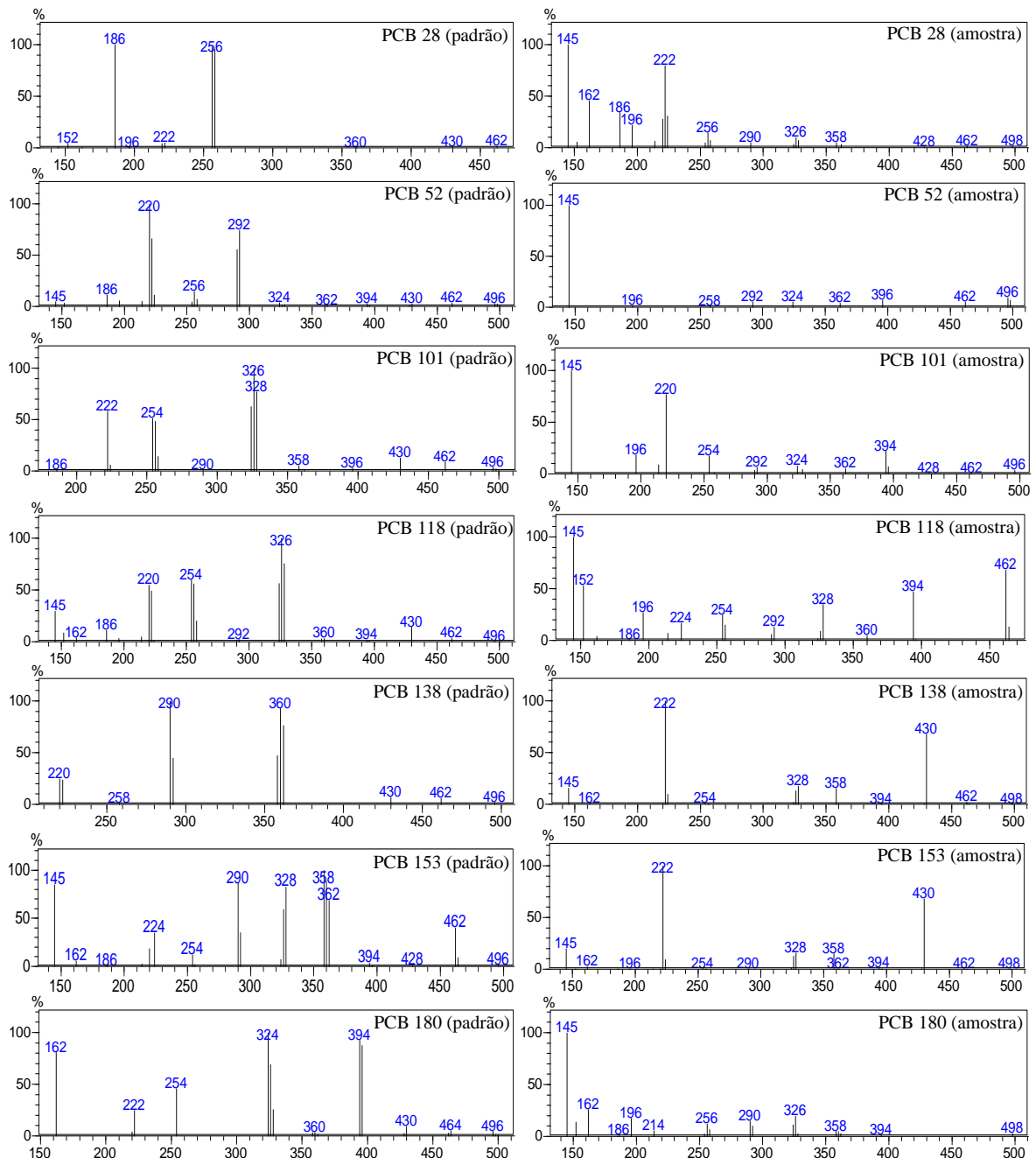
Em primeiro momento injetou-se o padrão referente a cada concentração nas condições previstas pelo método proposto de forma a realizar uma comparação entre as áreas de cada condição. Após análise dos padrões nas alterações propostas, compilou-se os dados de área para o software Excel de forma a comparar as variações através da análise do desvio padrão.

4 Resultados

4.1 Seletividade

A seletividade do método desenvolvido foi analisada a partir da comparação entre os espectros de massa obtidos da análise de uma amostra de água para consumo humano e da análise de um padrão de 0,1 ppm. Os dados foram comparados a partir do espectro obtido no tempo de retenção de cada congênere. Os espectros de alguns congêneres exigidos pela resolução brasileira são ilustrados na Figura 8, os quais demonstram uma clara diferença na presença dos íons monitorados pelo método no padrão frente aos da amostra indicando boa seletividade.

Figura 8. Comparativo entre alguns espectros de massa de padrão de 0,1 ppm (esquerda) e amostra em matriz aquosa (direita).



Apesar da técnica ser seletiva, os dados não são totalmente conclusivos quanto a possível interferência da matriz na análise de alguns íons, uma vez que a amostra não foi fortificada com o padrão no seu preparo, ficando esta verificação em aberto para possíveis trabalhos futuros.

4.2 Curva de Calibração

A montagem da curva de calibração envolveu o preparo de 5 soluções de trabalho nas concentrações 0,7, 1, 4, 8 e 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ (expressos em ppb) a partir de sucessivas diluições do padrão com valor certificado de 100 mg L^{-1} . Injetou-se as soluções de trabalho em duplicata utilizando uma coluna cromatográfica nova para posterior elaboração da curva. A partir do método proposto, as equações das curvas obtidas para todos os parâmetros estão apresentadas na Tabela 7, os cromatogramas ilustrados no APÊNDICE A e as curvas no APÊNDICE B.

Tabela 7. Parâmetros e coeficiente de determinação das curvas de calibração ($y = a x + b$) dos congêneres analisados.

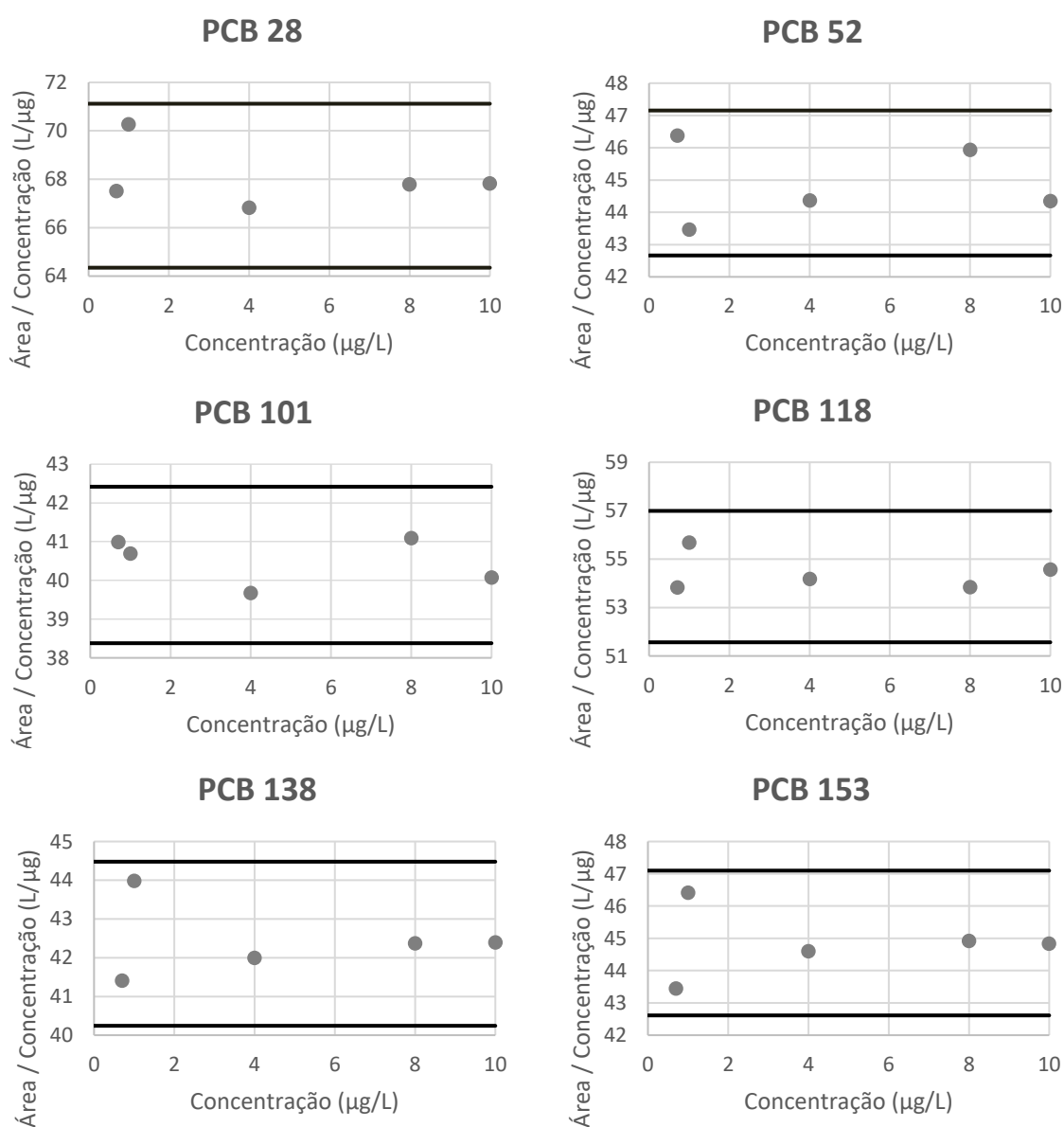
Parâmetro	Equação	Coeficiente de determinação (r^2)
<i>PCB 8</i>	$y = 108,332.x - 33,394$	0,999528
<i>PCB 18</i>	$y = 70,095.x + 15,547$	0,998456
<i>PCB 28</i>	$y = 67,677.x - 7,292$	0,999926
<i>PCB 44</i>	$y = 61,131.x - 13,464$	0,999650
<i>PCB 52</i>	$y = 44,914.x - 7,592$	0,999219
<i>PCB 66</i>	$y = 60,697.x - 3,604$	0,999958
<i>PCB 77</i>	$y = 47,865.x - 16,082$	0,999481
<i>PCB 101</i>	$y = 40,398.x + 1,310$	0,999559
<i>PCB 105</i>	$y = 49,082.x - 5,748$	0,999823
<i>PCB 118</i>	$y = 54,275.x - 21,964$	0,999895
<i>PCB 126</i>	$y = 68,099.x - 17,189$	0,999441
<i>PCB 128</i>	$y = 29,527.x - 3,457$	0,999953
<i>PCB 138</i>	$y = 42,379.x + 0,623$	0,999965
<i>PCB 153</i>	$y = 44,355.x + 10,557$	0,999579
<i>PCB 170</i>	$y = 23,750.x - 2,777$	0,999812
<i>PCB 180</i>	$y = 30,456.x + 17,435$	0,999731
<i>PCB 187</i>	$y = 28,129.x + 10,869$	0,999792
<i>PCB 195</i>	$y = 25,324.x + 11,562$	0,999382
<i>PCB 201</i>	$y = 33,794.x + 2,429$	0,999615
<i>PCB 206</i>	$y = 18,281.x + 1,845$	0,999975
<i>PCB 209</i>	$y = 21,382.x + 21,545$	0,999780

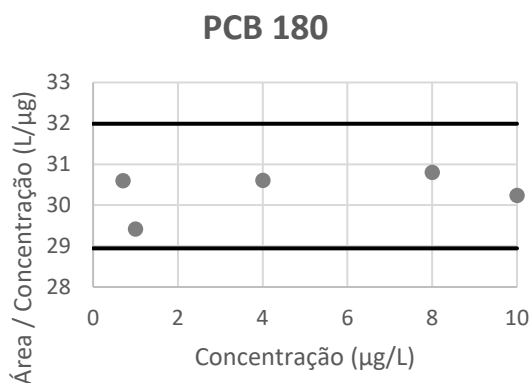
Todas as curvas elaboradas no programa GCMS Postrun Analysis forneceram um coeficiente de determinação com valores acima de 0,99 indicando forte correlação entre concentração de analito e sinal obtido. Os valores em duplicata das áreas obtidas para cada parâmetro apresentaram uma dispersão máxima com um RSD de 7%. Nos respectivos

gráficos de resíduos por concentração da curva de cada congêneres, não se observou qualitativamente a aparição de alguma tendência de erro sistemático, assumindo-se assim comportamento linear.

A Figura 9 apresenta os gráficos da razão entre área calculada pela equação da curva e concentração por concentração para PCBs solicitados na resolução a ser atendida. Para todos os congêneres analisados pelo método proposto, os valores da razão área/concentração ficaram dentro da faixa de 95-105% (linhas horizontais) do coeficiente angular, indicando que estão numa faixa linear.

Figura 9. Gráficos de indicação da faixa linear da curva de alguns congêneres.





4.3 Limites de Quantificação e Detecção

Os resultados de desvio padrão das 10 medidas do branco utilizadas para o cálculo de LD e LQ, juntamente com os respectivos valores de coeficientes angulares, LD (Equação 2) e LQ (Equação 3) para cada amostra são apresentados na Tabela 8.

Tabela 8. Limites de detecção e quantificação obtidos na validação proposta.

Parâmetro	Desvio Padrão	Coeficiente Angular	LD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)
<i>PCB 8</i>	3,58	108,30	0,11	0,33
<i>PCB 18</i>	5,78	70,10	0,27	0,82
<i>PCB 28</i>	5,20	67,73	0,25	0,77
<i>PCB 44</i>	4,57	61,13	0,25	0,75
<i>PCB 52</i>	3,55	44,91	0,26	0,79
<i>PCB 66</i>	4,89	60,70	0,27	0,81
<i>PCB 77</i>	3,83	47,83	0,26	0,80
<i>PCB 101</i>	3,20	40,40	0,26	0,79
<i>PCB 105</i>	3,82	49,09	0,26	0,78
<i>PCB 118</i>	4,05	54,28	0,25	0,75
<i>PCB 126</i>	4,86	68,07	0,24	0,71
<i>PCB 128</i>	2,26	29,58	0,25	0,76
<i>PCB 138</i>	3,33	42,36	0,26	0,79
<i>PCB 153</i>	3,71	44,86	0,27	0,83
<i>PCB 170</i>	1,79	23,76	0,25	0,75
<i>PCB 180</i>	2,24	30,47	0,24	0,74
<i>PCB 187</i>	2,29	28,19	0,27	0,81
<i>PCB 195</i>	1,83	25,30	0,24	0,72
<i>PCB 201</i>	2,56	33,72	0,25	0,76
<i>PCB 206</i>	1,40	18,28	0,25	0,77
<i>PCB 209</i>	1,79	21,36	0,28	0,84

É possível observar que os limites de quantificação com exceção do congênere PCB 8 representam valores muito próximos ao primeiro ponto da curva de calibração, em concordância com o recomendado pelo documento DOQ-CGCRE-008 (INMENTRO, 2008).

4.4 Recuperação

Pelo quociente entre a área obtida pelo extrato e a área de referência, obteve-se o valor de recuperação de cada parâmetro, sendo a recuperação média obtida pela média dos valores obtidos em cada duplicata. Os resultados de recuperação obtidos para cada parâmetro estão ilustrados na Tabela 9 e os picos dos congêneres de interesse apresentados no APÊNDICE C. Nos resultados expressados pela tabela, observa-se que todos os valores de recuperação média se enquadraram na faixa aceitável de recuperação entre 80 e 110%.

Tabela 9. Valores de recuperação média obtidos para cada parâmetro após análise do extrato resultante da ELL.

Parâmetro	Extrato de 1 ppb	Extrato de 4 ppb	Extrato de 10 ppb
	Recuperação Média	Recuperação Média	Recuperação Média
<i>PCB 8</i>	83%	85%	83%
<i>PCB 18</i>	87%	90%	82%
<i>PCB 28</i>	94%	91%	99%
<i>PCB 44</i>	99%	90%	84%
<i>PCB 52</i>	96%	98%	97%
<i>PCB 66</i>	86%	94%	81%
<i>PCB 77</i>	96%	92%	83%
<i>PCB 101</i>	92%	89%	93%
<i>PCB 105</i>	84%	100%	89%
<i>PCB 118</i>	95%	85%	89%
<i>PCB 126</i>	105%	83%	92%
<i>PCB 128</i>	90%	98%	96%
<i>PCB 138</i>	108%	85%	91%
<i>PCB 153</i>	105%	88%	92%
<i>PCB 170</i>	86%	95%	82%
<i>PCB 180</i>	101%	90%	82%
<i>PCB 187</i>	85%	96%	104%
<i>PCB 195</i>	96%	89%	92%
<i>PCB 201</i>	88%	88%	90%
<i>PCB 206</i>	104%	101%	92%
<i>PCB 209</i>	103%	97%	103%

Nesta etapa do estudo a análise realizada pelo método proposto não apresentou dados satisfatórios para monitoramento do íon principal dos congêneres 128, 153, 170 e 206 uma vez que não apresentaram os mesmos picos obtidos na curva de calibração. Desta forma a comparação de área foi realizada através dos picos gerados pelos íons de referência destes congêneres, fornecendo assim resultados satisfatórios.

4.5 Repetitividade

Os dados de repetitividade foram obtidos pelo cálculo da concentração a partir da curva de calibração de cada parâmetro após repetidas análises da solução padrão. Foram compilados para o Excel e, após tratamento estatístico, ilustrados na Tabela 9.

Tabela 10. Análise da repetitividade do método desenvolvido através da medição sequencial do padrão de 4 ppb.

Parâmetro	Média	RSD (%)	T _{observado}	T _{tabelado (α=0,05)}
PCB 8	4,03	2,88	0,6453	
PCB 18	4,04	1,13	2,1796	
PCB 28	3,97	2,77	-0,6572	
PCB 44	4,00	2,43	0,0995	
PCB 52	4,03	1,27	1,1752	
PCB 66	4,02	1,84	0,8150	
PCB 77	4,03	2,31	0,8783	
PCB 101	3,99	1,78	-0,3066	
PCB 105	4,06	1,61	2,3506	
PCB 118	3,99	2,87	-0,1798	2,4469
PCB 126	4,00	1,73	0,0443	
PCB 128	4,02	2,05	0,6921	
PCB 138	4,02	1,87	0,5962	
PCB 153	4,05	1,34	2,3771	
PCB 170	4,06	2,39	1,5499	
PCB 180	4,03	1,85	1,0277	
PCB 187	4,05	1,64	2,0893	
PCB 195	4,01	3,75	0,1967	
PCB 201	3,97	4,68	-0,3653	
PCB 206	4,12	3,55	2,1494	
PCB 209	4,00	3,90	0,0525	

Observa-se na Tabela 9 que apenas o RSD dos congêneres 201 e 209 ofereceram valores relativamente maiores que os demais. Ao analisar os valores obtidos para o T_{obs} do teste t de Student pode-se concluir que não há diferença estatisticamente significativa entre a média das concentrações medidas e o valor real de concentração. Assim, a hipótese alternativa é rejeitada de forma que para alguns parâmetros o $T_{obs} < T_{tab}$, e para outros o $T_{obs} > -T_{tab}$.

4.6 Precisão Intermediária

As médias e desvios relativos obtidos de todas as análises estão ilustrados na Tabela 11, após compilação dos dados dos cromatogramas para o software Excel.

Com a verificação da Tabela 11, que apresenta os resultados da medição de uma solução padrão de 4 $\mu\text{g L}^{-1}$ (ppb) durante um intervalo de tempo de duas semanas, percebe-se que apesar de alguns parâmetros fornecerem um valor de RSD relativamente maior, o

resultado da análise estatística com o teste t de Student através da Equação 5 demonstrou que as médias das concentrações medidas não diferem estatisticamente de forma significativa do valor real de concentração.

Tabela 11. Análise da precisão intermediária do método desenvolvido através da medição do padrão de 4 ppb em dias diferentes.

Parâmetro	Média	RSD (%)	T _{observado}	T _{tabelado ($\alpha=0,05$)}
<i>PCB 8</i>	3,98	3,35	-0,3544	
<i>PCB 18</i>	3,98	1,74	-0,8161	
<i>PCB 28</i>	4,04	1,87	1,3395	
<i>PCB 44</i>	3,98	1,05	-1,5437	
<i>PCB 52</i>	3,99	1,93	-0,3767	
<i>PCB 66</i>	4,04	2,27	1,0697	
<i>PCB 77</i>	4,06	1,84	2,2534	
<i>PCB 101</i>	4,07	2,54	1,6918	
<i>PCB 105</i>	3,97	3,79	-0,4624	
<i>PCB 118</i>	4,07	2,26	1,9019	
<i>PCB 126</i>	3,99	1,56	-0,2173	2,4469
<i>PCB 128</i>	3,99	2,35	-0,2115	
<i>PCB 138</i>	4,05	2,52	1,2259	
<i>PCB 153</i>	4,08	3,31	1,6498	
<i>PCB 170</i>	4,00	2,91	0,0585	
<i>PCB 180</i>	4,12	3,53	2,1512	
<i>PCB 187</i>	4,09	4,30	1,3240	
<i>PCB 195</i>	4,02	6,19	0,1789	
<i>PCB 201</i>	4,08	3,07	1,7023	
<i>PCB 206</i>	4,08	2,47	2,0942	
<i>PCB 209</i>	4,00	3,09	0,0663	

4.7 Robustez

Os valores obtidos nas duas diferentes condições foram comparados entre si para avaliar-se a dispersão entre eles pelo RSD calculado através da Equação 4. Uma vez compilados e analisados no software Excel, os resultados são expressados na Tabela 12.

Tabela 12. Análise de robustez do método através da medição de três padrões e comparadas suas áreas obtidas em duas condições distintas.

Parâmetro	Padrão de 10 ppb		Padrão de 4 ppb		Padrão de 1 ppb	
	Média	RSD (%)	Média	RSD (%)	Média	RSD (%)
<i>PCB 8</i>	512,25	1,17	238,50	4,15	60,00	3,54
<i>PCB 18</i>	314,75	1,24	184,00	3,46	48,50	1,46
<i>PCB 28</i>	282,00	0,00	159,75	0,22	48,75	6,53
<i>PCB 44</i>	240,25	1,03	112,50	0,63	43,75	0,81
<i>PCB 52</i>	163,25	0,22	72,75	5,35	33,00	0,00
<i>PCB 66</i>	186,50	1,90	97,50	2,18	25,25	4,20
<i>PCB 77</i>	144,00	1,47	78,00	1,81	20,75	5,11

<i>PCB 101</i>	121,25	2,62	63,50	7,79	30,00	2,36
<i>PCB 105</i>	85,00	0,00	29,25	3,63	16,00	0,00
<i>PCB 118</i>	116,75	2,12	74,75	0,47	37,00	1,91
<i>PCB 126</i>	94,75	2,61	41,50	0,00	24,00	0,00
<i>PCB 128</i>	74,25	2,38	42,50	0,00	17,75	1,99
<i>PCB 138</i>	97,00	3,64	52,25	3,38	20,50	6,90
<i>PCB 153</i>	75,75	0,47	42,25	5,86	23,50	0,00
<i>PCB 170</i>	68,50	0,00	33,75	1,05	14,75	2,40
<i>PCB 180</i>	84,00	0,00	39,00	5,44	16,75	2,11
<i>PCB 187</i>	47,75	0,74	24,25	1,46	16,25	2,18
<i>PCB 195</i>	121,50	2,33	65,25	4,88	41,25	0,86
<i>PCB 201</i>	265,00	1,87	110,25	0,32	79,50	2,67
<i>PCB 206</i>	34,75	5,09	18,75	5,66	10,00	7,07
<i>PCB 209</i>	61,50	3,45	33,75	1,05	17,75	5,98

Os resultados da Tabela 12 demonstram pequenos valores de dispersão (RSD) para grande parte dos congêneres indicando pequena variação nos resultados obtidos quando comparadas as análises nas duas situações. Contudo a sensibilidade do método foi afetada pelo patamar de temperatura, uma vez que as áreas obtidas não mais se igualaram às fornecidas pela curva de calibração.

5 Conclusões e Trabalhos Futuros

Sendo os Poluentes Orgânicos Persistentes um desafio em termos de disposição para alcançar as metas estabelecidas pelas normas que visam seu controle, estabelecer métodos suficientemente sensíveis para sua determinação é de grande importância para auxiliar nas medidas para redução destes compostos.

No presente trabalho foi estabelecida uma metodologia capaz de permitir a determinação de compostos PCBs em amostras de águas por meio de ensaio analítico com limite de detecção condizente com as tolerâncias estabelecidas por recomendações legais. Apesar de estar sujeito a condições que exigem um aparato laboratorial para prática do ensaio, o método avaliado no estudo revelou-se suficiente para atender a maioria dos parâmetros exigidos numa validação e produziu sinais seletivos para o monitoramento das substâncias desejadas e permitiu sua quantificação uma vez estabelecidas as condições instrumentais de análise.

A curva de calibração trabalhou com todos os compostos de interesse pela análise de padrões na faixa de trabalho proposta e o limite de quantificação dos parâmetros foi de encontro a um valor próximo ao ponto primeiro da curva conforme orientação do INMETRO. Os dados de precisão obtidos pela repetitividade e precisão intermediária apresentaram valores aceitáveis como indicado pelos valores de RSD e pelo teste estatístico. A análise de recuperação apresentou resultados dentro da faixa aceitável para concentração trabalhada e a robustez não apresentou dispersão acentuada de valores apesar de expressar uma menor sensibilidade na análise.

Uma vez que o método programado permite execução em todos os modelos do equipamento que comportem um detector por massas, pode-se afirmar que este método permite reprodutibilidade da análise em outros cromatógrafos uma vez que disponham de alguns parâmetros experimentais semelhantes como gás de arraste e coluna cromatográfica. Desta forma a análise do parâmetro de reprodutibilidade da validação pode ser realizada em próximos trabalhos visando avaliar resultados obtidos pela análise de outros laboratórios.

Verificar medidas que propiciem uma determinação sem perda eventual de sensibilidade, tal como uma análise mais aprofundada da seletividade, também fica como sugestão para futuros estudos.

6 Referências Bibliográficas

VALENTE R. P. C., Destinação Final Resíduos de Ascaréis – PCB's São Paulo, 2011. Apostila complementar da palestra “Alternativas de Destinação Final de Resíduos com ascaréis (PCB's) ”.

MILLS III S. A., THAL D. I., BARNEY J., A summary of the 209 PCB congener nomenclature, *Chemosphere* 2007; vol. 68 (1603-1612).

HORWAT M., TICE M., KJELLERUP B. V., Biofilms at work: Bio-, phyto- and rhizoremediation approaches for soils contaminated with polychlorinated biphenyls, *AIMS Bioengineering* 2018; vol. 2, ed. 4 (324-334).

PENTEADO J. C. P., VAZ J. M., O Legado das Bifenilas Policloradas (PCBs), *Química Nova* 2001; vol. 24, n. 3 (390-398).

FAROON O., JONES D., ROSA C., Effects of Polychlorinated Biphenyls on the Nervous System, *Toxicology and Industrial Health* 2000; vol. 16 (305-333).

NTP TECHNICAL REPORT 529, Toxicology and Carcinogenesis Studies of 2,2',4,4',5,5'-Hexachlorobiphenyl (PCB 153) in Female Harlan Sprague-Dawley Rats, 2006; National Institutes of Health - U.S. Department of Health and Human Services.

MASUDA Y., Toxic Effects of PCB/PCDF to Human observed in Yusho and Other Poisonings, *Fukuoka Acta Medica* 2009; vol. 100, n. 5 (141-155).

SAFE S., Polychlorinated Biphenyls (PCBs), Dibenzo-p-dioxins (PCDDs), Dibenzofurans (PCDFs), and Related Compounds: Environmental and Mechanistic Considerations Which Support the Development of Toxic Equivalency Factors (TEFs), *Critical Reviews in Toxicology* 1990; vol. 21 (51-88).

SAFE S., Polychlorinated Biphenyls (PCBs) and Polybrominated Biphenyls (PBBs): Biochemistry, Toxicology, and Mechanism of Action, *Critical Reviews in Toxicology* 1984; vol. 13 ed. 4 (319-393).

JAMES M.O., Polychlorinated Biphenyls: Metabolism and Metabolites. In: ROBERTSON L. & HANSEN L.G., Eds. PCBs, Recent Advances in Environmental Toxicology and Health Effects. Lexington, Kentucky: University Press of Kentucky, 2001. p. 35-46.

PEREG D., ROBERTSON L.W., GUPTA R.C., DNA adduction by polychlorinated biphenyls: adducts from hepatic microsomal activation and from synthetic metabolites, *Chemico-Biological Interactions* 2002; vol. 139 (129-144).

ROBERTSON L.W., GUPTA R., Metabolism of polychlorinated biphenyls (PCBs) generates electrophiles and reactive oxygen species that damage DNA. In: WILLIAMS G.M., ARUOMA O.I., Eds. *Molecular Drug Metabolism and Toxicology*. OICA International, 2000. p. 16-32.

MORCK A., LARSEN G., WEHLER E.K., Covalent binding of PCB metabolites to lipids: route of formation and characterization, *Xenobiotica* 2002; vol. 32 (625-640).

ZHAO S., NARANG A., DING X., EADON G., Characterization and quantitative analysis of DNA adducts formed from lower chlorinated PCB-derived quinones, *Chemical Research in Toxicology* 2004; vol. 17 (502-511).

LIN P. H., SANGAIAH R., RANASINGHE A., UPTON P.B., LA D.K., GOLD A., SWENBERG J.A., Formation of quinonoid-derived protein adducts in the liver and brain of Sprague-Dawley rats treated with 2,2',5,5'-tetrachlorobiphenyl, *Chemical Research in Toxicology* 2000; vol. 13 (710-718).

GRISONI F., CONSONNI V., VIGHI M., VILLA S., TODESCHINI R., Investigating the mechanisms of bioconcentration through QSAR classification trees, *Environment International* 2016; vol. 88 (198-205).

DROUILLARD K. G., Biomagnification, *Encyclopedia of Ecology* 2008; vol. 1 (441-448).

WEINTRAUB M., BIRNBAUM L. S., Catfish Consumption as a Contributor to Elevated PCB levels in a non-Hispanic Black Subpopulation, *Environmental Research* 2008; vol. 107 (412-417).

(USEPA) UNITED STATES ENVIRONMENT PROTECTION AGENCY, Quality Assurance Report for the Nacional Study of Chemical Residues in Lake Fish Tissue: Analytical Data for Years 1 through 4. Washington DC: U.S. Environmental Protection Agency, 2005; Publicação USEPA EPA-823-R-05-005.

HU D., LEHMLER H.J., MARTINEZ A., WANG K., HORNBUCKLE K.C., Amospheric PCB congeners across Chicago, *Atmospheric Environment* 2010; vol. 44 (1550 – 1557).

DU S., WALL S.I., CACIA D., RODENBURG L.A., Passive air sampling for polychlorinated biphenyls in the Philadelphia metropolitan area, *Environmental Science & Technology* 2009; vol. 43 (1287-1292).

PALMER P.M., BELANGER E. E., WILSON L.R., HWANG S.A., NARANG R.S., GOMEZ M.I., CAVO M.R., DUROCHER L.A., FITZGERALD E.F., Outdoor air PCB concentrations in three communities along the Upper Hudson River, New York, *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 2008; vol. 54, n. 3 (363 – 371).

GABRIO T., PIECHOTOWSKI I., WALLENHORST T., KLETT M., COTT L., FRIEBEL P., LINK B., SCHWENK M., PCB-blood levels in teachers, working in PCB-contaminated schools, *Chemosphere* 2000; vol. 40 (1055-1062).

(USEPA) UNITED STATES ENVIRONMENT PROTECTION AGENCY, Emissions Inventory of Section 112(c)(6) Pollutants. Washington DC: U.S. Environmental Protection Agency - Emissions and Analysis Division 1998, disponível em <https://www3.epa.gov/ttn/atw/112c6/final2.pdf>.

IWATA H., TANABE S., SAKAI N., NISHIMURA A., TATSUKAWA R., Geographical distribution of Persistent Organochlorines in Air, Water and Sediments from Asia and Oceania, and their implications for global redistribution from lower latitudes, *Environmental Pollution* 1994; vol. 85 (15-33).

TANABE S., PCB Problems in the Future: Foresight from Current Knowledge, *Environmental Pollution* 1988; vol. 50 (5-28).

(MMA) MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, Inventário Nacional de Bifenilas Policloradas (PCB): Convenção de Estocolmo. Brasília: MMA, 2015a. 112 p.

(WHO) WORLD HEALTH ORGANIZATION, Dioxins and furans from municipal incinerators. Copenhagen: World Health Organization; WHO, 1987 – Environmental Health Series, 17.

(EA) ENVIRONMENT AGENCY, Soil Guideline Values for dioxins, furans and dioxin-like PCBs in soil, Science report SC050021/Dioxins SGV, 2009, 22 p.

JENSEN S., Report of a New Chemical Hazard, *New Scientist* 1966; vol. 31 (612).

(USEPA) UNITED STATES ENVIRONMENT PROTECTION AGENCY, Federal Register, CFR-40, Part 761, July, 1, 1990.

PORTARIA INTERMINISTERIAL (MIC/MI/MME) nº 019 de 29/01/1981.

(SEMA) SECRETARIA ESPECIAL DO MEIO AMBIENTE, Instrução Normativa STC/CRS-001 de 15/06/1983.

DECRETO nº 5.472, de 20 de junho de 2005 (Promulga o texto da Convenção de Estocolmo sobre Poluentes Orgânicos Persistentes).

(MMA) MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, Plano Nacional de Implementação Brasil. Convenção de Estocolmo. Brasília: MMA, 2015b. 192 p.

(MMA) MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, Manual de Gerenciamento de Resíduos e Equipamentos com Bifenilas Policloradas (PCB). 2015c, 86 p.

RESOLUÇÃO CONAMA Nº 396, de 03/04/2008 (Dispõe sobre a classificação e diretrizes ambientais para o enquadramento das águas subterrâneas e dá outras providências).

COCCO R., Resíduos de Bifenilos Policlorados em arroz e feijão do Estado do Rio Grande do Sul. 2011. 83 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos – Universidade Federal de Santa Maria.

RIBANI M., BOTTOLI C. B. G., COLLINS C. H., JARDIM I. C. S. F., MELO L. F. C., Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos, *Química Nova* 2004; vol. 27 n. 5 (771-780).

ADORNO M. A. T., Desenvolvimento de métodos de extração e determinação de Bifenilas Policloradas por cromatografia gasosa e detector de captura de elétrons em óleo Ascarel, reator anaeróbico e solo. 2013. 223 f. Dissertação (Doutorado em Ciências: Engenharia Hidráulica e Saneamento) – Escola de Engenharia de São Carlos – Universidade de São Paulo.

SCHWANZ T. G., MOHR S., PORTE L. M. F., ZANATTA N., BONACORSO H. G., MARTINS M. A. P., COSTABEBER J. H., Determinação de bifenilos policlorados em milho através de extração em fase sólida seguida de cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas, *Química Nova* 2012; vol. 35, n. 3 (553-558).

KRAFT M., RAUCHFUSS K., SIEVERING S., WÖCKNER M., NEUGEBAUER F., FROMME H., Quantification of all 209 PCB congeners in blood – Can indicators be used to calculate the total PCB blood load?, *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 2017; vol. 220 n. 2 (201-208).

LAMBERT N., FAN T. S., PILETTE J. F., Analysis of PCBs in waste oil by enzyme immunoassay, *The Science of the Total Environment* 1997; vol. 196 (57-61).

KIM I. S., SETFORD S. J., SAINI S., Determination of Polychlorinated biphenyl compounds in electrical insulating oils by enzyme immunoassay, *Analytica Chimica Acta* 2000; vol. 422 (167-177).

(NRC) NATIONAL RESEARCH COUNCIL OF THE NATIONAL ACADEMIES, A risk management strategy for PCB-contaminated sediments. Washington, DC: The National Academy Press, 2001. 452 p.

ANTONELLO I., HUMERES E., SOUZA I. G., DEBACHER N. A., Determinação de ascarel em óleo isolante para transformadores, *Química Nova* 2007; vol. 30, n. 3 (709-711).

ENGVALL E., PERLMANN P., Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) Quantitative assay of immunoglobulin G, *Immunochemistry* 1971; vol. 8 (871-874).

CARLSON E. R., SWANSON T. A., Immunoassay for polychlorinated biphenyls. *Int CI G01N 33/53*. US 5538852 A. 13 jun. 1994, 23 jul. 1996. United States Patent. 20 p.

RITCHER C. A., DRAKE J. B., GIESY J. P., Immunoassay Monitoring of Polychlorinated Biphenyls (PCBs) in the Great Lakes, Environmental Science and Pollution Research 1994; vol. 1 ed. 2 (69-74).

LANÇAS F. M., MCNAIR H. M., Cromatografia em Fase Gasosa. 1. Teoria Elementar, Química Nova 1983; vol. 6, n. 1 (6-13).

PEREIRA A. S., SILVA E. F., NETO F. R. A., Cromatografia Gasosa de Alta Temperatura: A Nova Fronteira e sua Aplicação na Análise de Compostos de Alta Massa Molecular, Química Nova 1996; vol. 6 (600-604).

CAVALVANTE R. M., LIMA D. M., CORREIA L. M., NASCIMENTO R. F., SILVEIRA E. R., FREIRE G. S. S., VIANA R. B., Técnicas de extrações e procedimentos de *clean-up* para a determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) em sedimentos da costa do Ceará, Química Nova 2008; vol. 31, n. 6 (1371-1377).

DEGANI A. L. G., CASS Q. B., VIEIRA P. C., Cromatografia: um breve ensaio, Química Nova na Escola 1998; n. 7 (21-25).

(USEPA) UNITED STATES ENVIRONMENT PROTECTION AGENCY, Method 1668B: Chlorinated Biphenyl Congeners in Water, Soil, Sediment, Biosolids, and Tissue by HRGC/HRMS. Washington DC: U.S. Environmental Protection Agency, 2008. Publicação USEPA EPA-821-R-08-020.

(ABNT) ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, NBR 13882: Líquidos isolantes elétricos – Determinação do teor de bifenilas policloradas (PCB). Rio de Janeiro, 2005.

MATSUMURA C., TSURUKAWA M., NAKANO T., EZAKI T., OHASHI M., Elution Orders of 209 PCBs Congeners on Capillary Column “HT8-PCB”, Journal of Environmental Chemistry 2002; vol. 12, n. 4 (855-865).

MYDLOVÁ-MEMERSHEIMEROVÁ J., TIENPONT B., DAVID F., KRUPCIK J., SANDRA P., Gas chromatography of 209 polychlorinated biphenyl congeners on a extremely efficient nonselective capillary column, Journal of Chromatography A 2009; vol. 1216, ed. 32 (6043-6062).

(INMETRO) INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA, DOQ-CGCRE-008 - Orientação sobre Validação de Métodos Analíticos, Coordenação Geral de Acreditação 2010, rev. 3.

(ICH) INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION, Validation of Analytical Procedures: Methodology, Q2B (CPMP/ICH/381/95), 1995.

AUGUSTO F., ANDRADE J. C., CUSTODIO R., Faixa Linear de Uma Curva de Calibração, 2000; <http://chemkeys.com>, acessada em Novembro 2017.

THOMPSON M., ELLISON S. L. R., FAJGELJ A., WILLETTS P., WOOD R., Harmonised Guidelines for the use of Recovery Information in Analytical Measurement, Pure & Applied Chemistry 1999; vol. 71, n. 2 (337-348).

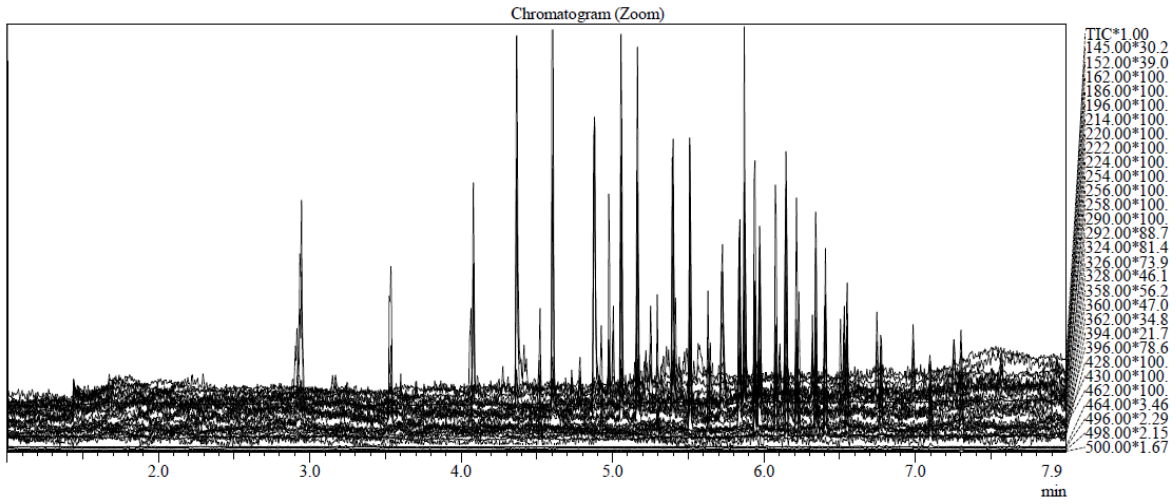
PEREZ M. A F., Validação de Métodos Analíticos: Como fazer? Porque ela é importante?, Boletim de Tecnologia e Desenvolvimento de Embalagens 2010; vol. 22 n. 3 (1-9).

(ANVISA) Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Resolução RE nº 899, de 29/05/2003.

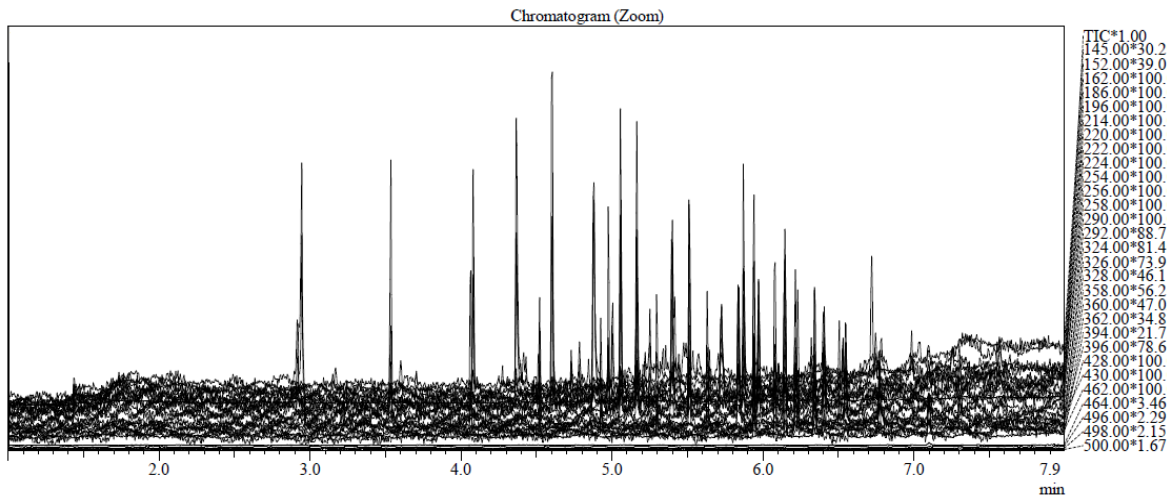
7 Apêndice

APÊNDICE A – Cromatogramas da curva de calibração.

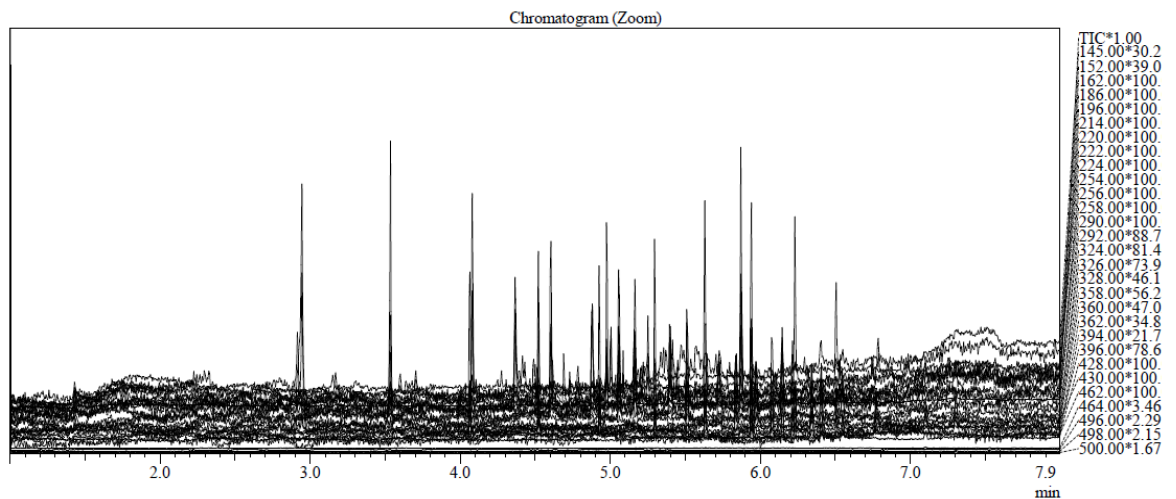
Ponto 5 da curva de calibração



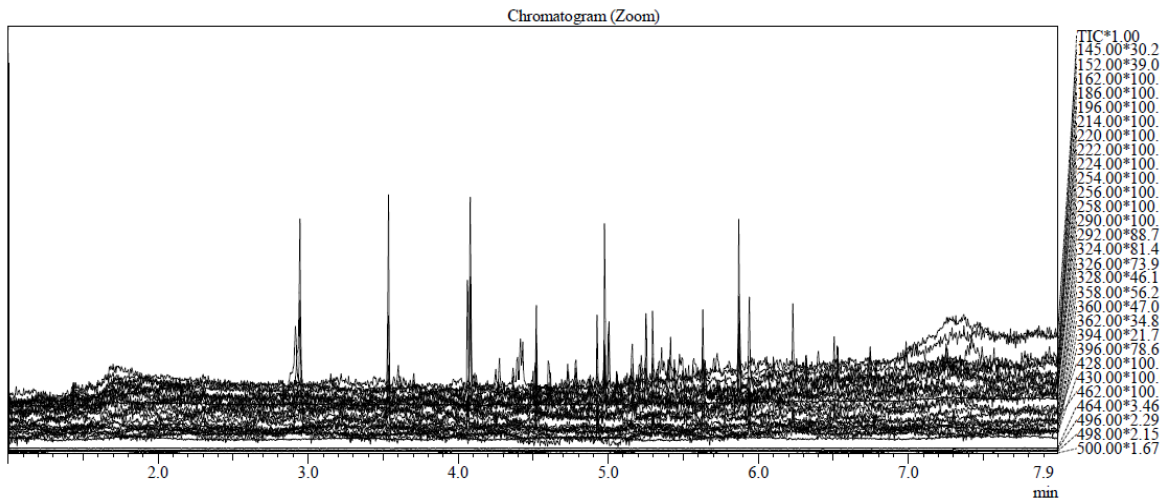
Ponto 4 da curva de calibração



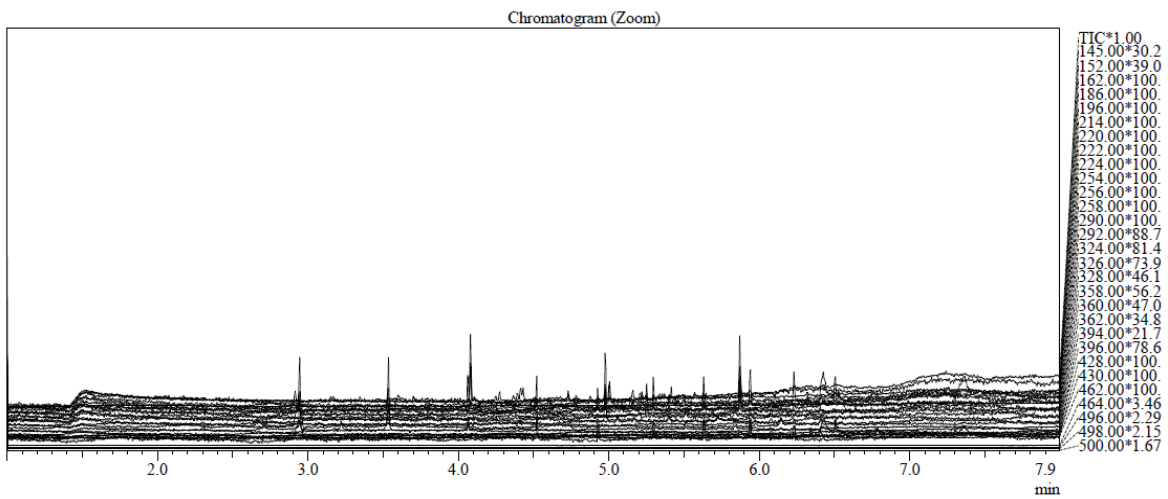
Ponto 3 da curva de calibração



Ponto 2 da curva de calibração

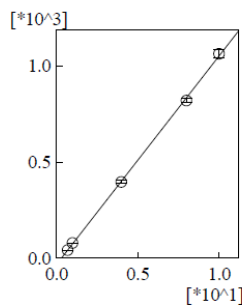


Ponto 1 da curva de calibração

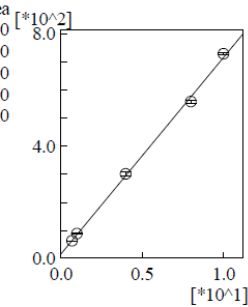


APÊNDICE B – Curvas de calibração dos parâmetros analisados

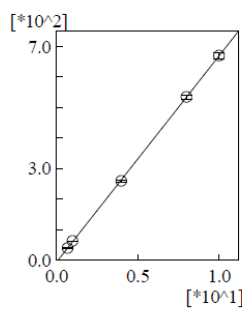
ID#:1 Mass:152.00 Name:PCB 8
 $f(x)=108.332080*x-33.394059$
 $r^2=0.999528$



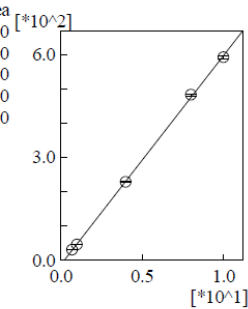
ID#:2 Mass:186.00 Name:PCB 18
 $f(x)=70.095442*x+15.547606$
 $r^2=0.998456$



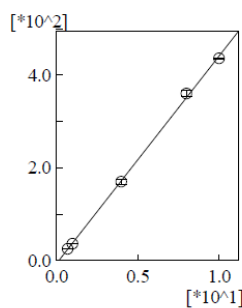
ID#:3 Mass:186.00 Name:PCB 28
 $f(x)=67.677724*x-7.292413$
 $r^2=0.999926$



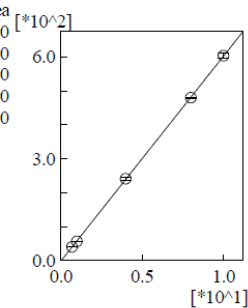
ID#:4 Mass:220.00 Name:PCB 44
 $f(x)=61.131854*x-13.464990$
 $r^2=0.999650$



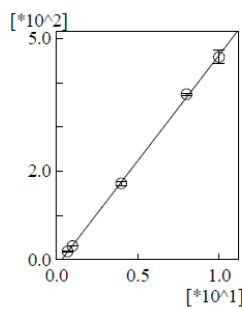
ID#:5 Mass:292.00 Name:PCB 52
 $f(x)=44.913958*x-7.592159$
 $r^2=0.999219$



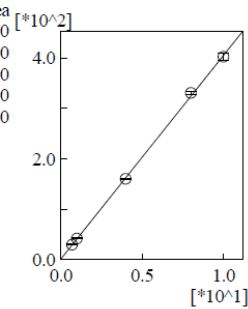
ID#:6 Mass:292.00 Name:PCB 66
 $f(x)=60.697160*x-3.604537$
 $r^2=0.999958$



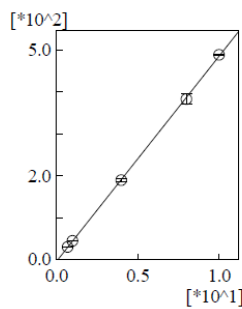
ID#:7 Mass:292.00 Name:PCB 77
 $f(x)=47.865427*x-16.082123$
 $r^2=0.999481$



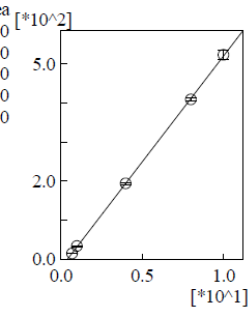
ID#:8 Mass:326.00 Name:PCB 101
 $f(x)=40.398542*x+1.310910$
 $r^2=0.999559$



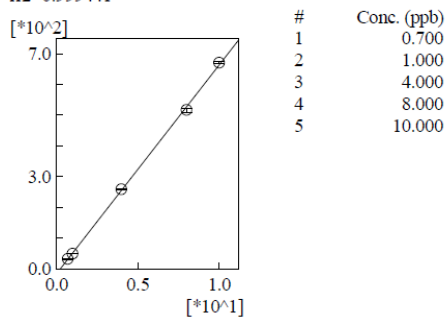
ID#:9 Mass:326.00 Name:PCB 105
 $f(x)=49.082022*x-5.748785$
 $r^2=0.999823$



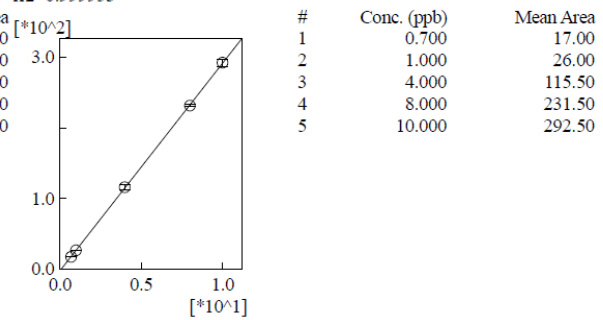
ID#:10 Mass:326.00 Name:PCB 118
 $f(x)=54.275220*x-21.964542$
 $r^2=0.999895$



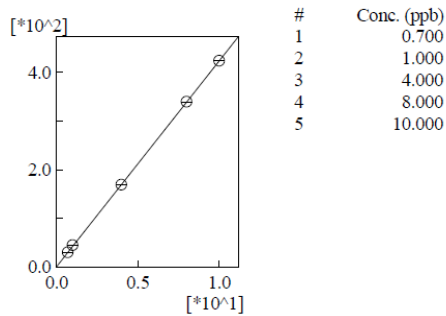
ID#:11 Mass:326.00 Name:PCB 126
 $f(x)=68.098970*x-17.189119$
 $r^2=0.999441$



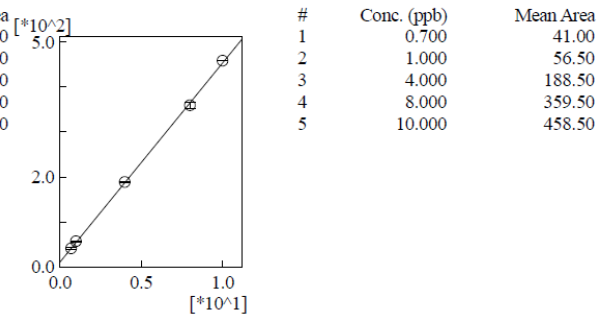
ID#:12 Mass:360.00 Name:PCB 128
 $f(x)=29.526984*x-3.457904$
 $r^2=0.999953$



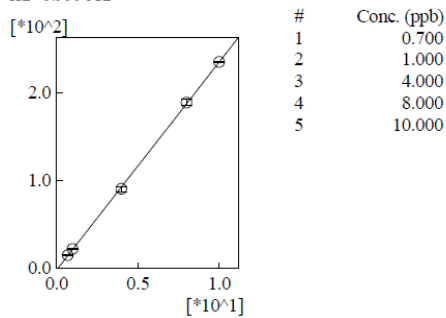
ID#:13 Mass:290.00 Name:PCB 138
 $f(x)=42.379107*x+0.623034$
 $r^2=0.999965$



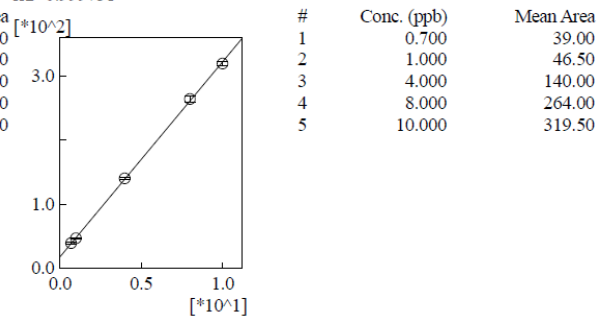
ID#:14 Mass:360.00 Name:PCB 153
 $f(x)=44.355044*x+10.557092$
 $r^2=0.999579$



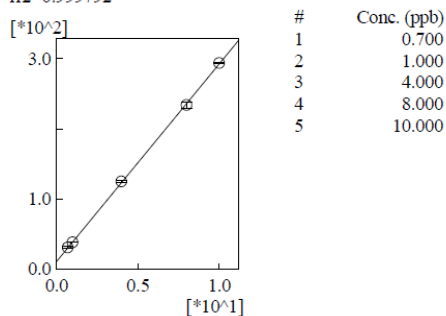
ID#:15 Mass:394.00 Name:PCB 170
 $f(x)=23.750434*x-2.777056$
 $r^2=0.999812$



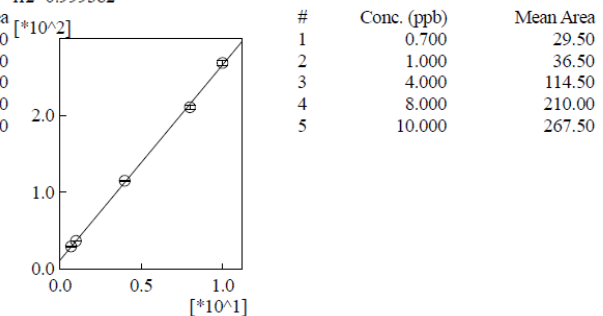
ID#:16 Mass:394.00 Name:PCB 180
 $f(x)=30.456675*x+17.435360$
 $r^2=0.999731$



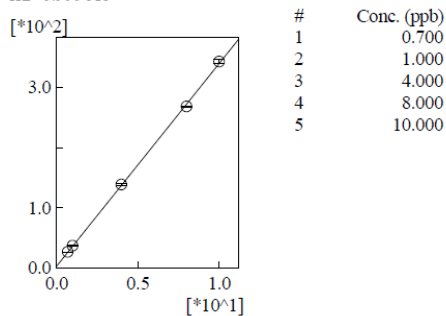
ID#:17 Mass:394.00 Name:PCB 187
 $f(x)=28.128760*x+10.869679$
 $r^2=0.999792$



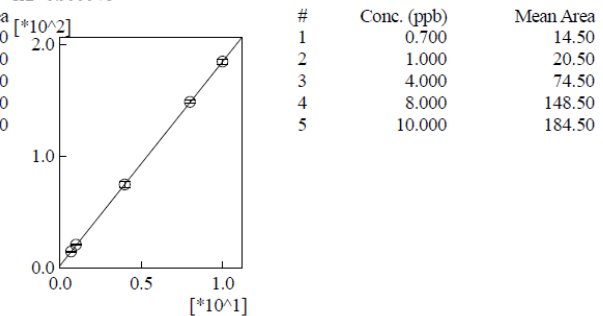
ID#:18 Mass:430.00 Name:PCB 195
 $f(x)=25.324358*x+11.562544$
 $r^2=0.999382$



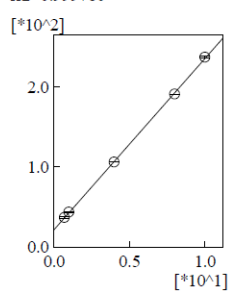
ID#:19 Mass:430.00 Name:PCB 201
 $f(x)=33.749132*x+2.429113$
 $r^2=0.999615$



ID#:20 Mass:464.00 Name:PCB 206
 $f(x)=18.281467*x+1.845847$
 $r^2=0.999975$



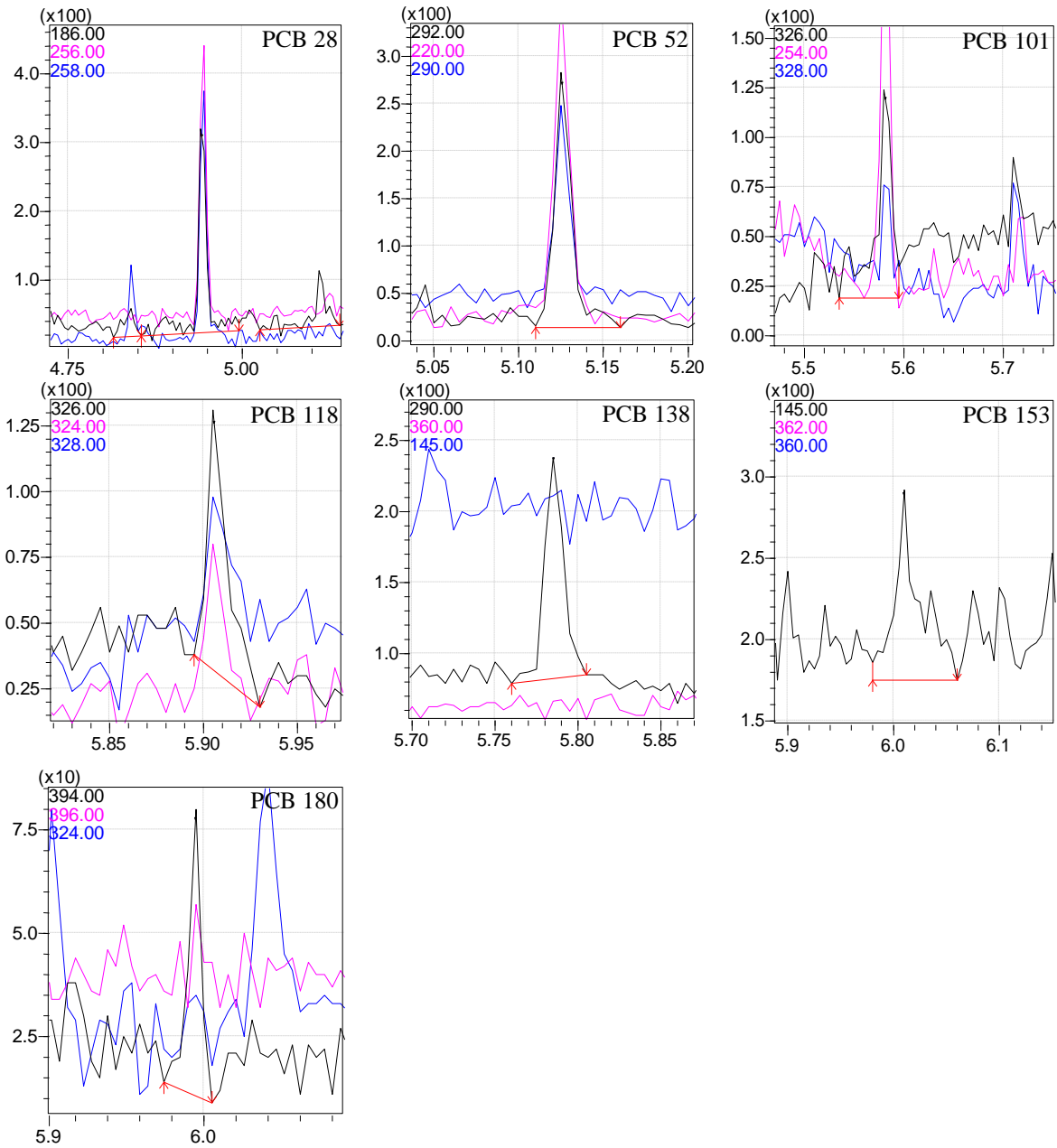
ID#:21 Mass:498.00 Name:PCB 209
f(x)=21.382896*x+21.545075
r2=0.999780



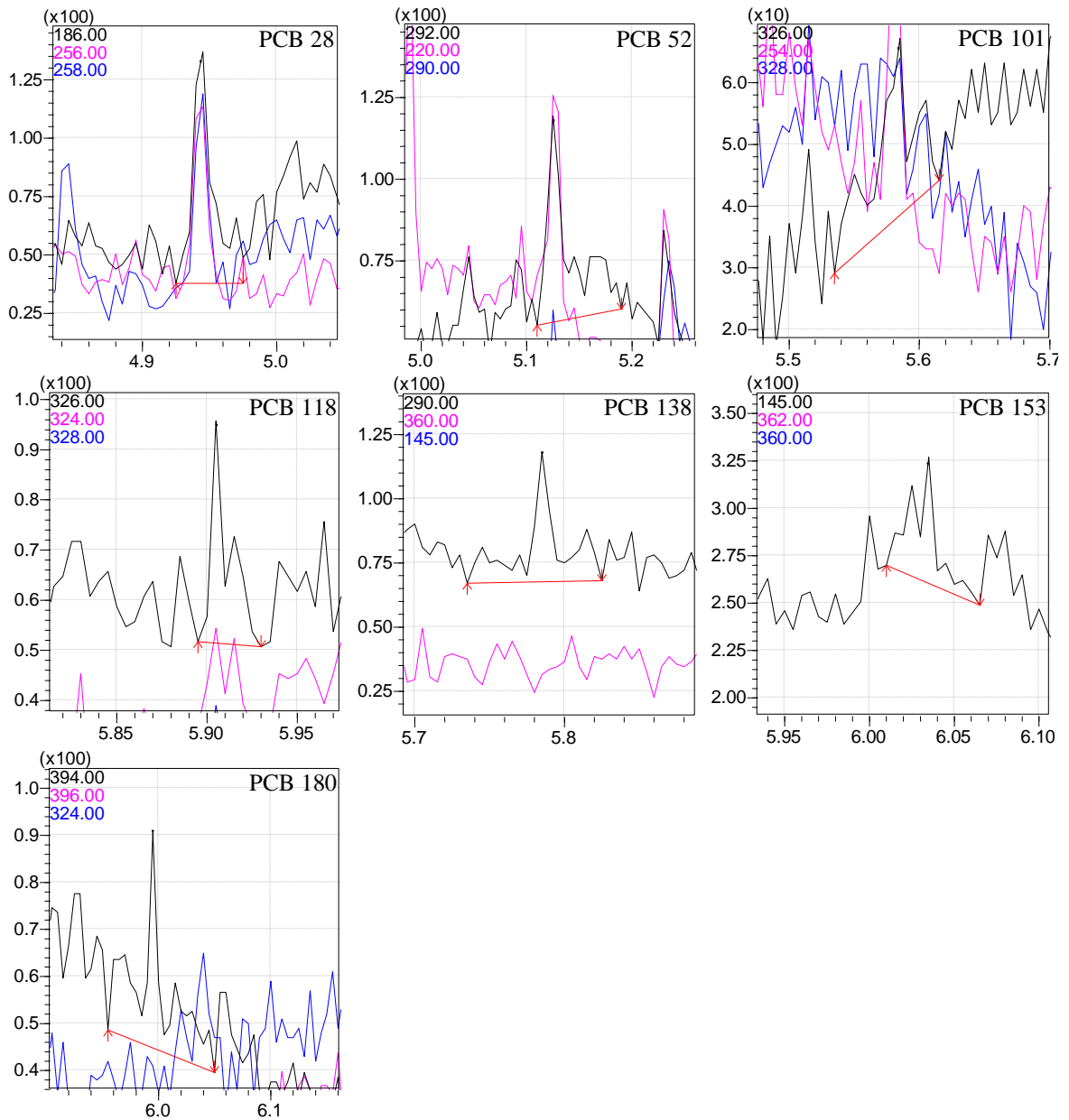
#	Conc. (ppb)	Mean Area
1	0.700	37.00
2	1.000	43.50
3	4.000	106.00
4	8.000	191.00
5	10.000	237.00

APÊNDICE C – Picos dos congêneres de interesse obtidos da análise do extrato na etapa de recuperação.

Extrato de 10 ppb da solução de curva



Extrato de 4 ppb da solução de curva



Extrato de 1 ppb da solução de curva

