



UFSM

Dissertação de Mestrado

**DETERMINAÇÃO DE BIFENILOS POLICLORADOS
EM CARNE E PRODUTOS CARNEOS NO RIO
GRANDE DO SUL, BRASIL**

Stanislau Bogusz Junior

PPGCTA

SANTA MARIA, RS, BRASIL

2004

**DETERMINAÇÃO DE BIFENILOS POLICLORADOS EM CARNE E PRODUTOS
CÁRNEOS NO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL, BRASIL**

por

Stanislau Bogusz Junior

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos,
da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito
parcial para a obtenção do grau de

MESTRE em Ciência e Tecnologia dos Alimentos.

PPGCTA

SANTA MARIA – RS – BRASIL

2004

Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos

A comissão examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**DETERMINAÇÃO DE BIFENILOS POLICLORADOS EM CARNE E PRODUTOS
CÁRNEOS NO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL, BRASIL**

Elaborada por

Stanislau Bogusz Junior

**Como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Ciência e Tecnologia dos Alimentos**

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a Ijoni Hilda Costabeber

(Presidente/Orientador)

Prof. Dr. Ernesto Hashime Kubota (UFSM)

Prof. Dr. Ednei Gilberto Primel (FURG)

Santa Maria, 30 de maio de 2004.

A sabedoria não nos é dada; é preciso descobri-la por nós mesmos, depois de uma viagem que ninguém nos pode poupar ou fazer por nós.

Marcel Proust
1871-1922
Escritor Francês

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha Mamãe querida, Terezina, pelo amor incondicional em todos os momentos da vida e pela força e fé depositadas em mim desde o princípio e, principalmente, durante a jornada deste trabalho.

Agradeço a minha companheira, Michele, por seu amor, carinho, incentivo, companhia e motivação constante, que foram imprescindíveis para a realização deste trabalho.

A minha orientadora Prof^ª. Ijoni Costabeber, que com muita paciência e dedicação me conduziu ao universo fascinante da pesquisa. Ijoni, sem qualquer dúvida, os conhecimentos que me foram transmitidos pela convivência em nosso grupo de pesquisa, na participação da elaboração de projetos, na prática do laboratório, e na construção da parte escrita deste trabalho jamais serão esquecidos.

A minha co-orientadora Prof^ª. Tatiana Emanuelli, por me encaminhar ao universo da pesquisa, pelo esforço dedicado, pela paciência, pelos conhecimentos compartilhados, pelo exemplo de vida e dedicação ao trabalho e a pesquisa. Tati, tua colaboração e orientação foram fundamentais para a construção do meu conhecimento e deste trabalho em especial. Pode ter certeza que será sempre lembrada como um exemplo de inteligência e de pesquisadora incansável.

A Marla Heck, grande amiga e companheira nos primeiros contatos com a pesquisa, com o laboratório e com o nosso amado CG.

Em especial a Joice, a Ana Augusta, a Juciele e a Fernanda, amigas nas intermináveis horas de trabalho no laboratório. Podem ter certeza que vocês foram mais do que meu braço direito, na realização da parte prática deste trabalho.

Ao pessoal do NIDAL, em especial ao Prof. Laerte, a Prof. Leila, e a todos os bolsistas e estagiários pela amizade, compreensão, boas conversas e risadas nos momentos de descontração.

Aos colegas do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, em especial ao Rodrigo Scherer e ao João Stahl que sempre foram amigos e companheiros, e a Cláudia Kaehler que com seu espírito interessado e dinâmico otimiza e revoluciona os lugares por onde passa.

Aos Professores e funcionários do DTCA e do PPGCTA, pelos conhecimentos adquiridos pela colaboração e pela amizade.

Ao CNPq, processos números 477779/01-8 e 54003201-8, pelo apoio financeiro ao desenvolvimento deste trabalho.

As empresas que gentilmente nos doaram as amostras de carne e produtos cárnicos para a realização desta pesquisa.

Ao Glademir, pelos conhecimentos partilhados e pela eterna amizade.

A “parceria” - galera do apê 02 e apê 04 - pela amizade, descontração e companheirismo.

Quero também compartilhar essa conquista com todos aqueles que não foram citados, mas que de uma ou outra forma contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

A TODOS VOCES O QUE APRENDI E AS BOAS LEMBRANÇAS E A SAUDADE DESTES BONS TEMPOS.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS.....	x
RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	3
1. INTRODUÇÃO.....	5
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	8
2.1. Estrutura e características físico-químicas dos PCBs.....	8
2.2. Aspectos toxicológicos dos PCBs.....	10
2.3. Acidentes envolvendo PCBs.....	12
2.3.1. Casos de Yusho (Japão) e Yu-Cheng (Taiwan).....	12
2.3.2. Contaminação do Rio Hudson.....	13
2.3.3. Acidentes no Brasil.....	13
2.3.4. Acidentes envolvendo contaminação de alimentos.....	14
2.4. PCBs e aspectos legais.....	15
3. ARTIGOS CIENTÍFICOS.....	17
3.1. ARTIGO 1 – Stanislau Bogusz Junior; Tatiana Emanuelli; Ijoni Costabeber. Validación de un procedimiento analítico para la determinación de bifenilos policlorados (PCBs) em carne y productos cárnicos.....	18
3.2. ARTIGO 2 – S. Bogusz Junior, J. Sifuentes dos Santos, A. A. Odorissi Xavier, J. Weber, F. Leal Leães, I. Costabeber, T. Emanuelli. Levels of polychlorinated biphenyls (PCBs) in meat and meat products from the state of Rio Grande do Sul, Brazil.....	39
4. DISCUSSÃO.....	66
5. CONCLUSÕES.....	71
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73
7. ANEXOS.....	82
7.1. ANEXO1 Revista Internacional de Contaminación Ambiental Instrucciones para los Autores.....	83
7.2. ANEXO 2. Food and Chemical Toxicology Manuscript Format.....	84

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Congêneres de PCBs possíveis, nº de isômeros, massa molecular e porcentagem de cloro para vários isômeros.....	9
TABELA 2 – Sistema de identificação dos PCBs.....	10

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Estrutura molecular dos bifenilos policlorados.....8

LISTA DE ABREVIATURAS

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas

ATSDR – Agency for Toxic Substances and Disease Registry

CE – Comunidade Européia

CG/ μ ECD – Cromatografia gasosa com micro detector de captura eletrônica

CV – Coeficiente de variação

EPA – Environmental Protection Agency

HCB – Hexaclorobenzeno

IUPAC - The International Union of Pure and Applied Chemistry

LMR – Limites máximos de resíduos

NBR – Instrução normativa

OSPAR – Convenção sobre Poluição Transfronteiriça de Longo Alcance de Rotterdam

PCBs – Bifenilos policlorados

PCDF – Policlorodibenzofuranos

PCT – Terfenilas policloradas

PCTs – Terfenilas policloradas

POA – Cidade de Porto Alegre Ro Grande do Sul

r– Coeficiente de correlação

r² – Coeficiente de determinação

WHO – World Health Organization

LOD – Limite de detecção

LOQ – Limite de quantificação

2,3,7,8-TCDD – Tetraclorodibenzodioxina

Σ PCB – Somatório de PCBs

RESUMO

Dissertação de Mestrado

Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos

Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil.

DETERMINAÇÃO DE BIFENILOS POLICLORADOS EM CARNE E PRODUTOS CÁRNEOS NO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL, BRASIL

Autor: Stanislau Bogusz Junior

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Ijoni Hilda Costabeber

Co-orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Tatiana Emanuelli

Local da defesa: Santa Maria, 30 de maio de 2004.

No presente trabalho foi validada uma metodologia analítica, empregando cromatografia gasosa com micro detector de captura eletrônica (CG/ μ ECD), com a finalidade de identificar e quantificar os bifenilos policlorados PCBs n^{os}. 10, 28, 52, 153, 138 e 180 em amostras de carne e de produtos cárneos obtidos em diferentes regiões do Estado do Rio Grande do Sul (Brasil). Além disto, comparou-se os níveis encontrados com os limites máximos permitidos pela legislação nacional e internacional, permitindo assim identificar a existência, nas regiões em estudo, de contaminação de produtos cárneos em níveis acima do permitido. Na etapa da validação avaliou-se a linearidade, a precisão, a exatidão e a sensibilidade do método. Todos estes parâmetros foram considerados satisfatórios de acordo com os valores sugeridos na literatura para a análise de resíduos empregando-se métodos cromatográficos. Para a linearidade foi verificada uma correlação de 99,9% entre a área dos picos e a concentração existente dos padrões, indicando alta eficiência. As recuperações estiveram entre 97,3-110,7% e o coeficiente de variação foi menor que 16%, o que permite considerar adequada a exatidão do método. Os limites de detecção situaram-se entre 0,2-0,5 ng/g o que evidencia a aplicabilidade do método para o monitoramento dos PCBs em carne e produtos cárneos. Os níveis dos seis congêneres de bifenilos policlorados foram avaliados em 55 amostras de carne (bovina e suína) e produtos cárneos (lingüiça, salsicha hot-dog, mortadela, carne enlatada para exportação e salame) obtidas de 11 cidades do estado do Rio Grande do Sul, entre julho e agosto de 2002. O composto encontrado na maior concentração foi o PCB 52 (2,64 ng/g de gordura), seguido dos PCBs 180 (0,85 ng/g de gordura), 10 (0,68 ng/g de gordura), 28 (0,60 ng/g de gordura), 138 (0,22 ng/g de gordura) e

153 (0,20 ng/g de gordura). O somatório dos seis congêneres, expresso como Σ PCB foi de 5,19 ng/g de gordura para os níveis médios. O valor máximo detectado nas amostras foi de 124,71 ng/g de gordura. A concentração média dos PCBs foi maior nos produtos cárneos do que na carne. Os níveis dos PCBs nas amostras seguem a seguinte ordem de magnitude: produtos cárneos com carne mista > carne suína > carne bovina. O PCB 153 foi encontrado em níveis significativamente mais altos na carne enlatada para exportação, quando comparado aos outros produtos cárneos. Este congêneres também foi encontrado em níveis significativamente maiores nas amostras da região sul, quando comparado com os valores das amostras provenientes das outras regiões do estado. Os resultados indicam a presença de PCBs em amostras de carne e produtos cárneos do Rio Grande do Sul, Brasil. Porém, os níveis encontrados estão abaixo dos limites máximos de resíduos estabelecidos para alimentos de origem animal na Comunidade Européia (200 ng/g de gordura) e no Brasil (3000 ng/g de gordura). Este é o primeiro trabalho que descreve os níveis de contaminação residual por PCBs na carne e nos produtos cárneos no Rio Grande do Sul, Brasil.

ABSTRACT

Master Dissertation

Pos-Graduate Course of Food Science and Technology

Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

DETERMINATION OF POLYCHLORINATED BIPHENYLS IN MEAT AND MEAT PRODUCTS FROM THE STATE OF RIO GRANDE DO SUL, BRAZIL

Author: Stanislaw Bogusz Junior

Adviser: Ijoni Hilda Costabeber

Co-Adviser: Tatiana Emanuelli

Place and date of defense: Santa Maria, May 30, 2004.

In the present work a method of gas chromatography with Electron Capture Detection (GC/ μ ECD) was validated for analysis of Polychlorinated Biphenyls (PCBs) n^o. 10, 28, 52, 153, 138 e 180. In addition, PCB levels of samples of meat and meat products from different regions of Rio Grande do Sul State (Brazil) were evaluated. Values found were compared to the Maximum Residue Level (MRL) established by national and international rules to determine the possible occurrence of risk regions for PCBs, i.e. regions with PCB levels higher than the MRL. Method validation was performed by determining the linearity, precision, accuracy and sensibility. All parameters evaluated were in good agreement with the values suggested for residue analysis using chromatographic methods. For linearity, a correlation of 99.9% was obtained between the peak area and PCB concentration, indicating high efficiency. The average recoveries ranged between 97.3 - 110.7% and the variation coefficient was lower than 16%, indicating the accuracy of the present method. The detection limits for PCBs ranged between 0.2-0.5 ng/g indicating the applicability of the method for the survey of PCB residues in meat and meat products. The levels of six congeners of PCBs (10, 28, 52, 153, 138, and 180) were evaluated in 55 samples of meat (bovine and pork) and meat products (sausage, hot dog sausage, bologna sausage, canned export meat and salami) obtained from 11 cities of the state of Rio Grande do Sul, Brazil, between July and August 2002. The compound found at the highest concentration was PCB 52 (2.64 ng/g fat), followed by the congeners 180 (0.85 ng/g fat), 10 (0.68 ng/g fat), 28 (0.60 ng/g fat), 138 (0.22 ng/g fat) and 153 (0.20 ng/g fat). The sum of the six PCBs, expressed as \sum PCB was 5.19 ng/g fat for the mean levels and 124.71 ng/g fat for

the maximum levels. The average concentrations of each congener were higher in meat products than in meat. PCB levels in samples were found in the following rank: mixed meat products>pork meat>bovine meat. PCB 153 was found at significantly higher levels in canned export meat than in the other meat products. Also, this congener was found at significantly higher levels in samples from southern region than in samples from the other regions. These results indicate the presence of PCBs in food samples from Rio Grande do Sul, Brazil. However, the levels found were well below the maximum level established for animal food products in European Community (200 ng/g fat) and in Brazil (3,000 ng/g fat). This is the first paper describing background concentrations of PCBs in meat and meat products from Rio Grande do Sul, Brazil.

1. INTRODUÇÃO

Os bifenilos policlorados (PCBs, do inglês Polychlorinated Biphenyls) são um grupo de compostos orgânicos sintéticos que contém 209 compostos individuais, conhecidos como congêneres. Estes compostos foram sintetizados pela primeira vez em 1881 por Schmidt & Schultz, porém sua produção industrial não teve lugar até o ano de 1929, quando passaram a ser comercializados como misturas técnicas e não como compostos individuais. A literatura cita até 46 nomes usados na comercialização destas mesclas de PCBs (de Voogt & Brinkman, 1989), dentre os mais comuns destacam-se: Aroclor (nos EUA, Reino Unido, Canadá e Austrália), Phenochlor (na França), Clophen (na Alemanha), Kaneclor (no Japão) e Ascarel no Brasil (ABNT, 1994; Eletropaulo, 1994, ABNT, 1997). Desses, a série Aroclor, fabricada pela empresa norte-americana Monsanto, foi provavelmente a mais amplamente usada. Nos Estados Unidos da América, sua produção foi iniciada na década de 20, época em que se considerava que os PCBs permaneciam no local onde eram utilizados. Suas aplicações industriais incluíam capacitores elétricos, óleos de transformadores elétricos, bombas de vácuo, turbinas de transmissão de gás, fluídos hidráulicos, resinas plastificantes, tintas, adesivos, plastificantes para borracha, fluídos de transferência de calor, aditivos antichama, óleos lubrificantes e para corte, conservantes de pesticidas e papel carbono (de Voogt & Brinkman, 1989; WHO/IPCS, 1993; ATSDR, 1997; Penteado *et al.*, 2001). O pico de produção dos PCBs nos EUA ocorreu em 1970, no qual, foi registrada uma produção de 50.000 toneladas. A maior parte desta produção era consumida pela indústria eletro-eletrônica. Estima-se que, devido ao grande emprego de PCBs, sua produção mundial acumulada chegou a aproximadamente 1.200.000 toneladas. Deste total, cerca de 60% foram utilizados em transformadores e capacitores, 15% em fluidos de transferência de calor e 25% como aditivos na formulação de plastificantes, tintas, adesivos e pesticidas. Pode-se estimar que deste total, cerca de 40% (300.000 toneladas) entraram para o ambiente desde 1929 e que grande parte do restante ainda está em uso, principalmente em equipamentos eletro-eletrônicos antigos (Penteado *et al.*, 2001).

O uso indiscriminado dos PCBs associado as suas características de lipossolubilidade e estabilidade térmica e química, levaram a sua difusão no meio ambiente, e, conseqüentemente, na cadeia alimentar. Para a população em geral, atualmente os alimentos são a principal fonte de contaminação por PCBs, chegando

a contribuir com mais de 90% desta (WHO/IPCS, 1993; Lien & Theelen, 1997; Safe, 1998; Schlummer *et al.*, 1998). Os PCBs podem ser freqüentemente detectados em diversos alimentos de origem vegetal e animal, destacando-se especialmente o pescado, a carne, os ovos e a gordura do leite (WHO/IPCS, 1993; Paumgarten *et al.*, 2000). Devido às conseqüências que estes resíduos podem causar, tanto nos ecossistemas naturais como na saúde humana, o interesse pelo seu estudo nos alimentos e no meio ambiente, é contínuo e crescente (Mes *et al.*, 1991; Zabik *et al.*, 1992; WHO/IPCS, 1993; Patandin *et al.*, 1999; Diber *et al.*, 2000; Bester *et al.*, 2001; Abad *et al.*, 2002; Costabeber & Emanuelli, 2004; Kim *et al.*, 2004).

A intoxicação humana através dos alimentos contaminados se caracteriza pelo aparecimento de afecções dérmicas, hipersecreção ocular, pigmentação das unhas e mucosas, fadiga, náuseas e vômitos (Goto & Higuchi, 1969). Os PCBs podem atravessar a barreira placentária produzindo malformações em fetos e abortos (Dekoning & Karmaus, 2000). Além disso, segundo Colman & Dawson (1996), os PCBs exercem ação de mimetismo estrogênico e/ou antagonismo androgênico, efeito que poderia ser responsável pela feminilização dos peixes, como conseqüência de uma alta contaminação aquática.

Os bifenilos possuem ações teratogênicas e carcinogênicas; afetam os sistemas reprodutor e endócrino, além de provocarem alterações cutâneas, imunotóxicas e neurotóxicas (Costabeber & Emanuelli, 2004). Ainda, apresentam uma ação sinérgica sobre o aparecimento de tumores hepáticos ocasionados por hexaclorobenzeno (HCB) em ratos (Nagasaki *et al.*, 1975). Este efeito tem grande relevância devido ao fato de os PCBs freqüentemente aparecerem com os pesticidas organoclorados, e apresentarem semelhanças em suas propriedades físicas, além de se acumularem nos mesmos tipos de alimentos (Nagasaki *et al.*, 1975).

Devido as conseqüências que estes resíduos podem causar para a saúde humana e considerando os resultados de trabalhos anteriores (Mes *et al.*, 1991; Hernandez *et al.*, 1994; Costabeber *et al.*, 1997), que sugerem uma redução no consumo de alimentos de origem animal e de alimentos processados (Patandin *et al.*, 1999), torna-se importante o monitoramento de PCBs em carne e produtos cárneos destinados ao consumo humano.

O objetivo do presente trabalho foi identificar e quantificar PCBs em amostras de carne e de produtos cárneos produzidos em diferentes regiões do Estado do Rio

Grande do Sul (Brasil), determinando, assim, os níveis de contaminação por estes compostos nas diferentes regiões.

Os objetivos específicos foram:

1. Validar uma metodologia para determinação de PCBs em carne e produtos cárneos através de cromatografia gasosa com micro detector de captura de elétrons (CG/ μ ECD).
2. Determinar os níveis de PCBs (10, 28, 52, 153, 138, 180) em amostras de carne (bovina e suína) e produtos cárneos (lingüiça, salsicha hot-dog, mortadela, carne para exportação e salame).
3. Comparar os níveis detectados com os máximos permitidos pela legislação.
4. Comparar os valores de resíduos encontrados nas amostras de carne e derivados conforme sua origem (cidade e região). Além disso, determinar a existência de localidades que possam apresentar amostras com níveis de contaminação acima do permitido pela legislação.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Estrutura e características físico-químicas dos PCBs

PCB é o nome genérico dado a classe de compostos organoclorados resultante da reação do grupo bifenilo com cloro anidro, utilizando ferro como catalisador. Sua fórmula empírica é $C_{12}H_{(10-n)}Cl_n$, onde n toma valores de 1 a 10. A Figura 1 mostra as dez posições possíveis que podem ocupar os átomos de cloro na estrutura do anel bifenilo: 4 posições *orto* (2,6,2',6'), 4 posições *meta* (3,5,3',5') e duas posições *para* (4,4').

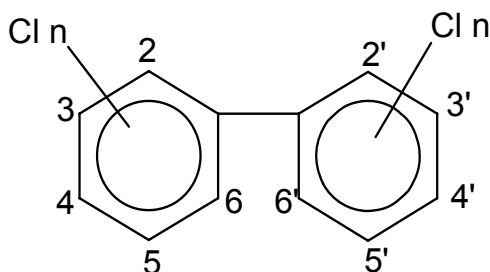


FIGURA 1. Estrutura molecular dos bifenilos policlorados, onde n é o número de átomos de cloro, compreendido entre 1 e 10. Fonte: Penteadó *et al.* (2001).

Todas as possíveis combinações na substituição clorada tornam possíveis um total de 209 congêneres diferentes. A palavra congênere designa de maneira geral os PCBs que diferem no número de átomos de cloro e os isômeros que diferem na distribuição de um mesmo número de átomos de cloro (Quensen *et al.*, 1990). Apresenta-se na Tabela 1 o número de isômeros possíveis em função do grau de cloração na molécula de PCBs.

A nomenclatura usual para os 209 congêneres de PCBs, considera a posição relativa dos átomos de cloro na estrutura bifenilo (Tabela 2), sendo a posição 1 reservada para a ligação entre os anéis. A partir desta, no anel da esquerda, as posições são numeradas em ordem crescente no sentido anti-horário. No outro anel, as posições são numeradas da mesma forma, mas em sentido horário, adicionando-se um índice para diferenciar do anel anterior (Figura 1). Na Tabela 2 apresentam-se alguns exemplos para esta nomenclatura.

TABELA 1 – Congêneres de PCBs possíveis, nº de isômeros, massa molecular e porcentagem de cloro para vários isômeros.

Bifenilo	Nº de isômeros	Massa molecular	% Cloro
Monocloro	3	188,7	18,8
Dicloro	12	223,1	21,8
Tricloro	24	257,5	41,3
Tetracloro	42	292,0	48,6
Pentacloro	46	326,4	54,3
Hexacloro	42	360,9	58,9
Heptacloro	24	395,3	62,8
Octacloro	12	429,8	66,0
Nonacloro	3	464,2	68,7
Decacloro	1	498,7	71,2
Total	209		

FONTE: Penteado *et al.* (2001).

As misturas comerciais contendo PCBs, em geral, contém 50 ou mais congêneres. A denominação comercial destas misturas técnicas sempre reflete seu grau de cloração (Abramowicz, 1990). Assim os distintos Aroclors são identificados por quatro dígitos, os dois primeiros representam a estrutura central (12 para bifenilos policlorados) e os dois últimos dígitos representam a quantidade de cloro existente na mistura. Desta forma a mistura denominada Aroclor 1242 contém PCBs (indicado pelo número 12) com 42% de cloro em massa (Donnelly *et al.*, 1996; Penteado *et al.*, 2001).

Entre as propriedades dos PCBs destacam-se sua resistência a altas temperaturas, baixa volatilidade e baixa constante dielétrica. São resistentes a oxidação, a redução e a ácidos e álcalis. São compostos insolúveis em água, mas solúveis em lipídeos e na maioria dos solventes orgânicos. Podem apresentar-se como líquidos oleosos ou sólidos cristalinos e resinas. Seu ponto de ebulição e de fusão, assim com de inflamabilidade aumentam com o aumento de números de cloro na molécula, aumentando sua capacidade de bioacumulação do mesmo modo (WHO/IPCS, 1993).

TABELA 2 – Sistema de identificação dos PCBs.

Número de cloros	Usual	IUPAC
2	2,6 diclorobifenil	PCB 10
3	2,4,4'triclorobifenil	PCB 28
4	2,2',5,5' tetraclorobifenil	PCB 52
6	2,2',3,4,4'5' hexaclorobifenil	PCB 138
6	2,2',4,4',5,5' hexaclorobifenil	PCB 153
7	2,2',3,4,4',5,5' heptaclorobifenil	PCB 180

FONTE: WHO/IPCS, (1993).

2.2- Aspectos toxicológicos dos PCBs

Os PCBs podem ser absorvidos pela via dérmica, assim como pela ingestão e inalação. Para a população geral, hoje, os alimentos são a principal fonte de contaminação, embora a exposição dérmica possa ser dominante entre as pessoas que manuseiam diretamente os PCBs ou materiais contendo PCBs (Lees *et al.*, 1987).

Foi relatado câncer renal em trabalhadores com exposição a PCBs, porém os dados obtidos não foram suficientes para possibilitar uma análise estatística (Shalat *et al.*, 1989). Em uma revisão epidemiológica sobre PCBs observou-se que o câncer de rim e o de pele eram marginalmente significativos, mas os revisores consideraram o conjunto dos estudos inconclusivos (Longnecker *et al.*, 1997). A exposição a PCBs em um cenário ocupacional exerce efeitos no sistema nervoso central humano, com sintomas tais como dores de cabeça, fadiga e danos na transmissão dos impulsos nervosos (Rogan & Gladen, 1992).

Em uma revisão sobre a toxicidade dos PCBs, Safe (1984) listou os seguintes sintomas: indução de enzimas; níveis de vitamina A diminuídos; diminuição dos elementos linfóides do sangue; atrofia do timo e do baço; imunossupressão; cloracne; alopecia (perda de cabelos em áreas do couro cabeludo); edema; hiperkeratose (engrossamento da pele); blefarite (inflamações das pálpebras); hiperplasia do revestimento epitelial dos ductos biliares extra-hepáticos, da vesícula biliar e do trato urinário; hepatomegalia; danos ao rim, incluindo necrose; hemorragia; hepatotoxicidade (alteração do metabolismo das

porfirinas interferindo na formação das hemáceas); promoção de tumores; alteração dos níveis de esteróides e hormônios tireoidianos; alterações do sistema reprodutivo feminino e masculino, incluindo irregularidades menstruais, concepção reduzida (dificuldade em engravidar), indução de aborto em fases iniciais da gravidez, sangramentos menstrual e puerperal excessivos, anovulação, atrofia testicular, espermatogênese diminuída, teratogênese e alterações do desenvolvimento embrionário. Além disso, níveis baixos de PCBs causaram distúrbios comportamentais em macacos (Rice, 1999).

Os Aroclors 1221, 1254 e 1268 reduziram as taxas de fertilização “*in vitro*” de ratos, sendo o Aroclor 1254 a mistura mais potente (Kholkute *et al.*, 1994). O Aroclor 1254 também comprometeu a resposta do sistema imunológico de minhocas (Roch & Cooper, 1991). Embora grande parte da pesquisa toxicológica esteja ligada a misturas de PCBs, os congêneres individuais têm efeitos distintos e agem por meio de vários mecanismos diferentes. O potencial tóxico para alguns congêneres de PCBs depende de sua conformação espacial. Esta conformação é classificada em planar ou coplanar, dependendo do número e posição dos átomos de cloro na molécula dos PCBs. A conformação planar apresenta átomos de cloro na posição *orto* (2,2') na molécula do PCB, enquanto que na conformação coplanar não existem átomos de cloro nesta posição. A conformação coplanar é considerada a mais tóxica possuindo ação semelhante a da dioxina (tetraclorodibenzodioxina ou 2,3,7,8-TCDD), que é considerada como padrão de referência toxicológica.

Alguns congêneres, ou seus metabólitos, causam disfunção endócrina (atuam no organismo como se fossem hormônios, alterando o metabolismo), incluindo estrogenicidade e anti-estrogenicidade. Em geral, os PCBs com substituição orto são estrogênicos, e os PCBs coplanares são anti-estrogênicos, como é a 2,3,7,8-TCDD (Li *et al.*, 1994). De acordo com Brouwer *et al.*, (1999), os PCBs podem afetar não apenas os níveis hormonais de estrógenos, mas também os níveis de hormônios androgênicos, tireoidianos, hipofisários e corticosteróides. Além disso, foram observados efeitos nos hormônios tireoidianos em populações selvagens de pássaros e leões-marinhos em cativeiro, que se alimentavam de peixes, e estes efeitos foram correlacionados à exposição a PCBs (Brouwer *et al.*, 1999).

Os PCBs com substituição orto (não semelhantes à dioxina) também apresentaram efeitos pronunciados na função neuroquímica. Descobriu-se que eles

reduziam a síntese de dopamina e, posteriormente, se estabeleceu que os efeitos eram causados pelos congêneres e não pelos seus metabólitos. O 2,2'-diclorobifenil (PCB 4) foi o congênere mais potente (Seegal & Shain, 1992).

O PCB 77 (3,3',4,4'-TeCB), semelhante à dioxina, também causou alterações comportamentais e neuroquímicas, a longo prazo, em animais de laboratório, incluindo alterações na função dopamínica. Esse congênere, no entanto, não se acumulou no tecido cerebral da mesma forma que alguns congêneres com substituição orto, indicando que ele opera através de um outro mecanismo, ou que o agente ativo é um de seus metabólitos (Seegal & Shain, 1992).

Os níveis de PCBs em material biológico podem ser várias vezes mais concentrados que no meio ambiente. Os PCBs são bioacumulados a um fator entre 2.500 a 100.000 vezes para peixes e 6.000 a 47.000 para invertebrados (Train, 1979).

Os efeitos da exposição crônica a PCBs em mamíferos marinhos incluem deformidade física e distúrbios na reprodução (Reijnders, 1986). Os PCBs foram implicados nos surtos de doenças entre populações de focas e golfinhos (Gilbertson, 1989), sugerindo que eles podem causar disfunções no sistema imunológico.

O consumo médio de PCBs em adultos, através de alimentos, é estimado em 14 µg/dia ou aproximadamente 100 µg/semana (WHO/EURO, 1987). Assim como os organoclorados, os PCBs são lipofílicos e se armazenam preferencialmente no tecido adiposo (Costabeber, 1999) e em menores quantidades no soro sangüíneo, nos demais órgãos e no leite (Angulo *et al.*, 1997).

2.3. Acidentes envolvendo PCBs

2.3.1. Casos de Yusho (Japão) e Yu-Cheng (Taiwan)

Em 1968, no Japão mais de 1600 pessoas foram envolvidas em um acidente, devido ao consumo de óleo de arroz que havia sido contaminado com PCBs, policlorodibenzofuranos (PCDF) e terfenilas policloradas (PCT) oriundos de um trocador de calor. Este episódio foi conhecido como Yusho (Penteado *et al.*, 2001), devido ao nome do óleo de arroz. Um outro acidente semelhante aconteceu em Yu-cheng, Taiwan em 1979, contaminando óleo de arroz por fluídos. Tal óleo, apresentou níveis de 196 mg/g de PCBs totais. A fatalidade causada pela ingestão do óleo de arroz contaminado foi avaliada como a mais importante ocorrência para

análise dos malefícios à saúde humana causada por compostos clorados aromáticos sem a extrapolação de experimentos em animais de laboratório (Soong & Ling, 1997). Os sintomas apresentados pelas vítimas foram: fadiga, dor de cabeça, dores com inchaço, inibição do crescimento da dentição, anemia, problemas sangüíneos, redução da condução nervosa, erupção na pele, despigmentação, dor nos olhos, entre outros. Estudos realizados com crianças de 8 a 16 anos, nascidas de mães que consumiram óleo contaminado em 1979 em Yu-cheng, mostraram efeitos como depressão do sistema imunológico, que resultou no aumento das doenças infecciosas. Estas crianças mostraram alta freqüência de bronquite e gripe nos seis primeiros meses, e após 6 anos do acidente estas mesmas crianças, apresentaram infecções no ouvido e no trato respiratório (YU *et al.*, 1998 appud, Penteado *et al.*, 2001). Foi observado, nas vítimas de ambos os acidentes, um aumento na incidência de casos de câncer no fígado (Penteado *et al.*, 2001).

2.3.2. Contaminação do Rio Hudson

O rio Hudson é um dos principais recursos hídricos do extremo oeste americano apresentando grande diversidade ictiológica (cerca de 100 espécies). Constitui-se numa importante ligação com os Grandes Lagos e o Estado de Michigan, sendo utilizado para o transporte marítimo. Em 1947 a empresa G.E. (General Electric Company) iniciou suas atividades na produção de capacitores elétricos com duas plantas situadas ao norte do rio Hudson. Em sua linha de produção eram empregados principalmente os Aroclors 1242 e 1016 como fluido dielétrico na fabricação dos capacitores, no período 1966 a 1976. A emissão de efluentes contaminados com PCBs pela G.E. teve um fluxo cerca de 14 Kg/dia, por mais de 30 anos até o encerramento de suas atividades naquele local. Somente em 1969 foram detectados PCBs em peixes do rio Hudson e a partir de 1975 o fato foi encarado como um “sério problema ambiental” (Brown *et al.*, 1985). Entretanto, já era tarde demais e o rio estava comprometido, apresentando concentrações de PCBs muito acima das permitidas pela legislação, na época. Como consequência todo o consumo e comercialização de peixes do rio foram proibidos (Feng *et al.*, 1998).

2.3.3. Acidentes no Brasil

No Brasil, em 1997, a Eletropaulo contabilizou um total de 562 toneladas de Ascarel. Furnas também declarou um total de 136 toneladas do mesmo produto

(Penteado *et al.*, 2001). Entretanto, não se tem idéia do montante de equipamentos contendo PCBs que ainda estão em uso no Brasil, em outras Estatais ou na iniciativa privada.

Intoxicações por PCBs são as conseqüências de incidentes ocorridos em diferentes estados do Brasil. Assim, em São Paulo, no ano de 1987, um vazamento de 10.000 L de Ascarel na subestação de Furnas Centrais Elétricas S.A. atingiu o solo e contaminou funcionários (Jornal O Estado de São Paulo, 1996a). Neste mesmo Estado, foi detectado um vazamento de 40.000 L de Ascarel na Subestação de Iperó (Jornal Folha do Paraná, 2001). No Rio de Janeiro, um ato de vandalismo ocasionou o vazamento de 400 L de Ascarel provenientes de dois transformadores. Este incidente provocou a intoxicação de 9 moradores e possivelmente a morte de uma criança (Jornal O Estado de São Paulo, 1996b, 1996c). No Rio Grande do Sul, a organização não-governamental internacional *Greenpeace* denunciou a siderúrgica Gerdau, situada na região metropolitana de Porto Alegre, por contaminar o meio ambiente por PCBs. As amostras coletadas na siderúrgica apresentaram Ascarel do tipo Aroclor 1254 (Jornal O Estado de São Paulo, 2001).

2.3.4 Acidentes envolvendo contaminação de alimentos

Em 1999, na Bélgica, ocorreu um acidente com PCBs que resultou na contaminação de alimentos, onde cerca de 10 milhões de pessoas foram contaminadas. Estima-se que 40 a 8.000 novos casos de câncer poderão ser desencadeados a partir deste acidente. O incidente na Bélgica serviu como alerta para que autoridades sanitárias aumentassem o rigor no monitoramento dos níveis de PCBs em alimentos de origem animal na Comunidade Européia (Esposito *et al.*, 2001). Trabalhos posteriores (Schepens *et al.*, 2001) descrevem casos de contaminação de produtos cárneos pelo aproveitamento de gordura animal contaminada usada como ingrediente em rações.

A presença de bifenilos policlorados em alimentos tem sido relatada pela literatura. Mes *et al.* (1991), analisando amostras de carne no Canadá, encontraram PCBs em concentrações variadas, sendo que em bovinos detectaram 6,2 ng/g em bife e 3,2 ng/g em carne assada; em suínos, foram encontrados 4,2 ng/g em carne fresca e 3,8 ng/g em carne curada; em cordeiro 0,6 ng/g; em fiambre 1 ng/g e em salsichas 0,6 ng/g. Os PCBs mais encontrados na carne bovina e em aves domésticas foram os de número 118, 138, 153 e 180, porém, algumas vezes estes

congêneres não foram encontrados em alimentos processados, como por exemplo em sopa de carne enlatada (Mes *et al.*, 1991). Todas as amostras analisadas por Hernandez *et al.* (1994) na Espanha, continham concentrações elevadas de PCBs, sendo que a carne de ovinos apresentou o valor médio mais alto (1032 ng/g de gordura), com um valor máximo de 5190 ng/g de gordura; a carne de suínos apresentou uma concentração média de 787 ng/g de gordura, seguida da de bovinos (765 ng/g de gordura) e da de aves (664 ng/g de gordura). Os mesmos tipos de carnes foram analisados por Kannan *et al.* (1994), que encontraram um valor médio de 92 ng/g de gordura. Analisando amostras de ganso canadense, Levengood *et al.* (1999) observaram que o cozimento do músculo do peito, sem a pele e tecido adiposo, resultou em uma redução na concentração do composto estudado, o Aroclor 1248.

2.4. PCBs e aspectos legais

Os PCBs são controlados pela maioria dos instrumentos legais internacionais relacionados a organoclorados, como por exemplo a Convenção sobre Poluição Industrial de Oslo-Paris (OSPAR), a Convenção sobre Poluição Transfronteiriça de Longo Alcance de Rotterdam (LRTAP) e a Comissão Internacional Sobre os Grandes Lagos.

Dentro da Comunidade Européia (CE), as aplicações dos PCBs foram primeiramente restringidas pela Diretriz 76/769/EEC, que lida com o mercado e o uso de substâncias e preparações perigosas (EC, 1976). Essa Diretriz, e sua Emenda (EEC, 1991), restringiram as aplicações de PCBs e seus substitutos, as terfenilas policloradas (PCTs).

As regulamentações da CE sobre a disposição de PCBs, conforme delineadas no Diretivo de 1996, dita que a eliminação gradativa dos PCBs deve se completar até 2010. Além disso, legislações nacionais a esse respeito deveriam ter sido efetivadas até março de 1998. Vários países perderam esse prazo e, na metade de 1999, a CE iniciou uma ação pela Corte de Justiça Européia contra a Alemanha, a Grécia, a Espanha, Portugal e o Reino Unido, por falharem em implementar a Diretriz (ENDS, 1999). Em se tratando de alimentos, a Comunidade Européia estabelece em 200 µg/kg de gordura o limite máximo de PCBs em produtos de origem animal (Bester *et al.*, 2001).

Em 1978 começaram a surgir as primeiras leis americanas restringindo o uso de PCBs somente para sistemas fechados, como trocadores de calor (Albaiges, 1980). Em 1983 foi publicada lei federal (EPA, 1983) proibindo o uso de PCBs em todo o território americano a partir de 1988.

No Brasil, as restrições para seu uso foram implementadas através da Portaria Interministerial 19, de 2 de janeiro de 1981. Essa portaria estabelece, entre outras coisas, a proibição da fabricação, comercialização e uso de PCBs em todo território nacional. Entretanto, permite que os equipamentos já instalados continuem em funcionamento até sua substituição integral ou a troca do fluido dielétrico por produto isento de PCBs. Esta portaria também proíbe o descarte de PCBs ou produtos contaminados em cursos d'água, exposição de equipamentos contendo PCBs a intempéries, além de regulamentar o local de instalação dos equipamentos que contenham PCBs que ainda estejam funcionando. Além dessa Portaria, há a Instrução Normativa 001 SEMA/STC/CRC, do Ministério do Interior, de 10 de junho de 1983, que disciplina as condições a serem observadas no manuseio, armazenagem e transporte de PCBs e/ou resíduos contaminados. Há também, a norma ABNT/NBR 8371/94 que estabelece orientação para o manuseio, embalagem, rotulagem, armazenagem e transporte de PCBs para transformadores e capacitores, níveis de contaminação permitidos em equipamentos novos, equipamentos em operação, além de valores para manutenção e descarte dos fluídos e equipamentos elétricos que contenham PCBs. Quanto aos limites máximos de resíduos de PCBs em alimentos no Brasil, existe a Instrução Normativa nº 42, do Ministério do Interior, de 20 de dezembro de 1999 que estabelece os limites de resíduos de PCBs em alimentos de origem animal em 3000 µg/kg de gordura.

3. ARTIGOS CIENTÍFICOS

3.1. ARTIGO 1

VALIDACIÓN DE UN PRODIMENTO ANALÍTICO PARA LA DETERMINACIÓN DE BIFENILOS POLICLORADOS (PCBs) EM CARNE Y PRODUCTOS CÁRNICOS

Stanislau BOGUSZ JUNIOR¹, Tatiana EMANUELLI^{1,2}, Ijoni COSTABEBER³.

¹ Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Campus de Camobi, Santa Maria, RS, Brasil. CEP: 97105-900.

² Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos, CCR, UFSM.

³ Departamento de Morfologia, Centro de Ciências da Saúde, UFSM. e-mail: ijoni@smail.ufsm.br

Palabras clave: Método Analítico, Validación, Bifenilos Policlorados, Carnes y Derivados.

RESUMEN

Se presenta la validación de un método, utilizando cromatografía a gas, para análisis de residuos de bifenilos policlorados (PCBs) en carne y productos cárnicos. La validación fue determinada a través de la linealidad, precisión, exactitud y sensibilidad. Para la linealidad fue verificada una correlación de 99,9%, entre el área de los picos y la concentración existente en las muestras fortificadas, indicando alta eficiencia. Las recuperaciones medias quedarán entre 97,3-110,7% y el coeficiente de variación encontrado fue menor que 16% lo que permite considerar adecuada la exactitud del presente método. Los límites de detección se encuentran entre 0,2-0,5 ng/g lo que evidencia la aplicabilidad del método para el monitoramiento de los compuestos residuales de PCBs en carne y productos cárnicos.

ABSTRACT:

VALIDATION OF AN ANALYTICAL METHOD TO DETERMINE POLYCHLORINATED BIPHENYLS (PCBs) IN MEAT AND MEAT PRODUCTS. The validation of a method of gas chromatography for analysis of polychlorinated biphenyls (PCBs) in meat and meat products is presented. The validation was performed by determining the linearity, precision, accuracy and sensibility. For linearity, a correlation of 99.9% was obtained between the peak area and PCB concentration, indicating high efficiency. The average recoveries ranged between 97.3-110.7% and the variation coefficient was lower than 16%, indicating the accuracy of the present method. The detection limits for PCBs ranged between 0.2-0.05 ng/g indicating the applicability of the method for the survey of PCB residues in meat and meat products.

INTRODUCCIÓN

Bifenilos policlorados (PCBs) son compuestos aromáticos halogenados de alta lipofilidad, baja volatilidad, baja reactividad biológica (Garrido et al., 1992) y conocida toxicidad (Platonow et al., 1971). Debido a su amplio empleo industrial se tornaron una clase de importantes contaminantes ambientales (Payá-Pérez et al., 1991). Segundo Hanaoka et al. (2002), la principal fuente de exposición de los PCBs en humanos se da por los alimentos como vegetales, agua, carne, pescados, leche y derivados (Frink et al., 1982; Woodley et al. 1991; Gill et al., 1992). Debido al riesgo que estos compuestos presentan para las poblaciones, algunos países baniran o restringirán el uso de los PCBs en virtud de acción sanitaria reguladora y publicidad favorable (Kennish et al., 1992; Duarte-Davison et al. 1994; Angulo et al., 1996; ABNT, 1997), además, establecerán en 200 µg/kg de grasa el límite máximo de residuos de PCBs totales en alimentos de origen animal (Bester et al., 2001), bien como, recomiendan la constante y continua monitorización de estos compuestos en alimentos.

El desarrollo de métodos constituyó una etapa extremadamente relevante en el área de análisis de residuos tóxicos. La investigación debe llevar en cuenta la validación del método desarrollado y no solo su optimización. Castro et al. (1989) definen la validación como la obtención de pruebas, convenientemente documentadas, demostrativas de que un método de control o fabricación es lo suficientemente fiable como para producir el resultado previsto dentro de un intervalo definido. El término "validación", desde el punto de vista del control de calidad, se emplea para indicar el proceso utilizado para establecer la calidad de un método y autorizar su uso en el laboratorio (Valcárcel y Ríos, 1992). La calidad y credibilidad de un trabajo analítico se fundamentan en los cuidados de que se acerca el analista para producir datos que expresen el valor real de la medida lograda. El analista que no se preocupa con parámetros como la linealidad, sensibilidad, límite de detección o precisión, difícilmente conseguirá obtener datos que tengan un significado real (Chasin et al. 1998). La mejor forma de evitar problemas con un método analítico es realizar una validación adecuada durante su desarrollo. La validación es discutida en muchos trabajos descritos en la literatura (Horwitz et al. 1980; Apostoli, 1995; Hanks, 1995; Huber, 1993; Jenke, 1996). El enfoque dado a la validación de métodos analíticos varía en función del área de aplicación, concentración del analito, objetivo del estudio y de la naturaleza del método.

La linealidad es la capacidad de un método analítico de obtener resultados linealmente proporcionales a la concentración del analito en la muestra, dentro de un intervalo determinado. Castro et al. (1989) consideran la linealidad como un criterio inicial de validación.

La precisión de un método analítico es el grado de concordancia entre una medida y otras realizadas para la misma muestra en condiciones sensiblemente iguales. Es la capacidad de un método para dar resultados semejantes cuando aplicado repetidamente sobre una muestra. La evaluación de la precisión de un método analítico se realiza mediante estudios de repetibilidad y reproducibilidad. Se puede definir cualitativamente la repetibilidad como la concordancia entre los resultados sucesivos obtenidos sobre una misma muestra cuando se llevan a cabo

determinaciones siguiendo el mismo método analítico, en idénticas condiciones experimentales (de instrumentos, operador, laboratorio, etc.) y trabajando con poca diferencia de tiempo entre las distintas determinaciones (Rauret, 1992). El concepto de reproducibilidad es parecido al de repetibilidad pero aplicado a otra situación. En lugar de unas condiciones que habían sido catalogadas de homogéneas (mismo método, operador, laboratorio y instrumentos), se ha encontrado ahora en una situación que se puede denominar heterogénea, (distintos instrumentos, laboratorios, operadores y métodos) (Rauret, 1992). En la práctica, Castro et al., (1989) establecen la reproducibilidad como realizar las determinaciones de una misma muestra en diferentes días.

La exactitud es definida por la International Organization for Standardization (ISO) como el grado de concordancia entre el resultado de una medida y el valor verdadero de la cantidad que se ha medido (Valcárcel y Ríos, 1992). La diferencia entre el valor verdadero o esperado y el medido para un cierto parámetro es denominado error.

La sensibilidad es la capacidad de un método analítico de registrar ligeras variaciones en la concentración de un analito. Este parámetro se relaciona con la cantidad de analito requerida para dar un resultado significativo, cualitativo o cuantitativo. La sensibilidad de un método suele evaluarse mediante la determinación de los límites de detección y de cuantificación. El límite de detección, según la Food and Drug Administration (FDA, 1994) es la menor concentración de analito en una muestra que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada, bajo las condiciones experimentales establecidas. Según la FDA (1994) el límite de cuantificación o de determinación es la menor cantidad o concentración de un analito de una muestra que puede ser determinada con aceptable precisión y exactitud bajo las condiciones experimentales establecidas. Concentraciones menores pueden detectarse pero no cuantificarse.

El objetivo de este trabajo fue presentar y discutir la validación de un método de cromatografía gaseosa para análisis de bifenilos policlorados en carne y productos cárnicos desarrollado en el Núcleo Integrado de Desenvolvimento em Análises Laboratoriais (NIDAL),

del Centro de Ciências Rurais de la Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Rio Grande do Sul, Brasil.

MATERIALES Y MÉTODOS

Padrones y reactivos

Como material patrón se ha utilizado los siguientes congéneres de bifenilos policlorados: IUPAC n°. 10 (2,6 - diclorobifenilo), n°. 28 (2,4,4'- triclorobifenilo), n°. 52 (2,2',5,5'- tetraclorobifenilo), n°. 138 (2,2',3,4,4',5'- hexaclorobifenilo), n°. 153 (2,2',4,4',5,5'- hexaclorobifenilo) y n°. 180 (2,2',3,4,4',5,5'- heptaclorobifenilo), adquiridos en SUPELCO, Inc., Bellefonte, Pensilvania, U.S.A. Todos se adquirieron con pureza superior al 98%. Los reactivos utilizados fueran hexano, éter de petróleo y acetona (Mallinckrodt Backer 40361, Kentucky, USA) todos grau resíduo (GR), sulfato de sodio anidro (Nuclear, Diadema, São Paulo, BR) previamente lavado con éter de petróleo GR y seco en estufa a 150° C por 12 horas y florisil 60-100 mesh (Mallinckrodt Backer 40361, Kentucky, USA), previamente activado en estufa a 150° C por 12 horas y parcialmente desactivado con 2% de agua ultra purificada Milli Q.

Método de análisis

Para la extracción de la fracción lipídica de las muestras se ha seguido la técnica descrita por Waliszewski et al. (1995), que utiliza aproximadamente 25 g de muestra (carne o producto cárnico), homogeneizada en picadora, a cual fue misturada con sulfato de sodio anidro hasta se obtener un polvo seco. A la continuación, el polvo fue acondicionado en una columna cromatográfica y eluído con éter de petróleo. La gordura fue obtenida por evaporación del solvente. Tomándose 0,5 g da gordura obtenida se ha procedido la extracción de los compuestos utilizándose una columna cromatográfica con 15 g de florisil, como fase estacionária y 100 mL de hexano, como eluyente, conforme describe Costabeber et al. (2000).

Los congéneres de PCBs fueran identificados y cuantificados utilizándose un cromatógrafo a gas AGILENT 6890 con micro detector de captura de electrones (μ ECD) de Ni⁶³

y columna capilar Agilent modelo HP-5 (Crosslinked 5% PH ME siloxane), de 30 m de largo, 0,25 mm de diámetro interno y 0,25 μm de espesura de fase estacionaria. Los análisis cromatográficos se realizaron bajo las siguientes condiciones de trabajo: volumen de inyección 3 μL , temperatura del inyector 250° C, temperatura del detector 350° C y las siguientes programaciones de rampas de temperatura: 110° C (durante 0,5 minutos) y gradiente de 14° C/min até 280° C. El nitrógeno fue el gas utilizado como gas de arrastre a un flujo de 1,6 mL/min, lo que resultó en una presión de 20,03 psi en la columna.

Validación del método

Para el estudio de la linealidad se prepararon una serie de patrones de analito de concentraciones crecientes (0,0001; 0,00025; 0,0004; 0,0005; 0,0007 y 0,0009 ng/ μL). Todos estos niveles de concentraciones de cada compuesto fueron inyectados en el sistema cromatográfico por duplicado. Con los datos obtenidos se ha calculado la curva de calibración que relaciona la respuesta del sistema de análisis con la concentración o cantidad de analito. La recta de regresión se halló por el método de ajuste de los mínimos cuadrados.

La precisión del método fue expresada matemáticamente por los coeficientes de variación porcentual (CV%) obtenidos en condiciones determinadas de repetibilidad y reproducibilidad. La repetibilidad del método fue calculada a partir de una serie de resultados obtenidos en condiciones homogéneas. Para evaluar la repetibilidad del método fue utilizada una muestra de gordura de producto cárnico, analizada antes e después de la contaminación de una cantidad conocida (0,01 ng/ μL) de cada uno de los compuestos en estudio. Para ello se ejecutó el método propuesto, desde la extracción y purificación de la gordura y de los congéneres de bifenilos policlorados hasta el análisis cromatográfico realizando tres repeticiones del proceso en el mismo día. Para la reproducibilidad, al igual que en los estudios de repetibilidad, se partió de una muestra de gordura de producto cárnico, analizada antes e después de la contaminación de una cantidad conocida (0,01 ng/ μL) de cada uno de los compuestos en estudio. La muestra fue

sometida a análisis por duplicado en 4 días separados. Estos días se eligieron para intentar incluir posibles variaciones que se produjeran en el sistema cromatográfico con el paso del tiempo. Estas variaciones son muy críticas cuando se realiza la cuantificación empleando patrón externo.

Para evaluar la exactitud del método se ha hecho pruebas de recuperación de cada uno de los PCBs en estudio. Para esto se ha preparado tres alícuotas de una misma muestra contaminada en el laboratorio con concentraciones conocidas de patrones de los analitos (0,0001; 0,00025; 0,0004; 0,0005; 0,0007 y 0,0009 ng/ μ L); una alícuota sin contaminación; tres blancos con las mismas concentraciones de los patrones de los analitos en estudio (0,0001; 0,00025; 0,0004; 0,0005; 0,0007 y 0,0009 ng/ μ L) usados para contaminar la muestra. Se ha realizado la purificación y extracción de las muestras segundo el método propuesto. Con los resultados obtenidos se ha calculado los porcentajes de recuperación mediante la aplicación de la siguiente fórmula: $\% \text{ recuperación} = (A-B)/C$, siendo A = concentración de analito en la muestra adicionada de patrón, B = concentración de analito en la muestra y C = concentración de analito en el patrón.

La sensibilidad de un método suele evaluarse mediante la determinación de los límites de detección y de cuantificación. Se ha establecido los límites de detección conforme el establecido por Long y Winefordner (1983) y Leite (1998). Según estos, los límites de detección son calculados a partir de tres veces el desvío de la señal de la línea de base o ruido del detector. Los límites de cuantificación del método fueron calculados como 10 veces el desvío del señal producido pela línea de base o ruido, obtenido a partir de las curvas de calibración de cada uno de los patrones (Miller y Miller, 1993).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La identificación de los distintos compuestos, se ha conseguido a partir de sus correspondientes tiempos de retención (t_r), obtenido al inyectar cantidades conocidas de los patrones individuales de los bifenilos policlorados (**Figura 1**).

El estudio de la linealidad del método para análisis de PCBs se ha realizado mediante la regresión lineal de las rectas de calibración y la determinación del coeficiente de correlación (r) y el de determinación (r^2). El coeficiente de correlación (r) nos informa el grado de relación entre dos variables, de como los cambios de una producen un efecto directo sobre la otra (Domenech y Riba, 1989). En este caso, una de las variables es la concentración de cada compuesto (x) y la otra, la señal del detector de captura de electrones (y) que es recogida en forma de área bajo una curva. El cuadrado del coeficiente de correlación se denomina coeficiente de determinación (r^2) y indica la proporción de la varianza total de la señal del detector de captura de electrones (y) que es explicada por el modelo lineal de regresión. El coeficiente de determinación explica en cada caso el porcentaje de variación de la concentración del analito (x) que se debe a la respuesta del sistema cromatográfico (y). Los valores de los coeficientes r y r^2 para cada uno de los compuestos en estudio se encuentran recogidos en la **Tabla I**. Según Castro et al. (1989), en el análisis de trazas de un elemento, se consideran aceptables valores de r iguales o mayores a 0,990. Como se puede observar en la **Tabla I**, los resultados obtenidos en todos los casos presentaron valor de r mayor que el recomendado por Castro et al. (1989).

La interpretación estadística de la significación de los valores de r experimentales obtenidos fue realizada comparándolos con valores teóricos de tablas de correlación, para $n-2$ grados de libertad, 4 en este caso, y una probabilidad de $p < 0,001$, siendo significativa la correlación lineal entre las dos variables cuando $r_{\text{experimental}} > r_{\text{teórico}}$. Así, $r_{\text{teórico}}(4, 0,001) = 0,974$. De los resultados obtenidos se puede afirmar que existe en todos los casos una correlación positiva con una probabilidad del 99,9% entre la concentración de los diferentes compuestos y el área registrado por el sistema de integración del cromatógrafo, al obtener en todos los casos valores de r mayores al valor teórico esperado.

Para verificar la significación estadística de la linealidad fue calculada la varianza de la pendiente b (S_b^2). La varianza de la pendiente (S_b^2) se utiliza como expresión matemática de la

linealidad: a menor varianza mejor linealidad (Castro et al., 1989). También se utiliza para expresar la linealidad la desviación estándar o error estándar de la pendiente S_b y la desviación estándar relativa S_b relativa (%). Según Castro et al. (1989), los valores de S_b relativa han de ser menores o iguales al 5% para considerar como aceptable la linealidad. Los valores de S_b relativa (%) obtenidos en las pruebas de linealidad para los compuestos estudiados están recogidos en la **Tabla I** siendo en todos los casos inferiores a 5%. A la vista de los resultados obtenidos en estas pruebas se considera la linealidad de los PCBs estudiados frente a la respuesta del detector como satisfactoria.

Los resultados de la precisión están en la **Tabla II** y se encuentran expresos como repetibilidad y reproducibilidad. La repetibilidad fue calculada a partir de los coeficientes de variación porcentual de una serie de resultados obtenidos en condiciones homogéneas. Para ello se ha empleado la fórmula siguiente:

$CV (\%) = 100 s/x$, siendo s la desviación típica y x la concentración media del analito. Según Horwitz (1975) los CV% máximos aceptables dependerán del tanto por ciento del analito en la muestra total.

Los bifenilos policlorados suelen encontrarse en muestras biológicas a niveles de ppm y ppb. Se ha tomado el rango 0,0001% marcado por este autor cuyo CV máximos se sitúan en 16% para las pruebas de precisión. A la vista de los CV% de las repeticiones de los análisis para cada compuesto, se puede asegurar la repetibilidad del método para bifenilos policlorados estudiados, al presentar en todos los casos un CV% menor de lo establecido por Horwitz (1975).

En la **Tabla III** se ha recogido los resultados obtenidos para pruebas de reproducibilidad. Del mismo modo que en los estudios de repetibilidad, se ha contrastado los CV% obtenidos con los valores máximos propuestos por Horwitz (1975), resultando en todos los casos valores menores que éstos. Las pruebas realizadas tanto de repetibilidad como de reproducibilidad de las muestras en cuanto a los compuestos en estudio, demuestran la precisión del método propuesto.

A partir de las recuperaciones calculadas, según la concentración de los patrones adicionados, se obtuvo el porcentaje de recuperación medio de cada uno de los analitos. Los resultados aparecen reflejados en la **Tabla IV**. Para determinar la significación estadística de estas recuperaciones, encaminadas a esclarecer el grado de exactitud del método, se realizó un test **t** de Student a los resultados, tomando como valor experimental los obtenidos por la aplicación de la siguiente fórmula: $t_{\text{experimental}} = (m-x)/S = (100-R)\sqrt{n}/CV$, siendo m = valor verdadero, S = desviación típica, x = valor medio, R = % de recuperación, n = nº de determinaciones, CV = coeficiente de variación. Los valores experimentales se comparan con valores teóricos tabulados, para $n-1$ grados de libertad y una probabilidad de $p < 0,05$. En este caso los grados de libertad son 4 y el valor esperado o teórico de t es igual a $t_{(4, 0,05)} = 5,598$. En la **Tabla IV** se recogen los valores de $t_{\text{experimental}}$ para cada compuesto en estudio. En todos los casos reportados el valor de $t_{\text{experimental}}$ es menor al valor de $t_{\text{teórico}}$. Por lo tanto, para todos los residuos de PCBs investigados se evidencia que la recuperación fue satisfactoria.

Jaouen-Madoulet, et. al (2000), utilizando cromatografía gaseosa con detector de captura electrónica ECD, para la validación de un método para bifenilos policlorados en muestras ambientales han encontrado valores distintos de recuperación para la mayoría de los compuestos por ellos analizados. Estos autores encontraron una recuperación media de 80,8% para el PCB 28, 104,7 % para el PCB 52, 102,0 % para el PCB 153, 115,4% para el PCB 138 y 99,7% para el PCB 180. Estas diferencias en los valores de recuperación probablemente pueden estar relacionadas a los diferentes métodos analíticos empleados, bien como a diferencias en la técnica de determinación.

Los valores para sensibilidad, representados por los límites de cuantificación y detección se quedan recogidos en la **Tabla V**. Los límites de detección encontrados se quedaron entre 0,2-0,5 ng/g y los límites de cuantificación entre 0,3-0,6 ng/g, lo que evidencia la aplicabilidad del método para el monitoramiento de los compuestos residuales de PCBs en carne y productos cárnicos.

CONCLUSIONES

El método desarrollado en el Núcleo Integrado de Análises Laboratoriais, del Centro de Ciências Rurais de la Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil, presento valores de validación que confirman su utilidad como método analítico para residuos de bifenilos policlorados en muestras de carne y productos cárnicos.

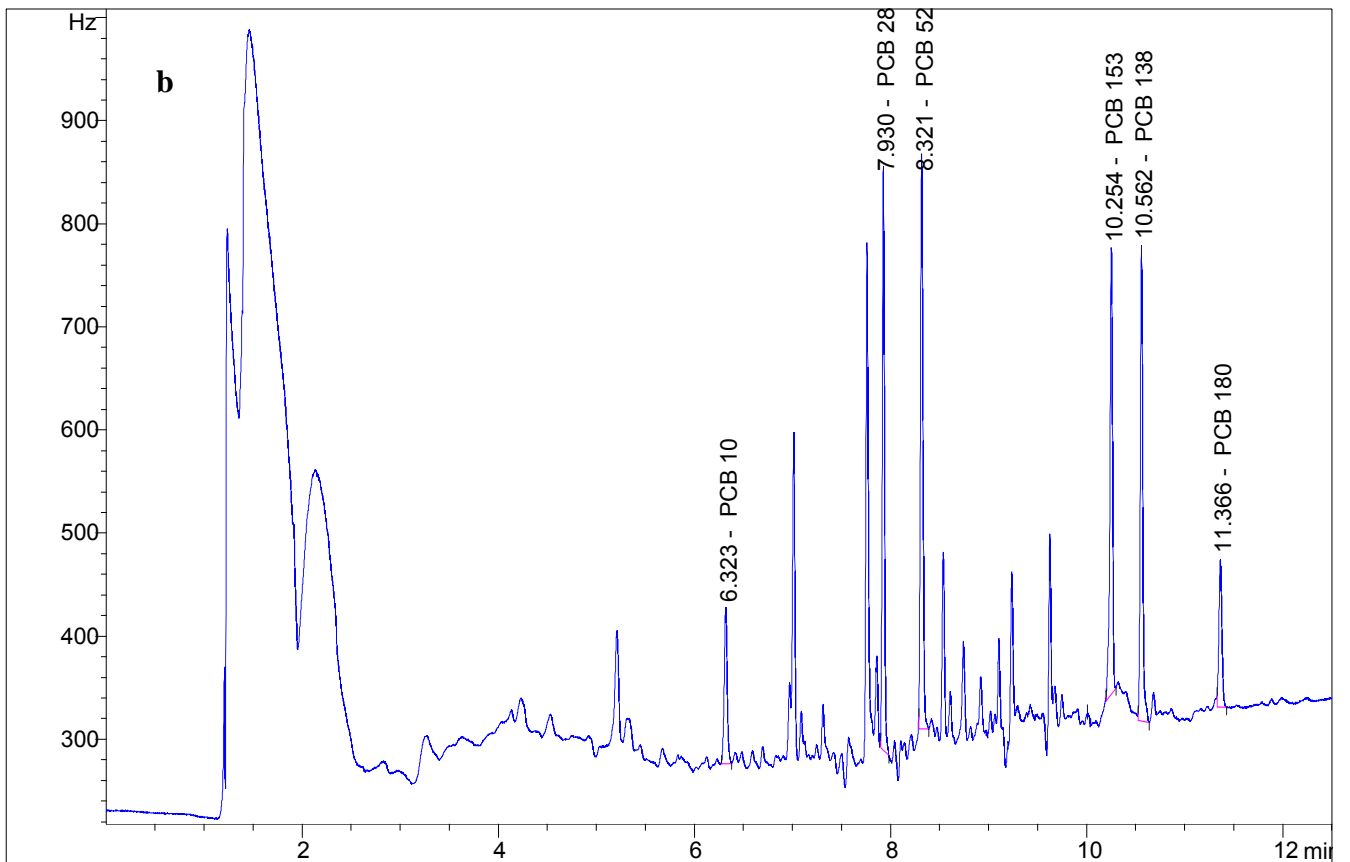
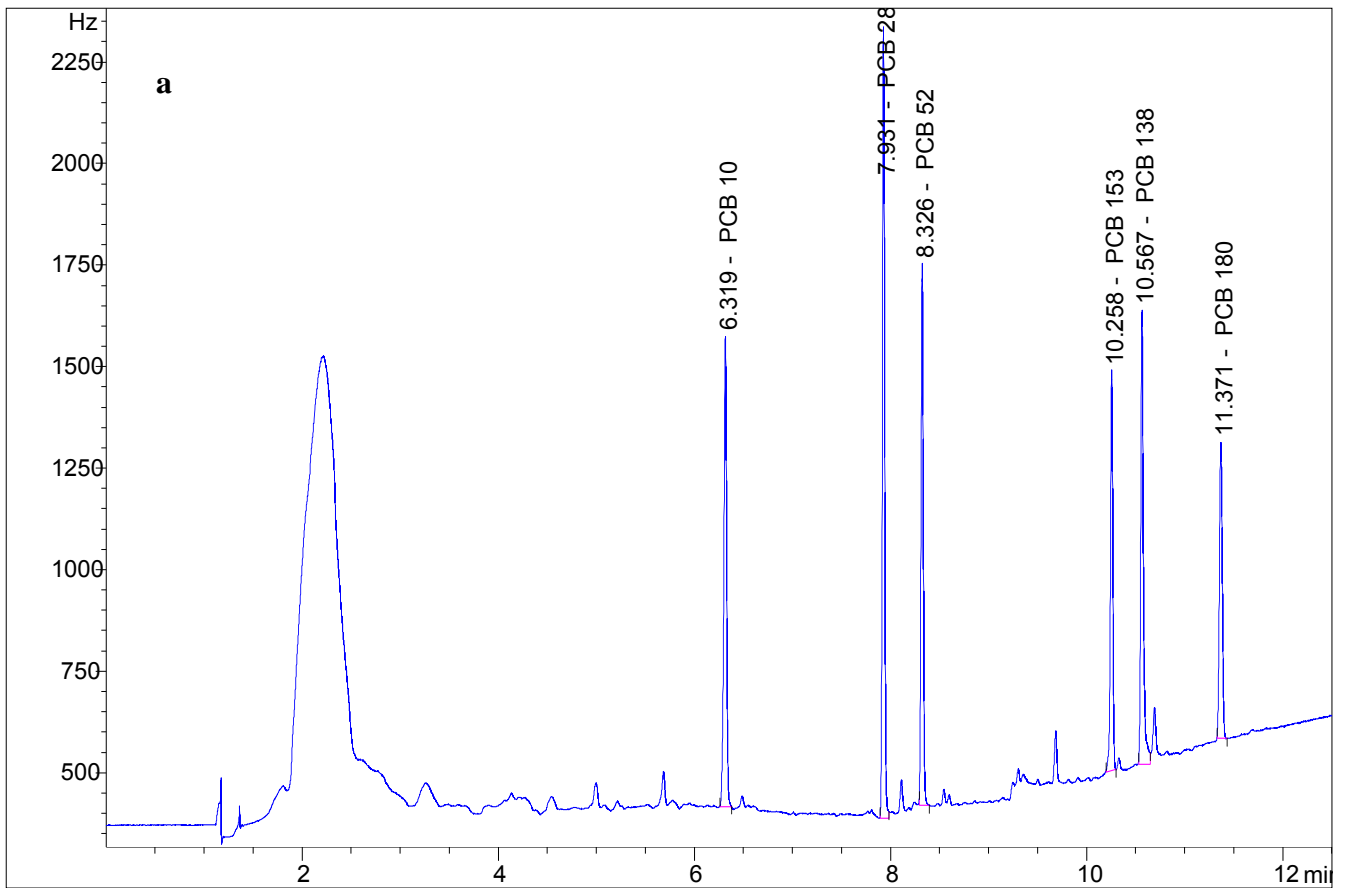


Figura 1 – Cromatogramas CG/ μ ECD: (a) mistura de patrones de los bifenilos policlorados e sus respectivos tiempos de retención y (b) extracto final de una de las muestras fortificadas.

TABLA I.- ESTUDIO DE LA LINEALIDAD PARA LOS PCBS

Compuesto	r	r ² (%)	S _b relativa (%)
PCB n°. 10	0,9990	99,9	2,84
PCB n°. 28	0,9991	99,9	3,38
PCB n°. 52	0,9990	99,9	4,66
PCB n°. 153	0,9995	99,9	3,89
PCB n°. 135	0,9987	99,8	2,97
PCB n°. 180	0,9983	99,8	2,49

r = coeficiente de regresión

r² = coeficiente de determinación

S_b relativa = varianzas relativas porcentuales

TABLA II.- PRECISIÓN: RESULTADOS OBTENIDOS EN LAS PRUEBAS DE REPETIBILIDAD.

Compuesto	Area Media (Hz*s)	Desviación Típica	Coefficiente de Variación (%)
PCB nº. 10	107,6	9,1	8,5
PCB nº. 28	109,4	6,9	6,3
PCB nº. 52	113,1	11,1	9,8
PCB nº. 153	174,8	13,8	7,9
PCB nº. 138	215,5	12,8	5,9
PCB nº. 180	79,8	4,6	5,8

TABLA III. PRECISIÓN: RESULTADOS OBTENIDOS EN LAS PRUEBAS DE REPRODUCIBILIDAD.

<i>Compuesto</i>	Area Media (Hz*s)	Desviación Típica	Coficiente de Variación (%)
PCB nº. 10	116,0	12,3	10,6
PCB nº. 28	114,6	9,3	8,1
PCB nº. 52	110,8	12,3	11,1
PCB nº. 153	174,0	21,6	11,2
PCB nº. 138	211,7	19,4	9,1
PCB nº. 180	94,4	10,2	10,8

TABLA IV. EXACTITUD: RECUPERACIONES OBTENIDAS Y VALORES DE t EXPERIMENTAL PARA LOS DIFERENTES COMPUESTOS

Compuesto	Recuperación Media (%)	Desviación Típica	Coefficiente de Variación (%)	$t_{\text{experimental}}$
PCB nº. 10	105,4	6,1	5,8	-1,595
PCB nº. 28	103,6	6,1	5,9	-1,071
PCB nº. 52	104,8	9,5	9,0	-0,928
PCB nº. 153	97,3	4,0	4,1	1,113
PCB nº. 138	110,7	5,9	5,4	-3,438
PCB nº. 180	104,3	7,3	7,0	-1,062

TABLA V. SENSIBILIDAD: LÍMITE DE DETECCIÓN Y LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN

<i>Compuesto</i>	Límite Detección (ng/g)	Límite Cuantificación (ng/g)
PCB nº. 28	0,2	0,3
PCB nº. 52	0,2	0,3
PCB nº. 101	0,2	0,3
PCB nº. 153	0,5	0,6
PCB nº. 138	0,5	0,6
PCB nº. 180	0,5	0,6

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- ABNT (Brasil, 1997) Líquidos Isolantes Eléctricos – Determinação do Teor de Bifenilas Policloradas NBR 13882/97, São Paulo.
- Angulo R., Costabeber I., Gallego M.C., Serrano S., Jodral M. (1996). Clean-up distillation: critical points in the organochlorine residue analysis. 1 St European Pesticide Residue Workshop Alkmaar-Netherlands, p.59, June 10-12.
- Bester K., De Vols P., Le Guern L., Harbeck S., Hendrickx F., Kramer G.N., Lisinger T., Mertens I., Schimmel H., Sejeroe-olsen B., Pauwels J., De Poorter G., Rimkus G.G., Schlabach M.(2001). Preparation and certification of a reference material on PCBs in pig fat and its application in quality control in monitoring laboratories during de belgian "PCB-crisis". Chemosphere, 44, 529-537.
- Castro M., Fora S.G., Forn M.P., Roca J.M^a.S., Pla L.V. Validación de métodos analíticos. Monografía de la Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria, Sección Catalana, 1989.
- Costabeber I., Jodral M., Angulo R., Valera M. y Molina A. (2000). Evaluación de niveles de residuos organoclorados en tejido adiposo de residentes en la provincia de Córdoba-España. Rev Int Contam Ambient, 16 (3), 119-126.
- Chansin da Matta A.A., Nascimento E. de S., Ribeiro-Neto L.M., Siqueira M.E.P.B., Andraus M.H., Salvadori M.C., de Fernícola N.A.G., Gorni R., Salcedo S. (1998). Validação de métodos em análises toxicológicas: uma abordagem geral. Rev Bras de Toxicol, 11 (1),1-6.
- Domenech, J.M. y Riba, M.D.(1989). Una síntesis de los métodos estadísticos bivariantes. Editorial Herder, Barcelona.
- Duarte-Davison R., Wilson S.C., Jones K.C.(1994). PCBs and other organochlorines in human tissue samples from the welsh population: I – Adipose. Environ Pollut., 84, 64-77.
- Frink C.R., Sawhney B.L., Kulp K.P., Fredette C.G.(1982). Bull. 800, The CT: Agric. Exper. Sta New Haven.

- Food and Drug Administration (FDA), 1994. Analytical Manual. Vol. 1. Methods which detect multiple residues. US. Department of Health and human services. 3rd Edition.
- Garrido F.M.D., Jodral V.M.L., Pozo, L.R.(1992). Bifenilos policlorados en leches esterilizadas españolas y estudio experimental del efecto de la temperatura sobre estos compuestos. ILE – Industrias Lácteas Españolas, 179, 35-40.
- Gill I.J., Roberts J.W.(1992). Management of land and livestock contaminated with polychlorinated biphenyls. Aust Vet J, 69 (7): 155–158.
- Hanaoka T., Takahashi Y., Kobayashi M., Sasaki S., Usuda M., Okubo S., Hayashi M., Tesugane S. (2002). Residuals of beta – hexachloro cyclohexane, dichlorodiphenyl trichloroethane, and hexachlorobenzene in serum, and relations with consumption of dietary components in rural residents in Japan. Sci Total Environ, 286 (1-3), 119–127.
- Hanks A.R. (1995). So you are going to validate an analytical method. In: Methods development and implementation of quality assurance systems. 1st International Symposium of Latin American and Caribbean Section – AOAC International, São Paulo, Brazil.
- Horwitz W., Kamps L.R. and Boyer K.W. (1980). Quality assurance in the analysis of food for trace constituents. J Assoc Off Ana Chem, 63, (6), 1344-1354.
- Horwitz W., 1975. Official Methods of Analysis of the AOAC, 12^a edición, Washington DC: 518-525.
- Huber, L. (1993). Good laboratory practice? A primer for high-performance liquid chromatography, capillary. Hewlett-Packard. 138p (Publication n.12-5091-6259E).
- Jaouen-Madoulet, A., Abarnou, A., Le Guellec, A.-M., Loizeau, V., Leboulenger, F. (2000). Validation of an analytical procedure for polychlorinated biphenyls, coplanar polychlorinated biphenyls and polycyclic aromatic hydrocarbons in environmental samples. J Chromatogr A, 886, 153-173.

- Jenke D.R. (1996). Chromatographic method validation a review of current practices and procedures. II Guidelines for primary validation parameters. *J Liq Chromatogr R T*, 26 (15), 2417-2447 Sep 2003
- Kennish M.J., Belton T.J., Hauge P., Lockwood K., Ruppel B.E. (1992). Polychlorinated biphenils in estuarine and coastal marine waters of New Jersey: a review of contanination problems. *Rev Aquat Sci*, 6, (3-4), 275-293.
- Kolthoff I. M., Sandell E. B., Meechan E.J. y Bruckenstein S. (1975). *Análisis Químico Cuantitativo*. 4ª edicion. Ed. Nigar S.R.L. Buenos Aires.
- Leite F. (1998). Sensibilidade, seletividade e limites de determinação e detecção. In: Leite F. *Validação em análise química*. 3ª E.D., Campinas: Átomo, 1998. Cap. 13, p. 67-69.
- Long G.L., Winefordner J.D. (1983). Limit of detection: a closer look ar the iupac definition. *Anal Chem*, 55, (7), A712-& 1983
- Miller J.C., Miller, J. N. (1993). Error in instrumental análisis; regresión and correlation. In: Miller J.C., Miller, J. N. *Statistic for analytical chemistry*. 3ª E.D. Chichester: Ellis Horwood. Chapter 5, p. 101-141.
- Payá-Pérez A., Riaz M., Larsen B.R. (1991). Soil sportion of 20 PCB congeners and six chlorobencene. *Ecotox Environ Safe*, 21, 1-17.
- Platonow N.S., Sachenbecker P.W., Funnell H.S. (1971). Residues of polychlorinated biphenyls in catte. *Canadian Vet J*, 12, (5), 115-118.
- Rauret G. (1992). Ejercicios de Intercomparación, en: Valcarcerl M. y Ríos A. (Coord.) *La calidad en los laboratórios analíticos*. Editorial Reverté, Barcelona; pp. 249-283.
- Valcárcel M. y Ríos A., 1992. *Metodologias Analíticas y Calidad en: La calidad en los laboratórios analíticos*. Editorial Reverté, Barcelona; pp.147-176.

- Waliszewski S. M., Padio Sedas V.T., Chantri Perez J.N., Infanzon Ruiz R.M. y Riviera, J. (1995). Evaluación de los niveles de DDT y HCH en tejido adiposo de algunas personas fallecidas en el Estado de Veracruz, México. *Rev Int Contam Ambient*, 11, (2), 87-93.
- Woodley T.H., Brown M.W., Kraus S.D. and Gaskin D.E. (1991). Organochlorine levels in north Atlantic right whale (*Eubalaena glacialis*) blubber. *Arch Environ Con Tox*, 21, 141–145.

3.2. ARTIGO 2

Levels of polychlorinated biphenyls (PCBs) in meat and meat products from the state of Rio Grande do Sul, Brazil.

S. Bogusz Junior^a, J. Sifuentes dos Santos^a, A. A. Odorissi Xavier^b, J. Weber^b, F. Leal Leães^a, I. Costabeber^{b,*}, T. Emanuelli^c

^a Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Camobi, Santa Maria, RS, Brasil. CEP: 97105-900.

^b Departamento de Morfologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Camobi, Santa Maria, RS, Brasil. CEP: 97105-900.

^c Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos, Centro de Ciências Rurais, Núcleo Integrado de Desenvolvimento em Análises Laboratoriais (NIDAL), Universidade Federal de Santa Maria, Camobi, Santa Maria, RS, Brasil. CEP: 97105-900.

* Corresponding author:

Ijoni Costabeber
Departamento de Morfologia
Centro de Ciências da Saúde
Universidade Federal de Santa Maria
Campus de Camobi
Santa Maria, RS, Brasil
CEP: 97105-900
E-mail: ijoni@smail.ufsm.br
Tel./FAX: +55 55 2208494

Keywords: polychlorinated biphenyls, meat, meat products, levels, residues.

Abstract

The levels of six polychlorinated biphenyl congeners (PCBs) were evaluated in 55 samples of meat (bovine and pork) and meat products (sausage, hot dog sausage, bologna sausage, canned export meat and salami) from 11 cities of the state of Rio Grande do Sul, Brazil, between July and August 2002. PCB congeners were found (in fat basis) in the following rank 52 (2.64 ng/g)>180 (0.85 ng/g)>10 (0.68 ng/g)>28 (0.60 ng/g)>138 (0.22 ng/g)>153 (0.20 ng/g), with a Σ PCB amounting to 5.19 ng/g. Meat products showed higher PCB levels than meat. PCB levels in samples followed the rank: mixed meat products>pork meat>bovine meat. Levels of PCB 153 were significantly higher in canned export meat than in the other products. Also, this congener was found at significantly higher levels in samples from the southern region than in samples from the other regions. These results indicate the presence of PCBs in food samples from Rio Grande do Sul, Brazil, but the levels found were well below the maximum level established for animal food products in European Community (200 ng/g fat) and in Brazil (3,000 ng/g fat). This is the first paper describing background concentrations of PCBs in meat and meat products from Brazil.

1. Introduction

Polychlorinated biphenyls (PCBs) are a group of toxic and highly persistent organic compounds that consist of 209 congeners differing in the number and position of chlorine atoms bound to the two coupled-biphenyl rings (Storelli et al., 2003). PCBs have been used extensively as commercial products and in various industrial applications (Platonow et al., 1971; Hutzinger et al., 1974; Schechter et al., 1997; Abad et al., 2002; Costabeber and Emanuelli, 2003). Industrial use of PCBs started in the early 1930s (Cairns and Siegmund, 1981), and since then over 2 million tons of PCBs were produced as commercial mixtures of 60-90 congeners such as Aroclor in United States and Great Britain, Kaneclor in Japan, Pyralene in France and Solvol in USSR (Kim et al., 2004). It is estimated that around 40% of this worldwide production entered in the environment. Although most countries have prohibited PCBs production, a considerable amount of these compounds are still in use, mainly in electro-electronic equipments (Penteado and Moreira Vaz, 2001).

Owing to their high lipid solubility, PCBs bind to lipid components in animal tissues, and accumulate in livestock throughout the food chain. Because of their high thermodynamic stability, all degradation mechanisms are difficult, and environmental and metabolic degradation are generally very slow (Erickson, 1997). There are various reports on the toxicological effects of PCBs, which include skin rashes (chloracne), eye irritation, liver damage, neuropathy, endocrine disruption, immunosuppression, and increased risk of cancer (WHO, 1993).

Dietary intake is the major route of human exposure to PCBs, contributing to more than 90% of the daily exposure to these compounds (WHO, 1993; Lien and Theelen, 1997; Safe, 1998; Schlummer et al., 1998). Thus, it is important to gather as much information as possible about PCB concentrations in food and human exposure. It is estimated that meat and meat products contribute to 14-19% of the cumulative toxic effects of PCBs when compared the other

foodstuffs (Patandin et al., 1999). Meat and meat products are important foods and there are various reports on the residual levels of PCBs in these products over the world (Mes et al., 1991; Lovett et al., 1998; Glynn et al., 2000; Schepens et al., 2001; Golian and Pavelka, 2002; Kim et al., 2004; Focant et al., 2004), but no study was found in Brazil. The aim of this study was to evaluate the levels of PCBs in samples of meat and meat products obtained in the state of Rio Grande do Sul, Brazil, between July and August 2002.

2. Material and methods

2.1. Materials

n-Hexane, acetone and petroleum ether were obtained from Mallinckrodt (Kentucky, USA). Anhydrous sodium sulfate and 60/100-mesh pesticide reagent grade Florisil were obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA). Florisil was previously activated at 150°C/12h and partially deactivated by adding 2% Milli-Q water before use. Standard PCB solutions (IUPAC n°. 10, 28, 52, 138, 153 and 180) were obtained from SUPELCO Inc. (Bellefonte, PA, USA). All other reagents used were of analytical reagent grade.

2.2. Samples

A total of 55 meat (bovine, pork) and meat products (sausage, hot dog sausage, bologna sausage, canned export meat and salami) samples were obtained from 11 cities from three regions of the state of Rio Grande do Sul, Brazil (Figure 1), between July and August 2002. Samples were kept frozen at -20°C until analysis. The content of fat was determined using the method described by LANARA (1981). Meat, sausage, hot-dog sausage, bologna sausage, canned export

meat and salami showed average fat contents of 7.05%, 20.88%, 17.42%, 17.02%, 4.80% and 16.30%, respectively.

2.3. Analysis of PCBs

Samples were analyzed for PCB congeners (10, 28, 52, 138, 153 and 180) using capillary column electron capture gas chromatography after passing the extracts through a florisil column. All glassware used was previously cleaned by the method of Angulo et al. (1996). The fat of meat and meat products was extracted as described by Waliszewski et al. (1997), with some modifications. In brief, homogenized samples (25 g) were ground with a sufficient amount of anhydrous sodium sulfate, transferred to a 50 x 1 cm i.d. chromatographic column and extracted with 120 ml petroleum ether. The extract was transferred to a 50 ml round-bottom flask and the solvent was eliminated in a rotary evaporator. The extract (0.5 g) was applied to a chromatographic column containing 15 g of florisil and anhydrous sodium sulfate, and eluted with 100 ml n-hexane to extract PCBs. The eluate was filtered through anhydrous sodium sulfate, evaporated to dryness in a rotary evaporator, dissolved in 2 ml n-hexane, and used for PCB determination by gas chromatography with a Hewlett Packard model 6890 gas chromatography equipped with a ⁶³Ni electron capture micro detector (CG/ μ ECD). An Agilent HP-5 (crosslinked 5% PH ME siloxane) capillary column (30 m long, 0.25 mm internal diameter and 0.25 μ m film thickness) was used. Operating conditions were as follows: injector 250 °C, detector 350 °C, oven temperature was held at 110 °C for 5 min, then increased to 280 °C at 14 °C/min and hold 2 min. The carrier gas was nitrogen at a column flow rate of 1.6 ml/min. All samples were analyzed in duplicate and results represent the arithmetic means. To determine the quality of the method, a

recovery study was performed on ten replicates of blank meat fat samples (initial contamination level lower than the detection limit – 0.2-0.5 ng/g fat) overspiked with PCBs. Mean recoveries ranged from 97.3 to 110.0 % with standard deviation and coefficient of variation below 10 %, indicating excellent repeatability of the method (Table 1). Limits of detection (LODs) and limits of quantification (LOQs) were evaluated using average blank values method (Table 1).

2.4. Statistical analysis

Data were analyzed using the Statistica[®] 4.5 software package. The effects of meat source, sample type, region or city on levels of PCB congeners were evaluated by one way analysis of variance (ANOVA), followed by Duncan's test when appropriate. Student's t-test was used to compare values of PCB congeners found in meat and meat products. Differences were considered to be significant when $P \leq 0.05$.

3. Results

Table 2 shows the levels of PCB congeners (ng/g lipid weight basis) in 55 meat and meat product samples collected in 2002. Results were calculated either for positive samples or for all samples. PCB congeners (n°. 10, 28, 52, 153, 138 and 180) were selected from the group of 'standard indicative' congeners recommended for the purpose of quantification, as potential target analytes, which are frequently the most abundant in various environmental matrices and cover a wide degree of chlorination (Falandysz et al., 1999; Frignani et al., 2001). PCB 180 was found in 40% of samples analyzed, followed by PCB 138 found in 13% of samples. PCBs 153 and 52 were found in 11%, while PCBs 28 and 10 were found in less than 10% of samples. Taking into account PCB levels found in samples analyzed PCB 52 was found at the highest

mean levels (2.64 ng/g), followed by PCB 180 (0.85 ng/g), PCB 10 (0.68 ng/g), 28 (0.60 ng/g fat), 138 (0.22 ng/g fat) and 153 (0.20 ng/g fat). The sum of the six PCBs expressed as \sum PCBs was 5.19 ng/g for the mean levels and 165.95 ng/g for maximum levels. On the other hand, taking into account only positive samples, the rank was PCB 52>10>28>180>153>138.

Fig. 2 shows the distribution of PCBs in 22 meat and 33 meat product samples. The average concentration of every PCB congener was higher in meat products than in meat. The level of PCB 52 in meat products was the highest (4.38 ng/g), followed by PCB 180 (1.01 ng/g) and PCBs 10 and 28 (0.90 and 0.85 ng/g fat, respectively). The lowest levels detected in meat products were for the congeners 153 and 138 (0.23 and 0.28 ng/g fat, respectively). In meat samples PCB 180 was found at the highest levels (0.59 ng/g) followed by PCB 10 and 28 (0.36 and 0.21 ng/g, respectively). Congeners 52, 153 and 138 were found at levels lower than 0.20 ng/g fat. Student's t-test did not reveal significant differences in PCB levels between meat and meat products.

Fig. 3 shows PCB levels in bovine meat, pork meat and mixed meat products (bovine/pork meat). The total concentration of PCB congeners exhibited the following rank mixed>pork meat>bovine meat. Mixed meat products exhibited the highest (PCB 52 = 5.38 ng/g fat) and the lowest level (PCB 153 <LOD) of contamination. PCB congener found at the highest level in pork meat was PCB 180 (0.81 ng/g fat), while PCB 52 was the congener found at the lowest level (0.03 ng/g fat). In bovine meat the congener found at the highest level was PCB 153 (0.56 ng/g fat), while the congener found at the lowest level was PCB 10 (<LOD). ANOVA analysis did not reveal significant differences in PCB levels among the different meat sources.

Table 3 shows PCB levels in 22 meat, 3 sausage, 13 hot dog sausage, 8 bologna sausage, 5 canned export meat and 4 salami samples. Among samples analyzed hot dog sausage exhibited the highest concentration of total PCBs (\sum PCB = 11.45 ng/g fat). PCB 52 (10.55 ng/g fat) was

the major congener that contributed to the sum of PCBs in hot dog sausage. The second product with a high \sum PCB value was bologna sausage (4.82 ng/g fat), which exhibited the highest levels of contamination for the PCB congener 10 (2.24 ng/g fat), when compared to the other products. Canned export meat exhibited a \sum PCB value of 3.58 ng/g fat. Also, this product exhibited higher levels of congeners 153 and 138 (1.26 and 0.80 ng/g fat, respectively) than the other products. Congener 180 was found at a level of 0.02 ng/g fat and PCB 10 was not detected. The \sum PCB for meat samples was 1.46 ng/g fat and PCB 180 was the major compound found (0.59 ng/g fat). In spite of the lower PCB levels found in meat, all the six congeners evaluated were found in these samples. Salami exhibited only PCBs 138 and 180, with a \sum PCB of 1.16 ng/g fat. Sausage samples exhibited contamination only of PCB 180 at a level of 0.53 ng/g fat. ANOVA analysis revealed that samples of canned export meat exhibited levels of PCB 153 significantly higher than those found in samples from the other products. No other statistically significant differences in PCB levels were observed among products.

The mean levels of PCB congeners in meat and meat products from different regions of Rio Grande do Sul, Brazil, are shown in Fig. 4. The highest PCB levels were found in samples from mountain/POA, which showed PCB 52 at the highest level (4.13 ng/g fat), followed by PCB 10 (1.10 ng/g fat), PCB 180 (1.04 ng/g fat) and PCB 28 (0.88 ng/g fat). Southern region exhibited the second highest level of PCB contamination. In the southern region, PCBs 153 and 138 were found at higher levels (0.72 and 0.47 ng/g fat, respectively) when compared to the other regions. PCB 52 was found at 0.45 ng/g fat followed by PCBs 28 and 180 (0.30 and 0.23 ng/g fat, respectively). PCB 10 was found at levels <LOD. Samples of the northern region exhibited the lowest levels of PCB contamination except for PCB 180 that was found at the second higher level (0.72 ng/g fat) when compared to the other regions. PCBs 138 and 153 were found at levels of 0.30 and 0.22 ng/g fat, while PCBs 10, 28 and 52 were found at levels <LOD. ANOVA analysis

revealed that samples from southern region exhibited levels of PCB 153 significantly higher than those found in samples from the other regions. No other statistically significant differences in PCB levels were observed among regions.

The levels of PCBs in samples of meat and meat products from different cities of Rio Grande do Sul (Brazil) are reported in Table 4. PCB 180 was the compound most frequent in samples from the cities studied. It was not found only in two out of eleven cities. PCB 138 was the second compound most frequently found, followed by PCBs 28 and 52. PCBs 10 and 153 were the least frequently found. Samples from city three exhibited the highest levels of contamination, with a \sum PCB of 21.67 ng/g fat. However, only congeners 52 and 180 were found in samples from this city (20.78 and 0.89 ng/g fat, respectively). PCB 52 was the compound found at the highest levels when compared to the other congeners. Samples from city four exhibited the second highest level for \sum PCB (8.31 ng/g fat). In samples from city four, compounds were found in the following rank PCB52 > PCB 28 > PCB 10 > PCB 180 > PCB 153 > PCB 138. City four exhibited the second highest levels of PCBs 10, 28 and 52. City five exhibited a \sum PCB of 4.90 ng/g fat. Congener 10 was the compound found at the highest level in samples from this city (1.82 ng/g fat), followed by congener 180 (1.76 ng/g fat). PCB 153 was the only compound not detected in samples from city five. In samples from city eleven, PCBs 10, 28 and 138 were found, with the levels of congener 28 being the highest when compared to the other cities. Samples from city one did not exhibit residues of PCBs 153 and 138. Samples from city six exhibited the highest levels of congeners 153 and 138 (0.90 and 0.57 ng/g fat, respectively), when compared to the other cities. PCB 10 was not found in samples from city six. Samples from city nine exhibited the second highest level of PCBs 153 and 138 (0.40 and 0.55 ng/g fat). Samples from city seven exhibited low levels of congeners 153, 138 and 180, while the other congeners analyzed were not detected (<LOD). Samples from cities eight and ten exhibited

only residues of PCB 180, while city two was the only city that did not exhibit samples contaminated. ANOVA analysis did not reveal significant differences in PCB levels among cities.

4. Discussion

Results of the present study indicate the presence of PCB congeners in samples of meat and meat products from Rio Grande do Sul, Brazil, but the levels found were below the maximum level established for animal food products in European Community (200 ng/g fat; Bester et al., 2001) and in Brazil (3,000 ng/g fat; Brasil, 1999). Similar results were obtained by Esposito et al. (2001) when monitoring levels of PCBs in 220 samples of pork tissues (meat and adipose tissue) collected in southern Italy, where only few samples of smoked ham exceeded the limit of European Community.

Concerning the PCB frequency, in present study PCB 180 was found in 40% of samples and the other compounds were found between 9.0-12.7%. This frequency is in agreement with the results of Zucato et al. (1999) that evaluated levels of PCBs in Italian diet and found the di-ortho congeners 153 and 138 in a frequency of 10.9% and 13.8% of the total samples. On the other hand, Diber and Kofler (2000) detected PCBs in 24 and 20% of pork and chicken fat, respectively.

The frequency of PCBs in meat and meat products followed the order of low to high molecular weight, with more chlorinated compounds being found more frequently (heptachlorobiphenyl PCB 180 > hexachlorobiphenyl PCBs 138 > hexachlorobiphenyl PCB 153 = tetrachlorobiphenyl PCB 52 > trichlorobiphenyl PCB 28 = dichlorobiphenyl PCB 10). In contrast to our results, Golian and Pavelka (2002) found highest levels of trichlorobiphenyls and lowest levels of heptachlorobiphenyls, in meat products from Czech and Slovak Republic.

The highest concentration of PCB 52 in meat products is related to the presence of one sample with residue levels much higher than the others (124.71 ng/g fat, see maximum level in Table 2). Accordingly, Lopez-Leiton et al. (2001) found tetrachlorobiphenyl PCB 52 as an abundant contaminant of commercial pork meat in Spain. It is worth noting that this compound as well as PCB 28 have been associated with breast malignant lesions in Spanish women (Costabeber, 1999; Lucena et al., 2001).

The highest levels of PCBs in meat products when compared to meat are in agreement with previous literature data that suggest an influence of meat processing in PCB levels (Mes et al., 1991; Schechter et al., 1997; Klein, 1983). Conversely, Bayarri (1997) did not find a significant influence of the processing in the levels of PCBs and organochlorine compounds in uncooked cured meat products. It is important to note that meat products with the highest PCB levels in the present study are cooked products (hot dog and bologna sausage).

The lower levels of PCBs in salami suggest a possible degradation of residual levels of PCBs by the starter culture used in the fermentation. This hypothesis is supported by the results of Bayarri (1997) that observed a decrease in PCB levels after *in vitro* incubation with *Micrococcus varians* (12.7% for HCB, 17.7% for p,p'DDE, 16.7% for dieldrin and 15.5% for PCB 153). Also, Abou-Arab (2002) observed decreases in DDT (10%) and lindane (18%) levels during sausage fermentation using *Lactobacillus plantarum* and *Micrococcus varians*.

Meat and meat products from mountain/POA region showed highest PCB levels. This finding is probably related to a higher industrial development in this region than in northern and southern regions. Such result is in agreement with other studies (Zabik et al., 1992; Valters et al., 1999; Bayarri et al., 2001) suggesting that industrial activity is an important source for environmental and occupational exposure to PCBs. This hypothesis is also supported by data

from Bennett (1983), who reported that the average air concentration of PCBs in rural areas is ten times lower than in industrialized areas.

The highest levels of PCB contamination were observed in hot dog and bologna sausage. In hot dog sausage only PCB 153 was not found, while in bologna sausage all congeners evaluated were found. The lowest levels of PCBs were observed in sausage and salami samples. These samples contained residues of hexachlorobiphenyls and heptachlorobiphenyls, which are considered as the most persistent due to their high chlorination degree (WHO, 1993). Similar results were observed in meat and meat products from different cities: PCBs 180, 138 and 153 appeared in most cities, while PCBs 10 and 28 appeared in few cities. Accordingly, it has been demonstrated that PCB 153 was the single PCB congener found in highest concentration in wildlife animals (Hoshi et al., 1998).

This is the first paper describing background concentrations of PCBs in meat and meat products from the state of Rio Grande do Sul, Brazil. Background concentrations of PCBs in meat and meat products collected in different cities and regions of Rio Grande do Sul, Brazil, between July and August 2002, appeared to be much lower than the maximum level established for animal food products in European Community (200 ng/g fat; Bester et al., 2001) and in Brazil (3,000 ng/g fat; Brasil, 1999). In most samples analyzed PCB congeners were present at levels < LOQs or not detected (<LODs). Only levels of PCB 153 significantly varied among the different products and regions evaluated.

Results obtained revealed that PCB levels found in meat and meat products in the south of Brazil are of the same order as those observed in most developed countries. Hence, there is no indication of important health risks associated with consumption of these products on the basis of current toxicological knowledge. Nevertheless, our data concerning the background levels of

PCBs in meat and meat products of south Brazil can be used to estimate the typical dietary intake of general population in this region.

Acknowledgments

This work was supported by CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento e Pesquisa). A.A. Odorissi and J. Weber were the recipients of Scientific Initiation Fellowships of FAPERGS and CNPq, respectively. I. Costabeber was the recipient of a PROFIX Fellowship. The samples were kindly supplied by local industries.

References

- Abad, E., Llerena, J.J., Sauló, J., Rivera, J., 2002. Study on PCDDs/PCDFs and co-PCBs content in food samples from Catalonia (Spain). *Chemosphere* 46, 1435-1441.
- Abou-Arab, A. A. K., 2002. Degradation of organochlorine pesticides by meat starter in liquid media and fermented sausage. *Food Chemical and Toxicology* 40, 33-41.
- Angulo, R., Costabeber, I., Gallego, M.C., Serrano, S., Jodral, M., 1996. Clean-up distillation: critical points in the organochlorine residue analysis. In 1ST European Pesticide Residue Workshop, Alkmaar, Netherlands, June 10-12, P-059.
- Bayarri, S., 1997. Degradación de residuos de contaminantes clorados en productos cárnicos por el procesado y la acción de microorganismos responsables de maduración. Zaragoza, Tesis Doctoral - Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza, España. 364 p.

- Bayarri, S., Baldassari, L.T.R., Iacovella, N., Ferrara, F., Di Domenico, A., 2001. PCDDs, PCDFs, PCBs and DDE in edible marine species from the Adriatic Sea. *Chemosphere* 43, 601-610.
- Bennett, B.G., 1983. Exposure of man to environmental PCBs an exposure commitment assessment. *Science of the Total Environment* 29, 101-111.
- Bester K., De Vols P., Le Guern L., Harbeck S., Hendrickx F., Kramer G.N., Lisinger T., Mertens I., Schimmel H., Sejerøe-olsen B., Pauwels J., De Poorter G., Rimkus G.G., Schlabach M., 2001. Preparation and certification of a reference material on PCBs in pig fat and its application in quality control in monitoring laboratories during de belgian "PCB-crisis". *Chemosphere* 44, 529-537.
- Brasil. 1999. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa número 42 de 20/12/1999.
- Cairns, T., Siegmund, E. G., 1981. PCBs/regulatory history and analytical problems. *Analytical Chemistry* 53, 1001A-1183A.
- Costabeber, I., 1999. Residuos organoclorados persistentes en grasa mamaria y su relación con los hábitos alimentarios: repercusiones sanitarias. Tesis Doctoral, Departamento de Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad de Córdoba, España. pp 315.
- Costabeber, I., Emanuelli, T., 2003. Influence of alimentary habits, age and occupation on polychlorinated biphenyls levels in adipose tissue. *Food and Chemical Toxicology* 41, 73-80.
- Diber, F. Kofer, J., 2000. Dioxin and PCB contend of Styrian pork and chicken fat. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau* 96, 247-250.

- Erickson, M.D., 1997. Analytical Chemistry of PCBs, 2nd Edition, CRC Lewis publishers, Boca Raton, FL, USA.
- Esposito M., Imperato E., Castellano V., Guadagnuolo G., Serpe L., 2001. Polychlorinated biphenyls (PCB) monitoring on food of animal origin. *Industrie Alimentari* 40, 29-32.
- Falandysz, J., Strandberg, B., Strandberg, L., Rappe, C., 1999. Tris (4-chlorophenyl) methane and tris (4-chlorophenyl) methanol in sediment and food webs from the Baltic south coast. *Environmental Science and Technology* 33, 517-521.
- Focant, J.-F., Pirard, C., De Pauw, E., 2004. Levels of PCDDs, PCDFs and PCBs in Belgian and international fast food samples. *Chemosphere* 54, 137-142.
- Frignani, M., Bellucci, L.G., Carraro, C., Russo, A., 2001. Distribution of polychlorinated biphenyls in dated sediments cores from the Venice Lagoon and the industrial area of Porto Marghera. *Organohalogen Compound* 51, 65-68.
- Glynn, A.W., Wernroth, L., Atuma S., Linder, C.-E., Aune, M., Nilsson, I., Darnerund, P.O., 2000. PCB and chlorinated pesticide concentrations in pork and bovine adipose tissue in Sweden 1991-1997: spatial and temporal trends. *The Science of the Total Environmental* 246, 195-206.
- Golian, J., Pavelka, M., 2002. Residues of PCB in certain meat products. *Magyar Allatorvosok Lapja* 124, 616-619.
- Hoshi, H., Minamoto, N., Iwata, H., Shiraki, K., Tatsukawa, R., Tanabe, S., Fujita, S., Hirai, K., Kinjo, T., 1998. Organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyl congeners in wild terrestrial mammals and birds from Chubu region, Japan: Interspecies comparison of the residue levels and compositions. *Chemosphere* 36, 3211-3221.
- Hutzinger, O., Safe, S., Zitko, V., 1974. *The Chemistry of PCBs*. CRC press, Cleveland, OH.

- Kim, M., Kim, S., Yun, S., Lee, M., Cho, B., Park, J., Son, S., Kim, O., 2004. Comparison of seven indicator PCBs and three coplanar PCBs in beef, pork and chicken fat. *Chemosphere* 54, 1533-1538.
- Klein, H., 1983. The PCB situation in the Federal Republic of Germany. In: Barros, M.C., Könemann, H., Visser, R. (Eds), *Proceedings of PCB Seminar, The Hague, 28-30 September 1983*, The Hague, Ministry of the Environmental, pp.66-79.
- LANARA (Laboratório Nacional de Referência Animal), 1981. Métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes. II – Métodos físico-químicos. Brasília.
- Lien, A.K.D., Theelen, R.M.C., 1997. *Dioxins: Chemical Analysis, Exposure and Risk Assessment*. National Institute of Public Health and the Environment, Bilthoven, The Netherlands.
- Lopes-Leiton, T.J.L., Pineiro, M.E.A, Yusty M.A.L., Davina, J.L.C., 2001. Levels of seven PCBs used as markers of dioxin in commercial pork meat in Spain. *Journal of AOAC International* 84, 1799-1801.
- Lovett, A.A., Foxall, C.D., Creaser, C.S., Chewe, D., 1998. PCB and PCDD/DF concentration in egg and poultry meat samples from know urban and rural locations in Wales and England. *Chemosphere* 37, 1671-1685.
- Lucena, R.A., Allam, M.F., Costabeber, I.H., Villarejo, M.L.J., Navajas, R.F-C, 2001. Breast cancer risk factors: PCB congeners. *European Journal of Cancer Prevention* 10, 117-119.
- Mes, J., Newsome, W.H., Conacher, H.B.S., 1991. Levels of specific polychlorinated biphenyls congeners in fatty foods from five Canadian cities between 1986 and 1988. *Food Additives and Contaminants* 8, 351-361.

- Patandin, S., Dagnelie, P.C., Mulder, P.G.H., De Coul, E.O., Van Der Veen, J.E., Weisglas-Kuperus, 1999. Dietary exposure to polychlorinated biphenyls and dioxins from infancy until adulthood: A comparison between breast-feeding, toddler, and long term exposure. *Environmental Health Perspectives* 107, 45-51.
- Penteado, J.C.P., Moreira Vaz, J., 2001. O legado das bifenilas policloradas (PCBs). *Química Nova* 24, 390-398.
- Platonow, N.S., Sachenbrecker, P.W., Funnell, H.S., 1971. Residues of polychlorinated biphenyls in cattle. *Canadian Veterinary Journal* 12, 115-118.
- Safe, S.H., 1998. Development validation and problems with the toxic equivalency factor: Approach of risk assessment of dioxins and related compounds. *Journal Animal Science* 76, 134-141.
- Schepens, P.J.C., Covaci, A., Jorens, P.G., Hens, L., Scharpe, S., Van Larebeke, N., 2001. Surprising findings following a Belgian food contamination with polychlorobiphenyls and dioxins. *Environmental Health perspectives* 109, 101-103.
- Schechter, A., Cramer, P., Boggess, K., Stanley, J., Olson, J.R., 1997. Levels of Dioxins, dibenzofurans, PCB and DDE congeners in pooled food samples collected in 1995 at supermarkets across the United States. *Chemosphere* 34, 1437-1447.
- Schlummer, M., Moser, G.A., McLachlan, M., 1998. Digestive tract absorption of PCDD/Fs, PCBs and HCB in humans: mass balance and mechanistic considerations. *Toxicology and Applied Pharmacology* 152, 128-137.
- Storelli, M.M., Giacomini-Stuffer, R., Storelli, A., Marcotrigiano, G.O., 2003. Polychlorinated biphenyls in seafood: contamination levels and human dietary exposure. *Food Chemistry* 82, 491-496.

- Valters, K., Olsson, A., Asplund, L., Bergman, A., 1999. Polychlorinated biphenyls and some pesticides in perch (*Perca Fluviaatilis*) from Inland Waters of Latvia. *Chemosphere* 38, 2053-2064.
- Waliszewski, S.M., Pardío, V. T., Waliszewski, K.N., Chantiri, J.N., Aguirre, A.A., Infanzón, R.M., Rivera, J., 1997. Organochlorine pesticide residues in cow's milk and butter in Mexico. *The Science of the Total Environment* 208, 127-132.
- WHO (World Health Organization), 1993. Polychlorinated Biphenyls and Terphenyls, second ed. WHO, Geneva.
- Zabik, M.E., Harte, J.B., Dickmann, G., 1992. Effect of preparation and coking on contaminant distributions in crustaceans:PCBs in blue crab. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 40, 1197-1203.
- Zucato, E., Calvarese, S., Mariani, G., Mangiapan, S., Grasso, P., Guzzi, A., Fanelli, R., 1999. Level, sources and toxicity of polychlorinated biphenyls in the Italian diet. *Chemosphere* 38, 2753-2765.

Table 1

Results of recovery study

Compound	Recovery (%)	Standard deviation	Detection limit (ng/g)	Quantification limit (ng/g)
PCB n°. 10	105.4	6.1	0.2	0.3
PCB n°. 28	103.6	6.1	0.2	0.3
PCB n°. 52	104.8	9.5	0.2	0.3
PCB n°. 153	97.3	4.0	0.5	0.6
PCB n°. 138	110.7	5.9	0.5	0.6
PCB n°. 180	104.3	7.3	0.5	0.6

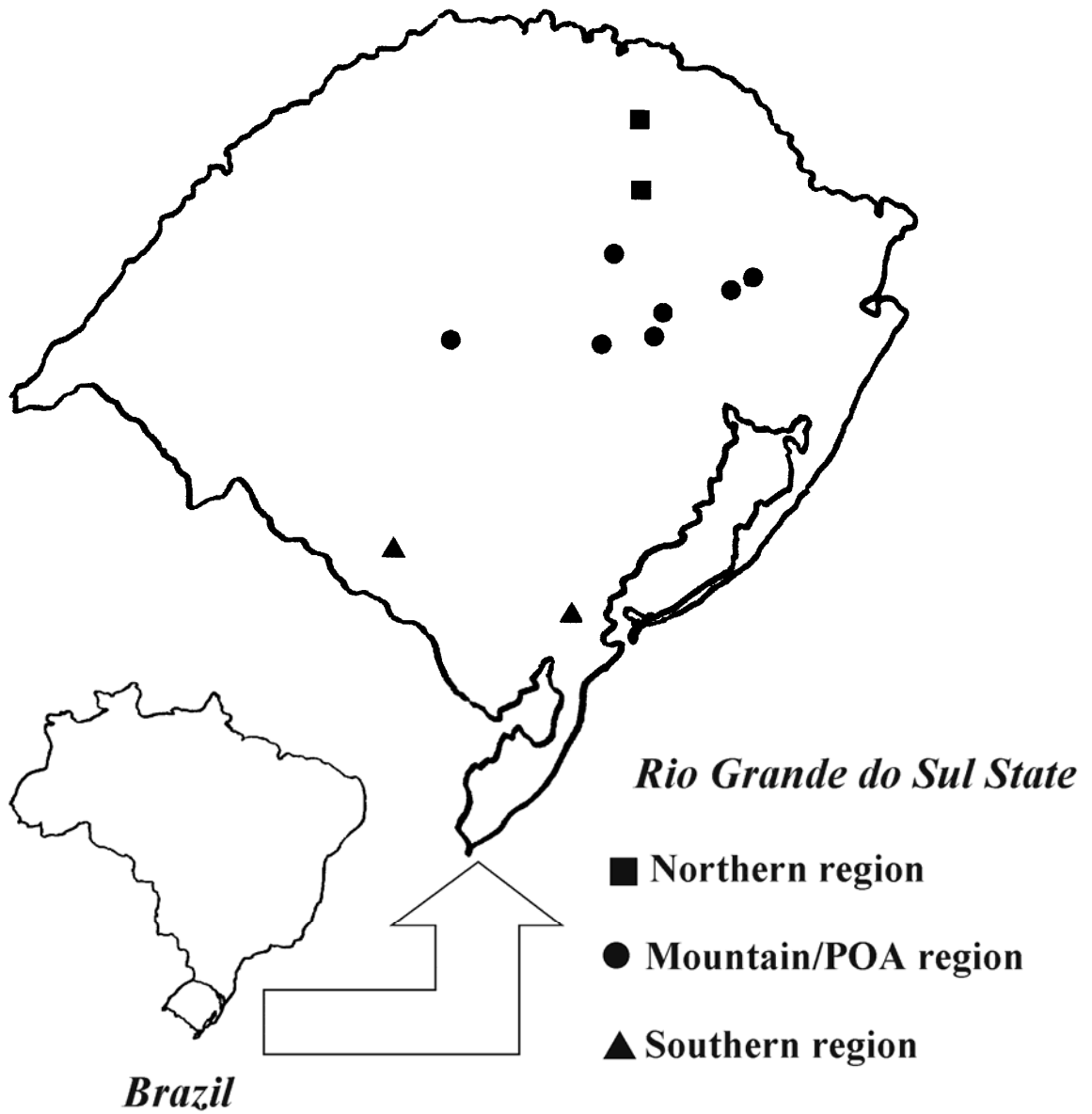


Fig. 1. Layout of sampling sites. Meat and meat products were obtained from 11 cities of the southern, northern and mountain/POA regions of the state of Rio Grande do Sul (Brazil).

Table 2

PCB residues in meat and meat products in ng/g fat.

Compound	Frequency of determination (%)	Positive samples*		All samples**	
		Mean \pm S.D.	Range	Mean \pm S.D.	Range
PCB 10	9.0 (N= 5)	7.50 \pm 5.57	1.54-16.40	0.68 \pm 2.65	ND-16.40
PCB 28	9.0 (N= 5)	6.56 \pm 2.63	3.00-9.44	0.60 \pm 2.03	ND-9.44
PCB 52	11.0 (N= 6)	24.17 \pm 49.45	0.50-124.71	2.64 \pm 16.86	ND-124.71
PCB 153	11.0 (N= 6)	1.84 \pm 1.70	0.95-5.28	0.20 \pm 0.78	ND-5.28
PCB 138	12.7 (N= 7)	1.70 \pm 1.10	0.70-4.01	0.22 \pm 0.68	ND-4.01
PCB 180	40.0 (N= 22)	2.10 \pm 1.31	0.60-6.11	0.85 \pm 1.32	ND-6.11
Σ PCBs	49.1 (N = 27)	43.87 \pm 61.76	7.29-165.95	5.19 \pm 24.32	ND-165.95

ND = not detected (<LOD).

*Calculated using values \geq LOQ.

**Calculated using values found in all samples (N = 55). Values for all non-detected congeners as well as values <LOQ were assumed as equal to zero.

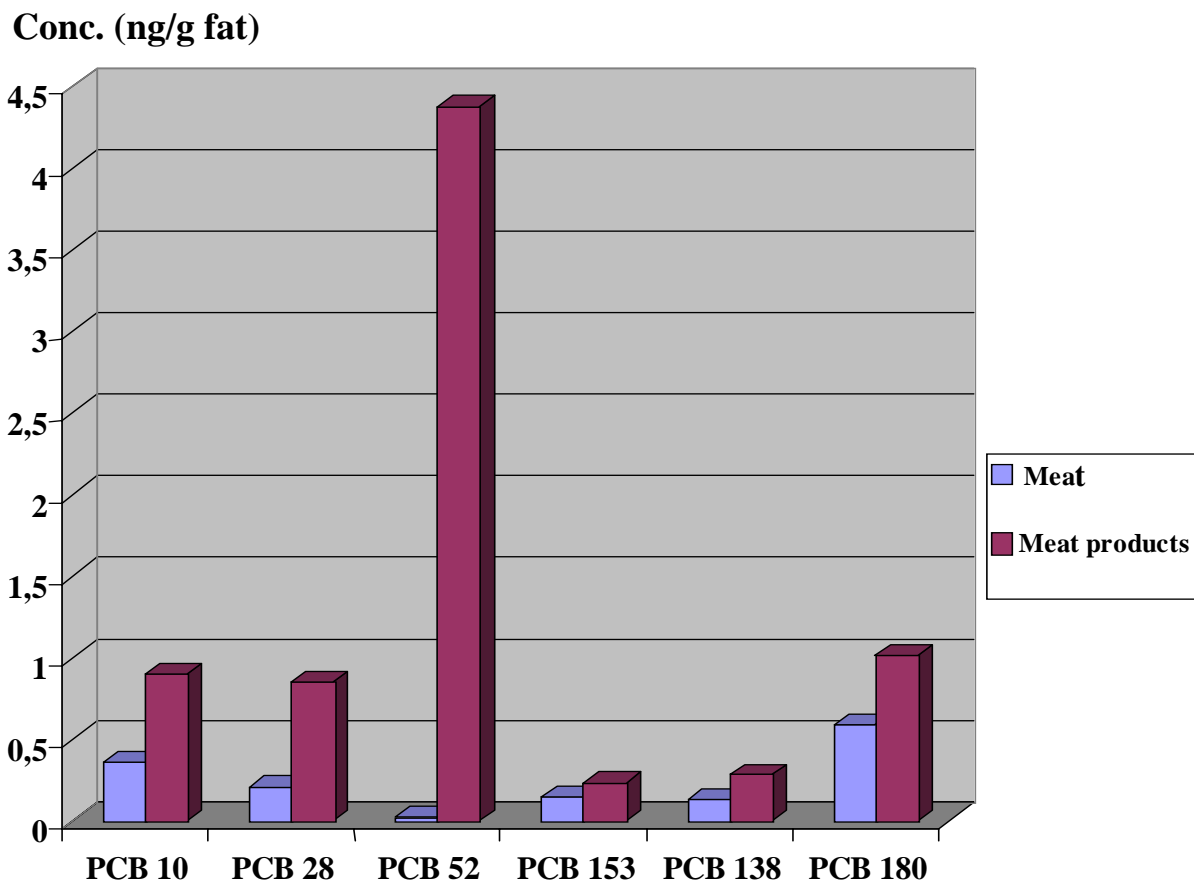


Fig 2. Distribution of PCB congeners in meat and meat products from Rio Grande do Sul, Brazil. Results are presents as mean of all samples analyzed (N=22 for meat and N=33 for meat products). Values for all non-detected congeners as well as values <LOQ were assumed as equal to zero.

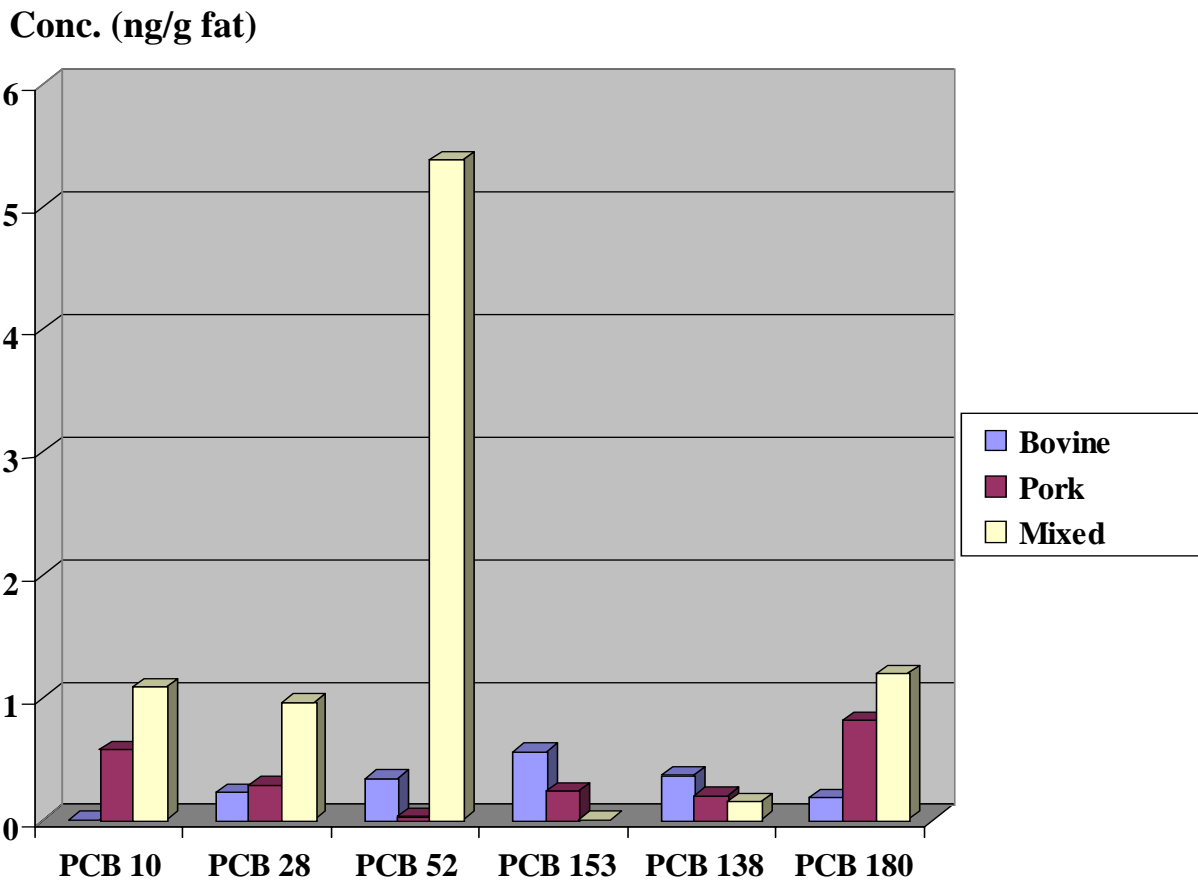


Fig 3. Mean levels of PCB congeners in bovine meat, pork meat and mixed meat products (bovine plus pork meat) from Rio Grande do Sul, Brazil. Results are presented as mean of all samples analyzed (N=13 for bovine meat, N=16 for pork meat and N=23 for mixed meat products). Values for all non-detected congeners as well as values <LOQ were assumed as equal to zero.

Table 3

PCB residues (ng/g fat) in meat, sausage, hot dog sausage, bologna sausage, canned export meat and salami.

Compound	Meat (N=22)	Sausage (N=3)	Hot dog sausage (N=13)	Bologna sausage (N=8)	Canned export meat (N=5)	Salami (N=4)
PCB 10	0.36	ND	0.90	2.24	ND	ND
PCB 28	0.21	ND	1.34	0.96	0.60	ND
PCB 52	0.02	ND	10.55	0.35	0.90	ND
PCB 153	0.15 ^b	ND ^b	ND ^b	0.17 ^b	1.26 ^a	ND ^b
PCB 138	0.13	ND	0.11	0.32	0.80	0.30
PCB 180	0.59	0.53	1.50	1.10	0.02	0.86
∑PCBs	1.46	0.53	11.45	4.82	3.58	1.16

ND = not detected (<LOD).

Results are presented as mean of all samples analyzed. Values for all non-detected congeners as well as values <LOQ were assumed as equal to zero. Values of the same row that do not show the same letter are significantly different ($p < 0.05$).

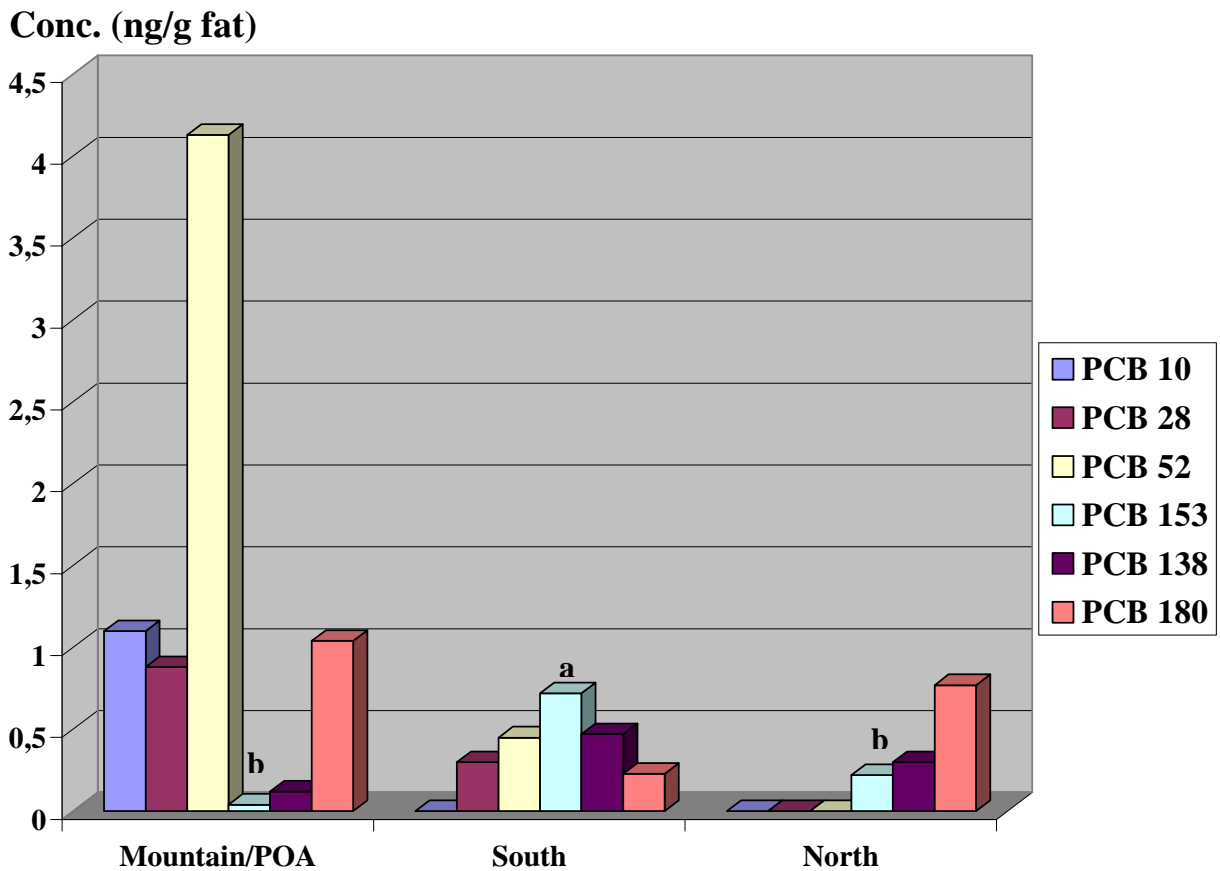


Fig 4. Levels of PCB congeners in meat and meat products from different regions of Rio Grande do Sul, Brazil. Results are presented as mean of all samples analyzed (N=34 for mountain/POA, N=10 for south and N=11 for north). Values for all non-detected congeners as well as values <LOQ were assumed as equal to zero. Values of the same PCB congener with different letters are significantly different ($p < 0.05$).

Table 4

PCB concentrations (ng/g fat) in various meat and meat product samples from different cities of Rio Grande do Sul, Brazil.

City	PCB 10	PCB 28	PCB 52	PCB153	PCB 138	PCB 180	∑PCBs
1 (N=6)	1.30±3.19	0.79±1.93	0.08±0.21	ND	ND	0.63±1.00	2.8
2 (N=3)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
3 (N=6)	ND	ND	20.78±50.91	ND	ND	0.89±1.64	21.67
4 (N=5)	1.76±3.15	1.89±4.22	2.50±5.59	0.28±0.62	0.22±0.49	1.66±2.66	8.31
5 (N=9)	1.82±5.47	0.85±2.56	0.31±0.72	ND	0.16±0.49	1.76±1.23	4.90
6 (N=7)	ND	0.43±1.13	0.64±1.69	0.90±1.97	0.57±1.51	0.14±0.34	2.68
7 (N=3)	ND	ND	ND	0.32±0.55	0.23±0.40	0.44±0.76	0.99
8 (N=5)	ND	ND	ND	ND	ND	0.50±0.69	0.50
9 (N=6)	ND	ND	ND	0.40±0.63	0.55±0.90	0.99±1.36	1.94
10 (N=1)	ND	ND	ND	ND	ND	2.22±0.00	2.22
11 (N=4)	1.11±2.23	2.00±4.00	ND	ND	0.34±0.69	ND	3.45

ND = not detected (<LOD). Results are presented as mean ± S.D. of all samples analyzed. Values for all non-detected congeners as well as values <LOQ were assumed as equal to zero.

FOOT NOTES FOR PAGE 1

Abbreviations: LOD, limit of detection; LOQ, limit of quantification; PCBs, polychlorinated biphenyls.

*Corresponding author. Tel/FAX: +55 55 220 8494.

E-mail address: ijoni@smail.ufsm.br

4. DISCUSSÃO

Alimentos isentos de substâncias químicas tóxicas constituem uma preocupação crescente nas entidades de pesquisa e de ensino, bem como dos consumidores em geral (WHO/IPCS, 1993). Dentre os possíveis contaminantes que podem estar presentes nos alimentos, os PCBs destacam-se por constituírem uma classe de compostos orgânicos clorados de interesse, em função de suas propriedades físico-químicas, efeitos tóxicos, e em especial, pelo fato da ingestão de alimentos contaminados por PCBs constituir a principal forma de exposição a estes compostos para os seres humanos. A ingestão de alimentos contaminados por PCBs chega a contribuir com até 90% dos níveis corporais destes no organismo (WHO/IPCS, 1993; Lien & Theelen, 1997; Safe, 1998; Schlummer *et al.*, 1998). Além disso, produtos de origem animal, como a carne e os produtos cárneos contribuem com 14 a 19% do valor cumulativo de PCBs, se comparados a outras formas de alimentos (Larini, 1999). Assim, o monitoramento dos níveis residuais de PCBs nos alimentos é de grande importância para informar quais os produtos alimentícios que não representam riscos à saúde (Oviedo *et al.*, 2002).

Nos procedimentos analíticos para determinação de resíduos tóxicos, o desenvolvimento de métodos constitui uma etapa fundamental e extremamente relevante. A investigação deve levar em conta a validação do método desenvolvido e não apenas sua otimização. Para tanto, deve-se obter provas, documentadas e demonstrativas, de que o método é confiável e capaz de produzir resultados dentro de um intervalo definido. A credibilidade do trabalho analítico se fundamenta nos cuidados do analista para produzir dados dentro dos parâmetros de linearidade, sensibilidade, limite de detecção e quantificação o que é obtido com a realização de uma validação adequada.

No presente trabalho, se procedeu à validação de um método cromatográfico para determinação dos PCBs 10, 28, 52, 153, 138 e 180, fazendo-se inicialmente a identificação dos compostos em estudo a partir de seus respectivos tempos de retenção, pela injeção de quantidades conhecidas dos padrões individuais dos PCBs em estudo.

A linearidade do método foi obtida a partir da regressão linear das retas de calibração e da determinação dos coeficientes de correlação (r) e de determinação (r^2). Segundo Castro *et al.* (1989), em análises de traços de um elemento se

consideraram aceitáveis os valores de r e r^2 iguais ou superiores a 0,990 e 99,0%, respectivamente. Em todos os casos, os valores de r e r^2 foram maiores que o recomendado por Castro *et al.* (1989). Os valores de r experimentais para $n-2$ graus de liberdade, com uma probabilidade de $p < 0,001$, foram superiores ao $r_{\text{teórico}}(4, 0,001) = 0,974$. Estes resultados demonstraram que em todos os casos havia uma correlação positiva de 99,9% entre a concentração dos diferentes compostos e a resposta no sistema cromatográfico. O significado estatístico da linearidade foi calculado através da variância da pendente b (S_b^2), que em todos os casos apresentou valores menores que 5% conforme recomenda Castro *et al.* (1989). Assim, as provas de linearidade confirmaram a boa resposta do detector frente aos PCBs utilizados.

A precisão do método foi obtida pelos valores de repetibilidade e reprodutibilidade, e estes parâmetros foram obtidos a partir do cálculo dos coeficientes de variação percentual (CV%) que foram comparados com os CV% máximos aceitáveis propostos por Horwitz (1975) e Kolthoff *et al.* (1975). Como os PCBs são encontrados em amostras biológicas a níveis de $\mu\text{g/mL}$ ou ppb, as amostras foram fortificadas com 0,01 $\text{ng}/\mu\text{L}$ para os testes de repetibilidade e reprodutibilidade. Nesta faixa de concentração o CV% máximo aceitável para as provas de precisão é de 16% (Horwitz, 1975). Tais provas demonstraram boa repetibilidade e reprodutibilidade, o que indica uma precisão adequada para o método proposto.

A recuperação média dos PCBs analisados foi obtida a partir das recuperações dos padrões individuais, e a esta recuperação média aplicou-se o teste t de Student para determinar a exatidão do método. Para tanto, considerou-se como valor experimental os obtidos pela aplicação da seguinte fórmula: $t_{\text{experimental}} = (m-x)/S = (100-R)\sqrt{n}/CV$, onde m = valor verdadeiro, S = desvio típico, x = valor médio, R = % de recuperação, n = nº de determinações, CV = coeficiente de variação. Os valores experimentais foram comparados com valores teóricos tabulados para $n-1$ graus de liberdade e uma probabilidade de $p < 0,05$. Neste caso os graus de liberdade são 4 e o valor esperado é $t_{(4, 0,05)} = 5,598$. Em todos os casos reportados o valor de $t_{\text{experimental}}$ foi menor que o valor de $t_{\text{teórico}}$. Por tanto, para todos os resíduos de PCBs investigados se obteve uma recuperação satisfatória.

A sensibilidade do método foi determinada a partir dos limites de detecção e quantificação para os congêneres em estudo. Os limites de detecção foram

calculados a partir de três vezes o desvio do sinal da linha de base (Long & Winefordner, 1983; Leite, 1998). Os limites de quantificação foram calculados como 10 vezes o desvio do sinal produzido pela linha de base, obtido a partir das curvas de calibração de cada um dos padrões (Miller & Miller, 1993). Os limites de detecção obtidos encontraram-se entre 0,2-0,5 ng/g e os limites de quantificação entre 0,3-0,6 ng/g o que evidencia a aplicabilidade do método para o monitoramento de resíduos de PCBs em carne e produtos cárneos.

As amostras analisadas revelaram a presença de congêneres de bifenilos policlorados na carne e nos produtos cárneos. O PCB 52 foi o composto encontrado com o maior nível (2,64 ng/g de gordura), seguido dos PCBs 180 (0,85 ng/g de gordura), 10 (0,68 ng/g de gordura), 28 (0,60 ng/g de gordura), 138 (0,22 ng/g de gordura) e 153 (0,20 ng/g de gordura). O somatório destes seis PCBs, expresso como \sum PCBs, foi de 5,19 ng/g de gordura para os níveis médios. O valor máximo detectado nas amostras foi de 124,71 ng/g de gordura. Estes resultados, entretanto, encontram-se abaixo dos limites máximos para resíduos de PCBs estabelecidos para a Comunidade Européia (200 ng/g de gordura; Bester *et al.*, 2001) e para o Brasil (3000 ng/g de gordura; Brasil, 1999).

Quanto às freqüências de determinação, o PCB 180 foi encontrado em 40% das amostras, seguido do PCB 138, que estava presente em 13%, enquanto que os congêneres 153 e 52 foram detectados em 11% e os congêneres 28 e 10 em 9% das amostras. Estes dados de freqüência são semelhantes aos obtidos por Zucato *et al.* (1999) que avaliaram PCBs na dieta italiana e encontraram os congêneres 153 e 138 com freqüências de 10,9 e 13,8%, respectivamente. Diber & Kofer (2000), analisando amostras de gordura de porco e frango, encontraram PCBs com uma freqüência de 24% e 20%, respectivamente. A freqüência de determinação encontrada nas amostras estudadas seguiu a ordem do maior para o menor peso molecular, sendo que os compostos mais clorados foram encontrados em maior freqüência (heptaclorobifenilo PCB180 > hexaclorobifenilo PCB 138 > hexaclorobifenilo PCB 153 = tetraclorobifenilo PCB 52 > triclorobifenilo PCB 28 = diclorobifenilo PCB 10). Estes dados divergem dos de Golian & Pavelka (2002), que encontraram altos níveis de triclorobifenilos e baixos níveis de heptaclorobifenilos, em produtos cárneos da República Checa e República Eslováquia.

Os níveis médios de contaminação por PCBs foram maiores nos produtos cárneos quando estes foram comparados com a carne. Nos produtos cárneos o

maior nível de contaminação foi para o PCB 52 (4,38 ng/g de gordura), seguido do PCB 180 (1,01 ng/g de gordura) e PCBs 10 e 28 (0,90 e 0,85 ng/g de gordura, respectivamente), enquanto que os congêneres 153 e 138 foram observados em níveis menores (0,23 e 0,28 ng/g de gordura, respectivamente). Nas amostras de carne o PCB 180 foi encontrado em altos níveis (0,59 ng/g de gordura), seguido dos PCBs 10 e 28 (0,36 e 0,21 ng/g de gordura, respectivamente). Os congêneres 52, 153 e 138 foram encontrados em níveis menores que 0,20 ng/g de gordura. O teste t de Student não mostrou diferenças significativas entre os níveis dos PCBs na carne e nos produtos cárneos.

A alta concentração do PCB 52 nos produtos cárneos está relacionada a presença de uma amostra que apresentou altos níveis deste congêner (124,71 ng/g de gordura). Resultados semelhantes foram encontrados por Lopez-Leiton *et al.* (2001), que encontraram o tetraclorobifenilo PCB 52 como um abundante contaminante em amostras de carne suína na Espanha. A relevância destes altos níveis encontrados para o congêner 52 deve-se as suas repercussões toxicológicas, pois Costabeber (1999) e Lucena *et al.* (2001), investigando a relação entre os hábitos alimentares e os níveis de PCBs em tecido adiposo mamário de mulheres residentes em Córdoba, Espanha, encontraram uma correlação positiva significativamente o PCB 52 e a presença de câncer de mama nestas mulheres.

Vários autores relatam uma maior contaminação de PCBs nos produtos cárneos quando comparados com a carne (Mes *et al.*, 1991; Schechter *et al.*, 1997; Klein, 1983), o que presume uma provável influência do processamento sobre os níveis de congêneres de bifenilos policlorados nos produtos cárneos. Entretanto, Bayarri (1997) não encontrou modificações significativas na contaminação por PCBs e pesticidas organoclorados em embutidos fermentados, crus e curados, após seu processamento. No entanto, é importante destacar que os dados obtidos por Bayarri (1997) não podem ser comparados aos encontrados no presente estudo para as amostras de mortadela e salsicha hot-dog, pois nestes produtos cárneos não são empregadas culturas iniciadoras e, além disso, estes são produtos cozidos durante o processamento. Destaca-se que as amostras de salsicha hot-dog e a mortadela foram as que apresentaram os maiores níveis de contaminação entre os produtos cárneos analisados. Considerando a ANOVA dos níveis de congêneres nos diferentes tipos de amostras, esta revelou significância estatística ($p < 0,05$) apenas

para o PCB 153 que foi encontrado em níveis significativamente maiores na carne enlatada para exportação, do que nas demais amostras.

O baixo nível de PCBs no salame sugere uma provável influência das culturas iniciadoras, usadas no seu processamento, na degradação dos níveis residuais de PCBs. Esta possível contribuição das culturas iniciadoras foi demonstrada *in vitro* por Bayarri (1997), que verificou uma potencial capacidade de degradação para a cultura iniciadora *Micrococcus varians* em meio salino, onde esta foi capaz de degradar 12,7% do fungicida HCB, 17,7% do p,p'DDE, 16,7% do dieldrin e 15,5% do PCB 153. Abou-Arab (2002) investigando o efeito *in vivo* das culturas iniciadoras utilizadas no processamento de embutidos fermentados verificou que o *Lactobacillus plantarum* e o *Micrococcus varians*, após 72 horas de fermentação da carne, foram capazes de reduzir os níveis do DDT e do lindano em 10 e 18%, respectivamente.

Considerando a contaminação da carne e dos produtos cárneos conforme a região de onde as amostras foram obtidas, verificou-se que a região serra/POA apresentou os maiores níveis de contaminação. Isto provavelmente está relacionado a um maior desenvolvimento industrial desta região. Esta hipótese é confirmada por muitos trabalhos da literatura consultada (Zabik *et al.*, 1992; Valters *et al.*, 1999; Bayarri *et al.*, 2001), que sugerem a influência do desenvolvimento industrial no aumento da exposição a contaminantes ambientais. A ANOVA revelou que apenas os níveis do PCB 153 encontrados na região sul apresentam diferenças estatisticamente significativas quando comparados com as outras regiões estudadas, sendo significativamente maiores nessa região.

Os resultados obtidos nesta pesquisa demonstram que os níveis de PCBs na carne e nos produtos cárneos no estado do Rio Grande do Sul, Brasil, são semelhantes aos observados em muitos países (Zucato *et al.* 1999; Diber & Kofer 2000; Lopez-Leiton *et al.* 2001). Com base no atual conhecimento toxicológico, pode-se afirmar que estes níveis não representam um risco importante associado ao consumo destes tipos de alimentos produzidos nesta região. Entretanto, salienta-se a importância de outros trabalhos na área com a finalidade de levantar dados sobre a contribuição da ingestão da carne e dos produtos cárneos para os níveis de contaminação por PCBs na população em geral desta região.

5. CONCLUSÕES

Dos resultados obtidos no presente trabalho pode-se concluir que:

- O método cromatográfico proposto para determinação de PCBs através de cromatografia gasosa (GC/ μ ECD), em amostras de carne e produtos cárneos é rápido e eficiente. A eficiência do método foi demonstrada pelos valores de recuperação obtidos, os quais encontram-se entre 97,3 e 110,7%.
- Na etapa da validação do método avaliou-se os parâmetros de linearidade, precisão, exatidão e sensibilidade. Todos estes parâmetros foram considerados satisfatórios de acordo com os valores sugeridos na literatura, para a análise de resíduos, empregando-se métodos cromatográficos.
- Os resultados das análises das amostras revelaram a presença de congêneres de bifenilos policlorados na carne e nos produtos cárneos obtidos em diferentes regiões do estado do Rio Grande do Sul. Entretanto, os resultados obtidos encontram-se abaixo dos limites máximos para resíduos de PCBs estabelecidos para a comunidade Européia (200 ng/g de gordura; Bester et al., 2001) e para o Brasil (3000 ng/g de gordura; Brasil, 1999).
- As amostras de produtos cárneos apresentaram maiores níveis de contaminação por PCBs do que as de carne, o que sugere uma provável influência do processamento na carga total destes congêneres nos produtos.
- Os resultados das análises das amostras de diferentes regiões revelam que não existem áreas de risco, isto é, não foram encontrados nas amostras níveis de contaminação acima do permitido pela legislação. Destaca-se que, as amostras da região mais industrializada apresentaram

maiores níveis de PCBs totais (Σ PCB) quando comparados aos das menos industrializadas.

- Considerando-se os testes estatísticos (ANOVA) para os níveis de congêneres nos diferentes tipos de amostras, apenas o PCB 153 foi encontrado em concentrações significativamente maiores em carne enlatada para exportação, quando comparadas as outras amostras.
- Comparando-se as concentrações dos PCBs segundo a região de onde se obteve a amostra, ANOVA revelou que apenas os níveis do PCB 153 encontrados na região sul foram significativamente maiores quando comparados com as outras regiões estudadas.
- Por se tratar da primeira pesquisa na área sugere-se a continuidade destes estudos para produtos de origem animal a fim de se determinar a influência do processamento na carga de PCBs nestes produtos, e também para avaliar a contribuição destes alimentos para a exposição das populações da região aos PCBs.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABAD, E.; LLERENA, J.J.; SAULÓ, J.; RIVERA, J. Study on PCDDs/PCDFs and co-PCBs contend in food simples from Catalonia (Spain). **Chemosphere**, v. 46, n.9-10, p. 1435-1441, 2002.
- ABOU-ARAB, A. A. K. Degradation of organochlorine pesticides by meat starter in liquid media and fermented sausage. **Food Chemical and Toxicology**, v. 40, p. 33-41, 2002.
- ABRAMOWICZ, D. A. 1990. Aerobic and anaerobic biodegradation of PCBs: a review. **Critical Reviews in Biotechnology**, v.10, n. 3, p. 241-249, 1990.
- ALBAIGES, J. **Analytical Techniques in Environmental Chemistry**; vol. 3; Pergamon Press; London; 1980; p 167.
- ANGULO, R.; COSTABEBER, I.; SERRANO, S.; JODRAL, M. Identification and quantitative determination of eleven PCBs congeners on biological samples. **8th Symposium on Handling of Environmental and Biological Samples in Chromatography. 26th Scientific Meeting of the Group of Chromatography and Related Techniques of the Spanish Royal Society of Chemistry**, p.89, Almería, Spain, Octubre 26-29, 1997.
- ATSDR **Toxicological profiles**. Agency for Toxic Substances and Disease Registry, U. S. Public Health Service (CD-ROOM), 1997.
- BAYARRI, S., 1997. Degradación de residuos de contaminantes clorados en productos cárnicos por el procesado y la acción de microorganismos responsables de maduración. Zaragoza, **Tesis Doctoral** - Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza, España. 364 p.
- BAYARRI, S., BALDASSARI, L.T.R., IACOVELLA, N., FERRARA, F., DI DOMENICO, A. PCDDs, PCDFs, PCBs and DDE in edible marine species from the Adriatic Sea. **Chemosphere**, v. 43, p. 601-610, 2001.
- BESTER K.; DE VOLS P.; LE GUERN L.; HARBECK S.; HENDRICKX F.; KRAMER G.N.; LISINGER T.; MERTENS I.; SCHIMMEL H.; SEJEROE-OLSEN B.; PAUWELS J.; DE POORTER G.; RIMKUS G.G.; SCHLABACH M. Preparation and certification of a reference material on PCBs in pig fat and its application in quality control in monitoring laboratories during de belgian "PCB-crisis". **Chemosphere**, v.44, n.4, p. 529-537, 2001.

- BRASIL, Portaria Interministerial 19, de 2 de janeiro de 1981.
- BRASIL, Instrução Normativa 001 SEMA/STC/CRC, do Ministério do Interior, de 10 de junho de 1983.
- BRASIL, Decreto Federal nº 96044/88, que dispõe sobre o transporte de cargas perigosas.
- BRASIL – ABNT . Ascareis para Transformadores e capacitores **NBR 8371/94**, São Paulo, 1994.
- BRASIL – ABNT . Líquidos Isolantes Elétricos – Determinação do Teor de Bifenilas Policloradas **NBR 13882/97**, São Paulo, 1997.
- BRASIL, Portaria Interministerial nº 019, de 29/01/1998 que dispõe sobre fabricação e uso de Ascarel, Ministério do Interior.
- BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Número 42 de 20/12/1999.
- BROUWER, A.; LONGNECKER, M.P.; BIRNBAUM, L.S.; COGLIANO, J.; KOSTYNIK, P.; MOORE, J.; SCHANTZ, S.; WINNEKE, G. Characterization of potential endocrine-related health effects at low-dose levels of exposure to PCBs. **Environmental Health Perspectives**. v.107, n. Suppl. 4, p. 639-649, 1999.
- BROWN, M. P.; WERNER, M. B.; SLOAN, R. J.; SIMPSON, K. W. Polychlorinated-biphenyls in the Hudson River. **Environmental Science & Technology**, v.19, n.8, p. 656-667, 1985.
- CASTRO M., FORA S.G., FORN M.P., ROCA J.M^a.S., PLA L.V. Validación de métodos analíticos. **Monografía de la Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria**, Sección Catalana, 1989.
- COLMAN, A. & DAWSON, J. Un estudio realizado en el Reino Unido revela que las hormonas naturales en los afluentes de aguas residuales afectan a los peces. Boletín **Moduladores Endocrinos. Grupo de dirección de Moduladores Endocrinos (CEFIC)**, 1996.
- COSTABEBER, I.; ANGULO, R.; SERRANO, S.; JODRAL, M. Organochlorine residues in chicken and sheep fat. **8th Symposium on Handling of Environmental and Biological Samples in Chromatography. 26th Scientific Meeting of the Group of Chromatography and Related Techniques of the**

Spanish Royal Society of Chemistry, p. 88. Almería, España, Octubre 26-29, 1997.

COSTABEBER, I. Residuos organoclorados persistentes en grasa mamaria y su relación con los hábitos alimentarios: repercusiones sanitarias. **Tesis Doctoral**, Departamento de Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad de Córdoba, España, 1999.

COSTABEBER, I. & EMANUELLI, T. Aspectos toxicológicos de los bifenilos policlorados: una recopilación. NO PRELO. **Boletim SBCTA**. 2004.

DE VOOGT, P. & BRINKMAN, U. A. The production, properties and usage of polychlorinated biphenyls. In: **Halogenated biphenyls, terphenyls, naphthalenes, dibenzodioxines and related products**. Kimbrough, R. D. & Jensen, A. A. [Eds] Topics in environmental health, Vol.4 Publ. By Elsevier Science Publishers B. V.: 3-29, 1989.

DEKONING, E. P. & KARMAUS, W. PCB Exposure in utero and via breast milk. A review. **Journal of Exposure Analysis and Environmental Epidemiology**, v.10, n.3, p. 285-293, 2000.

DIBER, F. & KOFER, J. Dioxin and PCB content of Styrian pork and chicken fat. **Deutsche Lebensmittel-Rundschau**, v.96, n.7, p.247-250, 2000.

DONNELLY, J. R.; GRANGE, A.H., HERRON, N.R.; NICHOL, G. R.; JETER, J. L.; WHITE, R. J.; BRUMLEY, W.C. and VAN EMON, J.. Modular methodology for determination of polychlorinated biphenyls in soil as Arochlors and individual congeners. **Journal of AOAC International**, v.79, n.4, p. 953-961, 1996.

EEC (1976) **Council Directive 76/769/EEC of 27 July 1976** on the approximation of the laws, regulations and administrative provisions of the Member States relating to restrictions on the marketing and use of certain dangerous substances and preparations. OJ L 262: 201-203.

EEC (1991) **Council Directive 91/339/EEC of 18 June 1991** amending for the 11 th time Council Directive 76/769/EEC on the approximation of the laws, regulations and administrative provisions of the Member States relating to restrictions on the marketing and use of certain dangerous substances and preparations. OJ L 186, 12.7.1991: 64-65.

ELETROPAULO. **Ficha de Instrução Para Transformadores e Capacitores**. Jun, 1994.

- ENDS (1999) UK in dock over PCBs directive. **ENDS Report 294, July 1999**, p. 43.
- EPA-ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USA); **Polychlorinated Biphenyls (PCBs) Manufacturing, Processing, Distribution in Commerce and Use Prohibitions. Use in Electrical Equipment. Statement of Policy**; Federal Register 40 CFR Part 761, v.48, n.35, 1983.
- ESPOSITO, M.; IMPARATO, E.; CASTELLANO, V.; SERPE, L. Distribution of polychlorinated biphenyls in contaminated swine tissue. **Veterinary and Human Toxicology**, v. 43, n.2, p. 97-98, 2001.
- FENG, H.; COCHRAN, J. K.; LWINZA, H.; BROWNAWELL, B. J.; HIRSCHBERG, D. J.; 1998, Distribution of heavy metal and PCB contaminants in the sediments of an urban estuary: The Hudson River **Marine Environmental Research**, v.45, n.1, p. 69-88, 1998.
- GILBERTSON, M. 1989. Effects on fish and wildlife populations. In: Kimbrorugh R.D. & Jensen, A.A. [editors]. **Halogenated biphenyls, terpehenyls, naphthalenes, dibenzodioxins and related products**. Elsevier, Amsterdam.
- GOLIAN, J., PAVELKA, M. Residues of PCB in certain meat products. **Magyar Allatorvosok Lapja** , v. 24, p. 616-619, 2002.
- GOTO, M. & HIGUCHI, K. The symptomatology of Yusho (chlorobiphenyls poisoning) in dermatology. **Fuoka Acta Medica**, n. 128, p. 993-996, 1969.
- HERNANDEZ, L.M.; FERNANDEZ, M.A.; JIMENEZ, B.; GONZALEZ, M.A.J.; GARCIA. J.F. Organochlorine pollutants in meats and cow's milk from Madrid (Spain). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**. v.52, n.2, p. 246-253, 1994.
- HORWITZ W., 1975. **Official Methods of Analysis of the AOAC**, 12^a edición, Washington DC: 518-525.
- HORWITZ W., KAMPS L.R. AND BOYER K.W. Quality assurance in the analysis of food for trace constituents. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v.63, n.6, p.1344-1354, 1980.
- JORNAL "O ESTADO DE SÃO PAULO". Furnas Escondeu Acidente em 87, 02/07/96. 1996a
- JORNAL "O ESTADO DE SÃO PAULO". Vazamento de óleo atinge Favela do Rio. 02/07/96. 1996b.

- JORNAL "O ESTADO DE SÃO PAULO". Bebê morre e família diz que causa foi Ascarel. 10/07/96. 1996c.
- JORNAL "O ESTADO DE SÃO PAULO". Greenpeace acha substância proibida. 05/01/01. 2001.
- JORNAL "FOLHA DO PARANÁ". RFFSA é multada em R\$ 20 mil por vazamento de ascarel. 27/04/01. 2001.
- KANNAN, N.; SCHULZ-BULL, D.E.; PETRICK, G.; DUINKER, J.C.; MATCHT-HAUSMANN, M.; WASSERMAN, O. Toxic Chlorobiphenyls in Adipose Tissue and Whole Blood of and Occupationally/Accidentally Exposed Man and the General Population. **Archives of Environmental Health**, v.49, n.5, p. 375-383, 1994.
- KHOLKUTE, S.D.; RODRIGUEZ, J.; DUKELOW, W.R. 1994. The effects of polybrominated biphenyls and perchlorinated terphenyls on *in vitro* fertilization in the mouse. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology** n.26, v.2, p. 208-211, 1994.
- KIM, M., KIM, S.; YUN, S.; LEE, M.; CHO, B.; PARK, J.; SON, S.; KIM, O.; Comparison of seven indicator PCBs and three coplanar PCBs in beef, pork and chicken fat. **Chemosphere**, v.54, n.10, p. 1533-1538, 2004.
- KLEIN, H., 1983. The PCB situation in the Federal Republic of Germany. In: Barros, M.C., Könemann, H., Visser, R. (Eds), **Proceedings of PCB Seminar**, The Hague, 28-30 September 1983, The Hague, Ministry of the Environmental, pp.66-79.
- KOLTHOFF I. M., SANDELL E. B., MEECHAN E.J. Y BRUCKENSTEIN S.1975. **Análisis Químico Cuantitativo**. 4ª edición. Ed. Nigar S.R.L. Buenos Aires.
- LARINI, L. **Toxicologia dos praguicidas**. São Paulo: Manole, 1999. p. 9-18.
- LEES, P.S.J.; CORN, M.; BREYSSE, P.N. Evidence for dermal absorption as the major route of body entry during exposure of transformer maintenance and repairmen to PCBs. **American Industrial Hygiene Association Journal**. n .48, v.3, p. 257-264, 1987.
- LEITE F. Sensibilidade, seletividade e limites de determinação e detecção. In: Leite F. **Validação em análise química**. 3ª E.D., Campinas: Átomo, 1998. Cap. 13, p. 67-69.

- LEVENGOOD, J.M.; ROSS, S.C.; STAHL, M.L.; BEASLEY, V.R. Organochlorine pesticide and polychlorinated biphenyl residues in Canada geese (*Branta canadensis*) from Chicago, Illinois. **Veterinary and Human Toxicology**. n.41, v.2, p.71-75, 1999.
- LI, M.H.; ZHAO, Y.D.; HANSEN, L.G. Multiple dose toxicokinetic influence on the estrogenicity of 2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology** v.53, n.4, p. 583-590, 1994.
- LIEN, A.K.D. & THEELEN, R.M.C. Dioxins: Chemical Analysis, Exposure and Risk Assessment. **National institute of Public Health and the Environment**, Bilthoven, The Netherlands.
- LONG G.L., WINEFORDNER J.D. Limit of detection: a closer look at the iupac definition. **Analytical Chemistry**, v.55, n.7, p. A712, 1983.
- LONGNECKER, M.P.; ROGAN, W.J.; LUCIER, G. The human health effects of DDT (dichlorodiphenyltrichloroethane) and PCBs (polychlorinated biphenyls) and an overview of organochlorines in public health. **Annual Review of Public Health**, v.18, p.211-244, 1997.
- LOPES-LEITON, T.J.L., PINEIRO, M.E.A, YUSTY M.A.L., DAVINA, J.L.C. Levels of seven PCBs used as markers of dioxin in commercial pork meat in Spain. **Journal of AOAC International**, v.84, p.1799-1801, 2001.
- Lucena, R.A., Allam, M.F., Costabeber, I.H., Villarejo, M.L.J., Navajas, R.F-C, 2001. Breast cancer risk factors: PCB congeners. **European Journal of Cancer Prevention** 10, 117-119.
- MES, J.; NEWSOME, W.H.; CONACHER, H.B.S.; Levels of specific polychlorinated biphenyls congeners in fatty foods from five Canadian cities between 1986 and 1988. **Food Additives and Contaminants**, n.10, v.4, p. 429-441, 1993.
- MES, J., NEWSOME, W.H., CONACHER, H.B.S. Levels of specific polychlorinated biphenyls congeners in fatty foods from five Canadian cities between 1986 and 1988. **Food Additives and Contaminants** 8, 351-361, 1991.
- MILLER J.C., MILLER, J. N. Error in instrumental análisis; regresión and correlation. In: Miller J.C., Miller, J. N. **Statistic for analytical chemistry**. 3^a E.D. Chichester: Ellis Horwood. Chapter 5, p. 101-141, 1993.

- NAGASAKI, H.; KAWABATA, H.; MIYATA, Y.; INOUE, K.; AOE, H.; ITO, N. Effects of various factors on induction of liver tumours in animals by the alpha-isomer of benzenehexachloride. **Gann**, v.66, n.2, p.185-191, 1975.
- OVIEDO, M, T. P.; TOLEDO, M.C.F.; VICENTE, E. Determinação de resíduos de agrotóxicos organoclorados em hortaliças. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, Curitiba, v.12, p.111-130, 2002.
- PATANDIN, S.; DAGNELIE, P.C.; MULDER, P.G.H.; de COUL, E.O.; van der VEEN, J. E.; WEISGLAS-KUPERUS,. Dietary exposure to polychlorinated biphenyls and dioxins from infancy until adulthood: A comparison between breast-feeding, toddler, and longterm exposure. **Environmental Health Perspectives**, v.107, n.10, p.496-497, 1999.
- PAUMGARTEN, F.J.R.; CRUZ, C.M.; CHAHOUD, I.; PALAVINSKAS, R.; MATHAR, W. PCDDs, PCDFs. PCBs and other organochlorine compounds in human milk from Rio de Janeiro. **Environmental Research**, v.83, n.3, p. 293-297, 2000.
- PENTEADO, J.C.P., MOREIRA VAZ, J. O legado das bifenilas policloradas (PCBs). **Química Nova** 24, 390-398, 2001.
- QUENSEN III, J.F.; BOYD, S.A.; TIEDJE, J.M. Dechlorination of four commercial polychlorinated biphenyls mixtures (Aroclors) by microorganisms from sediments. **Applied and Environmental Microbiology**, 56, 2360-2369.
- REIJNDERS, P.J.H. Reproductive failure in common seals feeding on fish from polluted coastal waters. **Nature**, v. 324, n. 6096, p. 456, 1986.
- RICE, D.C. 1999. Behavioral impairment produced by low-level postnatal PCB exposure in monkeys. **Environmental Research**, v. 80, n. 2, p. 113-121, 1999.
- ROCH, P. & COOPER, E.L. Cellular but not humoral antibacterial activity of earthworms is inhibited by Aroclor 1254. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 22, n. 3, p. 283-290, 1991.
- ROGAN, W.J. & GLADEN, B.C. Neurotoxicology of PCBs and related compounds. **Neurotoxicology**, v. 13, n. 1, p. 27-36, 1992.
- SAFE, S. Polychlorinated biphenyls (PCBs) and polybrominated biphenyls (PBBs): Biochemistry toxicology and mechanism of action. **CRC Critical Reviews of Toxicology**, v. 13, n. 4, p. 319-395, 1984.

- SAFE, S.H. Development validation and problems with the toxic equivalency factor. Approach of risk assessment of dioxins and related compounds. **Journal Animal Science**, v. 76, n. 1, p. 134-141, 1998.
- SCHECTER, A., CRAMER, P. BOGGESS, K., STANLEY, J., OLSON, J.R., Levels of Dioxins, dibenzofurans, PCB and DDE congeners in pooled food samples collected in 1995 at supermarkets across the United States. **Chemosphere**, v.34, p.1437-1447, 1997.
- SCHEPENS, P.J.C.; COVACI, A.; JORENS, P.G.; HENS, L.; SCHARPE, S.; VAN LAREBEKE, N. Surprising findings following a Belgian food contamination with polychlorobiphenyls and dioxins. **Environmental Health Perspectives**, v. 109, n. 2, p. 101-103, 2001.
- SCHLUMMER, M.; MOSER, G.A.; MCLACHLAN, M. Digestive tract absorption of PCDD/Fs, PCBs and HCB in humans: mass balance and mechanistic considerations. **Toxicology and Pharmacology**, v. 152, n. 1, p. 128-137, 1998.
- SEEGAL, R.F. & SHAIN, W. 1992. Neurotoxicity of polychlorinated biphenyls. The role of ortho-substituted congeners in altering neurochemical function. In: Isaacson, R.L. & Jensen, K.F., (Eds) **The vulnerable brain and environmental risks**. Volume 2: Toxins in food,. Publ: Plenum Press: 169-195.
- SHALAT, S.L.; TRUE, L.D.; FLEMING, L.E.; PACE, P.E. Kidney cancer in utility workers exposed to polychlorinated biphenyls (PCBs). **British Journal of Industrial Medicine**, v. 46, n. 11, p. 823-824, 1989.
- SOONG, D. & LING, Y.; Reassessment of PCDD/DFs and Co-PCBs toxicity in contaminated rice-bran oil responsible for the disease "Yu-Cheng", **Chemosphere**, v.34, n. 5-7, p. 1579-1586, 1997.
- TRAIN, R.E. 1979. **Quality criteria for water**. Castle House Publications 256 p.
- VALTERS, K., OLSSON, A., ASPLUND, L., BERGMAN, A. Polychlorinated biphenyls and some pesticides in perch (*Perca fluviatilis*) from Inland Waters of Latvia. **Chemosphere**, v. 38, p. 2053-2064, 1999.
- WHO/IPC (World Health Organization), **Polychlorinated Biphenyls and Terphenyls, second ed.** WHO, Geneva, 1993.
- WHO/EURO. **PCBs, PCDDs, and PCDFs: Prevention and control of accidental and environmental exposures.** **Environmental Health Serie 23.** Copenhagen, World Health Organization, Regional Office for Europe. 1987.

- YU, M.; HSIN, J.; HSU, C.; CHAN, W.; GUO, Y. L.; The immunologic evaluation of the yucheng children. **Chemosphere**, v.37, n.9-12, p.1855-1865, 1998.
- ZABIK, M. E.; HARTE, J.B.; DICKMANN, G. Effect of preparation and cooking on contaminant distributions in crustaceans:PCBs in blue crab. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 40, n. 7, p. 1197-1203, 1992.
- ZUCATO, E., CALVARESE, S., MARIANI, G., MANGIAPAN, S., GRASSO, P., GUZZI, A., FANELLI, R., Level, sources and toxicity of polychlorinated biphenyls in the Italian diet. **Chemosphere**, v. 38, p. 2753-2765, 1999.

7. ANEXOS

7.1 ANEXO1

7.2. ANEXO 2

Food and Chemical Toxicology Manuscript Format

Manuscripts should be written in clear and concise English; incomprehensible manuscripts will be returned to the authors for rewriting. If submitting hard copies, manuscripts should be printed on *one side of the paper* only and *double spaced* throughout, with at least 2.5-cm margins. All pages must be numbered, including the *title page*, which should carry the title of the paper, the surnames and initials of the authors, the names and addresses of the institutions where the work was done (with the affiliation of each author clearly indicated), named corresponding author, and keywords. Titles consisting of declarative or interrogative sentences are not acceptable. In order to raise the standard of papers, and inherently of the Journal, scientific quality needs to be at a high level. Authors are encouraged to use electronic submission, providing contact details of at least three relevant putative reviewers. The Editors will not be bound to choose from these proposed peers. A signed covering letter should be sent to the Editor at the time of submission.

Full details of electronic submission and other formats can be obtained from <http://www.elsevier.nl/locate/disksub> or from Author Services at Elsevier Science.

Manuscripts will not be returned to the author unless specifically requested.

Manuscripts of original papers should be organized in the following sections:

Abstract -a self-contained summary of the objectives, results and significance of the study, not exceeding 200 words. Uninformative sentences such as "the significance of the results is discussed" are not acceptable.

Introduction -a concise and clear statement on the background, purposes and significance of the work.

Materials and Methods -a detailed description of the experimental design and of any new or improved methods. Well established methods and techniques may be identified by reference only.

Results -presented concisely, with the aid of tables or figures where appropriate. Duplication between this section and the Discussion must be avoided.

Discussion -a succinct interpretation of the data. Extensive literature reviews and highly speculative comment are discouraged.

Acknowledgements -providing recognition of sources of funding and donations of materials, and including any thanks the authors may wish to accord for advisory, technical or other

assistance, since authorship should be limited to those who have made a major contribution to the study and to the preparation of the paper. Authors are advised to obtain approval for the wording of any acknowledgement from those whose help is noted.

References and Footnotes -For *Food and Chemical Toxicology* the Harvard style system is to be used: author's names (no initials) and dates (and specific pages, only in the case of quotations) are given in the main body of the text, e.g. (Philips, 1990, p. 40). References are listed alphabetically at the end of the paper, double spaced and conform to current journal style.

For Journals: Macintyre, S., MacIver, S., Sooman, A., 1993. Area, class and health: should we be focusing on places or people? *Journal of Social Policy* 22, 213-234.

For Books: Jones, K., Moon, G., 1987. *Health, Disease and Society*. RKP, London.

For chapters of edited books: Laws, G., Dear, M., 1988. Coping in the community: a review of factors influencing the lives of deinstitutionalized ex-psychiatric patients. In: Smith, C., Giggs, J. (Eds), *Location and Stigma*. Unwin Hyman, London, pp. 83-102.

Other publications: Where there is doubt include all bibliographical details.

Footnotes should be indicated in the text by superior Arabic numerals which run consecutively through the paper, they should be grouped together in a section at the end of the text in numerical order and double spaced.

References may be listed if they are 'in press', but the journal that has *accepted* the paper for publication must be identified. Submitted papers or papers in preparation should not be listed; such work should be mentioned in the text only, as 'unpublished data' or 'personal communication' (with surnames, initials and year). These sections should be followed by the tables in numerical order, each on a separate sheet, and finally by a typed list of the legends to the figures (see below).

Tables and Figures

These must be intelligible without reference to the text and should be planned to fit the page size of the Journal. Tables and figures should be numbered, in arabic numerals, in the sequence in which they are mentioned in the text. The same data may not be reproduced in both a table and a figure. Each table must have a title and on each column there should be a heading that clearly identifies the data therein. Illustrations and diagrams should be kept to a minimum; the figure number must appear only on the reverse side, together with the author's name and an arrow marking the top. Figures can be submitted on disk, labelled to include the

software program used, but the originals must also be supplied. Three copies of any half-tones (unmounted and on glossy paper) are required; for line drawings, an original (in black drawing ink on good-quality paper or computer generated figures of laser quality) or a glossy print is required for reproduction, together with two clear photocopies for the referees. No information that can be included in the legend should appear on the figure and the following standard symbols are preferred for line drawings: ▲(closed triangle), △(open triangle), ●(closed circle), ○(open circle), ⊙(circle with dot), ■(closed box), □(open box), ×(x), ◆(diamond). The legends for photomicrographs must state the staining method and magnification. Authors should bear in mind that the figures they submit may be subjected to photographic reduction. The cost for illustrations in colour will be the responsibility of the contributor(s) (an estimate may be obtained from the Editorial Office at TNO BIBRA International Ltd). If figures that have already been published under copyright are to be reproduced in the Journal (e.g. in reviews), copies of letters from the first publisher and the original author giving permission for such reproduction must always accompany the submitted manuscript. For more information about submitting graphics and artwork please visit the following website: <http://www.elsevier.nl/locate/authorartwork>

Footnotes

These should include the definitions of any abbreviations used in the text and any author's current address, if different from that given below the title. Other footnotes, as distinct from literature references, should be avoided in the text as far as possible. When they are essential, they should be identified by superscript numbers. All the footnotes except those for tables should be printed on a separate sheet, with an indication of the manuscript page to which the footnote refers.

Nomenclature

The metric system is the standard for all measurements. Test chemicals and enzymes must be clearly identified, wherever possible with the aid of CAS Registry and EC numbers.

Abbreviations

These should be used sparingly; they should be defined when first used in the paper but also listed in alphabetical order under *Abbreviations* as a footnote to the title page (see above).

Preparation of electronic manuscripts

For papers that have been accepted, authors are encouraged to submit electronic manuscripts. Typesetting from computer files has several advantages, not the least of which is the

avoidance of rekeying errors in the article. Files produced by most commercial word processing software packages (preferably Microsoft Word or Corel WordPerfect) can be used directly by the publisher. Please do not save your text as ASCII or similar: this will cause all special formatting codes to be lost. Authors should not use (or allow their word processor to introduce) any hyphenation or word splits and they should not use a "justified" layout. Authors should ensure that the digit "1" and the letter "l" [also the digit "0" (zero) and the capital letter "O"] have been used properly. The letter X and the "times" sign, the apostrophe and the prime, and the hyphen and dash (for minus, etc.) represent further sources of confusion.

Special characters (e.g. ä, h, ê, Ø, Greek letters and mathematical symbols) should be used consistently throughout the text. Characters not available on the word processor (Greek letters, mathematical symbols, etc.) should not be left open but indicated by a unique code (e.g., galpha, @, #, etc., for the Greek letter "α"). A list of such characters (codes) and a lexicon of what they actually represent should be added as a separate file.

All instructions given on style and arrangement of Regular papers should also be followed when preparing electronic manuscripts. This is especially important for the References section. Consistency in all operations is of vital importance in the preparation of articles. Facilities for "automatic" numbering of references and footnotes must not be used.

The manuscript file must contain the final corrected version of the article. The output from specific desktop publishing (DTP) equipment includes a considerable amount of coding which will interfere with normal file processing. Such DTP output should therefore be avoided.

Figures and tables are also handled electronically. Figures not included in the word processing file should be submitted separately in GIF or JPEG formats.

Submission on Disk after Acceptance for Publication

Elsevier Science now publishes all manuscripts using electronic production methods and strongly encourages submission on disk. Please send the electronic files of your article along with the hardcopy of the accepted version. To ensure fast and easy processing of your submission, please adhere to the following guidelines:

1. Save text and graphics on separate disks.
2. Label all disks with your name, a short version of the article title, the journal to be published in, and the filenames. Please also include details of the software and platform (PC, Mac, UNIX, etc) used to create your files.

3. Ensure that the files on the disk match the hardcopy exactly. In cases of a discrepancy, the hardcopy version will be used as the definitive version.

Electronic submission

Authors should submit an electronic copy of their paper with the final version of the manuscript. The electronic copy should match the hardcopy exactly. Always keep a backup copy of the electronic file for reference and safety. Full details of electronic submission and formats can be obtained from <http://authors.elsevier.com> .

Proofs

These will be sent by email as a PDF file to the first-named author for correction unless an alternative recipient is named on the submitted manuscript. Corrections should be restricted to printers' errors only. Corrections should be returned by fax or email within 48 hours.

Offprints

An offprint order form will be sent to the corresponding author when the manuscript is received by the publisher. This must be returned to the publisher. No payment should be included with the order as an invoice will be sent later.

Author Enquiries

Authors can keep a track of the progress of their accepted article on the Internet on our Author Gateway (go to <http://authors.elsevier.com/>) .

For specific enquiries on the preparation of electronic artwork, consult <http://www.elsevier.com/locate/authorartwork/> .

Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, are provided when an article is accepted for publication.