

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

Cláudia Hoffmann Kowalski

**Bifenilas Policloradas no Leite Materno Brasileiro:
Desenvolvimento de Metodologia Analítica e
Avaliação da Contaminação**

Prof. Dra. Helena Teixeira Godoy
Orientadora

Prof. Dr. Fabio Augusto
Co-orientador

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da
Faculdade de Engenharia de Alimentos para a obtenção do título de Doutor em Ciência
de Alimentos.

2008

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

K849b Kowalski, Cláudia Hoffmann
Bifenilas policloradas no leite materno brasileiro: desenvolvimento de metodologia analítica e avaliação da contaminação / Cláudia Hoffman Kowalski. -- Campinas, SP: [s.n.], 2008.

Orientador: Helena Teixeira Godoy
Co-orientador: Fabio Augusto
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos

1. Bifenilas policloradas. 2. Leite materno - Contaminação. 3. Microextração em fase sólida. 4. Cromatografia gasosa. 5. Quimiometria. I. Godoy, Helena Teixeira. II. Augusto, Fabio. III. Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos. IV. Título.

(cars/fea)

Titulo em inglês: Polychlorinated biphenyls in the brazilian breast milk: development of analytical methodology and evaluation of the contamination

Palavras-chave em inglês (Keywords): Polychlorinated biphenyls, Breast milk - Contamination, Solid-phase microextraction, Gás chromatography, Chemiometry

Titulação: Doutor em Ciência de Alimentos

Banca examinadora: Helena Teixeira Godoy

Ronei Jesus Poppi

Sônia Cláudia do Nascimento de Queiroz

Regina Zanes Furlani

Igor Renato Bertoni Olivares

Data de defesa: 04/12/2008

Programa de Pós Graduação: Programa em Ciência de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Helena Teixeira Godoy
FEA-UNICAMP
Presidente

Dr. Ronei Jesus Poppi
IQ-UNICAMP
Membro

Dra. Sônia Cláudia do Nascimento de Queiroz
EMBRAPA
Membro

Dra. Regina Zanes Furlani
ITAL
Membro

Igor Renato Bertoni Olivares
IQSC-USP
Membro

*"Deus,
conceda-me a serenidade para aceitar aquilo que não posso mudar,
a coragem para mudar o que me for possível
e a sabedoria para discernir entre as duas.
Vivendo um dia de cada vez,
apreciando um momento de cada vez,
recebendo as dificuldades como um caminho para a paz,
aceitando este mundo cheio de pecados como ele é,
assim como fez Jesus,
e não como gostaria que ele fosse;
confiando que o Senhor fará tudo dar certo
se eu me entregar à Sua vontade;
pois assim poderei ser razoavelmente feliz nesta vida
e supremamente feliz ao Seu lado na eternidade.
Amém.!"*

Teólogo protestante Dr. Reinhold Niebuhr (1892-1971).

Dedicatória

Dedico e agradeço especialmente...

À minha família atual: minha mãe **Lourdes**, meu pai **Vital** e meu irmão **André**, que estiveram sempre presentes, mesmo distantes geograficamente, amo muito vocês.

À minha futura família: meu noivo e quase marido **Hamilton**, que me deu o suporte, o ânimo e o amor necessários para a finalização deste trabalho, te amo profundamente.

Agradecimentos

Em primeiro lugar agradeço a **Deus**, por me amar de tal maneira que entregou seu único filho para me dar vida nova em Cristo.

À **Faculdade de Engenharia de Alimentos**, especialmente ao **Departamento de Ciência de Alimentos**, pela oportunidade de desenvolver esse trabalho numa das mais conceituadas universidades do país.

À **CAPES**, pela concessão da bolsa de estudo, suporte financeiro que possibilitou minha total dedicação à pesquisa para realização e divulgação deste trabalho.

Aos membros da **Banca Examinadora** que prontamente aceitaram participar deste projeto, ainda que na sua finalização. Agradeço pela revisão final, sugestões e pela oportunidade de aprender um pouco mais.

À **Profª. Helena**, pela orientação deste trabalho, mas principalmente pela amizade que fica, pelas longas conversas e desabafos.

Ao **Prof. Fábio Augusto**, pela imprescindível co-orientação, pela paciência e pelo grande exemplo como pesquisador.

Aos amigos do Laboratório de Análise de Alimentos: **Eliza, Carol, Dri, Eleda, Scherer, Roger, Romina, Raquel, Stanis, Merê, Cris, Gislaïne, Sen Dirceu**, obrigada pela paciência e pela amizade.

Aos amigos do Laboratório de Cromatografia Gasosa: **Raquel, Márcio, Sandra, Patrícia Donaire, Ana Lúcia**, obrigada por me aceitarem no laboratório, mesmo não sendo química.

À **Gilmare**, pelos trabalhos realizados em conjunto e pela grande amizade que perdurou a partir deles.

Aos amigos da república **Caverna do Adulão**, pelo tempo de convívio.

À minha grande amiga **Danielle**, que muito além de dividir a casa comigo, dividiu sonhos, angústias, orações e alegrias, obrigada pelo exemplo a ser seguido.

Às amigas **Maíra, Ana Raquel, Daphne, Clarinha**, pela amizade incondicional e por tornar mais fácil minha vida aqui em Campinas.

Aos amigos da faculdade, **Roberta, ED, Giovanna, Camila, Fabi Z., Fabi N.**, obrigada pela amizade e carinho demonstrados durante esses anos.

À **Comunidade Presbiteriana Chácara Primavera**, por ter me acolhido e me mostrado o verdadeiro sentido da vida: que Deus continue nos abençoando.

À **todos** que ajudaram de uma forma ou de outra na realização deste trabalho, muito obrigada.

Cláudia Hoffmann Kowalski

RESUMO GERAL

Um estudo sobre a contaminação do leite materno com bifenilas policloradas (PCB) foi desenvolvido objetivando um conhecimento mais amplo dessa problemática no nosso país. Para isso, amostras de leite foram coletadas em nove estados brasileiros e questionários contendo perguntas sobre hábitos alimentares, condições sócio-econômicas, locais de habitação entre outras foram aplicados às mães doadoras. A determinação dos PCB foi feita por Microextração em Fase Sólida no modo *headspace* (HS-SPME) combinada com Cromatografia Gasosa e Detector de Captura de Elétrons (GC-ECD). As etapas da SPME foram otimizadas univariadamente e através de planejamento experimental Doehlert. A análise de variância mostrou que a temperatura de extração e a força iônica do meio (estudada através da adição de NaCl) foram as variáveis que mais influenciaram nas quantidades de PCB extraídas. Em seguida, refinaram-se as condições experimentais através de uma abordagem neuro-genética (rede neural Bayesiana aliada a algoritmos genéticos) que identificou como o ponto experimental ótimo a seguinte condição: concentração de NaCl de 0,36 g mL⁻¹, temperatura de extração de 95,0 °C, tempo de extração de 60 minutos e adição de 210 µL de metanol. Após a otimização, o método foi validado através do estudo das figuras de mérito e apresentou-se linear na faixa estudada (1 a 16 µg L⁻¹) com $r > 0,9884$, além de boa precisão (RSD < 12 %, n = 5), recuperação aceitável (71 a 127 %) e limites de quantificação entre 0,45 µg L⁻¹ e 2,42 µg L⁻¹. A fim de estabelecer correlações entre os resultados das amostras (expressos na forma de áreas cromatográficas) e os resultados obtidos nos questionários, fez-se uso da rede neural de Kohonen. Assim, foi possível verificar que nas cidades metropolitanas o acúmulo de PCB no leite é mais expressivo que em outras regiões. Por exemplo, em São Paulo 58 % das amostras estavam contaminadas com algum PCB, principalmente os congêneres 180 e 153. Outro resultado gerado pela rede foi que, em geral, as amostras de leite maduro (maior porcentagem de gordura) estavam mais contaminadas com PCB. O número de gestações também

foi um fator importante a ser considerado, pois o estudo mostrou que o primeiro filho normalmente recebe uma dose maior de PCB do que os demais. Ainda, maior contaminação foi encontrada no leite de mães que moram nas proximidades de indústrias e/ou rios poluídos, corroborando com o fato de que esses compostos chegam facilmente ao meio ambiente e em seguida aos seres humanos.

Palavras-chave: Bifenilas policloradas, leite materno, microextração em fase sólida, cromatografia gasosa, quimiometria.

ABSTRACT

A study about the contamination of the breast milk with polychlorinated biphenyls (PCB) was developed aiming a wider knowledge of this problematic in our country. For that, breast milk samples were collected in nine Brazilian states and questionnaires with questions regarding to food habits, social and economic conditions, places of dwelling between others were applied to the donors. The determination of the PCB was done by *headspace* Solid-Phase Microextraction (HS-SPME) combined with Gas Chromatography and Electron Capture Detector (GC-ECD). The SPME steps were optimized through univariate procedures and Doehlert experimental design. The analysis of variance showed that the temperature of extraction and the ionic strength of the media (studied by the addition of NaCl) were the most significant variables in the quantities of extracted PCB. After that, the experimental conditions were refined considering a neuro-genetic approach (Bayesian neural network and genetic algorithms) and it was identified as the optimum experimental point the following condition: concentration of NaCl of 0.36 g mL^{-1} , temperature of extraction of $95.0 \text{ }^{\circ}\text{C}$, time of extraction of 60 minutes and addition of $210 \text{ }\mu\text{L}$ of methanol. After the optimization, the method was validated through the study of the figures of merit. It showed linear in the studied range (1 to $16 \text{ }\mu\text{g L}^{-1}$) with $r > 0.9884$, besides good precision ($\text{RSD} < 12 \%$, $n = 5$), acceptable recuperation (71 to 127%) and limits of quantization between $0.45 \text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ and $2.42 \text{ }\mu\text{g L}^{-1}$. In order to establish correlations between the results of the samples (expressed as chromatographic areas) and the results obtained in the questionnaires, Kohonen neural network had been used. Thus, it was possible to check that in the metropolitan cities the accumulation of PCB in the milk is more expressive than in other regions. For example, in Sao Paulo state, 58% of the samples were contaminated by some PCB, mainly the congener 180 and 153. Another result produced by the net was that the samples of hindmilk (higher fat percentage) were the most contaminated. The number of gestations also was an important factor to be considered, since the study showed that the first son

normally receives a higher dosage of PCB compared to the others. Also higher levels of contamination was found in the milk of mothers who lived in the proximities of industries and/or polluted rivers, corroborating with the fact that these compounds are easily spread in the environment and consequently in the human beings.

Key Words: Polychlorinated biphenyls, breast milk, solid-phase microextraction, gas chromatography, chemometry.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	1
CONSIDERAÇÕES GERAIS	2
OBJETIVOS	19
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	20
CAPÍTULO 1 - Otimização das condições de extração de bifenilas policloradas de leite materno: otimização univariada versus planejamento experimental.....	25
ABSTRACT	26
1. INTRODUÇÃO.....	27
2. MATERIAIS E MÉTODOS	30
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
4. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	51
5. REFERÊNCIAS	52
CAPÍTULO 2 - Neuro-genetic multioptimization of the determination of polychlorinated biphenyl congeners in human milk by headspace solid-phase microextraction-gas chromatographic-electron capture detection	55
ABSTRACT	56
1. INTRODUCTION	57
2. EXPERIMENTAL.....	61
3. RESULTS AND DISCUSSION	66
4. CONCLUSIONS.....	77
5. REFERENCES	78
CAPÍTULO 3 - Development of a quantitative method to determine polychlorinated biphenyls in brazilian breast milk samples using solid-phase microextraction-gas chromatography-electron capture detection	81
ABSTRACT	82
1. INTRODUCTION.....	84
2. EXPERIMENTAL.....	86

3. RESULTS AND DISCUSSION	89
4. CONCLUSIONS.....	99
5. REFERENCES	100
CAPÍTULO 4 - Utilização de mapas de Kohonen para a análise exploratória do perfil de contaminação do leite materno brasileiro com bifenilas policloradas	1055
ABSTRACT	1066
1. INTRODUÇÃO	1077
2. MATERIAIS E MÉTODOS	11010
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	1166
4. CONCLUSÕES.....	1355
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	1355
ANEXO 1	1422
ANEXO 2	1433
ANEXO 3	1455
Conclusões gerais.....	1477

INTRODUÇÃO

Considerações Gerais

Considerações gerais

1. Bifenilas policloradas (PCB)

As bifenilas policloradas (PCB) são compostos organoclorados sintéticos formados por dois anéis benzênicos ligados por uma ligação carbono-carbono simples. A cloração ocorre na presença de catalisadores, e nesse processo, os átomos de hidrogênio são substituídos por átomos de cloro, sendo que o número e a posição dos átomos de cloro na molécula determinam suas propriedades físicas, químicas e toxicológicas (WHO, 2003; Erickson, 1992; Breivik, 2002a).

A fórmula molecular dos PCB é $C_{12}H_{10-n}Cl_n$, onde n é o número (1 a 10) de átomos de cloro (Figura 1). Na teoria, 209 congêneres são possíveis, mas somente 130 desses têm sido identificados em produtos comerciais (WHO, 2000).

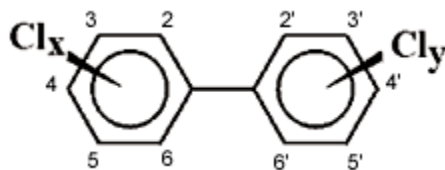


Figura 1. Estrutura molecular das bifenilas policloradas.

O sucesso tecnológico e a diversidade de usos dos PCB foram conferidos pelas suas notáveis propriedades químicas e físicas, isto é, são quimicamente pouco reativos, não inflamáveis, termicamente estáveis e têm alta resistência elétrica (Da Costa, 2004). Foram amplamente empregados como fluido dielétrico em transformadores e capacitores, fluidos hidráulicos, retardadores de fogo e isolantes térmicos; também foram usados na composição de graxas e óleos lubrificantes, tintas, papéis copiativos sem carbono, tintas de impressão e pesticidas (Breivik, 2002b; Pelizzari, 1997; WHO, 1993; Cairns, 1986).

Comercialmente, estes compostos receberam diversas denominações: Aroclor, Pyranol, Pyroclor (Estados Unidos); Phenochlor, Pyralene (França);

Clophen, Elaol (Alemanha); Kanechlor, Santotherm (Japão); Fenchlor, Apirolio (Itália) e Sovol (Rússia) (Da Costa, 2004; WHO, 1993), sendo a % de cloro na mistura a principal diferença entre eles. De 1930 até 1993, ano em que parou a sua fabricação em escala mundial, foram produzidas mais de 1,3 milhões de toneladas de PCB (Figura 2). Este número, de fato, pode ser bem maior, uma vez que fábricas na Polônia, Alemanha Oriental e Áustria produziram PCB em quantidades não conhecidas (Breivik, 2002a).

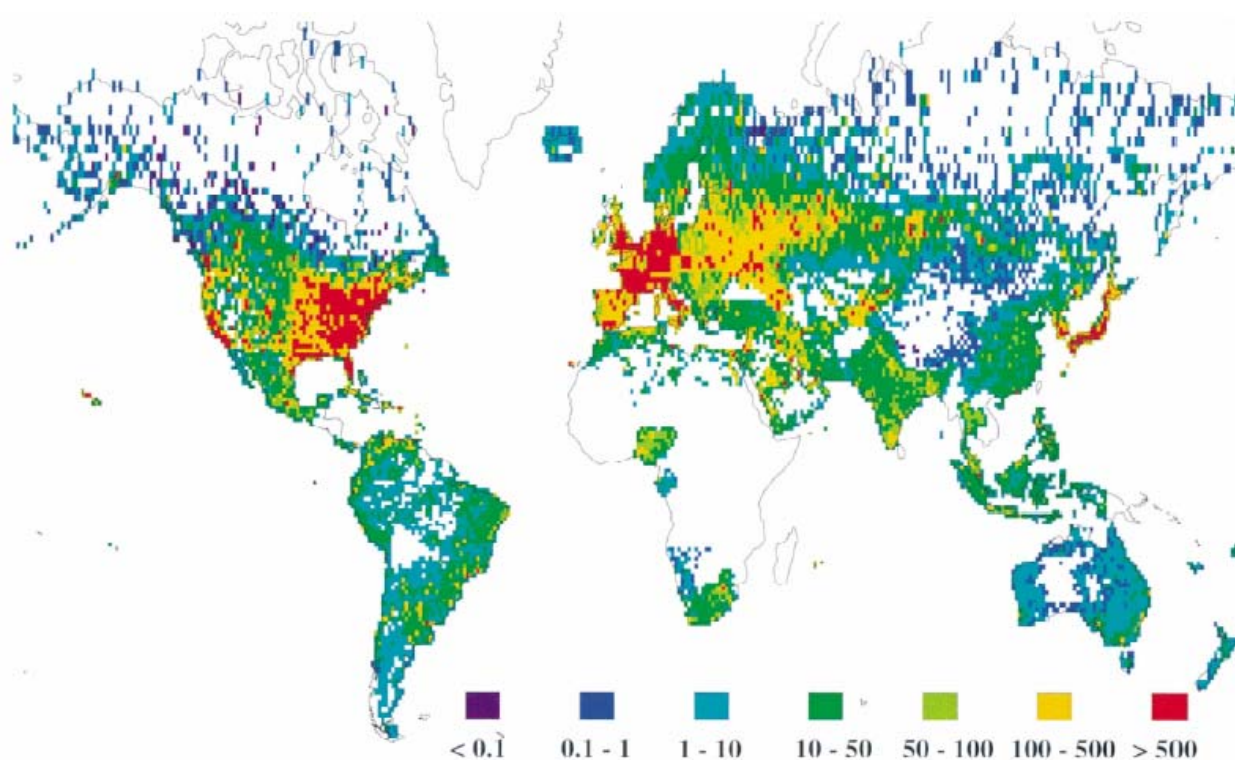


Figura 2. Estimativa do uso acumulado de PCB ao redor do mundo (em toneladas) (figura extraída de Breivik, 2002a).

O produto Aroclor da Monsanto foi o mais difundido no mundo inteiro (Breivik, 2002a). Uma consequência direta deste fato é que, em ambientes contaminados, quase sempre é possível associar a composição de congêneres de PCBs com algum produto desta empresa. A comercialização de PCB em nosso país foi proibida pela portaria interministerial 19, de 29 de janeiro de 1981

(Nogueira, 1987), sendo que a mesma permite o seu uso em equipamentos que já estão em funcionamento, até que sejam desativados ou substituídos (Bandeirante Energia, 2003). No estado de São Paulo, a Lei Estadual nº 12.288 (2006) prevê a eliminação de todos os equipamentos contendo PCB até o ano de 2020.

Estes poluentes foram incluídos entre os 10 poluentes com maior potencial de biotoxicidade no mundo (Pellizari, 1997) e compõem a lista de 12 poluentes prioritários do Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente (UNEP, 2003), o qual visa à redução e/ou eliminação de poluentes orgânicos persistentes de elevada toxicidade. Eles encontram-se disseminados globalmente como poluentes do ar, da água, do solo e dos alimentos. Por serem hidrofóbicos, lipofílicos, semivoláteis, quimicamente inertes e pouco biodegradáveis, têm grande propensão à persistência generalizada na natureza. Sofrem adsorção em sedimentos e na matéria orgânica do solo e da água (Shaw & Connell, 1986) e acumulam-se na cadeia alimentar em moluscos; crustáceos; peixes; aves; répteis; mamíferos marinhos em animais selvagens e nos seres humanos (WHO, 1993). A bioacumulação é geralmente maior no homem e outros animais que ocupam o topo da cadeia alimentar (Bucholsky, 1996).

A contaminação de recém nascidos pelo leite materno (Angulo, 1999) é de especial importância, assim como a transferência destes compostos para o feto através da placenta (Covaci, 2002). Devido a sua natureza lipofílica, estes poluentes se concentram na gordura do leite materno e passam para o recém-nascido justamente no período onde alguns órgãos ainda estão em desenvolvimento, como é o caso do fígado e do sistema nervoso (WHO, 1993). Normalmente, essas crianças são expostas ao PCB antes do seu nascimento e continuam sendo expostas através do leite recebido de suas mães (Campoy, 2001). Alguns dos efeitos já relatados em recém-nascidos são: calcificação anormal do crânio, pigmentação escura da pele e de membranas mucosas, hiperplasia gengival, baixo peso ao nascimento, crescimento reduzido e baixo QI (WHO, 1993). Além disso, essas crianças terão níveis maiores de PCB nos seus organismos (WHO, 2000), estando mais propensas a problemas hepáticos,

imunossupressão, neuropatias, aumento de risco de melanoma maligno (Pellizari, 1997), distúrbios respiratórios e do sistema nervoso central (WHO, 1993), alterações imunológicas (Lu, 1985) e endócrinas (Brower, 1999).

Muitos dos efeitos relatados acima estiveram presentes nas vítimas dos acidentes ocorridos em 1968 na localidade de Yusho – Japão (Yao, 2002; Aoki, 2001), e em 1979, em Yu-Cheng -Taiwan (Kashimoto, 1986, Yu, 1997) onde foram contaminadas aproximadamente 3.900 pessoas, após o consumo de óleo de arroz contendo PCB. Por volta de 1990, 149 das 1860 vítimas japonesas já haviam morrido (Aoki, 2001). Os níveis plasmáticos de PCB nas crianças expostas foram bem maiores ($\sim 6,7 \mu\text{g L}^{-1}$) do que no grupo controle ($\sim 3,7 \mu\text{g L}^{-1}$). Em 1987, na grande São Paulo, foram encontrados índices de PCB da ordem de 2 mg Kg^{-1} em 12,5 % das 189 amostras de tecido adiposo de homens e mulheres analisadas, o dobro do índice médio encontrado pela OMS em cidades industrializadas (Nogueira, 1987). A falta de um sistema eficiente de fiscalização contribui para a destinação inadequada desta fonte de poluição (Nogueira, 1987) e, por este motivo, dentre outros, níveis elevados de PCB são provavelmente encontrados entre habitantes de outras grandes cidades brasileiras. Atualmente, os limites máximos permitidos para a soma dos PCB em leite materno em vários países variam de $20 \mu\text{g Kg}^{-1}$ a $60 \mu\text{g Kg}^{-1}$ (Ahmed, 1999). No Brasil, não há uma legislação específica para os níveis de compostos organoclorados na maioria dos alimentos (Souza-Pereira, 2005).

2. Leite humano

O leite materno é o alimento mais completo para recém-nascidos pois sua composição nutricional é essencial para o bom desenvolvimento físico e mental do recém-nascido. A Organização Mundial da Saúde recomenda que todas as crianças sejam alimentadas exclusivamente com o leite materno até os 4 ou 6 meses de idade (WHO, 2001).

Devido a essa exclusividade na alimentação e ao fato de que nesta fase vários órgãos ainda estão em desenvolvimento, os recém-nascidos parecem ser o

setor da população mais vulnerável aos PCB. O leite humano é, portanto, uma excelente via para estudar e monitorar os níveis de poluentes orgânicos persistentes aos quais os recém-nascidos estão expostos. Além disso, o leite materno é a única matriz biológica capaz de monitorar a contaminação ambiental em ambos, mães e recém-nascidos, através de um método não-invasivo de coleta de material.

Os principais fatores que influenciam os níveis de PCB no leite humano são o teor de lipídios, tempo decorrido a partir do início da lactação, idade e peso da mãe, paridade, número de filhos, origem e local de residência, hábitos alimentares, sazonalidade, tabagismo, quantidade de leite e exposição ocupacional (Harris, 2001; WHO, 1993).

No Brasil, foram encontrados apenas 2 trabalhos científicos relatando a ocorrência de PCB em leite humano (Paumgarten, 2000; Barreta, 1994). Paumgarten e colaboradores (2000) analisaram uma mistura de leite de 40 mulheres residentes no Rio de Janeiro. Os tipos de PCB e suas respectivas concentrações foram: PCB 28 ($7 \mu\text{g kg}^{-1}$), 52 ($< 10 \mu\text{g kg}^{-1}$), 101 ($7 \mu\text{g kg}^{-1}$), 138 ($35 \mu\text{g kg}^{-1}$), 153 ($37 \mu\text{g kg}^{-1}$), 180 ($18 \mu\text{g kg}^{-1}$), 118 ($14 \mu\text{g kg}^{-1}$), 156 ($6 \mu\text{g kg}^{-1}$) e 187 ($3 \mu\text{g kg}^{-1}$). Todavia, este trabalho não informa se a mistura continha também colostro e/ou leite de transição ou se era apenas de leite maduro, o que afetaria as concentrações de PCB. Na outra pesquisa, Barreta (1994), determinaram organoclorados em leite humano na cidade de Porto Alegre mas não encontraram PCB, provavelmente por tentarem determinar simultaneamente outros organoclorados, e esse fato, portanto, ser uma limitação do método empregado.

3. Bancos de Leite Humano (BLH)

O Brasil tem a maior e mais bem estruturada rede de bancos de leite humano do mundo. Seu trabalho tem sido reconhecido por instituições internacionais como a Human Milk Bank Association of North América e pela OMS, que, em 2001, lhe atribuiu o Prêmio de Saúde Sasakawa – OMS (Giugliani, 2002). A Rede Nacional de Bancos de Leite Humano (RNBLH) conta com mais de

150 bancos de leite humano, os quais são entidades especializadas, sem fins lucrativos, ligados, obrigatoriamente, a maternidades ou hospitais, para atender a demanda de recém-nascidos (Góes, 2002). Maiores informações sobre a RNBLH estão disponíveis no site www.fiocruz.br/redeblh/.

Por ter uma uniformidade e sistematização nos seus procedimentos operacionais, e estar distribuída nos principais centros urbanos do país, a RNBLH torna-se uma excelente via para levantamento do grau de contaminação da população e monitoramento da exposição de recém-nascidos aos PCB e outros poluentes orgânicos persistentes lipossolúveis, através da análise do leite materno.

4. Cromatografia gasosa e detecção por captura de elétrons

A maioria das operações químicas, incluindo as análises químicas, envolve a separação de misturas em seus componentes individuais (IUPAC, 1974). A cromatografia gasosa é uma técnica analítica que permite separações, identificações e medidas quantitativas de componentes de uma mistura praticamente impossíveis de serem efetuadas pelos meios convencionais. Ela se torna uma técnica bastante interessante quando o objetivo é analisar compostos com certa volatilidade (voláteis ou semi-voláteis) e que sejam termicamente estáveis.

O sistema de detecção mais conveniente, devido à natureza química e às baixas concentrações dos PCB nas diferentes matrizes, é o detector de captura de elétrons (GC-ECD), que apresenta especificidade para compostos halogenados (Zhang, 2002; WHO, 1993). O espectrômetro de massa também tem sido muito utilizado principalmente porque pode ser empregado para monitoramento seletivo das razões m/z de interesse (Röhrig, 2001; Vetter, 1998; Font, 1996).

A maioria das análises de PCB por cromatografia gasosa emprega colunas capilares (exemplo, DB-5, HP-1, HP-5, SE-54) que utilizam fases estacionárias apolares, tais como, fenil metil silicone e fenil metil siloxano (Font, 1996). Dada a

complexidade das misturas de PCB, a separação deles em colunas capilares é feita de forma mais eficiente sob programação de temperatura (Llompart, 2001).

A análise cromatográfica isoladamente é rápida, podendo ser efetuada em minutos. No entanto, na maioria das vezes há a necessidade de realizar um preparo das amostras, para que não haja interferências durante a análise, ou ainda contaminação da coluna cromatográfica (Collins, 2006; Cecchi, 2003).

5. Microextração em fase sólida (SPME)

Previamente às análises por cromatografia, procedimentos de preparo das amostras são necessários para isolar os PCB da matriz. Técnicas convencionais de extração como extração líquido-líquido ou extração por Soxhlet são laboriosas, consomem tempo e solvente, além de serem difíceis de automatizar (Theodoridis, 2000). A microextração em fase sólida (SPME) foi introduzida por Arthur & Pawlislyn (1990) como uma técnica simples, rápida, confiável e livre de solvente de extração. Este método é baseado na partição dos analitos entre a matriz e uma fibra recoberta com um polímero (extração direta), ou entre a fase gasosa sobre a amostra, a amostra e a fibra (extração por *headspace*) (Augusto, 2002) (Figura 3).

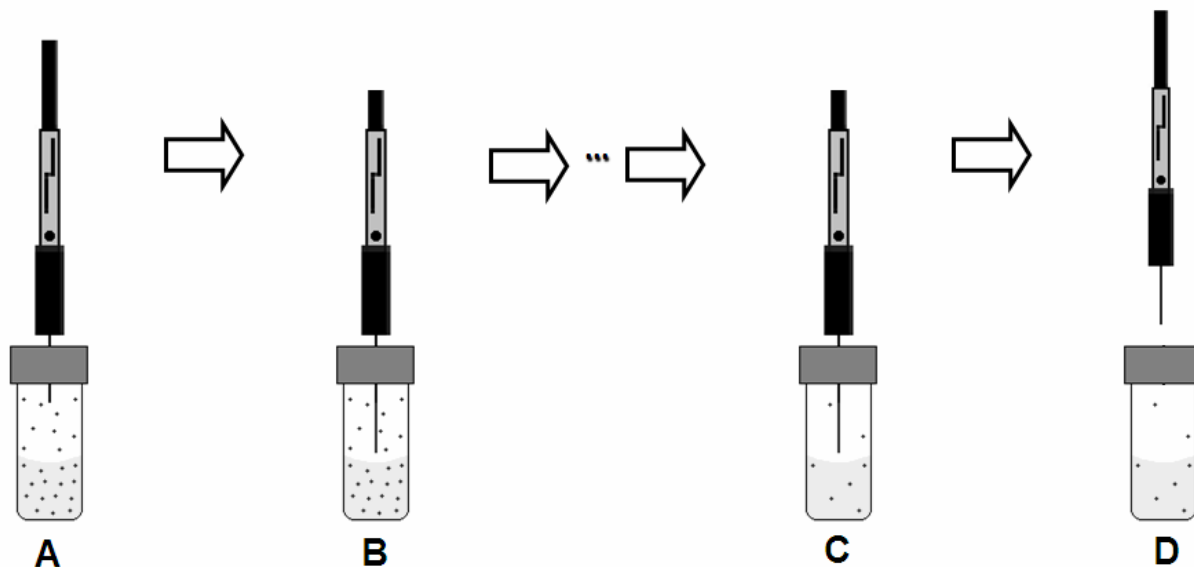


Figura 3. Sistema para microextração em fase sólida por *headspace*. Em A e B temos a exposição da fibra de SPME ao *headspace* da amostra; após decorrido o tempo de extração (C), a fibra é removida do frasco da amostra (D).

Os principais critérios observados para escolher entre os 2 tipos de extração são a volatilidade do analito e a matriz em questão. Analitos voláteis ou semi-voláteis são preferencialmente extraídos por *headspace*, sendo esse também o modo preferido de extração para amostras “sujas” e sólidas. A afinidade dos analitos pelas diferentes fases é que determinará a eficiência da extração (Valente, 2000). Os analitos adsorvidos à fibra podem ser determinados por cromatografia gasosa via dessorção térmica, no compartimento do injetor (Theodorides, 2000; Poon, 1999; Yang, 1998; LLompart, 1998) (Figura 4). Descrições de otimizações de condições experimentais para SPME para análise de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) (Cortazar, 2002; Jaouen-Madoulet, 2000), esteres de ftalatos (Cortazar, 2002) e PCB (Yang, 2006; Hong, 2005; Cortazar, 2002; Jaouen-Madoulet, 2000) são encontrados na literatura.

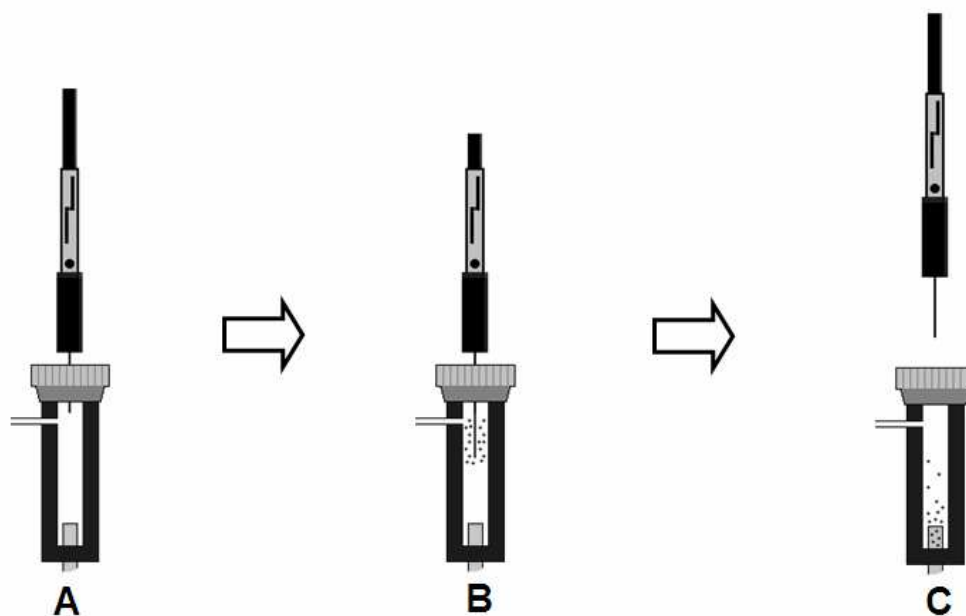


Figura 4. Dessorção no injetor de um cromatógrafo gasoso. Em A, a agulha é introduzida no GC, em B a fibra é exposta ao injetor e consequentemente, os analitos dessorvidos termicamente; em C a fibra é recolhida.

Embora metodologias baseadas em SPME tenham sido desenvolvidas para diversos tipos de matrizes, o número de publicações voltadas para leite é muito reduzido. Llompарт (2001) empregaram SPME para determinar 9 PCB adicionados ($1\text{-}100\text{ ng mL}^{-1}$) a leite de vaca disponível comercialmente e contendo níveis variáveis de gordura. As amostras foram saponificadas e os PCB extraídos a $100\text{ }^{\circ}\text{C}$, sob agitação, com fibras de PDMS ($100\text{ }\mu\text{m}$) ou PDMS/DVB ($65\text{ }\mu\text{m}$), posicionadas no *headspace* por 5 a 240 minutos, dependendo do experimento. A dessorção ocorreu termicamente ($260\text{ }^{\circ}\text{C}$), por 5 minutos, no injetor de um cromatógrafo a gás (CG) equipado com coluna capilar e detector de captura de elétrons (ECD) ou detector seletivo a massa, operando na configuração massa-massa (MS-MS).

Em 2001, Röhrig e Meisch desenvolveram uma metodologia de SPME para análise simultânea de fenóis e vários halogenados (hexaclorobenzeno, hexaclorociclohexano, DDT e alguns PCB). O experimento foi conduzido com 4 mL de leite humano, sob agitação, e temperatura de $100\text{ }^{\circ}\text{C}$. A extração foi realizada no *headspace*, por 40 minutos, com uma fibra de poliacrilato ($85\text{ }\mu\text{m}$). A dessorção foi feita no compartimento do injetor (aquecido a $280\text{ }^{\circ}\text{C}$), de um de um CG equipado com coluna capilar e ECD. Segundo os autores, o método é rápido, de baixo custo e apresentou boa reprodutibilidade.

6. Planejamento experimental

Na maioria dos trabalhos publicados, o processo de otimização das condições experimentais é univariado, ou seja, cada variável é avaliada isoladamente. Especialmente nos últimos anos, devido as suas características, o planejamento experimental multivariado tem sido largamente difundido na química analítica e outras ciências (Ferreira, 2004).

Um planejamento bastante conveniente para o processo de otimização multivariada é o planejamento Doehlert, proposto em 1970 (Doehlert, 1970). Os pontos da matriz Doehlert correspondem aos vértices de um hexágono, sendo o número total de pontos experimentais do planejamento igual a k^2+k+pc , em que k é o número de fatores e pc é o número de experimentos no ponto central. Como cada hexágono utiliza pontos experimentais já explorados pelo hexágono anterior (Figura 5), um número reduzido de experimentos é necessário para construir a superfície de resposta e identificar a região experimental ótima.

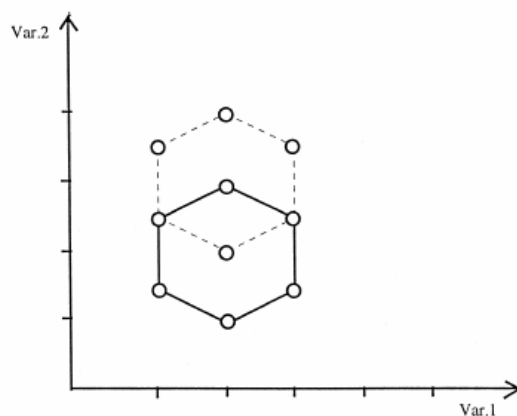


Figura 5. Planejamento experimental com duas variáveis. A parte pontilhada ilustra a exploração da vizinhança através da adição de três experimentos.

Outra característica é que o número de níveis avaliados não é o mesmo para todas as variáveis. Esta propriedade permite uma seleção das variáveis a serem estudadas em um maior ou menor número de níveis. A escolha pode ser feita de forma que a variável com maior importância no sistema seja analisada em maior número de níveis ou de forma a se obter maiores informações sobre o comportamento de uma ou outra variável naquele sistema (Ferreira, 2004). Cada planejamento Doehlert é definido considerando o número de variáveis e os valores codificados (x_i) da matriz experimental. A relação entre os valores codificados e os valores reais é dada pela Equação 1.

$$X_i = \left(\frac{z_i - z_i^0}{\Delta z_i} \right) \alpha \quad (\text{Equação 1})$$

Em que o x_i corresponde ao valor codificado para o nível do fator i ; z_i é o correspondente valor experimental; z_i^0 é o valor experimental no ponto central; Δz_i é a distância entre o valor experimental no ponto central e o valor experimental no nível superior ou inferior; e α é o maior valor limite codificado na matriz para cada fator (variável ou coluna). Para cada variável experimental ocorrerá um determinado α , de acordo com o número de variáveis e dos níveis para cada variável do planejamento (Da Silva, 2007).

7. Multiotimização

Quando existe a necessidade de otimizar a extração de vários compostos simultaneamente, o planejamento experimental pode não satisfazer esse quesito, já que o mesmo fornece uma melhor condição experimental para cada composto individualmente. Nestes casos, faz-se necessário encontrar uma única propriedade que descreva o comportamento de todos os compostos simultaneamente. Recentemente, redes neurais têm sido usadas para a modelagem das superfícies de resposta (Garcia, 1999; Agatonovic-Kustrin, 1998) pois apresentam muitos benefícios quando comparadas às técnicas convencionais de otimização, como a possibilidade de modelar simultaneamente várias respostas: o processo de multiotimização (Pereira-Filho, 2001).

Redes neurais artificiais (em inglês Artificial Neural Networks, ANN) originaram-se do campo da inteligência artificial. A motivação inicial para o desenvolvimento das redes foi tentar imitar algumas características únicas do cérebro humano, tais como a habilidade de aprendizagem de mecanismos gerais pela apresentação de um número reduzido de exemplos, ou de restaurar informações corretas de dados ausentes ou distorcidos (Despagne, 1998). De

forma geral, podemos definir as redes neurais artificiais como um conjunto de métodos matemáticos e algoritmos computacionais que tem a intenção de imitar o comportamento de uma rede neural biológica no que se refere à maneira de organização e processamento da informação (Zupan, 1999). Assim, várias analogias podem ser feitas entre redes neurais biológicas e artificiais (Figura 6).

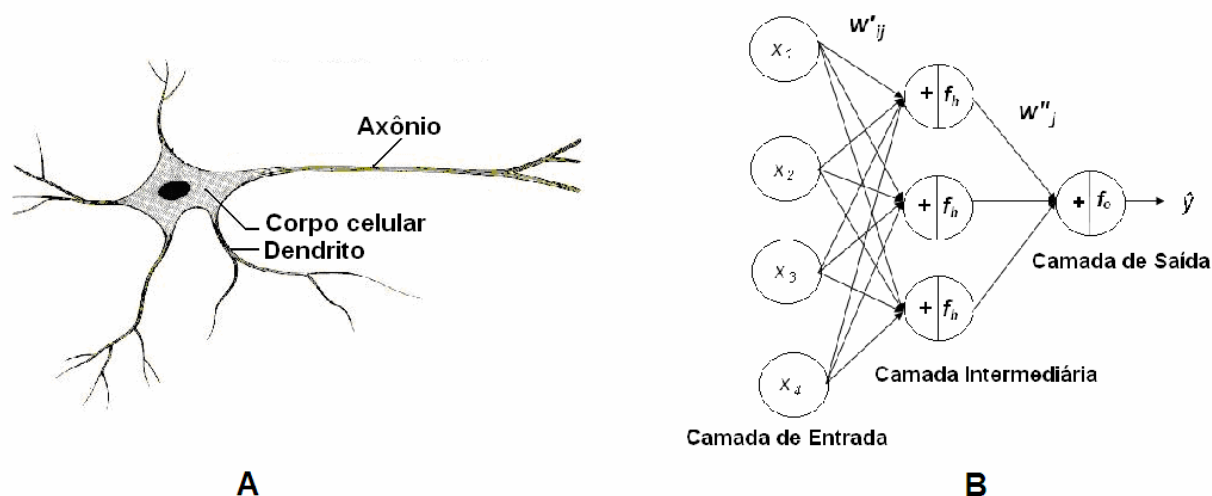


Figura 6. Representação típica de um neurônio biológico (A) e de uma rede neural artificial (B).

As redes neurais permitem estimar as relações entre uma ou mais variáveis de entrada e uma ou muitas variáveis de saída. As variáveis de entrada estão relacionadas às medidas instrumentais e as variáveis de saída às propriedades de interesse monitoradas, sejam concentração ou alguma propriedade físico-química. Esse tipo de abordagem é muito desejável neste estudo, onde tem-se um número considerável de PCB (respostas) e uma relação entre eles e as condições experimentais da SPME.

No entanto, a rede neural pode somente modelar o sistema e outro algoritmo é necessário para encontrar as condições experimentais ótimas. O algoritmo genético (do inglês Genetic Algorithm, GA) (Lucarius, 1993) é uma interessante maneira de encontrar essas condições ideais, baseado em um

modelo desenvolvido pela rede neural, gerando uma abordagem híbrida chamada neuro-genética (Pereira-Filho, 2001).

Os algoritmos genéticos são algoritmos de otimização estabelecidos sob os princípios da evolução natural formulada por Charles Darwin. A seleção natural escolhe os melhores fenótipos (características comportamentais, fisiológicas e morfológicas), de acordo com as restrições ambientais e parâmetros evolutivos. O GA é estruturado de modo que a informação relativa para um dado sistema seja codificada analogamente como um cromossomo biológico (Figura 7).

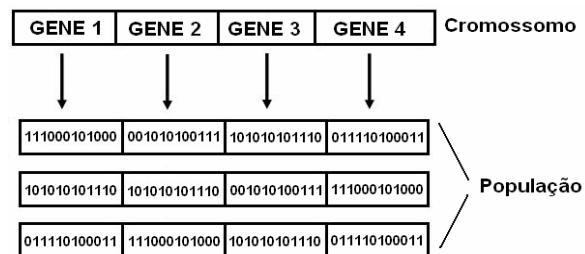


Figura 7. Elementos do algoritmo genético.

Em um algoritmo genético, cada gene representa um valor ou variável a ser otimizada, como por exemplo, variáveis operacionais de determinada técnica.

De acordo com teoria evolucionária, somente os elementos mais adaptados da população provavelmente sobreviverão e gerarão descendentes, transmitindo assim sua hereditariedade para as novas gerações (Shukla, 2000). Esse comportamento é também visualizado nos algoritmos genéticos que tenderão a gerar “indivíduos” mais adaptados, ou seja, condições experimentais que proverão respostas mais adequadas ao sistema de interesse.

8. Validação da metodologia analítica

Após a otimização das condições experimentais, o próximo passo é a validação do método desenvolvido. A validação de um método é um processo contínuo que começa no planejamento da estratégia analítica e continua ao longo

de todo o seu desenvolvimento (Ribani, 2004). A necessidade de se mostrar a qualidade das medições químicas, através de sua comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade, está sendo cada vez mais reconhecida e exigida. Vários órgãos internacionais e nacionais emitiram protocolos visando à harmonização das etapas do processo de validação, bem como sugerindo novos procedimentos. Dentre esses documentos temos o “Commission Decision 2002/657/EC”, publicado pela Comissão das Comunidades Europeias (EC, 2002), o “The fitness for purpose of analytical method, a laboratory guide to method validation and related topics” publicado por um grupo de trabalho da EURACHEM (EURACHEM, 1998) e o “Harmonized guidelines for single laboratory validation of methods of analysis” emitido pela AOAC, ISO e IUPAC (Thompson, 2002). No Brasil, o INMETRO publicou o DOQ-CGCRE-008 com orientações sobre validação de métodos e ensaios químicos (INMETRO, 2003).

Os parâmetros analíticos normalmente encontrados para validação de métodos de separação são: seletividade, linearidade e faixa de aplicação, precisão (através da repetibilidade dos resultados), exatidão (através do cálculo da recuperação), limite de detecção, limite de quantificação e robustez (Ribani, 2004). Llompart *et al.* (2001) avaliaram a precisão do método desenvolvido para determinação de 9 PCB em leite de vaca com uma série de 5 análises consecutivas e obtiveram variação do desvio padrão relativo dentro da faixa de 5,6 a 10 % quando empregaram fibra de PDMS e, 5,0 a 13 %, quando usaram fibra de PDMS-DVB. A faixa de linearidade pode ser expressa como uma equação de reta chamada de curva analítica (Ribani, 2004). Desta forma, eles obtiveram coeficientes de correlação $> 0,99$ para ambas as fibras (PDMS e PDMS-DVB), na faixa de $0,58 \text{ ng mL}^{-1}$ a $115,2 \text{ ng mL}^{-1}$. Portanto, o método apresentou excelente linearidade. Röhrig e Meisch (2001) conseguiram uma linearidade que variou de ótima ($R^2 > 0,99$) a adequada ($R^2 \sim 0,94$), na faixa de concentração estudada ($0,25$ a $10 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$), para 6 PCB extraídos com fibra de poliacrilato.

Os limites de detecção e quantificação podem ser calculados de três diferentes maneiras: o método visual (adição de concentrações conhecidas do

composto de interesse na amostra até ser possível a distinção entre ruído e sinal analítico), o método relação sinal-ruído (comparação do sinal analítico obtido para uma amostra contendo baixas concentrações do composto de interesse com o sinal de um branco) e o método baseado em parâmetros da curva analítica. Segundo Ribani et al. (2004), o melhor deles é o método baseado nos parâmetros da curva analítica, que é estatisticamente mais confiável. No trabalho de Llompart et al. (2001), o limite de detecção foi calculado a partir da relação sinal-ruído e variou de 0,015 a 0,040 ng mL⁻¹ com a fibra de PDMS e 0,011 a 0,71 ng mL⁻¹, com a fibra de PDMS-DVB. Já Röhrig & Meisch (2001) para os 6 PCB estudados, obtiveram limites de detecção e quantificação que variaram de 0,06 a 2,45 µg L⁻¹ e 0,23 a 9,28 µg L⁻¹, respectivamente.

9. Rede Neural Kohonen

O córtex cerebral humano é constituído de uma fina camada de células de aproximadamente um metro quadrado, contendo seis camadas de neurônios redobradas de forma a caber no crânio (Freeman, 1991). Apesar da mecânica e dos processos do córtex não serem ainda completamente entendidos, evidências anatômicas e fisiológicas sugerem a existência de interação lateral entre os neurônios. No caso do cérebro dos mamíferos, ao redor de um centro de excitação existe uma região (50 a 100 µm) de excitação lateral. Ao redor desta existe uma área de ativação inibitória, aproximadamente de 200 a 500 µm (Kohonen, 1989). Novamente, ao redor desta última área, segue-se uma região de excitação fraca (alguns centímetros). O fenômeno de interação lateral pode ser modelado pela função *chapéu-mexicano* (*Mexican-hat*) (Figura 8) que matematicamente pode ser descrita pela diferença entre duas Gaussianas.

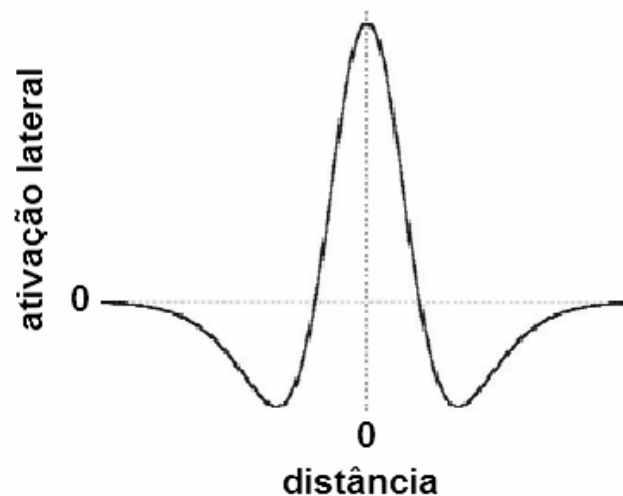


Figura 8. Função Chapéu-mexicano descrevendo a ativação lateral (figura extraída de Costa, 1999).

Apesar das idéias de auto-organização em sistemas neurais terem sido iniciadas no final dos anos 50 e início dos anos 60 (Yovits e Cameron, 1960), C. von der Malsburg demonstrou pela primeira vez, em 1973, a possibilidade de treinar uma rede neural usando métodos competitivos de forma a criar mapas auto-organizáveis. Esses estudos foram baseados na capacidade de alguns neurônios de responderem seletivamente a estímulos, como os sensíveis a intensidade de luz e orientação de segmentos de retas, no córtex visual (Willshaw e von der Malsburg, 1976).

Kohonen (1989) introduziu o conceito de mapas auto-organizáveis (*Self-organizing Maps* – SOM) de características topológicas, os quais preservam a topologia de uma representação multidimensional dentro de um novo arranjo de dimensões bastante reduzidas de neurônios. Geralmente dados de aplicações reais são multi-dimensionais o que torna difícil a visualização das relações entre os dados. O SOM implementa uma projeção não-linear de um espaço de dados sensoriais ou de atributos geralmente de dimensionalidade elevada, em um conjunto discreto de neurônios, geralmente dispostos na configuração de um vetor ou uma matriz (Costa, 1999).

Assim é que se traduz o aprendizado da rede neural, pois, havendo pelo menos um neurônio que represente uma determinada informação (um estímulo apresentado na entrada), sempre que este estímulo for apresentado a esta rede neural, aquele neurônio que foi treinado para representá-lo, automaticamente irá ser disparado, informando assim, qual o estímulo que foi apresentado para a rede neural. É indicada para resolver problemas não-lineares de alta dimensionalidade, tais como extração de características e classificação de imagens e padrões acústicos, controle adaptativo de robôs, equalização, modulação e transmissão de sinais (Francisco, 2004).

A rede consiste de duas camadas de neurônios conectados por pesos. A camada de entrada é conectada a um vetor de entrada do conjunto de dados e a camada de saída forma um mapa que consiste de uma grade retangular ou hexagonal onde são dispostos vários neurônios. Um esquema geral da rede de Kohonen pode ser visualizado na Figura 9.

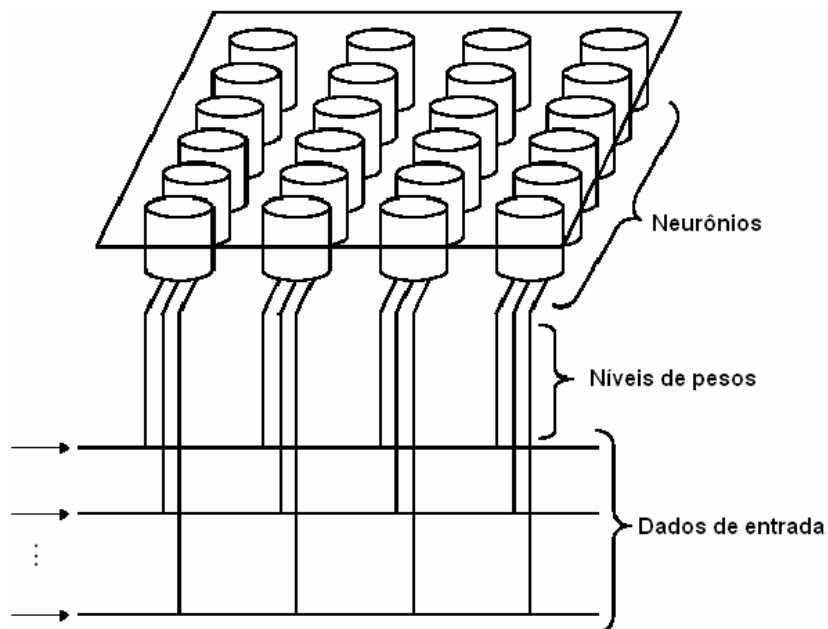


Figura 9: Arquitetura típica de uma rede neural de Kohonen (figura extraída de Zuchini, 2003).

Os neurônios podem ser representados como colunas ou tubos arranjados em uma caixa. Se, por exemplo, um determinado dado de entrada possuir 40 amostras, 40 vetores de entrada serão obtidos, e a dimensionalidade desses vetores dependerá do número de variáveis contidas nos dados, ou seja, o número de elementos dos vetores que podem ser valores de absorbância de um espectro, ou picos de um cromatograma. Logo também, o número de pesos de cada neurônio da rede será o mesmo que o número dos elementos dos vetores. De acordo com os valores dos pesos, variáveis específicas do vetor de entrada, que corresponde a uma amostra, serão mais representativas na descrição desta amostra e na localização desta amostra em determinado neurônio (Da Silva, 2007).

Apesar de ter sido relacionado a componentes principais (PC), existem diferenças fundamentais entre estes dois métodos, como por exemplo o espaço discreto de saída do SOM, enquanto que no PCA o espaço é contínuo. Além disto, componentes principais são obtidos por combinações lineares das variáveis, enquanto que o SOM é obtido matematicamente por regressão recursiva e não paramétrica (Costa, 1999).

Objetivos

Considerando o grande problema que são os PCB disseminados no meio ambiente e conseqüentemente, nos seres humanos, identificamos a necessidade de desenvolver um método capaz de avaliar a presença desses compostos, mesmo em pequenas concentrações, no leite materno e assim conhecer os níveis de contaminação aos quais os recém-nascidos estão expostos no nosso país.

Sendo assim, um dos objetivos foi desenvolver um método confiável para a determinação de PCB no leite humano. Para isso, utilizaram-se duas técnicas internacionalmente reconhecidas: para a extração dos PCB foi utilizada a técnica de microextração em fase sólida (SPME) e para a sua determinação foi utilizada a cromatografia gasosa com detector de captura de elétrons (GC-ECD).

Com o objetivo de identificar as variáveis mais importantes no processo extrativo e obter as melhores condições experimentais para a extração dos PCB da matriz láctea fez-se uso do planejamento experimental Doehlert. Ainda, ferramentas quimiométricas bastante inovadoras na nossa área, como rede neural Bayesiana e algoritmos genéticos, foram empregadas para possibilitar a obtenção de uma condição experimental ótima para todos os PCB, simultaneamente.

Após a etapa de otimização, foi realizada a validação do novo método analítico através do estudo das figuras de mérito. Em seguida, o método foi aplicado em amostras de leite materno coletadas em dez Bancos de Leite de nove diferentes Estados brasileiros. Os resultados analíticos obtidos nesta fase (áreas dos cromatogramas) foram correlacionados com os questionários aplicados às mães que participaram da pesquisa, nos quais continham informações sobre hábitos alimentares, condições sócio-econômicas, locais de habitação, etc. Para o estudo das possíveis correlações, a rede neural de Kohonen foi eficientemente aplicada, já que várias inferências muito pertinentes foram estabelecidas a partir deste tratamento.

Este foi o primeiro trabalho que se propôs a fazer uma determinação ampla dos níveis de PCB em leite humano no Brasil, bem como buscar correlações que possam auxiliar na tomada de decisões quanto ao assunto.

Referências Bibliográficas

1. Agatonovic-Kustrin, S.; Zecevic, M.; Zivanovic, L.; Tucker, I.G.; *Anal. Chim. Acta* **1998**, 364, 265.
2. Ahmed F.E. in: C.F. Moffat, K.J. Whittle (Ed.) *Environmental Contaminants in Food*, Sheffield Academic Press, England, Ch.13, 500 p., **1999**.
3. Angulo, R.; Martinez, P.; Jodral, M. L.; *Food Chem. Toxicol.* **1999**, 37, 1081.
4. Aoki, Y.; *Environ. Research Section A* **2001**, 86, 2.
5. Arthur, C.L.; Pawliszyn J.; *Anal. Chem.* **1990**, 62, 2145.
6. Augusto, F.; Valente, A.L.P.; *Trends in Anal. Chem.* **2002**, 21, 428.

7. Bandeirante Energia *Programa de Investimentos da Bandeirante Energia (BR-0401)*: Relatório de impacto ambiental e social. São Paulo, **2003**.
8. Barreta, M.; Dick, T.; *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **1994**, 53, 357.
9. Breivik, K.; Sweetman, A.; Pacyna, J.M.; Jones, K.C.; *Sci. Total Environ.* **2002b**, 290, 199.
10. Breivik, K.; Sweetman, A.; Pacyna, J.M.; Jones, K.C.; *Sci. Total Environ.* **2002a**, 290, 181.
11. Brouwer, A.; Longnecker, M.P.; Birnbaum, L.; Coglian, J.; Kostyniak, P.; Moore, J.; Schantz, S.; Winneke, G.; *Environ. Health Perspect.* **1999**, 107, 639.
12. Bucholsky, K. A.; Begerow, J.; Winneke, G.; Dunemann, L.; *J. Chromat. A* **1996**, 754, 479.
13. Cairns, T.; Doose, G. M.; Froberg, J. E.; Jacobson, R. A.; Siegmund, E. G.; Analytical chemistry of PCBs. In: Waid, J. S., ed. *PCBs and the environment*. Boca Raton: CRC Press, **1993**.
14. Campoy, C.; Jimenez, M.; Olea-Serrano, M.F.; Moreno-Frias, M.; Canabate, F.; Olea, N.; *et al. Early Hum. Dev.* **2001**, 65, 183.
15. Cecchi, H.M.; *Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos*. 2 ed. Editora da Unicamp, Campinas, **2003**.
16. Collins, C.H.; Braga, G.L.; Bonato, P.S.; *Fundamentos de Cromatografia*. 8 ed. Editora da Unicamp, Campinas, **2006**.
17. Cortazar, E.; Zuloaga, O.; Sanz, J.; Raposo, J.C.; Etxebarria, N.; Fernandez, L.A.; *J. Chromatogr. A* **2002**, 978, 165.
18. Costa, J.A.F.; *Tese de doutorado*. Universidade Estadual de Campinas. Campinas, **1999**.
19. Covaci, A.; Jorens, Ph.; Jacquemyn, Y.; Schepens, P.; *Sci. Total Environ* **2002**, 298, 45.
20. Da Costa, J.G.; *Tese de doutorado*, Universidade Estadual de Campinas, Brasil, **2004**.

21. Da Silva, G.A.; *Tese de doutorado*, Universidade Estadual de Campinas, Brasil, **2007**
22. Despagne, F.; Massart, D. L.; *Analyst* **1998**, 123, 157.
23. Doehlert, D.H. *Appl. Statist.* **1970**, 19, 231.
24. EC (European Commission): Commission decision 2002/657/EC of 12 august 2002. Implementing Council Directive 96/23/EC concerning performance of analytical methods and the interpretation of results. *Official Journal of the European Communities*, **2002**.
25. Erickson, D.; *Analytical Chemistry of PCBs*. Heidelberg:Springer-Verlag, **1992**.
26. "EURACHEM. *The fitness for purpose of analytical method, a laboratory guide to method validation and related topics*. **1998**.
27. Ferreira, S. L. C.; Santos, W. N. L. dos; Quintella, C. M.; Neto, B. B.; Bosque-Sendra, J. M.; *Talanta* **2004**, 63, 1061.
28. Font, G.; Mañes, J.; Moltó, J.C.; Picó, Y.; *J. Chromat. A* **1996**, 733, 449.
29. Francisco, C.A.C.; *Dissertação de Mestrado*. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, **2004**.
30. Freeman, W.J.; *Scientific American*, **1991**, 264, 78.
31. Garcia, J.; Araujo, A.N.; Lima, J.L.F.C.; Villaescusa, I.; Poch, M.; *Anal. Chim. Acta* **1999**, 402, 275.
32. Giugliani, E.R.J.; *J. Pediatrics* **2002**, 78, 183.
33. Goés, H.C.A.; Torres, A.G.; Donangelo, C.M.; Trugo, N.M.F.; *Nutrition* **2002**, 18, 590.
34. Harris, C.A.; Woolridge, M.W.; Hay, A.W.; *Chemosphere* **2001**, 43, 243.
35. Hong, J.E.; Pyo, H.; Park, S.-J.; Lee, W.; *Anal. Chim. Acta* **2005**, 539, 55.
36. <http://www.fiocruz.br/redeblh>, acessada em 11 de outubro de 2008.
37. INMETRO; *DOQ-CGCRE-008. Orientações sobre validação de métodos e ensaios químicos*. Rio de Janeiro, **2003**.
38. IUPAC; *Analytical Chemistry Division, Commission on Analytical Nomenclature*. **1974**.

39. Jaouen-Madoulet, A.; Abarnou, A.; Le Guellec, A-M.; Loizeau, V.; Leboulenger, F.; *J. Chromatogr. A* **2000**, 886, 153.
40. Kashimoto, T.; Miyata, H. Differences between yusho and other kinds of poisoning involving only PCBs. In: WAID, J. S. (Ed.). *PCBs and the environment*. Boca Raton: CRC Press, **1986**.
41. Kohonen, T.; Self-organization and associative memory. 3 ed. Springer Verlag, Berlin, **1989**.
42. Lei Estadual nº 12.288 de 22 de fevereiro de 2006, São Paulo, Brazil.
43. Llompарт, M.; Li, K.; Fingas, M.; *Anal. Chem.* **1998**, 70, 2510.
44. Llompарт, M.; Pazos, M.; Landín, P.; Cela, R.; *Anal. Chem.* **2001**, 73, 5858.
45. Lu, Y.C.; Wu, Y.C.; *Environ. Health Perspect.* **1985**, 59, 17.
46. Lucasius, C.B.; Kateman, G.; *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **1993**, 19.
47. Nogueira, D. P.; Souza, J.M.P.; Colacioppo, S.; Gomes, J.R.; Brandao, J.B.; Souza, M.L.A.; *Rev. Saúde Públ.* **1987**, 21, 279.
48. Paumgarten, F.J.R.; Cruz, C.M.; Chahoud, I.; Palavinskas, R.; Mathar, W.; *Environ. Res. Sec. A* **2000**, 83, 293.
49. Pellizari, V. H.; Rodrigues, J. M.; Biodegradação de PCBs. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Eds.). *Microbiologia ambiental*. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, **1997**.
50. Pereira-Filho, E.R.; Mello, C.; Costa-Filho, P.A.; Arruda, M.A.Z.; Poppi, R.J.; *Anal. Chim. Acta* **2001**, 433, 111.
51. Poon, K.-F.; Lam, P.K.S.; Lam, M.H.W., *Chemosphere* **1999**, 39, 905.
52. Ribani, M.; Bottoli, C.B.G.; Collins, C.H.; Jardim, I.C.S.F.; Melo, L.F.C.; *Química Nova* **2004**, 27, 771.
53. Röhrig, L.; Meisch, H.; *Fresenius J. Anal. Chem.* **2001**, 366, 106.
54. Shaw, G. R.; Connell, D. W.; Factors controlling bioaccumulation of PCBs. In: Waid, J. S., ed. *PCBs and the environment*. Boca Raton: CRC Press, **1986**.
55. Shukla, K.K.; *Inform. Software Tech.* **2000**, 42, 701.
56. Souza-Pereira, M.; Kuch, B; *Chemosphere* **2005**, 60, 844.

57. Theodoridis, G.; Koster, E.H.M.; Jong, G.J. J.; *Chromatogr. B* **2000**, 745, 49.
58. Thompson, M.; Ellison, S.L.R.; Wood, R.; *Pure Appl. Chem.* **2002**, 74, 835.
59. UNEP; *Master list of actions: on the reduction and/or elimination of the releases of persistent organic pollutants*, Geneva, **2003**.
60. Valente, A.L.P., Augusto, F. *Química Nova* **2000**, 23, 523.
61. Vetter, W.; Luckas, B.; Buijten, J.; *J. Chromatogr. A* **1998**, 799, 249.
62. WHO, *Air Quality Guideline*. Copenhagen, **2000**, 2, 1.
63. WHO; *Polychlorinated biphenyls and terphenyls (Environmental Health Criteria 140)*. Geneva, **1993**.
64. WHO; *Polychlorinated Biphenyls: Human Health Aspects. Concise International Chemical Assessment Document*. Geneva, **2003**, 55.
65. WHO; *The Optimal Duration of Exclusive Breastfeeding. Report of an Expert Consultation WHO/NHD/01.09 and WHO/FCH/CAH/01.24*. Geneva, **2001**.
66. Willshaw, D.J.; von der Malsburg, C.; *Proc. of the Royal Society of London, Series B* **1976**, 194, 431.
67. Yang, Y.; Miller, D.J.; Hawthorne, S.B.; *J. Chromatogr. A* **1998**, 800, 257.
68. Yang, Z.-Y.; Zeng, E.Y.; Xia, H.; Wang, J.-Z.; Mai, B.-X.; Maruya, K.A.; *J. Chromatogr. A* **2006**, 1116, 240.
69. Yao, Y.; Takasuga, T.; Masunaga, S.; Nakanishi, J.; *Chemosphere* **2002**, 46, 1461.
70. Yovits, M.; Cameron, S.; (eds.). *Self-Organizing Systems*. Pergamon Press, Oxford, **1989**.
71. Yu, M.L.; Guo, Y.L.; Hsu, C.C.; Rogan, W.J.; *Am. J. Ind. Med.* **1997**, 31, 172.
72. Zhang, Q.; Liang, X.; Chen, J.; Lu, P.; Yediler, A.; Kettrup, A.; *Anal Bioanal Chem.* **2002**, 374, 93
73. Zuchini, M.H.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo. **2003**.
74. Zupan, J.; Gasteiger, J.; *Neural Networks in Chemistry and Drug Design*. 2 ed.; Wiley-VCH Verlag, New York, **1999**.

CAPÍTULO 1

OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO DE BIFENILAS POLICLORADAS DE LEITE MATERNO: OTIMIZAÇÃO UNIVARIADA VERSUS PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

Cláudia Hoffmann Kowalski^{1*} ; Fabio Augusto² ; Helena Teixeira Godoy¹

¹ Departamento de Ciência de Alimentos (DCA), Faculdade de Engenharia de Alimentos (FEA), Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), CP 6121, CEP 13083-862, Campinas, SP, Brasil.

² Departamento de Química Analítica (DQA), Instituto de Química (IQ), Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), CP 6154, CEP 13084-971, Campinas, SP, Brasil.

* claukowalski@gmail.com

(Manuscrito a ser submetido para publicação no periódico Química Nova)

Abstract

This work describes the optimization of solid-phase microextraction (SPME) conditions for the determination of polychlorinated biphenyls (PCB) from breast milk. For this, the main parameters of extraction were previously selected and valued through univariate optimization and experimental design. A comparative study between the two approaches has shown the advantage of the use of optimization based in response surface methodology. Besides, the analysis of variance (ANOVA) allowed identifying the variables that are statistically significant in this model: high temperature (**T**) and ionic strength (**C_{NaCl}**) had the most significant effect in the extraction of PCB while medium time (**t**) and low methanol addition (**C_{MeOH}**) also they contribute to the extraction.

Keywords: PCB; SPME; Experimental design; Breast milk.

1. Introdução

As bifenilas policloradas (PCB) constituem um grupo de contaminantes altamente tóxicos classificados como poluentes orgânicos persistentes (POP). Tal atribuição deve-se a três características básicas: persistência ambiental, bioacumulação (com conseqüente biomagnificação na cadeia trófica) e alta toxicidade (LeBlanc, 1997). A persistência desses compostos ocorre em função de sua baixa degradação por processos bióticos e abióticos, acarretando em elevada meia-vida no ambiente, que pode chegar a anos ou décadas (Jones, 1999).

Embora amplamente utilizados na indústria desde 1929, os PCB só foram detectados em amostras ambientais em 1966 pelo sueco Sören Jensen. Enquanto ele estudava a ocorrência de DDT em amostras de peixe, o cientista acidentalmente encontrou grandes quantidades de substâncias desconhecidas, que posteriormente foram identificadas como PCB (Jensen, 1972). Apesar de sua produção ter sido banida na década de 70, eles continuam sendo detectados nos ecossistemas (WHO, 2000, Jaraczewska, 2006, Hong, 2005).

Os PCB são absorvidos pelos organismos através da alimentação, respiração e pele. Alimentos como leite e derivados, carne e peixe tem sido identificados como a principal rota de entrada dos PCB e pesticidas nos organismos humanos. (Heck, 2007, Johansen, 2004, Schechter, 1997). Essas substâncias, depois de absorvidas, são distribuídas através da corrente sanguínea para os vários tecidos e órgãos do corpo, sendo armazenadas principalmente nos tecidos ricos em gordura. No caso das mulheres, ocorre um grande acúmulo desses compostos no leite e conseqüentemente, nos recém-nascidos por elas amamentados (Basheer, 2004). O leite materno constitui-se de uma mistura complexa de substâncias produzidas pelo corpo da mãe (substâncias endógenas como lipídios, proteínas, carboidratos) e outras substâncias introduzidas no organismo da mãe (substâncias exógenas como drogas farmacêuticas, substâncias químicas presentes no meio ambiente e nos alimentos).

A contaminação do leite materno por PCB é de grande impacto, pois esse é o primeiro alimento do recém-nascido, constituindo um grande problema para a saúde dos mesmos. Llompart *et al.* (2001) verificaram que um aumento na porcentagem de gordura do leite provocou uma diminuição drástica na área extraída dos PCB estudados. Devido a toda a complexidade desta matriz, a etapa de extração dos analitos é fundamental no desenvolvimento de métodos confiáveis e sensíveis.

Dentre as técnicas para extração de analitos orgânicos, a Microextração em Fase Sólida (SPME) é bastante pertinente. Ela foi desenvolvida por Arthur e Pawliszyn (1990) e baseia-se na sorção dos analitos da amostra ou do seu *headspace* por um filme de fase extratora, podendo essa fase ser uma fase polimérica de um líquido puro ou de um sólido poroso disperso em um líquido, sobre uma fibra de sílica. É uma técnica de fácil manuseio, livre de grandes quantidades de solvente, além de necessitar de pequenas quantidades de amostras. Essa última é uma grande vantagem principalmente para matrizes nas quais não se dispõe de grandes quantidades, como é o caso de fluídos biológicos como o leite.

A operação em SPME precisa ser otimizada de forma a maximizar a eficiência de extração dos analitos de interesse. Dentre os parâmetros a serem otimizados, o tipo de fibra, a concentração e o volume da amostra e a temperatura e o tempo de extração são alguns exemplos de variáveis normalmente consideradas no processo extrativo da SPME. Outra possibilidade para aumentar o rendimento da SPME é a adição de diferentes reagentes ou solutos no frasco de extração. A grande estabilidade dos PCB aliada a SPME no modo *headspace*, permite o uso de tratamentos agressivos com a finalidade de reduzir sua afinidade pelo leite, aumentando sua extração (Llompart, 2001). A adição de NaOH, metanol e NaCl são algumas substâncias utilizadas para esse fim.

Duas abordagens podem ser empregadas para realizar essa otimização: univariada e multivariada. Na primeira, cada variável é estudada separadamente, enquanto que na segunda, as variáveis são estudadas simultaneamente, tornando

possível distinguir interações entre elas que não seriam detectadas na abordagem tradicional (Massart, 1997, Araujo, 1996, Lundstedt, 1998).

O uso de planejamento experimental para determinar as melhores condições experimentais de uma análise já é bem conhecido e constantemente melhorado através de novas ferramentas estatísticas. Uma abordagem muito conveniente de otimização é a proposta por Doehlert em 1970 (Doehlert, 1970), pois permite o estudo de um número grande de variáveis utilizando um número reduzido de experimentos, considerando o número de variáveis avaliadas, tornando-o mais eficiente quando comparado a outros planejamentos (Silva, 2007, Ferreira, 2004, Lundstedt, 1998, Butine, 1991). Outra vantagem deste planejamento é que o número de níveis não é o mesmo para todas as variáveis. Por exemplo, em um planejamento Doehlert com duas variáveis, uma pode ser estudada em cinco níveis enquanto outra em três. Essa propriedade permite a livre escolha de quais fatores serão avaliados em um número maior ou menor de níveis. Como regra geral é preferível escolher a(s) variável (is) com maior (es) efeito (s) para os níveis de maior magnitude, a fim de obter mais informações a cerca de suas variações no sistema (Teófilo, 2006, Araújo, 1996).

Neste trabalho foi proposta a otimização das condições experimentais para a extração de PCB de amostras de leite materno utilizando a técnica de SPME. Para isso, utilizou-se tanto a abordagem univariada como a multivariada, sendo possível comparar os resultados obtidos em cada estudo e identificar as vantagens e desvantagens de cada. Além disso, a qualidade do ajuste dos modelos individuais obtidos de cada superfície foi estimada através da análise de variância (ANOVA), possibilitando identificar quais são as variáveis que influenciam na extração dos PCB bem como os melhores valores experimentais para cada uma delas.

2. Materiais e Métodos

2.1 Reagentes e Materiais

Empregou-se um solução padrão de bifenilas policloradas em isooctano (International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) 28, 52, 74, 101, 118, 128, 138, 153, 156, 170, 180 e 187) com concentração de $3,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de cada PCB, obtidas da AccuStandard (New Haven, CT). Outros reagentes utilizados foram o metanol, tolueno e NaOH (Merck, Darmstadt, Alemanha), o NaCl P.A. (Ecibra, São Paulo, Brasil) e o isooctano (Mallinckrodt, Kentucky, PA). Água deionizada purificada através de um sistema Millipore Milli-Q (Bedford, MA) também foi utilizada.

As fibras para a SPME utilizadas foram polidimetilsiloxano (PDMS) com espessura de recobrimento de $100 \mu\text{m}$ e polidimetilsiloxano-divinilbenzeno (PDMS-DVB) com espessura de recobrimento de $65 \mu\text{m}$. Para o uso, elas foram adaptadas em um aplicador apropriado, sendo esse conjunto fornecido pela Supelco (Bellefonte, PA). As fibras foram condicionadas de acordo com as recomendações do fabricante. Foram utilizados frascos de vidro de 16 mL tampados com septos de Teflon/silicone fornecidos pela Pierce (Rockford, IL). Todos os frascos foram silanizados com uma solução de clorotrimetilsiloxano em tolueno, como descrito por Potter (1994). Para a descontaminação, os frascos e barras magnéticas foram lavados com detergente neutro e água deionizada e após foram colocados em forno microondas com água por 10 minutos. Depois, foram abundantemente lavados com água deionizada e secos em estufa a 70°C . Durante as extrações, a temperatura das amostras foi mantida constante através de um banho termostático com circulação de água (Cole Parmer, USA).

2.2 Preparo dos padrões

Como citado no item anterior, partiu-se de doze soluções individuais de PCB em isooctano, cada uma com concentração de $3,5 \mu\text{g mL}^{-1}$. Esses padrões foram misturados e diluídos obtendo-se uma solução estoque de $1,4 \mu\text{g mL}^{-1}$ de

cada PCB. Para o estudo de otimização, dopou-se um *pool* de amostras de leite materno (isento de quantidades detectáveis de PCB) com a solução estoque, obtendo-se amostras contaminadas com $9,25 \mu\text{g L}^{-1}$ de cada PCB estudado.

2.3 Amostras

O leite humano foi obtido de um banco de leite da cidade de São Paulo, sendo mantido congelado da coleta até a análise. Antes do uso, o leite dopado foi mantido a 4°C por 24 h para permitir o equilíbrio entre os compostos biológicos ativos do leite e os compostos organoclorados adicionados (Röhrig, 2000).

2.4 Instrumentação

Todas as análises cromatográficas foram realizadas em um cromatógrafo AutoSystemXL GC-ECD (Perkin-Elmer, Norwalk, CT) com uma coluna HP-1MS (100 % polidietilsiloxano) $30 \text{ m} \times 0,32 \text{ mm} \times 0,25 \mu\text{m}$. O injetor *split-splitless* foi operado no modo *splitless* com um *liner* adequado para SPME. A programação de temperatura do forno foi: 40°C por 2 min até 190°C por 5 min a $30^\circ\text{C min}^{-1}$, então a 5°C min^{-1} até 220°C mantida por 5 min, a 300°C por min a $20^\circ\text{C min}^{-1}$. As temperaturas de injetor e detector foram 280°C e 320°C , respectivamente. O gás de arraste foi hélio 5.0 a uma vazão de $1,3 \text{ mL min}^{-1}$.

2.5 Otimização univariada

Alíquotas de 5,00 mL de amostra (juntamente com os outros aditivos quando foi o caso) foram colocadas em frascos e termostatizados em banho de água (Cole-Parmer – Vernon Hills, IL) sob agitação magnética (1200 rpm) por 10 min para o equilíbrio amostra/*headspace*. Então, a fibra de SPME era exposta ao *headspace* da amostra por tempos pré-definidos, sendo então imediatamente recolhida e exposta ao injetor do cromatógrafo a 280°C para dessorção dos analitos extraídos por 5 min. Para a total dessorção e evitar o efeito de memória, corridas em branco eram feitas entre cada experimento.

2.6 Planejamento experimental

Aqui, usou-se apenas a fibra de PDMS 100 μm , e o procedimento genérico foi similar ao descrito no item anterior. A adição de NaCl (para ajuste da força iônica) (C_{NaCl}), a temperatura de extração (T), o tempo de extração (t), e a adição do co-solvente metanol (C_{MeOH}), foram os parâmetros da HS-SPME variados e otimizados de acordo com o planejamento experimental Doehlert (Kowalski, 2007). As repetições foram realizadas em torno do ponto central num total de três.

As faixas de trabalho abrangeram concentrações de NaCl de 0 a 0,36 g mL^{-1} (5 níveis), temperaturas de extração de 45 °C a 95 °C (7 níveis); tempos de extração de 40 min a 100 min (7 níveis); e adições de metanol de 0 a 500 μL por 5 mL de amostra (3 níveis) (Tabela 1).

Tabela 1. Condições operacionais segundo distribuição de Doehlert para as quatro variáveis HS-SPME estudadas.

Ensaio Experimental	C_{NaCl} (% m/v)	T (°C)	T (min)	C_{MeOH} (% v/v)
1*	0 (18,0)	0 (70,0)	0 (70,0)	0 (5,0)
2	1 (36,0)	0 (70,0)	0 (70,0)	0 (5,0)
3	0,5 (27,0)	0,866 (95,0)	0 (70,0)	0 (5,0)
4	0,5 (27,0)	0,289 (78,3)	0,817 (100,0)	0 (5,0)
5	0,5 (27,0)	0,289 (78,3)	0,204 (77,5)	0,791 (10,0)
6	-1 (0,0)	0 (70,0)	0 (70,0)	0 (5,0)
7	-0,5 (9,0)	-0,866 (45,0)	0 (70,0)	0 (5,0)
8	-0,5 (9,0)	-0,289 (61,7)	-0,817 (40,0)	0 (5,0)
9	-0,5 (9,0)	-0,289 (61,7)	-0,204 (62,5)	-0,791 (0,0)
10	0,5 (27,0)	-0,866 (45,0)	0 (70,0)	0 (5,0)
11	0,5 (27,0)	-0,289 (61,7)	-0,817 (40,0)	0 (5,0)
12	0,5 (27,0)	-0,289 (61,7)	-0,204 (62,5)	-0,791 (0,0)
13	-0,5 (9,0)	0,866 (95,0)	0 (70,0)	0 (5,0)
14	0 (0,0)	0,577 (86,7)	-0,817 (40,0)	0 (5,0)
15	0 (0,0)	0,577 (86,7)	-0,204 (62,5)	-0,791 (0,0)
16	-0,5 (9,0)	0,289 (78,3)	0,817 (100,0)	0 (5,0)
17	0 (18,0)	-0,577 (53,3)	0,817 (100,0)	0 (5,0)
18	0 (18,0)	0 (70,0)	0,613 (92,5)	-0,791 (0,0)
19	-0,5 (9,0)	0,289 (78,3)	0,204 (77,5)	0,791 (10,0)
20	0 (18,0)	-0,577 (53,3)	0,204 (77,5)	0,791 (10,0)
21	0 (18,0)	0 (70,0)	-0,613 (47,5)	0,791 (10,0)

*Ponto central com três repetições.

2.7 Tratamento dos dados

Os resultados obtidos foram transferidos para o programa Origin 5.0 (Microcal Software Inc., Northampton, MA) para que os respectivos gráficos fossem gerados.

Para a regressão linear múltipla (MLR), necessária para a otimização multivariada, foi necessário encontrar um modelo matemático (Equação 1) apropriado para cada PCB estudado, a fim de descrever o comportamento de cada composto em função das variáveis experimentais de extração avaliadas.

$$\begin{aligned} z = & b_0 + b_1 C_{\text{NaCl}} + b_2 T + b_3 t + b_4 C_{\text{MeOH}} + b_{11} C_{\text{NaCl}}^2 + b_{22} T^2 \\ & + b_{33} t^2 + b_{44} C_{\text{MeOH}}^2 + b_{12} C_{\text{NaCl}} T + b_{13} C_{\text{NaCl}} t + b_{14} C_{\text{NaCl}} C_{\text{MeOH}} \\ & + b_{23} T t + b_{24} T C_{\text{MeOH}} + b_{34} t C_{\text{MeOH}} \end{aligned}$$

(1)

Nesta equação, z é área de pico do PCB e b corresponde aos coeficientes da regressão. Cada PCB apresentará uma equação de regressão com seus respectivos coeficientes, ao nível de significância de 0,05.

A qualidade dos modelos individuais foi estimada através da análise de variância (ANOVA). Os cálculos dos modelos de regressão e das análises de variância foram feitos através de planilhas eletrônicas elaboradas no software Excel 2003 (Teófilo, 2006) e do programa estatístico Statistica 6.0 (StatSoft Inc, Tulsa, OK).

3. Resultados e discussão

3.1 Otimização univariada

Em qualquer estudo de otimização, procura-se identificar o máximo possível de variáveis experimentais e verificar a influência de cada uma na resposta final. No caso da otimização das condições experimentais para extração de PCB de leite materno utilizando HS-SPME, foram identificadas algumas variáveis que poderiam ser importantes no processo de extração, tais como: o efeito da matriz, o tipo de recobrimento da fibra de SPME, o modo de extração, o tamanho do frasco, a quantidade de amostra no frasco, a agitação magnética, a altura da fibra no

frasco, o tempo de equilíbrio amostra/headspace, o tempo de extração (tempo de exposição da fibra) a temperatura de extração, a adição de NaCl, a adição de um ou mais co-solventes, o controle do pH e a saponificação da gordura.

Dentre estas, sabe-se que alguns parâmetros já estão bem definidos na literatura como favoráveis para esse tipo de extração, como por exemplo, o uso de agitação magnética (Komatsu, 2004; Montes, 2006) e a extração no modo *headspace*. Frascos de 16 mL foram utilizados devido à disponibilidade no laboratório, sendo assim definidos também a quantidade de amostra de 5,00 mL.

Efeito da matriz. A Figura 1 mostra as áreas dos picos dos PCB após a dopagem de uma amostra de água deionizada e de leite com $9,25 \mu\text{g L}^{-1}$ de cada PCB, utilizando uma fibra PDMS 100 μm . Conforme esperado, a influência da matriz foi grande, observando-se uma redução de aproximadamente 90 % na área dos picos. Com esses resultados, a necessidade de encontrar condições experimentais ótimas para a extração de PCB desta matriz ficou evidente. Sendo assim, todos os testes de otimização realizados a partir de então, foram realizados nas próprias amostras de leite dopadas com PCB.

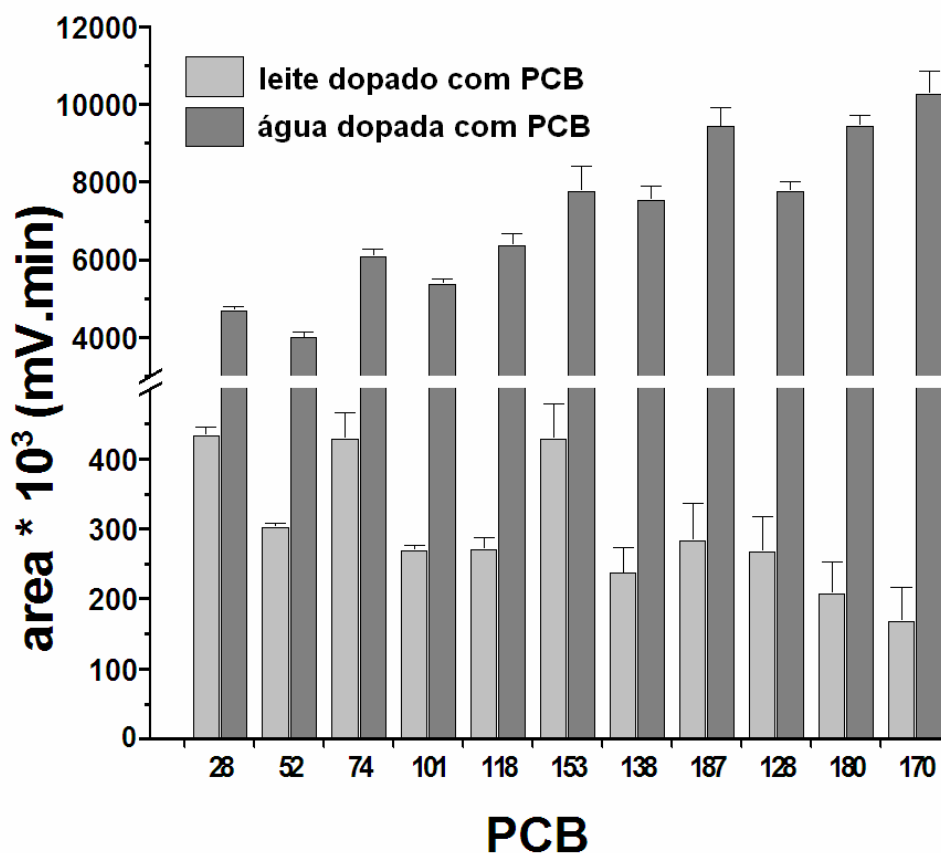


Figura 1. Avaliação do efeito de matriz na extração de PCB por HS-SPME-GC-ECD. Água e leite materno dopados com $9,25 \mu\text{g L}^{-1}$ de cada PCB. $C_{\text{NaCl}} = 360 \text{ g L}^{-1}$; $T = 85 \text{ }^{\circ}\text{C}$; $t = 60 \text{ min}$.

Tipo de recobrimento da fibra. Duas fibras com características bem distintas foram testadas: PDMS 100 μm e PDMS-DVB. A primeira tem como recobrimento um filme líquido de 100 μm de polidimetilsiloxano (PDMS) bastante robusto e estável as altas temperaturas utilizadas nos injetores (aproximadamente $300 \text{ }^{\circ}\text{C}$). PDMS é uma fase não-polar e por isso analitos não-polares são facilmente extraídos por essa fibra, entretanto, ela também pode ser aplicada com sucesso na extração de compostos polares depois de uma otimização das condições de extração (Pawliszyn, 1997). É bastante utilizada em aplicações biológicas devido a sua robustez e estabilidade (Theodoridis, 2000). A fibra de

polidimetiosiloxano/divinilbenzeno (PDMS-DVB) é uma fase mista, composta de microesferas porosas de DVB imobilizadas na fibra de PDMS. São comercializadas com uma espessura de filme de 60 e 65 μm sendo bastante utilizada para analitos voláteis e não-voláteis de baixa e alta polaridade (Valente, 2000). Tem como principais características o alto coeficiente de recuperação para compostos voláteis e/ou polares mas seu curto tempo de vida é uma limitação a ser considerada (Theodoridis, 2000).

A Figura 2 mostra os resultados obtidos com essas fibras considerando 80 °C como a temperatura de extração e 60 minutos como o tempo de extração. Apesar da eficiência de extração ser maior com a fibra de PDMS-DVB, observou-se maior variação entre as áreas obtidas nas replicatas. Além disso, a corrida de um branco entre as amostras mostrou que essa fibra apresenta efeito de memória significativa, quando comparada a PDMS. Esses resultados estão de acordo com os obtidos por Montes (2006) que calcularam o carryover para ambas as fibras para os congêneres de PCB com maior cloração, e encontraram 2 a 13 % e 15 a 35 % para a fibra PDMS e PDMS-DVB, respectivamente. A partir de então, todos os experimentos foram conduzidos com fibras de PDMS 100 μm .

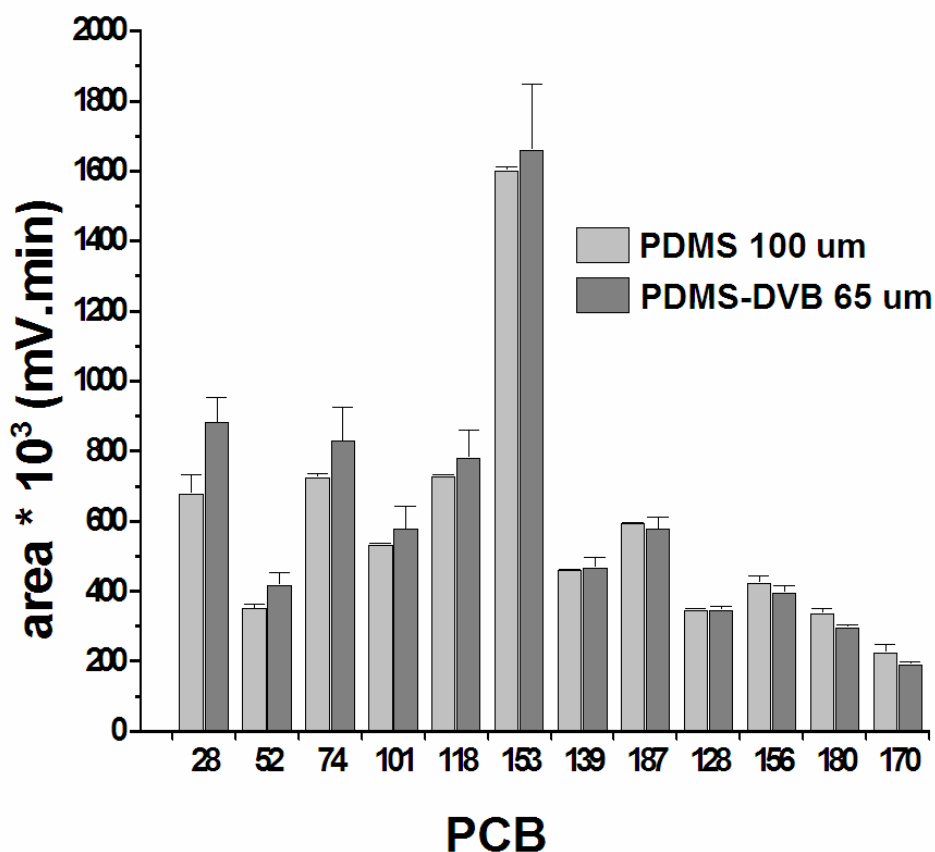


Figura 2. Perfis de extração dos PCB para as fibras PDMS 100 µm e PDMS-DVB 65 µm. Leite materno dopado com 9,25 µg L⁻¹ de cada PCB. C_{NaCl} = 360 g L⁻¹; T = 85 °C; t = 60 min).

Tempo de extração. Após definir o modo de extração e o tipo de fibra, foi avaliado o tempo de extração, no intervalo de 20 a 90 min, sob agitação constante. Para os PCB de menor peso molecular (PCB 28, 52, 74, 101 e 118), 50 min foi suficiente para atingir o equilíbrio. Já para os PCB com maior cloração (PCB 180 e 170), mesmo após 90 min o equilíbrio não foi alcançado. Entretanto, para análises de rotina, 90 min ou mais de extração seria muito tempo, mostrando a necessidade de otimizar outros parâmetros que possibilitem o sistema alcançar o equilíbrio com menos tempo.

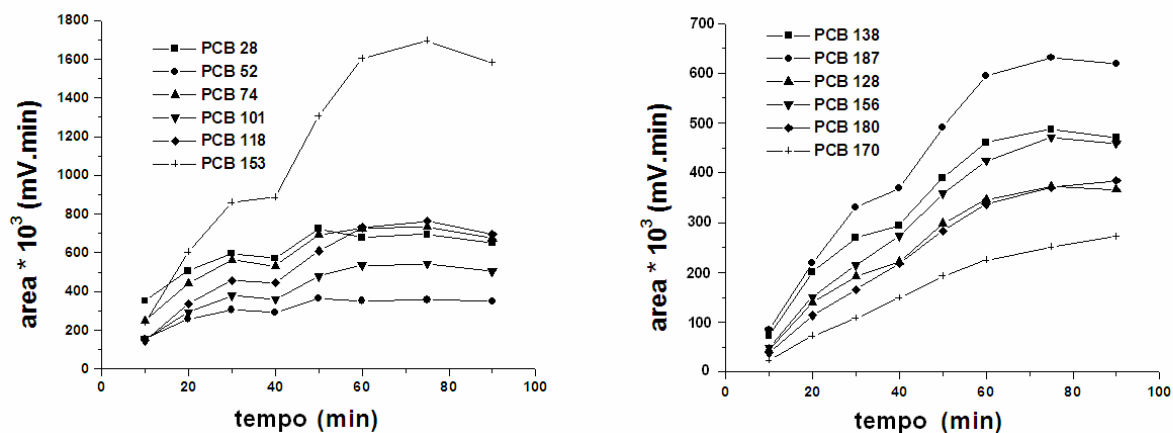


Figura 3: Otimização univariada do tempo de extração. Leite materno dopado com 9,25 $\mu\text{g L}^{-1}$ de cada PCB. $C_{\text{NaCl}} = 360 \text{ g L}^{-1}$; $T = 85^\circ\text{C}$.

Temperatura de extração. O aumento da temperatura durante a extração aumenta a difusão do analito ao redor da fibra. Contudo, no modo de extração utilizando o *headspace* da amostra, a temperatura ajuda na transferência dos analitos da matriz da amostra para o seu *headspace* (Penalver, 1999). A Figura 4 mostra a influência deste parâmetro na eficiência de extração de 27 °C até 80 °C. Aqui, também podemos ver que quanto maior o peso molecular, maior a temperatura necessária para que o equilíbrio entre as fases (amostra/*headspace*/fibra) seja obtido. Além disso, verifica-se a necessidade de testar temperaturas de extração mais altas.

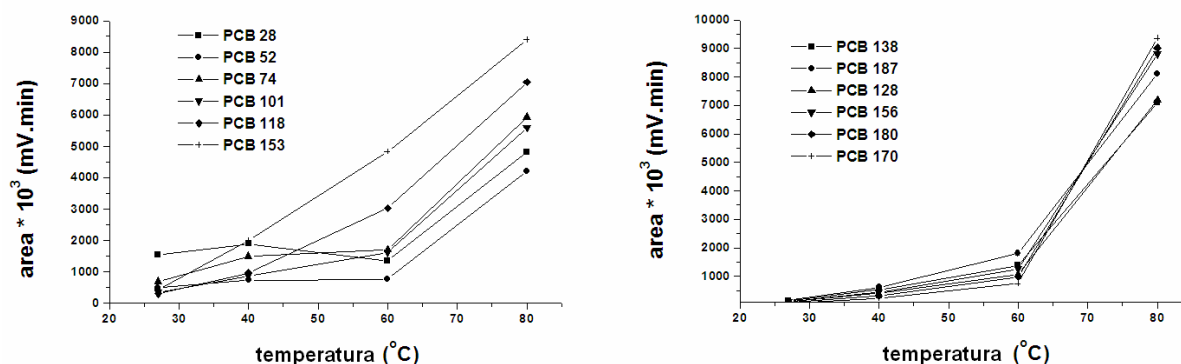


Figura 4. Otimização univariada da temperatura de extração. Leite materno dopado com $9,25 \mu\text{g L}^{-1}$ de cada PCB. $C_{\text{NaCl}} = 360 \text{ g L}^{-1}$; $t = 60 \text{ min}$.

Adição de NaCl. A adição de sal aumenta a força iônica da amostra, levando a redução na solubilidade dos analitos que são mais facilmente retidos pela fibra. Muitos estudos mostram um aumento da sorção dos analitos no revestimento da fibra de SPME pela adição de sal, usualmente cloreto de sódio, na matriz da amostra. Mas esse processo não é válido em todos os casos, sendo que esse efeito de aumento da extração depende da polaridade do analito, da concentração do sal e da matriz na qual o analito se encontra (Penalver, 1999).

Na Figura 5 é possível verificar o aumento da quantidade de PCB extraída quando da adição de 0,9 g de NaCl em 5,00 mL da matriz (correspondente a uma solução semi-saturada de cloreto de sódio), principalmente para os PCB de maior peso molecular.

Adição de um ou mais co-solventes. A adição de solventes orgânicos nas amostras pode ter efeitos bem distintos. Por exemplo, a presença de solventes orgânicos na amostra aquosa usualmente reduz a quantidade de analito extraído devido à competição entre os analitos e o solvente orgânico pela fibra de SPME (Penalver, 1999). Por outro lado, em amostras de solo e sedimentos, a adição de água ou solventes orgânicos na matriz promoveu um aumento na difusão dos analitos da amostra em direção a fibra (Pawliszyn, 1997).

Neste estudo foram testadas a adição de tolueno (baixa polaridade) e metanol (média polaridade) na matriz. Na mesma Figura 5 vemos que o tolueno diminuiu drasticamente a extração dos PCB da matriz. Já a adição de metanol em uma solução saturada de NaCl proporcionou um ligeiro aumento da extração, quando comparada a uma solução somente saturada.

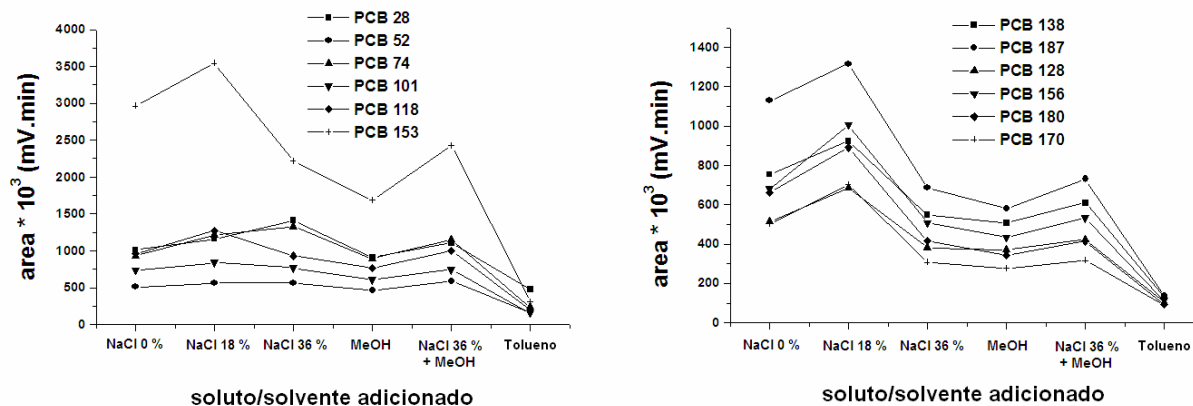


Figura 5. Otimização univariada do efeito da adição de NaCl e MeOH. Leite materno dopado com $9,25 \mu\text{g L}^{-1}$ de cada PCB. $T = 85^\circ\text{C}$; $t = 60 \text{ min}$.

Saponificação da gordura. Segundo Llompart (2001), a saponificação da gordura do leite ajuda na transferência dos PCB da matriz para a fibra, além de atuar como um *clean up* e assim, aumentar a seletividade e confiança na identificação dos picos cromatográficos. Isso ocorre porque a saponificação da gordura em seus correspondentes gliceróis e ácidos graxos facilita a liberação dos PCB da matriz. Esse procedimento pode ser de grande importância principalmente para amostras com grandes quantidades de gordura (leite maduro), nas quais os PCB estarão mais fortemente ligados.

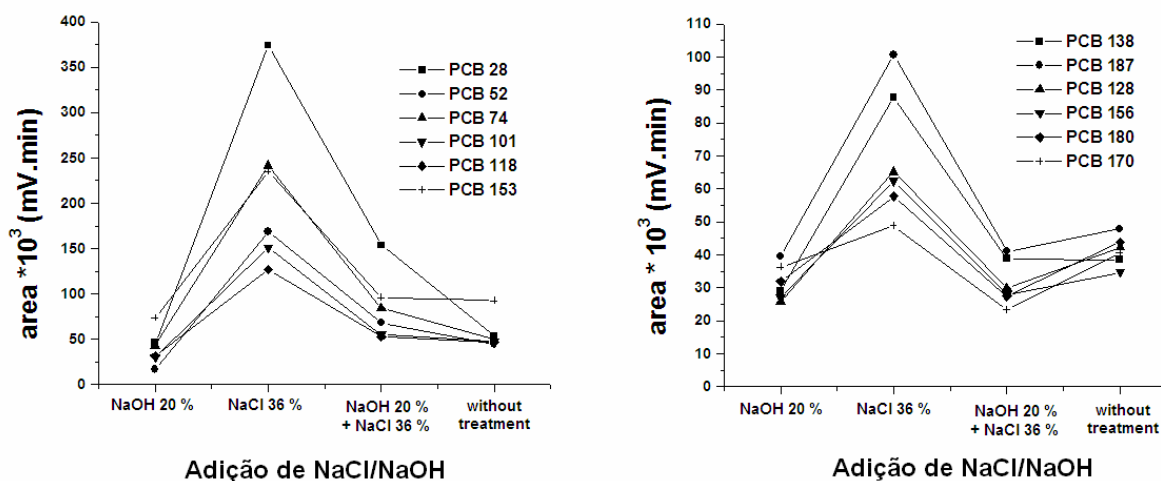


Figura 6. Otimização univariada da saponificação do meio. Leite materno dopado com $9,25 \mu\text{g L}^{-1}$ de cada PCB. $T = 85^\circ\text{C}$; $t = 60 \text{ min}$.

Na Figura 6 vemos que com a adição de 20 % de NaOH na amostra, a área extraída foi muito pequena. Além disso, a presença de NaOH suprimiu o efeito da força iônica exercida pela adição de NaCl. Ambos os resultados podem ser comparados aos obtidos quando a extração foi feita sem NaOH e NaCl, ou seja, não foi observada nenhuma influência positiva da saponificação, diferentemente dos resultados obtidos por Llompart (2001). Sendo assim, essa variável foi descartada do planejamento experimental.

3.2 Planejamento Doehlert

Quando estudamos o processo de forma univariada não se considera o efeito das interações entre variáveis. Em um planejamento fatorial são investigadas as influências de todas as variáveis experimentais de interesse e os efeitos de interação na resposta ou respostas (Silva, 2007, Teófilo, 2006).

Pode-se assumir, desde o início do experimento, que o sistema estudado é regido por alguma função que é descrita pelas variáveis experimentais. Normalmente essa função pode ser aproximada de um polinômio, o qual pode fornecer uma boa descrição entre as variáveis e as respostas obtidas. Para identificar os valores das variáveis que produzam as melhores respostas, ou seja,

encontrar a região ótima, utiliza-se a metodologia de superfície de resposta. Ela baseia-se na construção de modelos matemáticos empíricos que geralmente empregam funções polinomiais lineares ou quadráticas para descrever o sistema estudado e, conseqüentemente, dão condições para explorar o sistema até sua otimização (Silva, 2007, Teófilo, 2006).

Para efeito visual, essas superfícies são plotadas na forma de gráficos 3D, como demonstrado na Figura 7. Sendo assim, o efeito da interação entre as variáveis fica evidente. No nosso caso, 4 variáveis experimentais foram avaliadas, gerando assim 6 superfícies com as seguintes interações: $C_{NaCl} \times T$, $C_{NaCl} \times t$, $C_{NaCl} \times C_{MeOH}$, $T \times t$, $T \times C_{MeOH}$, $t \times C_{MeOH}$. Para cada PCB, 6 superfícies foram geradas, totalizando 72 superfícies. Na Figura 7 temos as superfícies geradas para o PCB 153. Através de uma simples visualização dos gráficos, é possível identificar que a C_{NaCl} e a T são as variáveis que mais influenciam na resposta analítica.

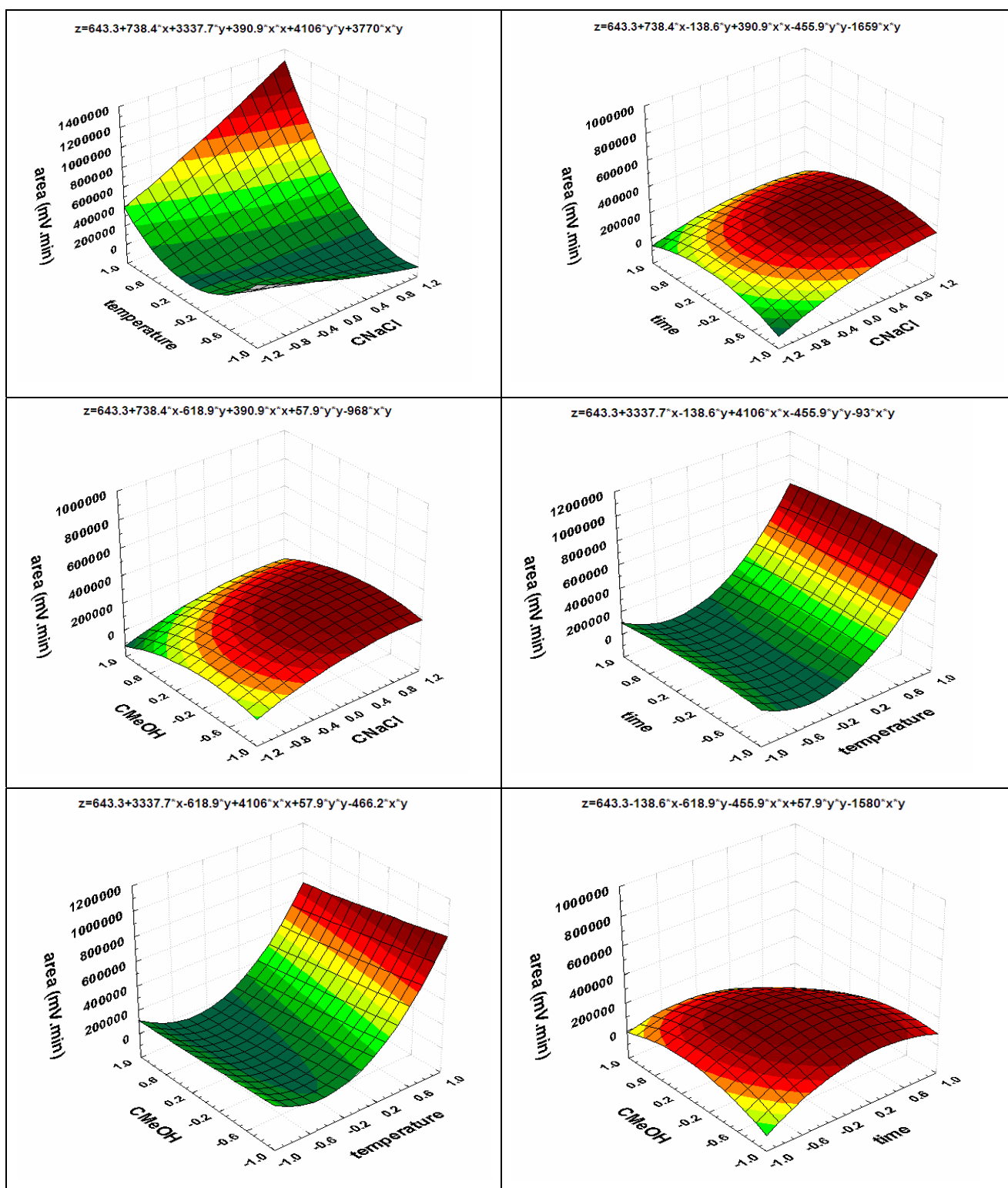


Figura 7. Superfícies de resposta obtidas no planejamento experimental para o PCB 153.

A Tabela 2 mostra os coeficientes polinomiais b obtidos através das superfícies de resposta para cada PCB, ao nível de significância de 0,05, definidos de acordo com o modelo quadrático da Equação 1.

Tabela 2. Coeficientes polinomiais das superfícies de resposta para os PCB individuais determinados por MLR.

Coeficientes	PCB #											
	28	52	74	101	118	153	138	187	128	156	180	170
b_0	<u>345</u>	<u>505</u>	<u>161</u>	<u>245</u>	<u>222</u>	<u>643</u>	<u>215</u>	<u>222</u>	<u>97</u>	<u>113</u>	<u>210</u>	<u>76</u>
Coeficientes de 1ª ordem												
b_1	117	114	<u>134</u>	<u>206</u>	<u>234</u>	<u>738</u>	<u>240</u>	<u>327</u>	<u>46</u>	<u>143</u>	<u>173</u>	<u>129</u>
b_2	196	<u>248</u>	<u>607</u>	<u>736</u>	<u>1188</u>	<u>3338</u>	<u>1217</u>	<u>1856</u>	<u>963</u>	<u>1016</u>	<u>1220</u>	<u>878</u>
b_3	61	148	-3	-52	-69	-139	<u>-70</u>	<u>-117</u>	<u>-47</u>	<u>-46</u>	-37	<u>-45</u>
b_4	-58	-19	<u>-133</u>	<u>-237</u>	<u>-293</u>	<u>-619</u>	<u>-255</u>	<u>-390</u>	<u>-168</u>	<u>-200</u>	<u>-237</u>	<u>-124</u>
Coeficientes de 2ª ordem												
b_{11}	76	270	81	159	<u>189</u>	<u>391</u>	<u>133</u>	<u>196</u>	<u>108</u>	<u>119</u>	109	<u>79</u>
b_{22}	-12	-60	<u>567</u>	<u>578</u>	<u>1264</u>	<u>4106</u>	<u>1539</u>	<u>2416</u>	<u>1349</u>	<u>1405</u>	<u>1637</u>	<u>1349</u>
b_{33}	190	202	-28	-8	-66	<u>-456</u>	<u>-129</u>	<u>-324</u>	<u>-202</u>	<u>-227</u>	<u>-289</u>	<u>-248</u>
b_{44}	104	76	81	130	129	58	71	16	-18	-10	9	-81
Coeficientes de interação												
b_{12}	116	363	<u>576</u>	<u>695</u>	<u>980</u>	<u>3770</u>	<u>1035</u>	<u>1643</u>	<u>151</u>	<u>699</u>	<u>933</u>	<u>695</u>
b_{13}	-109	-137	-297	<u>-377</u>	<u>-536</u>	<u>-1659</u>	<u>-518</u>	<u>-794</u>	<u>-151</u>	<u>-343</u>	<u>-395</u>	<u>-337</u>
b_{14}	-164	-126	-143	-184	<u>-236</u>	<u>-968</u>	<u>-282</u>	<u>-383</u>	-15	<u>-165</u>	<u>-267</u>	<u>-180</u>
b_{23}	-436	-437	-131	<u>-350</u>	<u>-270</u>	-93	-84	-50	<u>79</u>	80	151	<u>160</u>
b_{24}	-102	-407	-69	<u>-336</u>	<u>-319</u>	-466	<u>-236</u>	<u>-310</u>	<u>-73</u>	<u>-146</u>	<u>-273</u>	<u>75</u>
b_{34}	88	87	-98	-244	<u>-423</u>	<u>-1580</u>	<u>-496</u>	<u>-908</u>	<u>-501</u>	<u>-577</u>	<u>-699</u>	<u>-555</u>

Valores sublinhados indicam valores de F{cal} significativos em relação aos valores da distribuição de F tabelado.

A observação dos efeitos significativos dos modelos individuais evidenciou a relação não-linear entre as áreas cromatográficas obtidas para cada conjunto experimental SPME, devido à presença de vários efeitos significativos de segunda ordem. Além disso, pode ser também notado muitos efeitos significativos de interação entre as variáveis. Sendo assim fica evidente que a otimização univariada não é a melhor opção, já que ela pode conduzir à seleção de variáveis operacionais distantes do ótimo, resultando em sensibilidade e detectabilidade significativamente reduzidas considerando o máximo desempenho do método.

Através da observação das superfícies de resposta (Figura 7) e da Tabela 2 verifica-se que para as variáveis C_{NaCl} e T , a maioria dos coeficientes se apresentaram positivos enquanto para as variáveis t e C_{MeOH} os coeficientes se mostraram em grande parte negativos, indicando direções distintas dos valores das variáveis experimentais para o aumento das respostas cromatográficas, para a maioria dos PCB estudados. Assim, geralmente, a adição de NaCl e o aumento na temperatura de extração aumentam a eficiência de extração dos PCB. Do contrário, o indicativo é que períodos intermediários de tempo e baixas concentração do co-solvente metanol ampliam a eficiência de extração na região experimental avaliada.

A qualidade do ajuste dos modelos individuais foi estimada através da análise de variância (ANOVA) apresentada na Tabela 3.

Tabela 3. Análise de variância das regressões quadráticas dos modelos individuais dos PCB, ao nível de significância de 0,05.

Fonte de variação	Soma quadrática (SQ)	Graus de liberdade (GL)	Média quadrática (MQ)	F _{calc}	<i>p</i>	Fonte de variação	Soma quadrática (SQ)	Graus de liberdade (GL)	Média quadrática (MQ)	F _{calc}	<i>p</i>
PCB 28						PCB 52					
Regressão	513325.53	14	36666	5.4472	0.0107	Regressão	893877.91	14	63848	6.05694	0.0076
Resíduos	53849.445	8	6731.2			Resíduos	84330.897	8	10541		
F. Ajuste	28329.835	4	7082.5	1.11012	0.4609	F. Ajuste	59470.905	4	14868	2.39223	0.2095
Erro Puro	25519.61	4	6379.9			Erro Puro	24859.992	4	6215		
Total	5.67E+05	22				Total	1.73E+06	22			
R²	90.5057					R²	91.379				
PCB 74						PCB 101					
Regressão	2840648.2	14	202903	6.89185	0.0079	Regressão	4428071.6	14	316291	9.58803	0.0016
Resíduos	235528.7	8	29441			Resíduos	263904.81	8	32988		
F. Ajuste	229643.8	4	57411	39.0225	0.0064	F. Ajuste	258780.28	4	64695	50.4983	0.0011
Erro Puro	5884.9024	4	1471.2			Erro Puro	5124.5352	4	1281.1		
Total	3.08E+06	22				Total	4.69E+06	22			
R²	92.3435					R²	94.3754				
PCB 118						PCB 153					
Regressão	11479535	14	819967	8.21801	0.0027	Regressão	100571003	14	7E+06	4.33857	0.0216
Resíduos	798214.76	8	99777			Resíduos	13246104	8	2E+06		
F. Ajuste	795570.51	4	198893	300.868	3E-05	F. Ajuste	13228883	4	3E+06	768.182	5E-06
Erro Puro	2644.2526	4	661.06			Erro Puro	17221.034	4	4305.3		
Total	1.23E+07	22				Total	1.14E+08	22			
R²	93.4987					R²	88.3619				

PCB 138						PCB 187					
Regressão	12974491	14	926749	5.08859	0.0189	Regressão	31056671	14	2E+06	4.95899	0.0143
Resíduos	1456983.2	8	182123			Resíduos	3578689.1	8	447336		
F. Ajuste	1454734.6	4	363684	646.954	1E-04	F. Ajuste	3577692.3	4	894423	3589.24	2E-07
Erro Puro	2248.5906	4	562.15			Erro Puro	996.78168	4	249.2		
Total	1.44E+07	22				Total	3.46E+07	22			
R²	89.9041					R²		89.6675			
PCB 128						PCB 156					
Regressão	7982986.5	14	570213	6.22663	0.0069	Regressão	9340492.4	14	667178	4.83431	0.0155
Resíduos	732612.93	8	91577			Resíduos	1104070.8	8	138009		
F. Ajuste	732395.22	4	183099	3364.07	3E-07	F. Ajuste	1103627.9	4	275907	2491.81	5E-07
Erro Puro	217.71092	4	54.428			Erro Puro	442.90189	4	110.73		
Total	8.72E+06	22				Total	1.04E+07	22			
R²	91.5942					R²	89.4292				
PCB 180						PCB 170					
Regressão	13363859	14	954561	4.5158	0.0191	Regressão	7582845.2	14	541632	3.27494	0.0484
Resíduos	1691061	8	211383			Resíduos	1323094.8	8	165387		
F. Ajuste	1689474.6	4	422369	1064.94	3E-06	F. Ajuste	1322867.1	4	330717	5810.2	9E-08
Erro Puro	1586.4553	4	396.61			Erro Puro	227.68009	4	56.92		
Total	1.51E+07	22				Total	8.91E+06	22			
R²	88.7674					R²	85.1437				

De acordo com a Tabela 3, as regressões para todos os PCB estudados foram estatisticamente válidas, considerando 95 % de confiabilidade. Entretanto, também ocorreu falta de ajuste dos modelos para a maioria dos analitos ao mesmo nível de confiança o que indica discrepância entre os resultados previstos pelo modelo matemático e os resultados obtidos no conjunto experimental. Em outras palavras, grande parte dos resultados não foi explicada pela equação de regressão, mas sim pelo resíduo, resultando em um modelo estatístico inadequado. Além disso, pelos coeficientes significativos das interações entre as variáveis (p menor que o nível de significância $\alpha=0,05$), pode-se estimar que o efeito das variações dos parâmetros operacionais na eficiência de extração não é independente.

Ainda, cada PCB gerou um modelo individual diferente, cada qual com condições operacionais distintas, tornando a escolha de uma condição particular para a extração simultânea dos PCB essencialmente subjetiva (para o PCB 153, temos a Figura 7).

Na Figura 4 é apresentada uma comparação entre as melhores condições experimentais observadas na otimização univariada e multivariada. É possível observar que condições experimentais mais específicas para cada PCB são obtidas através do planejamento, já que o domínio da vizinhança é considerado neste estudo, enquanto que no univariado, somente os pontos experimentais em si são considerados. Outra fonte de variação dos resultados vem das interações entre as variáveis, que somente são consideradas no planejamento experimental.

Tabela 4. Comparação entre as melhores condições experimentais apresentadas pelo estudo univariado e pelo planejamento experimental.

Estudo Univariado												
PCB	28	52	74	101	118	153	138	187	128	156	180	170
t (min)	50,0	50,0	75,0	60,0	75,0	75,0	75,0	75,0	75,0	75,0	90,0	90,0
T (°C)	80,0	80,0	80,0	80,0	80,0	80,0	80,0	80,0	80,0	80,0	80,0	80,0
C _{NaCl} (% v/v)	36,0	18,0	36,0	18,0	18,0	18,0	18,0	18,0	18,0	18,0	18,0	18,0
C _{MeOH} (% v/v)	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Estudo Multivariado												
PCB	28	52	74	101	118	153	138	187	128	156	180	170
t (min)	70,0	100,0	62,5	62,5	62,5	70,0	70,0- 92,5	70,0- 92,5	70,0- 92,5	70,0- 92,5	70,0- 92,5	70,0- 92,5
T (°C)	95,0	95,0	95,0	95,0	95,0	95,0	95,0	95,0	95,0	95,0	95,0	95,0
C _{NaCl} (% v/v)	36,0	36,0	36,0	36,0	36,0	36,0	36,0	36,0	18,0- 27,0	27,0	27,0	27,0
C _{MeOH} (% v/v)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0- 5,0	0,0- 5,0	0,0- 5,0	0,0- 5,0	0,0- 5,0	0,0- 5,0	5,0

A causa para esta complexa dependência entre a eficiência de extração e os parâmetros experimentais pode ser discutida em termos dos aspectos cinéticos e termodinâmicos da *headspace* SPME. Os efeitos individuais dos parâmetros operacionais básicos, tais como tempo e temperatura de extração e força iônica do meio podem ser tratados considerando a teoria da SPME (Pawliszyn, 1997):

a) Quando a fibra é exposta à amostra ou ao *headspace* da amostra, os analitos transportados para a superfície da fibra por difusão ou convecção podem ser sorvidos pela fibra. Eventualmente, um equilíbrio entre as espécies sorvidas no recobrimento da fibra, dissolvidas na amostra, e presentes no *headspace* é

alcançado. Após esse tempo de equilíbrio, as massas extraídas se apresentam maximizadas e permanecem constantes.

b) No equilíbrio, a massa extraída depende da concentração do analito na amostra e das constantes de equilíbrio da distribuição dos analitos entre a fibra, a matriz da amostra, e o *headspace*. Estas constantes, e assim as massas extraídas, são função da temperatura, usualmente decrescendo a temperaturas muito altas.

c) A presença de eletrólitos, tais como NaCl, nas amostras aquosas decresce a atividade do solvente (água), aumentando a atividade do analito e deslocando o equilíbrio de extração. Na maioria dos casos, especialmente para espécies não-polares, a massa extraída aumenta quando eletrólitos fortes são adicionados a amostras aquosas.

Finalmente, temos que amostras aquosas adicionadas de pequenas quantidades de solventes orgânicos miscíveis em água, tais como metanol ou acetonitrila, podem ter ampliada a eficiência de extração de compostos altamente hidrofóbicos (Garcia-Falcon, 2004), tais como os PCB, desde que reduzem as quantidades perdidas por adsorção nas superfícies dos frascos, barra magnética, gotículas de gordura, ou agregados protéicos do leite. Entretanto, esse efeito é devido ao aumento na solubilidade dos analitos no meio. Um aumento excessivo de co-solvente pode mudar as constantes de equilíbrio amostra/*headspace* e amostra/fibra para os analitos, reduzindo as quantidades extraídas na condição de equilíbrio.

Por isso, dependências complexas entre a eficiência de extração e os parâmetros operacionais são esperadas em aplicações de SPME e devem ser consideradas em cada nova matriz e/ou analito testados.

4. Conclusões e perspectivas

Neste estudo, o uso de planejamento experimental como ferramenta para otimizar a extração dos PCB foi importante pois identificou faixas experimentais favoráveis para se obter máxima capacidade de extração. Alguns dos resultados

obtidos através do planejamento foram similares aos obtidos pelo estudo univariado, no entanto, como esse último não considera a interação entre variáveis, condições experimentais diferentes foram observadas na maioria dos casos. Além disso, diferentes parâmetros de SPME ótimos foram obtidos para os diferentes PCB analisados (tanto no estudo uni como multivariado), dificultando o ajuste das condições de forma a satisfazer simultaneamente altas áreas extraídas para os doze PCB. Essa limitação indica a necessidade da realização de estratégias matemáticas e computacionais mais adequadas com o objetivo de alcançar o compromisso ideal, ou quase ideal, entre altos valores de áreas cromatográficas para todos os PCB simultaneamente e valores operacionais adequados para todas as variáveis.

5. Referências

1. LeBlanc, G. A.; In *Basics of environmental toxicology*; Hodgson, E; Levi, P. E., eds.; A Textbook of modern toxicology. Appleton & Lange, Samford, Connecticut, USA, 2nd ed, 1997, 389.
2. Jones, K. C.; Voogt, P. de.; *Environ. Pollut.* **1999**, 100, 209.
3. Jensen, S., *Ambio*, **1972**, 1, 123.
4. WHO; *Air Quality Guideline*. Copenhagen, **2000**, 2, 1.
5. Jaraczewska, K.; Lulek, J.; Covaci, A.; Voorspoels, S.; Kaluba-Skotarczak, A.; Drews, K.; Schepens, P.; *Sci. Total Environ.* **2006**, 372, 20.
6. Hong, E.; Pyo, H.; Park, S-J.; Lee, W.; *Anal. Chim. Acta* **2005**, 539, 55.
7. Heck, M. C.; Santos, J. S.; Bogusz Jr., S.; Costabeber, I.; Emanuelli, T.; *Food Chem.* **2007**, 102, 288.
8. Johansen, P.; Muir, D.; Asmund, G.; Riget, F.; *Sci. Total Environ*, **2004**, 31, 189.
9. Schecter, A.; Cramer, P.; Boggess, K.; Stanley, J.; Olson, J. R.; *Chemosphere* **1997**, 34, 1437.
10. Basheer, C.; Lee, H. K.; Obbard, J. P.; *J. Chromatogr. A* **2004**, 1022, 161.

11. Llompart, M.; Pazos, M.; Landín, P.; Cela, R.; *Anal. Chem.* **2001**, 73, 5858.
12. Arthur, C.L.; Pawliszyn, J.; *Anal. Chem.* **1990**, 62, 2145.
13. Massart, D. L.; Vandeginste, B. G. M.; Buydens, L. M. C.; Jong, S. de; Lewi, P. J.; Smeyer-Verbeke, J.; *Handbook of chemometrics and qualimetrics Part A*, Elsevier, Amsterdam, 1997.
14. Araújo, P. W.; Brereton, R. G.; *Trends Anal. Chem.* **1996**, 15, 63.
15. Lundstedt, T.; Seifert, E.; Abrano, L.; Thelin, B.; Nystrom, A.; Pettersen, J.; Bergman, R.; *Chemometr. Intell. Lab. Syst.* **1998**, 42, 3.
16. Doehlert, D. H.; *Appl. Statist.*, **1970**, 19, 231.
17. Silva, G. A.; *Tese de Doutorado*, Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 2007.
18. Ferreira, S. L. C.; Santos, W. N. L. dos; Quintella, C. M.; Neto, B. B.; Bosque-Sendra, J. M.; *Talanta* **2004**, 63, 1061.
19. Butine, W. L.; Weigend, A. S.; *Complex Syst.* **1991**, 5, 603.
20. Teófilo, R. F.; Ferreira, M. M. C.; *Quim. Nova* **2006**, 29, 338.
21. Potter, D. W.; Pawliszyn, J.; *Environ. Sci. Technol.* **1994**, 28, 298.
22. Röhrig, L.; Meisch, H.-U.; *Fresenius J. Anal. Chem.* **2000**, 366, 106.
23. Kowalski, C.H.; Da Silva, G.A.; Poppi, R.J.; Godoy, H.T.; Augusto, F. *Anal. Chim. Acta*, **2007**, 585, 66.
24. <http://www.originlab.com>, acessada em 13 de maio de 2007.
25. <http://www.statsoft.com>, acessada em 05 de maio de 2007.
26. Komatsu, E.; Vaz, J. M.; *Quím. Nova* **2004**, 27, 720.
27. Montes, R.; Ramil, M.; Rodriguez, I.; Rubí, E.; Cela, R.; *J. Chromatogr. A* **2006**, 1124, 43.
28. Pawliszyn, J.; *Solid phase microextraction: Theory and practice*. Wiley: New York, 1997.
29. Theodoridis, G.; Koster, E. H. M.; Jong, G. J. de; *J. Chromatogr. B* **2000**, 745, 49.
30. Valente, A. L. P.; Augusto, F.; *Quím. Nova* **2000**, 23, 523.

31. Penalver, A.; Pocurrull, E.; Borrull, F.; Marcé, R.M.; *Trends Anal. Chem.* **1999**, 18, 557.
32. Garcia-Falcon, M. S.; Perez-Lamela, M.; Simal-Gándara, J.; *J. Agric. Food Chem.* **2004**, 52, 6897.

CAPÍTULO 2

NEURO-GENETIC MULTIOPTIMIZATION OF THE DETERMINATION OF POLYCHLORINATED BIPHENYL CONGENERS IN HUMAN MILK BY HEADSPACE SOLID-PHASE MICROEXTRACTION-GAS CHROMATOGRAPHIC-ELECTRON CAPTURE DETECTION

**Cláudia Hoffmann Kowalski^{1*}; Gilmare Antônia da Silva²; Ronei Jesus Poppi²;
Helena Teixeira Godoy¹; Fabio Augusto²**

¹ Department of Food Science, Faculty of Food Engineering, State University of Campinas (UNICAMP), P.O. Box 6121, Campinas, SP, Brazil.

² Department of Analytical Chemistry, Institute of Chemistry, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), State University of Campinas (UNICAMP), P.O. Box 6154, Campinas, SP, Brazil.

* claukowalski@gmail.com

(Manuscrito publicado no periódico *Analytica Chimica Acta*)

C.H. Kowalski, G.A. Da Silva, R.J. Poppi, H.T. Godoy, F. Augusto. Neuro-genetic multioptimization of the determination of polychlorinated biphenyl congeners in human milk by headspace solid-phase microextraction-gas chromatographic-electron capture detection, *Anal. Chim. Acta*, **2007**, 585, 66-75.

Abstract

Polychlorinated biphenyls (PCB) can eventually contaminate breast milk, which is a serious issue to the newborn due to their high vulnerability. Solid phase microextraction (SPME) can be a very convenient technique for their isolation and pre-concentration prior chromatographic analysis. Here, a simultaneous multioptimization strategy based on a neuro-genetic approach was applied to a headspace SPME method for determination of 12 PCB in human milk. Gas chromatography with electron capture detection (ECD) was adopted for the separation and detection of the analytes. Experiments according to a Doehlert design were carried out with varied extraction time and temperature, media ionic strength and concentration of the methanol (co-solvent). To find the best model that simultaneously correlate all PCB peak areas and SPME extraction conditions, a multivariate calibration method based on a Bayesian Neural Network (BNN) was applied. The net output from the neural network was used as input in a genetic algorithm (GA) optimization operation (neuro-genetic approach). The GA pointed out that the best values of the overall SPME operational conditions were the saturation of the media with NaCl, extraction temperature of 95 °C, extraction time of 60 min and addition of 5% (v/v) methanol to the media. These optimized parameters resulted in the decrease of the detection limits and increase on the sensitivity for all tested analytes, showing that the use of neuro-genetic approach can be a promising way for optimization of SPME methods.

Keywords: Multioptimization; Neuro-genetic approach; Doehlert design; Solid phase microextraction; Polychlorinated biphenyls.

1. Introduction

Polychlorinated biphenyls (PCB) are synthetic chlorinated compounds consisting of two benzene rings linked by a single carbon–carbon bond where the chlorine atoms (up to 10) are substituents on the rings. They were used in plastifiers and formulation of coatings, inks, adhesives, flame retardants, pesticide extenders and in the micro-encapsulation of dyes for carbonless duplicating papers. PCB are rapidly absorbed from the gastrointestinal tract, and are distributed and accumulated in the liver and adipose tissues [1]. Over 90% of human exposure to these species takes place through diet, predominantly by meat, fish and poultry [2]. Toddlers can also be exposed during breastfeeding [3]; indeed, they may have a much higher PCB intake than adults [4]. The general toxic effects of PCB include liver damage, immunosuppression, neuropathy and increased risk of cancer [5]. In response to their adverse effects, production and use of PCB were restricted and banned in Europe and North America during the 1970s and, consequently, the levels of PCB in human are now decreasing [6]. Regulatory limits for PCB in dairy milk in various countries vary from 20 to 60 $\mu\text{g kg}^{-1}$ [7].

Due to the low levels usually found, gas chromatography with electron capture detection (GC-ECD) has been the technique of choice for separation and detection of PCB isomers. However, prior to chromatographic analysis, sample preparation procedures are necessary to isolate and pre-concentrate the analytes. Solid phase microextraction (SPME) – a simple, fast, reliable and solvent-free extraction technique – can be employed on chromatographic determination of PCB [8]. This technique is based on the distribution of the analytes between the matrix and the coating of a fused silica fiber (direct mode) or between the gas phase above the sample and the SPME fiber coating (headspace mode) [9]. SPME has been extensively applied to varied analytes and matrixes, ranging from the determination of volatile organics released from aromatic plants [10] and foodstuff [11] to the evaluation of industrial processes [12].

Although optimization of SPME methods is habitually performed by univariate procedures, multivariate procedures are becoming widespread. Two-level factorial design has widely been applied for the development of SPME methods including: quantification of pesticides in herbal infusions [13]; of pesticides [14], phthalates [15], phenolic flame retardants [16] and synthetic musks [17] in water; for derivatization and quantification of inorganic and organic mercury species [18]. However, response surface methodologies are more suitable when complex dependencies between response and operational parameters are expected. In these cases, experimental designs arranged according to Doehlert matrixes are useful to generate the necessary data [19], demanding fewer experiments and allowing choice of the number of levels for each optimized variable according to their impact on the response. The convenience of the optimization of SPME procedures through response surfaces calculated after Doehlert experimental designs has been demonstrated [20].

Multiple linear regression (MLR) algorithms can be used to find the mathematical models associated to the response surfaces and relating the response as function of the studied variables. Alternatively, artificial neural networks (ANN) can also be employed on response surface modeling [21]: it does not demand formal knowledge of the mathematical function describing the response surface and allows complex, non-linear response/data relationships to be modeled. ANN can also be convenient on simultaneous multioptimization of several analytical responses [22]; for example, Novotná et al. [23] successfully employed ANN for the simultaneous optimization of the HPLC separation conditions for ten neuroprotective peptides. This is also the case of SPME methods for determination of a large group of analytes on complex matrixes, which should be optimized taking in account responses associated to all analytes simultaneously.

Routines allowing estimation of the response surfaces from a limited number of experimental points are desirable, for practical reasons, such as the case with the variant of ANN known as Bayesian Neural Network (BNN) [24]. BNN, where

the generalization process is improved applying Bayesian statistic concepts to the regularization process, is highly appropriate to situations where the number of samples is thought small and where network overfitting is possible; in other words, the error on the training set is small, but when new data is presented to the network the error is large. During the network general training process, it obtains its weights (w) and bias (b) for each connection reaching output values as close as possible to the actual outputs, minimizing the error function given by Eq. (1) [25]:

$$E = \sum_{m=1}^p \sum_{k=1}^n (y_{m,k} - t_{m,k})^2 \quad (1)$$

where t is the target (actual) value; y the predicted value (net output); n the number of experiments in training set; and p the number of dependent variables or responses to be optimized. The correction of weights and bias is continued until the error function converged to a minimum.

In the regularization process, a modification of the error function (Eq. (1)) is accomplished by adding a term that consists of the mean of the sum of squares of the network weights and biases:

$$F_{reg} = \gamma E + (1 - \gamma) msw \quad (2)$$

where γ is the performance ratio and

$$msw = \frac{1}{n} \sum_{j=1}^n w_j^2 \quad (3)$$

The Bayes' theorem allows the optimum regularization to be applied to the modeling process [26]. In this framework, the weights and biases of the network are assumed to random variables with specified distribution. The regularization parameters, for improving generalization, are related to the unknown variances associated with these distributions. The Bayesian approach to neural network modeling considers all possible values of network parameters weighted by the probability of each set of weights. Bayesian methods are complementary to neural network as they overcome the tendency of an overflexible network to discover non-existent or excessively complex data models [27].

The application of optimization algorithms after modeling the system by ANN is necessary to determine the desired optimized experimental conditions. Non-derivative methods, such as the genetic algorithm (GA) are especially suitable, since they are more robust than other alternatives and provide faster convergence [28]. GA emulates the biological evolutionary theory and allow to find a global, true optimized condition among several possible local alternatives. The process begins with a randomly created population of individuals. Genetic operators, such as selection, crossover and mutation are applied and the best specimens from the set are selected; their genes are transferred to the next generation. This process is repeated until a single individual has the best fitness: this is the best solution to the problem. It is much superior to conventional search and optimization techniques in high-dimensional problem spaces due their inherent parallelism and directed stochastic search implemented by recombination operators [29].

In this work, a method for the determination of 12 PCB congeners in breast milk combining headspace SPME and GC-ECD (HS-SPME-GC-ECD) was developed and validated. BNN was employed to find a model that correlates the PCB peak areas with SPME operational parameters: media ionic strength (C_{NaCl}), extraction temperature (T) and time (t) and concentration of the methanol added as co-solvent (C_{MeOH}). GA was applied to this model to find the operational conditions that provides the maximized chromatographic responses for all evaluated analytes simultaneously. The loss-minimization function [30] (Eq. (4)), defined by the sum of the weighted relative deviations, was minimized through the GA algorithm.

$$\varphi = \sum_{i=1}^m w_i \left[\frac{Q(x_1, x_2, \dots, x_n) - Q^*}{Q^*} \right]^2 \quad (4)$$

In Eq. (4), φ is the loss-minimization function, w_i is the weight factor for $i=1-m$, where m is the number of objectives (i.e., the number of PCB). The term $Q(x_1, x_2, \dots, x_n)$ corresponds to the objective function and n indicates the number of independent variables that was related to the HS-SPME parameters. The objective function is the output value of the trained BNN. Q^* corresponds to the individual

optimum value of the objective function, defined as the maximum possible peak area for each individual PCB.

2. Experimental

2.1 Materials and samples

A standard PCB mix in isooctane (IUPAC 28, 53, 74, 101, 118, 128, 138, 153, 156, 170, 180 and 187) was obtained from AccuStandard (New Haven, CT). Methanol from Merck (Darmstadt, Germany), NaCl P.A. from Ecibra (São Paulo, Brazil), pesticide-grade isooctane from Mallinckrodt (Kentucky, PA) and deionized water purified through a Millipore Milli-Q system (Bedford, MA) were also used. Polydimethylsiloxane (PDMS) 100µm SPME fibers fitted in the appropriate holder were supplied by Supelco (Bellefonte, PA) and conditioned prior use according the supplier's instructions. Septum-sealed 16 mL glass vials were obtained from Pierce (Rockford, IL). Control of extraction temperature was done by a Cole-Parmer heated circulating bath (Vernon Hills, IL).

For the optimization studies, human milk samples exempt of detectable PCB was spiked with known amounts of the PCB. The spiked milk was cooled at about 4 °C for 24 h to allow equilibration between the active biological milk compounds and the added species, as described in literature [31]. For the optimization studies, the individual PCB spiked concentration was 9.25 µg L⁻¹; for the validation experiments, blank samples were spiked with amounts ranging from 1.00 to 16.0 µg L⁻¹ of the analytes.

2.2 Instruments

All chromatographic analysis were performed in an AutoSystemXL GC-ECD (Perkin-Elmer, Norwalk, CT) fitted with a 30 m x 0.32 mm x 0.25 µm HP-1MS column (Agilent, Wilmington, DE). The split-splitless injector was operated in the splitless mode and fitted with a suitable liner for SPME. The oven temperature was programmed as follows: 40 °C hold for 2 min, then 30 °C min⁻¹ to 190 °C, hold for 5 min, then 5 °C min⁻¹ to 220 °C, hold for 5 min and finally, 20 °C min⁻¹ up to 300 °C

and hold for 1 min. The injector and detector temperatures were 280 and 320 °C, respectively. The carrier gas was 99.999% pure He (flow rate of 1.3 mL min⁻¹); 99.999% pure nitrogen was the detector make-up gas.

2.3 General SPME procedure

For all the experiments, to 5 mL of spiked milk enclosed in a sample vials, proper amounts of methanol (up to 5.0%, v/v) and NaCl (up to 36%, m/v) were added. After magnetic stirring of the sample for 10 min at 1200 rpm for sample/headspace equilibration, a SPME fiber was exposed to the headspace for periods between 40 and 100 min. The extracted analytes were immediately desorbed in the GC injector at 280 °C and the fiber was kept there for 5 min. During the sample/headspace equilibration and extraction, the sample temperature was kept constant between 45.0 and 95.0 °C. Carryover between injections was prevented checked by blank runs after each extraction. For each extraction for the method optimization, values for the concentrations of methanol (**C_{MeOH}**) and NaCl (**C_{NaCl}**) added to the sample, extraction time (**t**) and temperature (**T**) were selected according to a multivariate Doehlert experimental design (Table 1).

The number of levels for each optimizable parameter was five for **C_{NaCl}**, seven for **T** and **t** and three for **C_{MeOH}**; more levels were allotted to variables known to have more impact in the response (peak areas of the PCB). The number of experiments was 25, including five replicates of the central point (**C_{MeOH}** = 2.5%, m/v; **C_{NaCl}** = 18%, m/v; **T**=70.C; **t** = 70 min) were performed to estimate the repeatability. For the validation of the final method, all extractions were conducted using the optimized conditions (**C_{MeOH}** = 5.0 %, v/v; **C_{NaCl}** = 36%, m/v; **T**=95.C; **t** = 60 min).

Table 1. Real and coded values (between parentheses) for the operational variables for the optimization experiments determined according Doehlert matrix: concentration of NaCl C_{NaCl} (% m/v), extraction temperature T (°C), extraction time t (min) and concentration of methanol C_{MeOH} (% v/v).

#	C_{NaCl}	T	T	C_{MeOH}
1 ^a	18 (0.0)	70.0 (0.000)	70.0 (0.000)	5.0 (0.000)
2	36 (1.0)	70.0 (0.000)	70.0 (0.000)	5.0 (0.000)
3	27 (0.5)	95.0 (0.866)	70.0 (0.000)	5.0 (0.000)
4	27 (0.5)	78.3 (0.289)	100.0 (0.817)	5.0 (0.000)
5	27 (0.5)	78.3 (0.289)	77.5 (0.204)	10.0 (0.791)
6	0 (-1.0)	70.0 (0.000)	70.0 (0.000)	5.0 (0.000)
7	9 (-0.5)	45.0 (-0.866)	70.0 (0.000)	5.0 (0.000)
8	9 (-0.5)	61.7 (-0.289)	40.0 (-0.817)	5.0 (0.000)
9	9 (-0.5)	61.7 (-0.289)	62.5 (-0.204)	0.0 (-0.791)
10	27 (0.5)	45.0 (-0.866)	70.0 (0.000)	5.0 (0.000)
11	27 (0.5)	61.7 (-0.289)	40.0 (-0.817)	5.0 (0.000)
12	27 (0.5)	61.7 (-0.289)	62.5 (-0.204)	0.0 (-0.791)
13	9 (-0.5)	95.0 (0.866)	70.0 (0.000)	5.0 (0.000)
14	18 (0.0)	86.7 (0.577)	40.0 (-0.817)	5.0 (0.000)
15	18 (0.0)	86.7 (0.577)	62.5 (-0.204)	0.0 (-0.791)
16	9 (-0.5)	78.3 (0.289)	100 (0.817)	5.0 (0.000)
17	18 (0.0)	53.3 (-0.577)	100 (0.817)	5.0 (0.000)
18	18 (0.0)	70 (0.000)	92.5 (0.613)	0 (-0.791)
19	9 (-0.5)	78.3 (0.289)	77.5 (0.204)	10.0 (0.791)
20	18 (0.0)	53.3 (-0.577)	77.5 (0.204)	10.0 (0.791)
21	18 (0.0)	70 (0.000)	47.5 (-0.613)	10.0 (0.791)

^a Central point (extraction performed in triplicate).

2.4 Software

All calculations were performed using the MATLAB 6.5 platform (The MathWorks, Natick, MA). The Bayesian Neural Network routine from the MATLAB Neural Network Toolbox 3.0 (MathWorks) and an independent GA toolbox

implementation [32] were combined to perform the neuro-genetic modeling and optimization.

2.5 Response modeling by MLR and BNN

The peak areas for each of the PCB measured after the 25 extractions performed according the Doehlert design were employed in all calculations. Two approaches were compared: conventional MLR (where response surfaces for each pesticide were modeled separately) and BNN (a common model was evaluated considering simultaneously all PCB peak areas). The mathematical model adopted for the individual response surfaces estimation by MLR is expressed in Eq. (5):

$$z = b_0 + b_1C_{\text{NaCl}} + b_2T + b_3t + b_4C_{\text{MeOH}} + b_{11}C_{\text{NaCl}}^2 + b_{22}T^2 + b_{33}t^2 + b_{44}C_{\text{MeOH}}^2 + b_{12}C_{\text{NaCl}}T + b_{13}C_{\text{NaCl}}t + b_{14}C_{\text{NaCl}}C_{\text{MeOH}} + b_{23}Tt + b_{24}TC_{\text{MeOH}} + b_{34}tC_{\text{MeOH}} \quad (5)$$

where z is the response (peak area of the PCB) and b is the regression coefficients. As for the BNN, in this work, it was applied with a tangent sigmoid transfer function in the hidden layer and in the output layer, four neurons in the input layer (corresponding to the operational variables to be optimized) and 12 neurons in the output layer, equivalent to the PCB studied (Fig. 1). The BNN architecture optimization was performed varying the number of neurons in the intermediate layer from 1 to 20 and proceeding 5 replicates to each network architecture generated. The quality of the MLR response surfaces were evaluated through ANOVA tables; the BNN model evaluated considering the root mean square errors (RMSE) calculated using the model residues.

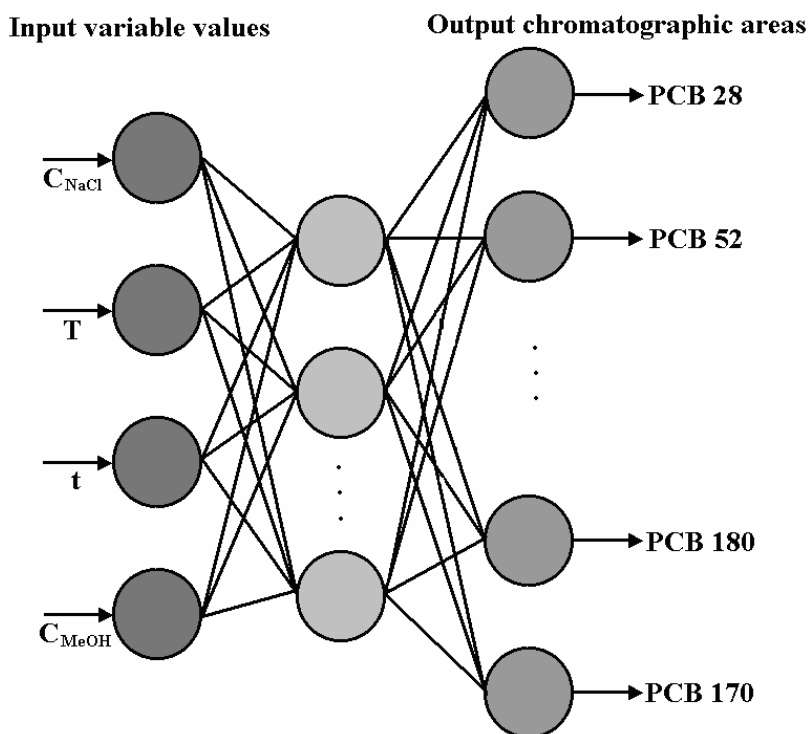


Figure 1. Structure of the artificial neural network with the number of neurons in the input and output layers used in this work. In the input layers are presented the SPME variable values and in the output layers are obtained the PCB chromatographic areas.

2.6. Neuro-genetic optimization

The BNN modeled above (Section 2.5) was combined to the GA for the neuro-genetic optimization. The weight factors for each PCB used in the loss-minimization function (Eq. (4)) were calculated from the chromatograms obtained in the central point in the Doehlert design and defined as the ratio between the peak areas of each PCB and of PCB 156 (the larger peak in the set). This procedure assures that all PCB will have the same influence in the calculation of the loss function.

The experimental variables (C_{NaCl} , T , t and C_{MeOH}) were codified in such a way that each variable was presented as a gene in a binary number form with 16

bits of resolution (Fig. 2). As for the GA, the population consisted on 100 individuals. During the evolution, the probability of two random chromosomes mate in the crossover was 90% and the probability of mutation was 1%. The evolutionary process was continued until $\varphi \leq 10^{-3}$ or the number of generations reached 100. The set of experimental conditions pointed as optimum after the neuro-genetic optimization was adopted for the remainder extractions.

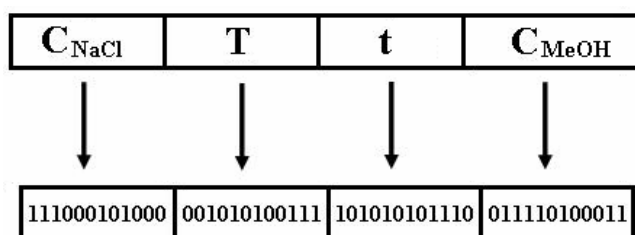


Figure 2. Codification of each variable in the genetic algorithm.

2.7 SPME method validation

The detection and quantification limits of the optimized HS-SPME-GC-ECD method (concentrations of analyte resulting in S/N (signal to noise) ratios of 3 and 10, respectively [33]), were estimated after extractions of blank and spiked ($1.00 \mu\text{g mL}^{-1}$) human milk. Recovery for two levels of concentration (4 and $8 \mu\text{g L}^{-1}$) were estimated; analytical curves in the range from 1.00 to $16.0 \mu\text{g L}^{-1}$ (five points, $n = 3$) were employed.

3. Results and discussion

3.1. Optimization through individual PCB response surfaces determined by MLR

The polynomial coefficients for the response surfaces for each PCB, defined according the quadratic model defined by Eq. (5) and found by MLR on the experimental data, are shown in Table 2.

Table 2. Polynomial coefficients for the individual PCB quadratic response surfaces determined by MLR.

Coefficient ^a	PCB #											
	28	52	74	101	118	153	138	187	128	156	180	170
b ₀	<u>345*</u>	<u>505</u>	<u>161</u>	<u>245</u>	<u>222</u>	<u>643</u>	<u>215</u>	<u>222</u>	<u>97</u>	<u>113</u>	<u>210</u>	<u>76</u>
First-degree coefficients												
b ₁	117	114	<u>134</u>	<u>206</u>	<u>234</u>	<u>738</u>	<u>240</u>	<u>327</u>	<u>46</u>	<u>143</u>	<u>173</u>	<u>129</u>
b ₂	196	<u>248</u>	<u>607</u>	<u>736</u>	<u>1188</u>	<u>3337</u>	<u>1217</u>	<u>1856</u>	<u>963</u>	<u>1016</u>	<u>1220</u>	<u>878</u>
b ₃	61	148	-3	-52	-69	-139	<u>-70</u>	<u>-117</u>	<u>-47</u>	<u>-46</u>	-37	<u>-45</u>
b ₄	-58	-19	<u>-133</u>	<u>-237</u>	<u>-293</u>	<u>-619</u>	<u>-255</u>	<u>-390</u>	<u>-168</u>	<u>-200</u>	<u>-237</u>	<u>-124</u>
Second-degree coefficients												
b ₁₁	76	270	81	159	<u>189</u>	<u>391</u>	<u>133</u>	<u>196</u>	<u>108</u>	<u>119</u>	109	<u>79</u>
b ₂₂	-12	-60	<u>567</u>	<u>578</u>	<u>1264</u>	<u>4106</u>	<u>1539</u>	<u>2416</u>	<u>1349</u>	<u>1405</u>	<u>1637</u>	<u>1349</u>
b ₃₃	190	202	-28	-8	-66	<u>-456</u>	<u>-129</u>	<u>-324</u>	<u>-202</u>	<u>-227</u>	<u>-289</u>	<u>-248</u>
b ₄₄	104	76	81	130	129	58	71	16	-18	-10	9	<u>-81</u>
Interaction coefficients												
b ₁₂	116	363	<u>576</u>	<u>695</u>	<u>980</u>	<u>3770</u>	<u>1035</u>	<u>1643</u>	<u>151</u>	<u>699</u>	<u>933</u>	<u>695</u>
b ₁₃	-109	-137	-297	<u>-377</u>	<u>-536</u>	<u>-1659</u>	<u>-518</u>	<u>-794</u>	<u>-151</u>	<u>-343</u>	<u>-395</u>	<u>-337</u>
b ₁₄	-164	-126	-143	-184	<u>-236</u>	<u>-968</u>	<u>-282</u>	<u>-383</u>	-15	<u>-165</u>	<u>-267</u>	<u>-180</u>
b ₂₃	-436	-437	-131	<u>-350</u>	<u>-270</u>	-93	-84	-50	<u>79</u>	80	151	<u>160</u>
b ₂₄	-102	-407	-69	<u>-336</u>	<u>-319</u>	-466	<u>-236</u>	<u>-310</u>	<u>-73</u>	<u>-146</u>	<u>-273</u>	<u>75</u>
b ₃₄	88	87	-98	-244	<u>-423</u>	<u>-1580</u>	<u>-495</u>	<u>-908</u>	<u>-501</u>	<u>-577</u>	<u>-699</u>	<u>-555</u>

Note: Bold underlined data, statistically significant coefficients at a 95 % confidence level.

* Indexes defined according Eq. (5) (text).

For most of the individual PCB response surfaces, most of the second-degree polynomial coefficients are significantly different from zero, as well as several of the coefficients denoting interactions between the variables. Therefore, there is a non-linear relationship between the chromatographic areas obtained for each PCB and the SPME experimental conditions under evaluation. In this case, classic univariate optimization procedures are inconvenient since they can suggest the selection of values for the operational conditions far from optimum, resulting on sensitivities and detectabilities that can be significantly reduced compared to the maximum attainable performance of the method. As for the coefficients themselves, the positive values for most of the coefficients for C_{NaCl} (b_1 and b_{11}) and for T (b_2 and b_{22}) suggests that addition of NaCl and increase on the extraction temperature generally improves the extraction efficiency of the PCB. On the contrary, as the majority of the coefficients for t (b_3 and b_{33}) and C_{MeOH} (b_4 and b_{44}) indicates that the extracted amounts of PCB are maximized by short extraction times and low concentrations of the methanol co-solvent within the evaluated experimental region.

The quality of the adjust of the experimental data to the individual response surfaces shown in [Table 2](#) can be assessed through ANOVA analysis, whose results are shown in [Table 3](#).

According to the ANOVA coefficients, the models found for all PCB are statistically valid ($F_{cal} > F_{crit}$ for 95% confidence level). This is a confirmation that, at least for the analytical problem studied here, the dependence between the extracted masses and SPME operational parameters is non-linear. Also, since most of the inter-variable polynomial coefficients, such as b_{12} (C_{NaCl} and T) are statistically significant, the effect of variations on the operational parameters on the extraction efficiency is not independent. Therefore, univariate optimization or even simple two-level factorial design strategies are not suitable for optimization of the SPME method and may not lead to the best possible set of values for the operational parameters. Other aspect from [Table 3](#) is that most of the MLR models show lack; therefore, their convenience for the optimization of the SPME method

would be doubtful. Finally, as the individual models are different, each one would generate a distinct set of optimum operational parameters, and the choice of a particular condition from these sets would be essentially subjective.

Table 3. ANOVA analysis coefficients for the individual PCB quadratic response surfaces determined by MLR.

	F_{calc}	F_{dist}	F_{calc}	F_{dist}	F_{calc}	F_{dist}	F_{calc}	F_{dist}
	PCB 28		PCB 52		PCB 74		PCB 101	
Regression	<u>5.45</u>	1.1×10^{-2}	<u>6.06</u>	7.6×10^{-3}	<u>6.89</u>	7.9×10^{-3}	<u>9.59</u>	1.6×10^{-3}
Lack of fit	1.11	4.6×10^{-1}	2.39	2.1×10^{-1}	<u>39.02</u>	6.4×10^{-3}	<u>50.5</u>	1.1×10^{-3}
r^2	0.905		0.914		0.923		0.944	
	PCB 118		PCB 153		PCB 138		PCB 187	
Regression	<u>8.22</u>	2.7×10^{-3}	<u>4.34</u>	2.2×10^{-2}	<u>5.089</u>	1.9×10^{-2}	<u>4.96</u>	1.4×10^{-2}
Lack of fit	<u>301</u>	3.0×10^{-5}	<u>768</u>	5.0×10^{-6}	<u>647</u>	1.0×10^{-4}	<u>3510</u>	2.0×10^{-7}
r^2	0.935		0.884		0.899		0.897	
	PCB 128		PCB 156		PCB 180		PCB 170	
Regression	<u>6.23</u>	1.9×10^{-2}	<u>4.83</u>	1.6×10^{-2}	<u>4.52</u>	1.9×10^{-2}	<u>3.28</u>	4.8×10^{-2}
Lack of fit	<u>3364</u>	3.0×10^{-7}	<u>2492</u>	5.0×10^{-7}	<u>1065</u>	3.0×10^{-6}	<u>5810</u>	9.0×10^{-8}
r^2	0.916		0.894		0.888		0.851	

Note: Bold underlined data, statistically significant F_{calc} coefficients at a 95% confidence level.

The cause for these complex dependence between extraction efficiency and experimental parameters can be discussed in view of the kinetical and thermodynamical aspects of headspace SPME. The individual effects of basic operational parameters, such as extraction time, temperature and ionic strength of the matrix can be discussed considering SPME theory [34]:

- When the fiber is exposed to the sample or its headspace, analytes transported to the fiber surface by diffusion or convection could be sorbed by the coating.

Eventually, an equilibration between the sorbed species on the fiber coating, dissolved on the sample and on present the headspace is reached. After the equilibrium time, the extracted masses are maximized and remain constant.

- On equilibrium, the extracted mass depends on the concentration of the analyte on the sample and on the equilibrium constants for the distribution of analytes between the fiber coating, the sample matrix and the headspace. These constants – and therefore the extracted masses – are function of the temperature, usually decreases at higher temperatures.
- The presence of electrolytes, such as NaCl in aqueous samples decreases the activity of the solvent (water), increases the activity of the analyte and shifts the extraction equilibria. In most cases (especially for non-polar analytes), the extracted masses increase when strong electrolytes are added to aqueous samples.

Finally, it has been shown that spiking aqueous samples with small amounts of water-miscible organic solvents, such as methanol or acetonitrile, can improve the extraction efficiency of highly hydrophobic species [35] (such as the PCB), since they reduce the amounts lost by adsorption over vial surfaces, stirring bar, fat droplets or proteic aggregates present on the milk. However, this effect is due to the increase on the solubility of the analytes in the media; an excessive amount of co-solvent could change the sample/headspace and sample/fiber equilibration constants for the analytes, reducing the extracted amount on equilibrium conditions.

Therefore, complex dependencies between the extraction efficiency and the operational parameters are expectable in SPME; the net effect of changes is almost unpredictable. Anyway, this indicates the need of more sophisticated mathematical and computational procedures to find models suitable for optimization, especially when considering simultaneous multioptimization as discussed previously.

3.2. Neuro-genetic approach

The BNN architecture was defined with four neurons in the input layer, corresponding to each experimental variable (C_{NaCl} , T , t and C_{MeOH}); 12 neurons in the output layer (related to the 12 PCB studied). In the intermediate layer, the number of neurons ranged from 1 to 20, according to the BNN training. Due the complexity of the response surface, it was necessary to run the procedure several times to find an optimal solution [36]. Five replicates were performed for each different architecture trained, using the parameters mentioned in Section 2.6 above.

The generated networks were evaluated according to their root mean square error values and the behavior of the residuals. Fig. 3 shows the RMSE from the chosen architecture during the net training process. According to a compromise with RMSE values that could satisfy the modeling of all the PCB, it was decided to proceed the neuro-genetic approach utilizing the net obtained from the fifth training, constituting of 15 neurons in the intermediate layer.

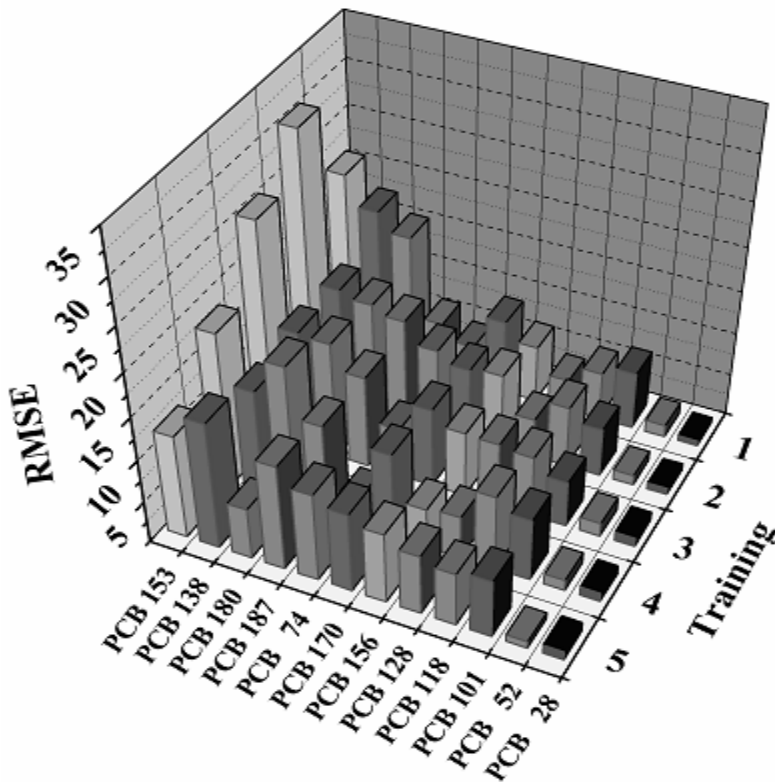


Figure 3. RMSE values for PCB calculated from the BNN model with 15 neurons in the intermediate layer in each network training.

The distribution of residuals for the optimum BNN models are presented in [Fig. 4](#). It could be seen that there is a random distribution of the residues, showing that the data are well modeled.

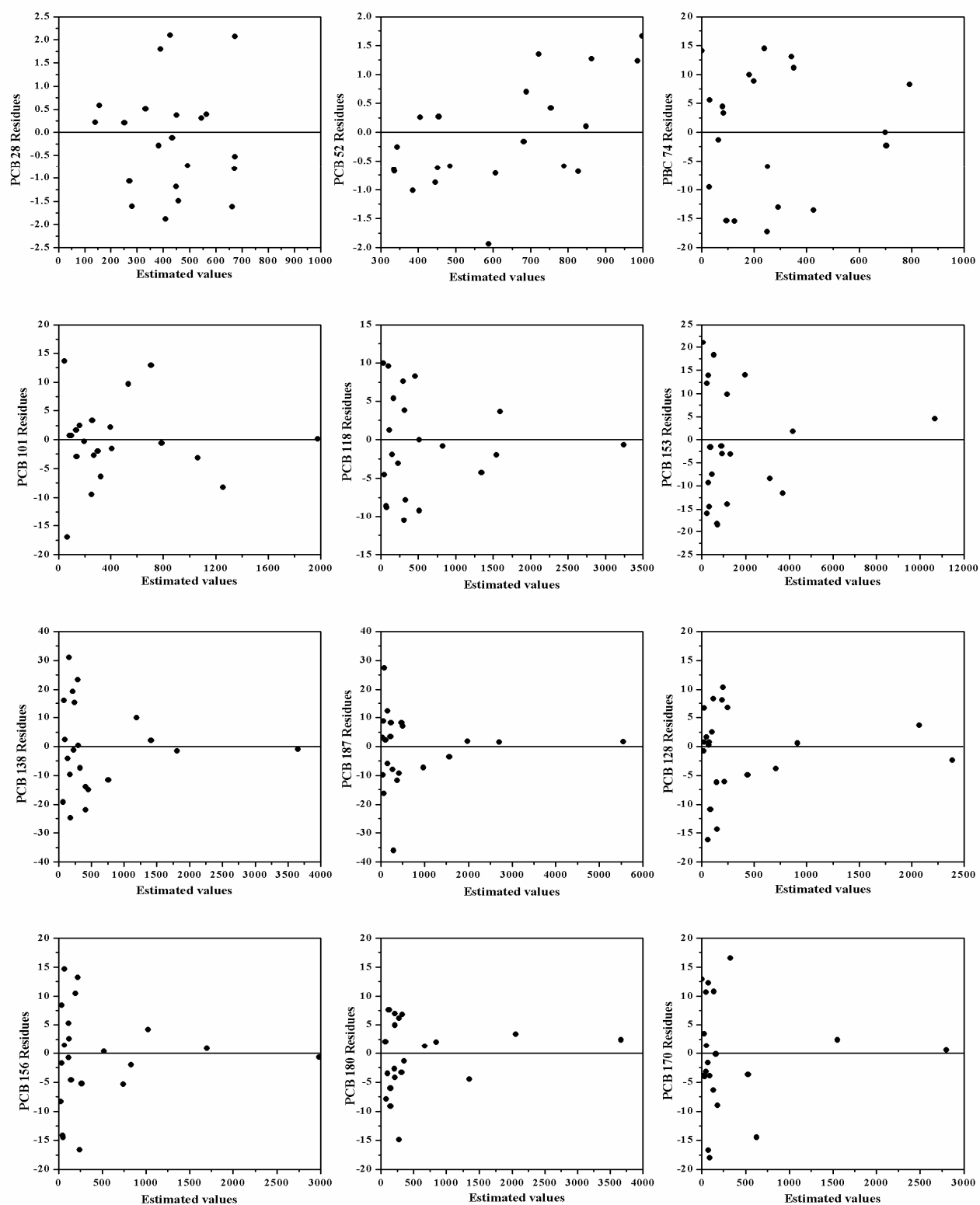


Figure 4. Residue plots for the studied PCB, estimated from BNN optimized model.

After definition of the network, the genetic algorithm was used to optimize the output for estimation of the best experimental SPME conditions. The net output from the BNN (the chromatographic areas for all the PCB) was used as input to the genetic algorithm. The best overall operational conditions pointed by the GA were $C_{NaCl} = 36\%$ (m/v) (saturated solution), $T = 95.C$, $t = 60$ min and $C_{MeOH} = 2.1\%$ (v/v). Visual inspection of the chromatograms obtained for the optimization studies shows that these suggested optimum experimental parameters are coherent with the general behavior observed: larger PCB peaks were obtained for extractions with higher C_{NaCl} and T ; also, most of the peak areas are larger for intermediate values of C_{MeOH} and t . This can be assessed inspecting [Fig. 5](#) that compares chromatograms obtained using non-optimized and multioptimized conditions.

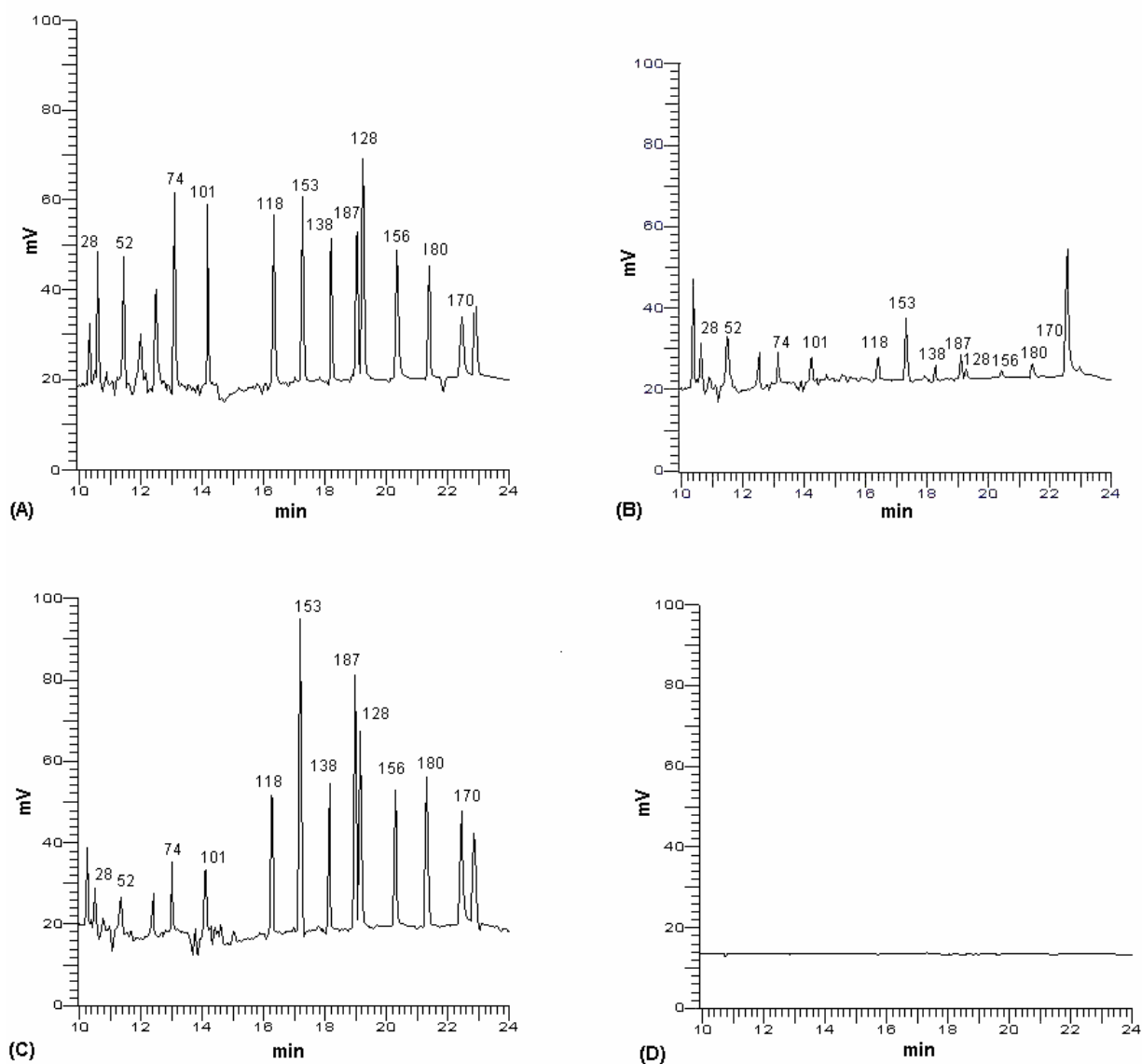


Figure 5. HS-SPME-GC-ECD chromatograms from milk spiked with 9.25 $\mu\text{g L}^{-1}$ of each PCB: (A) fully multioptimized condition; (B) maximum efficiency point on the Doehlert design experiments ($C_{\text{NaCl}} = 90 \text{ g L}^{-1}$, $T = 95 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $t = 70 \text{ min}$ and $C_{\text{MeOH}} = 50 \text{ } \mu\text{L mL}^{-1}$); (C) minimum efficiency point on the Doehlert design experiments ($C_{\text{NaCl}} = 180 \text{ g L}^{-1}$, $T = 70 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $t = 70 \text{ min}$ and $C_{\text{MeOH}} = 50 \text{ } \mu\text{L mL}^{-1}$); (D) blank (unspiked) sample.

3.3. Quantitative validation of the HS-SPME-GC-ECD method

The Table 4 shows figures of merit obtained from validation of the method based on the multioptimized HS-SPME-GC-ECD procedure. The analytical curves were found to be linear in the range between 1.0 and 16 $\mu\text{g L}^{-1}$ each PCB, and the correlation coefficients ranged from 0.994. The limits of detection and quantitation were, for the worst case (PCB #74), 2.42 and 7.34 $\mu\text{g L}^{-1}$. Recoveries were estimated for two PCB levels, and varied from 83 to 111% (for 4 $\mu\text{g L}^{-1}$; average recovery of 98%) and from 99 to 129% (for 8 $\mu\text{g L}^{-1}$; average recovery of 111%).

Table 4. Quantitative figures of merit for the optimized HS-SPME-GC-ECD method: correlation coefficients (r), limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) in $\mu\text{g L}^{-1}$ and recoveries (%) for samples spiked with 4 $\mu\text{g L}^{-1}$ ($R1$) and 8 $\mu\text{g L}^{-1}$ ($R2$) each PCB.

PCB #	r	LOD	LOQ	$R1$	$R2$
28	0.9945	1.65	5.00	83	118
52	0.9900	2.24	6.79	99	125
74	0.9884	2.42	7.34	111	126
101	0.9933	1.84	5.57	103	129
118	0.9959	1.43	4.33	101	113
128	0.9989	0.73	2.22	98	103
138	0.9974	1.14	3.47	101	108
153	0.9970	1.23	3.70	102	108
156	0.9997	0.50	1.51	96	100
170	0.9995	0.51	1.54	96	101
180	0.9996	0.45	1.37	94	99
187	0.9980	1.00	3.04	96	107

These values can be considered acceptable for routine application of the method, and are consistent with the levels of PCB expected to be found on real samples. The procedure is being currently employed on a systematic effort to monitor PCB levels on samples from public human milk banks on the city of São Paulo, Brazil; Fig. 6 shows an unspiked chromatogram from a typical sample, where $4.1 \mu\text{g L}^{-1}$ of PCB #153 and $1.2 \mu\text{g L}^{-1}$ of PCB #170 were detected.

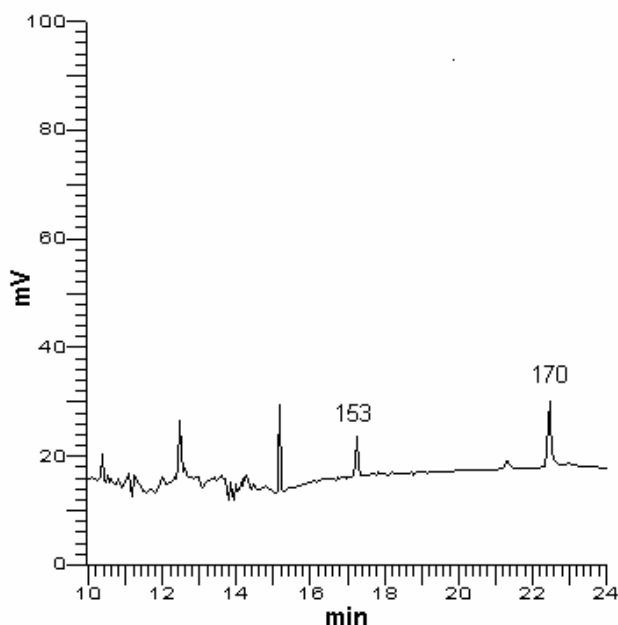


Figura 6. HS-SPME-GC-ECD chromatogram of an unspiked breast milk sample.

4. Conclusions

An efficient multioptimization methodology was developed to find the best operational SPME conditions to the simultaneous detection of 12 congeners PCB presented in breast milk at very low levels using Bayesian Neural Network and genetic algorithm. The experimental parameter values, ionic strength of the media, extraction temperature, extraction time and addition of the co-solvent methanol were optimized to obtain maximized chromatographic signals for all the PCB. These optimized parameters resulted in decreased of the detection limit of the method, especially to the lower molecular weight PCB, that consist of the most

critical ones during the quantification process. Therefore, the use of neuro-genetic approach showed to be a promising way for the optimization of SPME methods.

Acknowledgements

This work was funded by São Paulo State Research Support Foundation (FAPESP) and by the Brazil National Council for Scientific and Technological Research (CNPq). C. Kowalski and G. Silva thanks the Coordination for Improvement of Higher Level Personnel (CAPES) and CNPq, respectively, for scholarships.

5. References

- [1] WHO, Polychlorinated biphenyls: human health aspects, Concise International Chemical Assessment Document, 55, Geneva, 2003.
- [2] I. Costabeber, J.S. Santos, A.A.O. Xavier, J.Weber, F.L. Leaes, S. Boqusz, T. Emanuelli, Food Chem. Toxicol. 44 (2006) 1.
- [3] S. Patantin, N. Weisglas-Kuperus, M.A.J. de Ridder, C. Koopman-Esseboom, W.A. Van Staveren, C.G. Van Der Paauw, Am. J. Public Health 87 (1997) 1711.
- [4] WHO, Air Quality Guideline, vol. 2, Copenhagen, 2000, pp.1–21.
- [5] WHO, Polychlorinated Biphenyls and Terphenyls, second ed., Geneva, 1993.
- [6] K. Norén, D. Meironyté, Chemosphere 40 (2000) 1111.
- [7] F.E. Ahmed, in: C.F. Moffat, K.J. Whittle (Eds.), Environmental Contaminants in Food, Sheffield Academic Press, Sheffield, 1999.
- [8] A.L. Lopes, F. Augusto, J. Chromatogr. A 1056 (2004) 13.
- [9] F. Augusto, A.L.P. Valente, Trends Anal. Chem. 21 (2002) 428.
- [10] F. Augusto, A. Sartoratto, Chromatographia 57 (2003) 351.
- [11] A.M. Oliveira, N.R. Pereira, A. Marsaioli Jr., F. Augusto, J. Chromatogr. A 1025 (2004) 115.
- [12] G.L.V. Coelho, F. Augusto, J. Pawliszyn, Ind. Eng. Chem. Res. 40 (2001) 364.

- [13] V.G. Zuin, A.L. Lopes, J.H. Yariwake, F. Augusto, J. Chromatogr. A 1056(2004) 21.
- [14] V. Casas, M. Llompart, C. Garc'ya-Jares, R. Cela, T. Dagnac, J. Chromatogr. A 1124 (2006) 148–156.
- [15] M. Polo, M. Llompart, C. Garcia-Jares, R. Cela, J. Chromatogr. A 1072 (2005) 63.
- [16] M. Polo, M. Llompart, C. Garcia-Jares, G. Gomes-Noya, M.H. Bollain, R. Cela, J. Chromatogr. A 1124 (2006) 11.
- [17] C. Garcia-Jares, M. Llompart, M. Polo, C. Salgado, S. Macias, R. Cela, J. Chromatogr. A 963 (2002) 277.
- [18] A.M. Carro, I. Neira, R. Rodil, R.A. Lorenzo, Chromatographia 56 (2002) 733.
- [19] C.R.T.Tarley, W.N.L. Santos, C.M. Santos, M.A.Z. Arruda, S.L.C. Ferreira, Anal. Lett. 37 (2004) 1437.
- [20] A. Martínez-Uruñuela, J.M. González-Sáiz, C. Pizarro, J. Chromatogr. A 1056 (2004) 49.
- [21] C.G. Zampronio, J.J.R. Rohwedder, R.J. Poppi, Chemom. Intell. Lab. Sys. 62 (2002) 117.
- [22] E.R. Pereira-Filho, C. Mello, P.A. Costa Filho, M.A.Z. Arruda, R.J. Poppi, Anal. Chim. Acta 433 (2001) 111.
- [23] K. Novotná, J. Havliš, J. Havel, J. Chromatogr. A 1096 (2005) 50.
- [24] W.L. Butine, A.S. Weigend, Complex Syst. 5 (1991) 603.
- [25] F. Despagne, D.L. Massart, Analyst 123 (1998) 157R.
- [26] D.A. Winkler, F.R. Burden, J. Mol. Graphics Modell. 22 (2004) 499.
- [27] F.R. Burden, D.A. Winkler, J. Med. Chem. 42 (1999) 3138.
- [28] V. Centner, J. Verdu-Andres, B. Walczak, D. Jouan-Rimbaud, F. Despagne, L. Pasti, R.J. Poppi, D.L. Massart, O.E. de Noord, Appl. Spectrosc. 54 (2000) 608.
- [29] P.A. Costa, R.J. Poppi, Anal. Chim. Acta 446 (2001) 39.
- [30] S. Gergely, E. Bekassy-Molnar, G. Vatai, J. Food Eng. 58 (2003) 311.
- [31] L. Röhrig, H.-U. Meisch, Fresenius J. Anal. Chem. 366 (2000) 106.

- [32] C. Houck, J. Joines, M. Kay, A genetic algorithm for function optimization: a Matlab implementation, NCSU-IE, Technical Report, 95-09, North Caroline State University, 1995.
- [33] United States Food and Drug Administration, Guidance for Industry—Q2B Validation of Analytical Procedures: Methodology, Department of Health and Human Services, Washington, DC, 1996.
- [34] J. Pawliszyn, SPME: Theory and Practice, Wiley-VCH, New York, 1997.
- [35] M.S. García-Falcón, M. Pérez-Lamela, J. Simal-Gandara, J. Agric. Food Chem. 52 (2004) 6897.
- [36] R.J. Poppi, D.L. Massart, Anal. Chim. Acta 375 (1998) 187.

CAPÍTULO 3

DEVELOPMENT OF A QUANTITATIVE METHOD TO DETERMINE POLYCHLORINATED BIPHENYLS IN BRAZILIAN BREAST MILK SAMPLES USING SOLID-PHASE MICROEXTRACTION-GAS CHROMATOGRAPHY- ELECTRON CAPTURE DETECTION

**Cláudia Hoffmann Kowalski^{1*}; Josemar Gurgel da Costa²; Helena Teixeira
Godoy¹; Fabio Augusto³**

¹ Department of Food Science, Faculty of Food Engineering, State University of Campinas (UNICAMP), P.O. Box 6121, Campinas, SP, Brazil.

² Bioscience Center, Federal University of Rio Grande do Norte (UFRN), P.O. Box 1511, Natal, RN, Brazil.

³ Department of Analytical Chemistry, Institute of Chemistry, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), State University of Campinas (UNICAMP), P.O. Box 6154, Campinas, SP, Brazil.

* claukowalski@gmail.com

(Manuscrito submetido para publicação no periódico Journal of the Brazilian Chemical Society)

Development of a quantitative method to determine polychlorinated biphenyls in Brazilian breast milk samples using solid-phase microextraction-gas chromatography-electron capture detection

Os níveis de bifenilas policloradas (PCB) no leite de mães que vivem em quatro regiões diferentes do Brasil foram determinados. Os PCB foram extraídos através da Microextração de Fase Sólida e analisados por Cromatografia Gasosa com Detecção de Captura de Elétrons. As figuras de mérito foram estudadas e apresentaram os seguintes resultados: linearidade de 1 para 16 $\mu\text{g l}^{-1}$ ($r > 0.9884$), boa precisão ($\text{RSD} < 12\%$, $n = 5$), recuperação aceitável (71 para 127 %) e limites de quantificação entre 0.45 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 2,42 $\mu\text{g L}^{-1}$. A análise das amostras revelou níveis de PCB acima de 11.8 $\mu\text{g l}^{-1}$ na região metropolitana de São Paulo, sendo o PCB 153 encontrado em todas essas amostras. Em Vitória/ES e Florianópolis/SC foram encontrados PCB em 100 e 60 % das amostras, respectivamente. Nenhuma contaminação foi detectada nas amostras do Acre. Comparando esses resultados, uma alta correlação foi encontrada entre a contaminação dessas amostras e o nível de industrialização da região.

Abstract

The levels of polychlorinated biphenyls (PCB) in breast milk from women living in four different regions of Brazil were determined. PCB were extracted by Solid Phase Microextraction and analyzed by Gas Chromatography with Electron Capture Detection. The figures of merit were studied and showed the next results: linearity from 1 to 16 $\mu\text{g L}^{-1}$ ($r > 0.9884$), good precision ($\text{RSD} < 12\%$, $n = 5$), acceptable matrix recovery (71 to 127%) and limits of quantification between 0.45 $\mu\text{g L}^{-1}$ and 2.42 $\mu\text{g L}^{-1}$. The samples analysis revealed PCB levels up to 11.8 $\mu\text{g L}^{-1}$ in São Paulo metropolitan area being the PCB 153 found in all these samples. In Vitória/ES and Florianópolis/SC were found PCB in 100 and 60% of the samples, respectively. No contamination was detected in the samples from Acre. Comparing

these data, a high correlation between the contamination of these samples and the industrialization level of the region was found.

Keywords: PCB, HS-SPME, validation, breast milk, contamination.

1. Introduction

Polychlorinated biphenyls (PCB) have been used commercially since 1929 as dielectric and heat exchange fluids as well in a variety of other applications. However, the distribution of PCB in the environment was not recognized until 1966, when Jensen identified PCB in human and wildlife samples (WHO, 2000). Owing to their physicochemical properties, these compounds are extremely resistant to chemical and biological degradation and are easily bioaccumulated through the trophic pyramid (Lambropoulou et al., 2006; Safe, 1994), especially due to their lipophilic character (which causes their accumulation on fat tissues) (Llompart et al., 2001; Ahlborg et al., 1994). Therefore, PCB contamination is a serious issue, and despite the fact that their production and use have been banned during the 70s and 80s, they are still detected in the ecosystem (Jaraczewska et al., 2006; Hong et al., 2005; Norén and Meironyté, 2000). In Brazil, a law implemented in 1981 prohibits the import, the manufacture, the use and the marketing of PCB and demands the substitution of the equipments of electric system in operation only for others that do not contain PCB besides it prohibit discard in sanitary landfills and courses of water.

The primary immediate intake route of organochlorine pesticides and PCB congeners for general population has been identified as being food-related, mainly due to consume of contaminated dairy products, meat and fish (Heck et al., 2007; Costabeber et al., 2006; Johansen et al., 2004; Schechter et al., 1997). It is now well known that PCB can be transferred from mother to fetus and newborn babies through the placenta, as well as to newborn infants being fed with breast milk [Basheer, 2004]. These infants probably will have more risks to develop immunosuppression, neuropathy, liver damage and cancer (WHO, 1993).

Due to the high concentration levels usually found, and since it is a comparably easier to collect than other alternatives, breast milk has also been employed on studies of human background exposure to PCB (Bencko et al., 2004; Furst et al., 1994). The most abundant PCB congeners found on breast milk are

PCB 153, 180, 138, 170, 118, 101 and 187 (referred as their IUPAC numbers) (Ingelido et al., 2007; Yu et al., 2007; Vukavic et al., 2007; Jaraczewska et al., 2006; Gonzales et al., 1995; Di Muccio et al., 1990). All these PCB, except #118, are non-coplanar and ortho-substituted, and classified as non-dioxin-like species. The effects of non-dioxin-like PCB are related to multiple toxicity pathways, even though sometimes they have similar action to their dioxin-like counterparts (US-EPA, 2003). Regulatory limits for PCB contamination in foodstuff vary from 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$ to 60 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (Ahmed, 1999), depending on the country. As for the situation in Brazil, there is no specific legislation regarding the maximum equivalent concentration levels of organochlorine compounds in breast milk (Pereira and Kuch, 2005); besides, the degree and level of contamination are not well known. One of the few studies was performed by the National Agency for Sanitary Surveillance (ANVISA, 2003), and showed that the levels of dioxin-like PCB (the most toxic) in breast milk collected in Brazil varied from 1.30 and 12.30 pg (PCB) g^{-1} of milk fat.

The conventional analytical procedures for the determination of PCB and similar species on complex matrices involves preliminary steps, such as their isolation by liquid-liquid extraction (LLE), combined to clean-up and purification of the extracts to remove impurity before chromatographic separation (Valsamaki et al., 2006). A relatively large amount of sample is required, as well as it is necessary to use large amounts of toxic organic solvents. In 1990, Arthur and Pawliszyn (Arthur and Pawliszyn, 1990) introduced the Solid Phase Microextraction (SPME) - a solvent-free sample preparation technique - to replace such conventional procedures and has been used extensively to a wide variety of samples (Augusto and Valente, 2002), including the determination of PCB on some matrixes (Montes et al., 2006; Penalver et al., 1999). SPME is based on the sorption of analytes on sample or its headspace by a film of up to 100 μm of an extracting phase - either pure liquid polymeric phases or porous solids dispersed in liquid polymers - over a silica fiber. For liquid polymeric phases such as polydimethylsiloxane (PDMS), the mechanism involved is partition; for porous solid

coatings (Carboxen/PDMS), there is a mix of partition and adsorption, with large predominance of the later. When the separation and detection of analytes is performed by Gas Chromatography (GC), after introduction of the re-usable fiber directly inside the injection port of the chromatograph the extracts can be thermally desorbed. Since the kinetics and thermodynamics of the extraction is governed by experimental conditions such as temperature, time, ionic strength of the sample, stirring rate, volume of the headspace and addition of co-solvents, the optimization of the extraction parameters is fundamental. Optimization of SPME methods can be performed either using classic unvaried approaches or, more conveniently, multivariate procedures such as factorial design (Kowalski et al., 2007). For separation and detection of PCB, the use of GC coupled with Electron Capture Detection (ECD) is almost universal (López et al, 2007; Sundberg et al, 2006). Despite its high sensibility for halogenated contaminants, ECD is neither specific nor provides qualitative information, and the identification of the PCB should be confirmed by retention data combined to GC-MS (Verenitch et al., 2007; Popp et al., 2005).

In a previous paper (Kowalski et al., 2007), a headspace SPME method combined with GC-ECD to determine PCB in breast milk was optimized using a chemometric multi-optimization procedure, in order to demonstrate the applicability of simultaneous chemometric optimization strategies to SPME. Therefore, in this work we present the validation of this method, which was also extended to GC-MS and finally applied to identify and quantify PCB in breast milk samples collected from different Brazilian regions.

2. Experimental

2.1 Reagents and Materials

Standards of twelve PCB (IUPAC # 28, 52, 74, 101, 118, 128, 138, 153, 156, 170, 180 and 187) were purchased from AccuStandard (New Haven, CT, USA). Methanol was obtained from Merck (Darmstadt, Germany), NaCl P.A. from Ecibra (São Paulo, Brazil) and isooctane (pesticide grade) from Mallinckrodt

(Kentucky, USA). Deionized water was purified through a Milli-Q system (Millipore, Bedford, MA, USA). Helium (99.999 % purity) and nitrogen (99.999 %) were supplied by White Martins (Rio de Janeiro, Brazil). SPME fibers coated with 100 μm (PDMS) were supplied by Supelco (Bellefonte, PA, USA); the fibers were fit in appropriate holder (Supelco). Septum-sealed 16 mL glasses were obtained from Pierce (Rockford, IL, USA). All glassware were silanized with a 10 % solution of chlorotrimethylsilane in toluene as described by Potter (Potter and Pawliszyn, 1994). For cleaning and decontamination of the glassware and magnetic stir bars prior use, they were washed with neutral detergent and deionized water and boiled with deionized water for 10 minutes in a microwave oven, followed by rinsing with deionized water and dried in oven at 70 °C. During the extractions, the samples were thermostated using a heated circulating bath (Cole Parmer, USA).

2.2 Instrumentation

The GC-ECD system was an AutoSystemXL GC-ECD (Perkin-Elmer, Norwalk, CT) fitted with a HP-1MS column (30 m x 0.32 mm x 0.25 μm) and a ^{63}Ni electron-capture detector. The split-splitless injector was operated in the splitless mode and fitted with a suitable liner for SPME. The injector and detector temperatures were 280 °C and 320 °C, respectively. Helium was used as carrier gas at a flow rate of 1.3 ml min⁻¹ and nitrogen was the make-up gas. The GC-MS system used to confirm the results was Shimadzu 17A GC coupled with a Shimadzu QP-5000 quadrupole mass spectrometer (Shimadzu, Tokyo, Japan) operated using full scan and selective ion monitoring mode (SIM). In this case, the separation was carried out using a DB-5 (30 m x 0.25 mm x 0.25 μm) and the injector and interface temperatures were 280 °C. Helium was used as carrier gas at a flow rate of 1.3 ml min⁻¹. Full-scan mass spectra were obtained in the electron ionization mode (70 eV) in the range from 100 to 400 m/z for analyte identification. On SIM runs, the target and secondary ions monitored for each PCB were (IUPAC congener number and fragment m/z): PCB 28 (186, 256 and 258), PCB 52 and 74 (220 and 292), PCB 101 and 118 (254 and 326), PCB 153, 138, 128 and 156 (290

and 360) and PCB 187, 180 and 170 (324 and 394). In both chromatographic systems, the oven temperature was programmed as follows: 40 °C (hold for 2 min), then 30 °C min⁻¹ to 190 °C (hold for 5 min), then 5 °C min⁻¹ to 220 °C (hold for 5 min) and 220 °C min⁻¹ up to 300 °C (hold for 1 min).

2.3 Sampling and storage

This study analyzed 20 breast milk samples collected between 2005 and 2006 from Human Milk Banks (five samples per bank) associated to public health services in the metropolitan areas with diversified profiles: São Paulo (capital of São Paulo State, population 10.9 million, heavily industrialized and highly polluted), Vitória (capital of Espírito Santo State, pop. 0.31 million, export harbor), Florianopolis (capital of Santa Catarina State, pop. 0.4 million, mainly leisure and tourist activity) and Rio Branco (capital of Acre State, pop. 0.29 million, urban center surrounded by Amazon rainforest). It should be noticed that sample donators are not necessarily residents in the collection area, since mothers from bordering regions not serviced by public health facilities usually need to travel to these larger centers for assistance. After collection, they were immediately frozen and stored at – 20 °C until the analysis. The procedure was previously examined and approved by the National Commission of Research Ethics (CONEP), as well as by the local Ethics Committees from the public health offices involved.

2.4 SPME procedure

For all extractions, the samples were defrosted and 5.00 ml immediately transferred to 16 ml silanized glass vials. After addition of 1.8 g NaCl and 210 µl of methanol, the samples were magnetically stirred at 1200 rpm for 10 min to permit sample/headspace equilibration. A 100 µm PDMS SPME fiber was exposed to the sample headspace for 60 min of time. During sample/headspace equilibration and extraction, the sample was thermostated at 95 °C. After extraction the fiber was withdrawn and extracted analytes were immediately desorbed directly in the GC-

ECD or GC-MS injection port at 280 °C for 5 min. To minimize inter-extractions fiber carryover, blank runs were performed between each extraction.

2.5 Validation and application to real samples

For all validation experiments, pooled blank breast milk was prepared from samples found to be non-contaminated on preliminary assays. The blank sample was spiked with 0.5 $\mu\text{g L}^{-1}$ to 64 $\mu\text{g L}^{-1}$ of each PCB evaluated. The spiked samples were kept at 4 °C for 24 h to allow the equilibration between the PCB and the lipid fraction and other possible active biological milk compounds, as described by Rohrig and Meisch (2000). This sample set was employed to determine the figures of merit of the HS-SPME-GC-ECD method. Linearity was evaluated through the calibration curve in eight different levels (0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32 and 64 $\mu\text{g L}^{-1}$) and this way the linear range was obtained. To calculate the LOD and LOQ of each compound it was considered the standard deviation of the linear coefficient (σ) divided by the slope or angular coefficient (S) obtained from the calibration plot. In both cases, the result was multiplied by 3.3 and 10.0, respectively (Miller, 2005; ICH, 1995). The precision was estimated through the repeatability obtained by five successive extraction of samples spiked with 4 $\mu\text{g L}^{-1}$ of each PCB being the result expressed as relative standard deviation (% RSD). The accuracy was evaluated at the same five levels that the calibration curve was performed. It was subtracted each point, recalculate the equation and obtained the theoretical area that was compared with the experimental area and reported as percent recovery. The selectivity of the method was assessed inspecting GC-MS chromatograms for the test samples. Finally, the validated method was applied to the 20 breast milk samples.

3. Results and Discussion

3.1 Method evaluation

It is well known that SPME is an extraction technique affected by the matrix and this fact needs to be considered mainly in trace analysis. Therefore

quantitative measurements in real samples normally require applying the standard addition technique (Criado et al., 2004). So, to perform all the validation steps, a non contaminated pooled milk was spiked with the mixture of PCB congeners. The Figure 1 shows a chromatogram obtained by this pooled milk spiked with $9.25 \mu\text{g L}^{-1}$ of each PCB. Through the Figure 1 it was observed that the peak resolution was adequate for the target analytes identification and quantification.

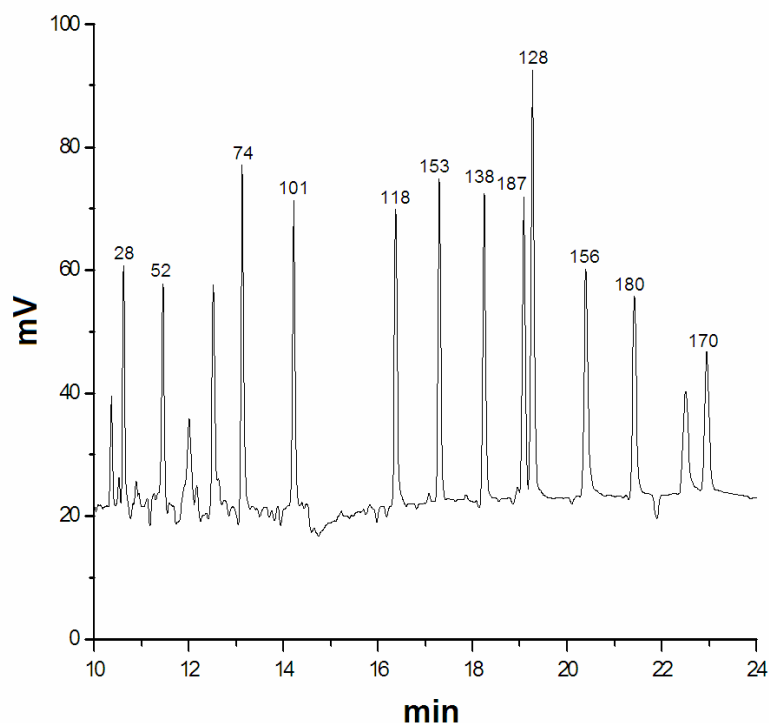


Figure 1. Chromatogram obtained by HS-SPME-GC-ECD of breast milk sample spiked with $9.25 \mu\text{g L}^{-1}$ of each PCB.

The figures of merit are showed in the Table 1. The linearity of the proposed method was evaluated from 0.5 to $64 \mu\text{g L}^{-1}$ of each compound, however a linear correlation between amount and concentration was found between 0.5 and $16 \mu\text{g L}^{-1}$ (PCB 128, 156, 170 and 180) and between 1 and $16 \mu\text{g L}^{-1}$ to the others. This range is in agreement with other studies since the real concentration of these

compounds in the majority of breast milk analyzed around the world is allocated in this range. Calibration curves (peak area versus concentration) were obtained for the 12 PCB being all the correlation coefficients (r) higher than 0.9884.

The LOD values ranged from $0.45 \mu\text{g L}^{-1}$ (PCB 180) to $2.42 \mu\text{g L}^{-1}$ (PCB 74) and the LOQ values ranged from $1.37 \mu\text{g L}^{-1}$ to $7.34 \mu\text{g L}^{-1}$ to the same PCB (Table 1).

The precision, obtained by the RSD values, ranged between 4.91 (PCB 52) and 11.76 % (PCB 28). The accuracy varied between 70.66 and 128.97 % of recovery.

Table 1. Performance of the HS-SPME-GC-ECD method for PCB analysis.

PCB #	Retention time (min)	Linear range ($\mu\text{g l}^{-1}$)	Correlation coefficient (r)	Repeatability * (%)	LOD ($\mu\text{g l}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g l}^{-1}$)	Recovery (%)				
							1 $\mu\text{g l}^{-1}$	2 $\mu\text{g l}^{-1}$	4 $\mu\text{g l}^{-1}$	8 $\mu\text{g l}^{-1}$	16 $\mu\text{g l}^{-1}$
28	10.59	1-16	0.9945	11.8	0.54	1.65	71	97	82	118	86
52	11.43	1-16	0.9900	5.0	0.74	2.24	71	81	99	125	79
74	13.10	1-16	0.9884	10.3	0.80	2.42	76	97	111	126	78
101	14.19	1-16	0.9933	11.3	0.61	1.84	82	109	103	129	83
118	16.34	1-16	0.9959	5.9	0.47	1.43	89	116	101	113	87
128	19.23	0.5-16	0.9989	6.4	0.24	0.73	88	127	98	103	97
138	18.21	1-16	0.9974	6.5	0.38	1.14	96	126	101	108	91
153	17.26	1-16	0.9970	4.9	0.41	1.23	92	127	102	108	93
156	20.35	0.5-16	0.9997	8.5	0.16	0.50	92	122	96	100	100
170	22.91	0.5-16	0.9995	8.5	0.17	0.51	90	121	96	101	99
180	21.38	0.5-16	0.9996	9.1	0.15	0.45	91	120	94	99	102
187	19.05	1-16	0.9980	10.0	0.33	1.00	91	128	93	107	93

* Measure with 5 replicates of the breast milk spiked with 4 $\mu\text{g.L}^{-1}$.

In order to become available the selectivity and to confirm the identity of the suspected PCB present in the breast milk samples a validation was performed in a GC-MS instrument. The same SPME experimental conditions previously defined was used. Good results were obtained in accordance with the Table 2. Besides, the GC-MS results confirmed the PCB contamination in the same samples.

Comparing the Table 1 and 2 is possible to conclude that the results obtained by the ECD and MS were quite similar. Verenitch (2007) compared the two equipments to determine PCB in fish and shellfish and provide comparable data to their samples results. Another important point is that the column used was different (HP-1 in the GC-ECD system and DB-5 in the GC-MS system) being the retention time longer in the MS analysis than in the ECD growing the analysis time from 25 to 30 minutes. This fact enables a better resolution between the PCB 187 and 128 in the GC-MS system. It was observed that in the ECD system, lower LOD were obtained for heavier PCB in opposition to the MS system, which provided lower LOD for the lighter PCB. These differences are explained by detectors response: basically, whereas ECD is proportional to the halogen number, MS is proportional to the ions number.

Table 2. Performance of the HS-SPME-GC-MS method for PCB analysis.

PCB #	Retention time (min)	Linear range ($\mu\text{g l}^{-1}$)	Correlation coefficient (r)	Repeatability * (%)	LOD ($\mu\text{g l}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g l}^{-1}$)	Recovery (%)				
							1 $\mu\text{g l}^{-1}$	2 $\mu\text{g l}^{-1}$	4 $\mu\text{g l}^{-1}$	8 $\mu\text{g l}^{-1}$	16 $\mu\text{g l}^{-1}$
28	10.90	1-16	0.9959	4,27	0.79	2.41	126	112	91	83	121
52	12.07	1-16	0.9967	10,95	0.71	2.16	122	102	112	84	114
74	14.10	1-16	0.9985	4,92	0.48	1.46	132	117	88	92	110
101	15.30	1-16	0.9967	4,88	0.72	2.17	100	128	109	109	88
118	17.70	1-16	0.9965	9,97	0.73	2.22	115	121	116	105	90
128	21.26	0.5-16	0.9949	5,12	1.04	3.16	110	127	108	95	99
138	19.90	1-16	0.9941	2,53	0.96	2.91	123	123	110	94	98
153	18.80	1-16	0.9926	10,21	1.07	3.26	103	118	103	119	82
156	22.68	0.5-16	0.9929	7,40	1.23	3.74	106	121	119	95	96
170	24.10	0.5-16	0.9885	6,95	1.58	4.78	84	117	137	107	83
180	23.45	0.5-16	0.9894	10,42	1.51	4.57	93	126	117	112	82
187	21.08	1-16	0.9865	10,85	1.71	5.18	93	126	108	105	84

* Measure with 5 replicates of the breast milk spiked with 4 $\mu\text{g.L}^{-1}$.

3.2 Real samples analysis

Once the analytical methodology was validated, it was applied to 20 breast milk samples. In the Table 3 is given the results obtained by HS-SPME-GC-ECD.

Table 3. Concentration of PCB ($\mu\text{g L}^{-1}$) in the 20 breast milk samples obtained in the four studied regions.

	ΣPCB	PCB 28	PCB 52	PCB 74	PCB 101	PCB 118	PCB 128	PCB 138	PCB 153	PCB 156	PCB 170	PCB 180	PCB 187
São Paulo													
1	4,6	-	< LQ	< LQ	-	-	-	< LQ	4.6	-	-	-	-
2	4.4	-	< LQ	-	-	-	-	-	4.4	-	-	-	-
3	3.3	-	< LQ	< LQ	-	-	-	-	3.3	-	-	-	-
4	5.3	-	-	-	-	-	-	-	4.1	-	-	1.2	-
5	11.8	-	6.2	< LQ	-	-	-	-	4.2	-	-	1.4	-
Total	29.4	-	6.2	< LQ	-	-	-	< LQ	20.6	-	-	2.6	-
Vitória													
1	0.7	-	< LQ	< LQ	-	-	-	-	< LQ	-	0.7	-	-
2	4.0	-	4.0	< LQ	-	-	-	< LQ	< LQ	-	-	-	-
3	0.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.6	-	-
4	5.6	-	4.7	< LQ	-	-	-	-	-	-	0.9	-	-
5	2.2	-	< LQ	< LQ	-	-	-	-	-	-	2.2	-	-
Total	13.1	-	8.7	< LQ	-	-	-	< LQ	< LQ	-	4.4	-	-
Florianópolis													
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	2.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2.1
4	1.7	-	-	-	-	-	-	1.7	< LQ	-	-	-	-
5	10.7	-	10.7	< LQ	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Total	14.5	-	10.7	< LQ	-	-	-	1.7	< LQ	-	-	-	2.1
Rio Branco													
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Total	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

It was observed that 65 % of the analyzed samples had PCB levels above the LOQ. The most abundant PCB congeners found in these samples were PCB 52 (45 %), PCB 74 and PCB 153 (40 %), PCB 170 (20 %), PCB 138 (15 %), PCB 180 (10 %) and 187 (5 %). Considering the quantified results ($>$ LOQ) the distribution of the contamination were: PCB 153 (25 %), PCB 170 (20 %), PCB 52 (15 %), PCB 180 (10 %), PCB 138 and 187 (5 %). All these PCB in association with PCB 101, PCB 118 and PCB 156 were abundantly commercialized and distributed around the world in a mixture called Aroclor® (Monsanto, USA) being the most common in the environment and consequently in the human tissues and fluids, as breast milk. This product had been extensively used in several industrial applications, such as electrical capacitors, hydraulic fluids, adhesives and rubber plasticizers. A review study published in 2007 (Almeida et al, 2007) related that around 250.000 to 300.000 t of Aroclor still are been used in Brazil mainly in industrial centers as São Paulo. Many cases of oil leak were detected in inactive electric power stations in São Paulo state. This problem is yet bigger due to the difficulty to manage the industrial and municipal residues. In a study performed in sewage sludge from wastewater treatment in Rio de Janeiro state (approximately 450 km of São Paulo) was found 57.6 mg kg⁻¹ to the digested sludge and 145.0 mg kg⁻¹ to the activated sludge. In regard to the indicator-PCB, a limiting value of 0.2 mg kg⁻¹ of congener (d.w.) is recommended, which means that the values found in Brazilian sludge samples exceed this limit by far (Pereira and Kuch, 2005).

All the PCB found in this study could be classified as non-dioxin-like congeners as described in the majority of the papers. Due to their higher chemical stability, PCB 153 and 180 are usually detected in breast milk samples (Jaraczewska, et al., 2006; Norén and Meironyté, 2000; She et al., 1998) being also the most common in this study: the PCB 153 was found in all the samples from São Paulo city and the PCB 180 in two of these samples. All the donors from São Paulo city lived in the Santo Amaro district and neighborhoods. In the 70 and 80', this region was the principal industrial centers of the city but it changed recently with the outing of the industries to the interior of the state. In 2005, the

State Company of Technology of Environmental Sanitation (CETESB) from São Paulo seals off a lot of deep wells in this region because of the confirmation of a contamination of the subterranean and superficial water with chlorides substances. It is still more worrying since in this area there is the dam responsible for the distribution of water for the whole metropolitan region. The Figure 3 shows a typical chromatogram of a São Paulo breast milk sample contaminated with $4.1 \mu\text{g L}^{-1}$ of PCB 153 and $1.2 \mu\text{g L}^{-1}$ of PCB 180. In all this study, the maximum of contamination ($11.78 \mu\text{g L}^{-1}$ of PCB) was found in a sample from São Paulo being found $6.19 \mu\text{g L}^{-1}$ of PCB 52, $4.18 \mu\text{g L}^{-1}$ of PCB 153 and $1.41 \mu\text{g L}^{-1}$ of PCB 180.

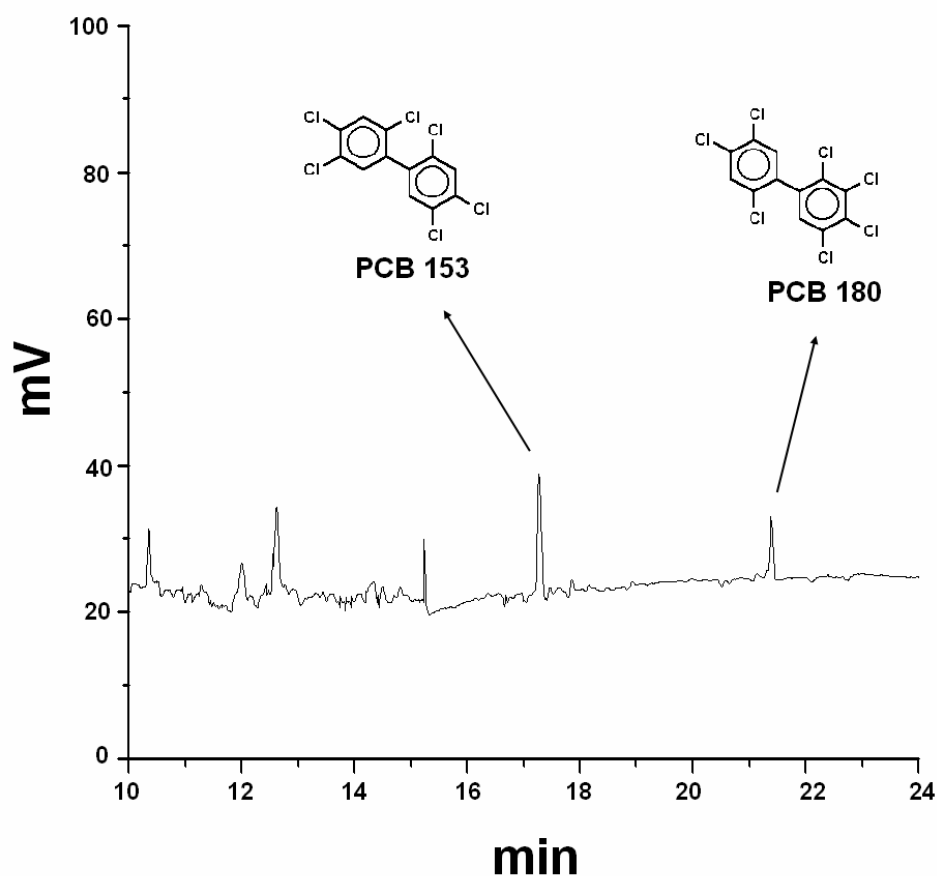


Figure 2. HS-SPME-GC-ECD chromatogram of a breast milk sample containing $4.1 \mu\text{g L}^{-1}$ of PCB 153 and $1.2 \mu\text{g L}^{-1}$ of PCB 180.

All the samples collected in Vitória were contaminated by some PCB, however, the most common in these samples was the PCB 170 that was quantified in 80 % of the samples. Vitória is an island and two big harbors support the local economy besides siderurgic and mining industries. Two of these mothers had reported that lived near to siderurgic industries and another mother related the presence of a rubber industry in the roundness. Furthermore, the donors related that used to eat sea fish and crustacean at least once a week, being another possible contamination font.

As well as Vitória, Florianopolis is situated in an island however in this case, the economy is based mainly in tourist and leisure activities being the big industries situated in another cities of the state. It was found 60 % of contamination in these samples being all them provided by donors from the countryside of Santa Catarina state. One of these samples was contaminated with $10.7 \mu\text{g L}^{-1}$ of PCB 52: this donor related that used to eat sea fish and crustacean more than once a week besides her family do not have water and sewage treatment in their district. Possibly, in this state the contamination are distributed to the countryside according to the industries distribution.

In Rio Branco was not found any contamination at the quantification levels. These mothers had reported that used to consume fish from local rivers at least once a week. Probably, the levels of PCB are lower in this region than in the other because it is located in a remote area inside to the Amazon region.

4. Conclusions

In this study, we did the first evaluation of the distribution of the PCB contamination in different parts of Brazil. Although some studies were conduced in the past, all of they were restricted to a small region. Besides, none of them had used SPME as the extraction technique. The HS-SPME-GC-ECD method developed and applied in this study proved to be a simple, fast and convenient tool for the simultaneously determination of twelve PCB congeners in breast milk samples. The use of optimized HS-SPME condition allowed increasing the

efficiency of the proposed method. Acceptable results of linearity, precision, recovery, selectivity, LOD and LOQ were obtained in the validation process. The sample analysis revealed that no PCB was found in breast milk samples from the Amazon region. On the other side, all samples from industrialized cities like São Paulo and Vitória showed any contamination. An extensive study will be necessary to map all the country and afterwards to investigate the development of these children. However, so far we conclude that a high correlation was found between the industrialization of the area and the presence of PCB in the breast milk analyzed.

Acknowledgements

This work was funded by São Paulo State Research, Support Foundation (FAPESP) and by the Brazil National Council for Scientific and Technological Research (CNPq). C. Kowalski thanks the Coordination for Improvement of Higher Level Personnel (CAPES) for scholarships. The authors also thank Roger Wagner for the assistance in GC-MS analysis and the donors and the Human Milk Bank's from the district of Santo Amaro-São Paulo, Vitória, Florianopolis and Rio Branco for the participation in the study.

5. References

1. WHO (World Health Organization). Air Quality Guideline. No. 2, WHO, Copenhagen, 2000.
2. Lambropoulou, D.A.; Konstantinou, I.K.; Albanis, T.A.; *J. Chromatogr. A* **2006**, *1124*, 97.
3. Safe, S. *Crit. Rev. Toxicol.* **1994**, *24*, 87.
4. Llompарт, M.; Pazos, M.; Landín, P.; Cela, R.; *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 5858.
5. Ahlborg, U.G.; Becking, G.C.; Birnbaum, L.S.; Brouwer, A.; Derks, H.J.G.M.; Feeley, M.; Golor, G.; Hanberg, A.; Larsen, J.C.; Liem, A.K.D.; *Chemosphere* **1994**, *28*, 1049.

4. Jaraczewska, K.; Lulek, J.; Covaci, A.; Voorspoels, S.; Kaluba-Skotarczak, A.; Drews, K.; Schepens, P.; *Sci. Total Environ.* **2006**, 372, 20.
5. Hong, J.E.; Pyo, H.; Park, S.J.; Lee, W.; *Anal. Chim. Acta* **2005**, 539, 55.
6. Norén, K.; Meironyté, D.; *Chemosphere* **2000**, 40, 1111.
7. Heck, M.C.; Santos, J.S.; Bogusz Jr, S.; Costabeber, I.; Emanuelli, T.; *Food Chem.* **2007**, 102, 288.
8. Costabeber, I.; Santos, J.S.; Xavier, A.A.O.; Weber, J.; Leães, F.L.; Bogusz Jr, S.; Emanuelli, T.; *Food Chem. Toxicol.* **2006**, 44, 1.
9. Johansen, P.; Muir, D.; Asmund, G.; Riget, F.; *Sci. Total Environ.* **2004**, 331, 189.
10. Schechter, A.; Cramer, P.; Boggess, K.; Stanley, J.; Olson, J.R.; *Chemosphere* **1997**, 34, 1437.
11. Basheer, C.; Lee, H.K.; Obbard, J.P.; *J. Chromatogr. A* **2004**, 1022, 161.
12. WHO (World Health Organization). Polychlorinated biphenyls and terphenyls. Environmental Health Criteria. No. 140, WHO, Geneva, 1993.
13. Bencko, V.; Cerna, M.; Jech, L.; Smid, J.; *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **2004**, 18, 83.
14. Furst, P.; Furst, C.; Wilmers, K.; *Environ. Health Perspect* **1994**, 102, 187.
15. Ingerido, A.M.; Ballard, T.; Dellatte, E.; di Domenico, A.; Ferri, F.; Fulgenzi, A.R.; Herrmann, T.; Iacovella, N.; Minero, R.; Papke, O.; Porpora, M.G.; Felip, E.D.; *Chemosphere* **2007**, 67, 301.
16. Yu, Z.; Palkovicova, L.; Drobna, B.; Petrik, J.; Kocan, A.; Trnovec, T.; Hertz-Picciotto, I.; *Chemosphere* **2007**, 66, 1012.
17. Vukavic, T.; Miloradov, M.V.; Ristivojevic, A.; Hlpka, J.; *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **2008**, 25, 176.
18. Gonzales, M.J.; Jiménez, B.; Hernández, L.M.; *J. High Resolut. Chrom.* **1995**, 16, 129.
19. Di Muccio, A.; Camino, I.; Dommarco, R.; Santilio, A.; Ausili, A.; Rizzica, M.; Gibli, B.; Calzolari, C.; *Ann. Inst. Super. Sanità* **1990**, 26, 155.

20. US-EPA, (US Environmental Protection Agency). Non-dioxin-like PCBs: effects and consideration in ecological risk assessment. National Center for Environmental Assessment, Office of Research and Development, Cincinnati, OH. NCEA-C-1340, 2003.
21. Ahmed, F.E. In *Environmental Contaminants in Food*; Moffat, C.F.; Whittle, K.J., eds.; Sheffield Academic Press: England, 1999.
22. Pereira, M.S.; Kuch, B.; *Chemosphere* **2005**, 60, 844.
23. http://www.anvisa.gov.br/toxicologia/dioxina_leite.doc, accessed in March 2008.
24. Valsamaki, V.I.; Boti, V.I.; Sakkas, V.A.; Albanis, T.A.; *Anal. Chim. Acta* **2006**, 573-574, 195.
25. Arthur, C.L.; Pawliszyn, J.; *Anal. Chem.* **1990**, 62, 2145.
26. Augusto, F.; Valente, A.L.P.; *Trends Anal. Chem.* **2002**, 21, 428.
27. Montes, R.; Ramil, M.; Rodriguez, I.; Rubí, E.; Cela, R.; *J. Chromatogr. A* **2006**, 1124, 43.
28. Penalver, A.; Pocurull, E.; Borrull, F.; Marcé, RM.; *Trends Anal. Chem.* **1999**, 18, 557.
29. Kowalski, C.H.; Silva, G.A.; Poppi, R.J.; Godoy, H.T.; Augusto, F.; *Anal. Chim. Acta* **2007**, 585, 66.
30. López, R.; Goñi, F.; Etxandia, A.; Millán, E.; *J. Chromatogr. A* **2007**, 846, 298.
31. Sundberg, S.E.; Ellington, J.J.; Evans, J.J.; *J. Chromatogr. B* **2006**, 831, 99.
32. Verenitch, S.S.; deBruyn, A.M.H.; Ikonomou, M.G.; Mazumder, A.; *J. Chromatogr. A* **2007**, 1142, 199.
33. Popp, P.; Keil, P.; Montero, L.; Ruckert, M.; *J. Chromatogr. A* **2005**, 1071, 155.
34. Potter, D.W.; Pawliszyn, J.; *Environ. Sci. Technol.* **1994**, 28, 298.
35. Röhrig, L.; Meisch, H.U.; *Fresenius J. Anal. Chem.* **2000**, 366, 106.
36. Miller, J.M. *Chromatography: Concepts and Contrasts*, 2nd ed., Wiley: New Jersey, 2005.

37. ICH (International Conference on Harmonisation). Validation of Analytical Procedures: Methodology, Q2B (CPMP/ICH/281/95), 1995.
38. Criado, M.R.; Pereiro, I.R.; Torrijos, R.C.; *Talanta* **2004**, 63, 533.
39. Almeida, F.V.; Centeno, A.J.; Bisinoti, M.C.; Jardim, W.F.; *Quim. Nova* **2007**, 30, 1976.
40. She, J.; Petreas, M.X.; Visita, P.; McKinney, M.; Sy, F.J.; Winkler, J.J.K.; Hooper, K.; Stephens, R.D.; *Chemosphere* **1998**, 37, 431.
41. http://www.cetesb.sp.gov.br/noticentro/2005/11/23_jurubatuba.htm, accessed in september 2008.

CAPÍTULO 4

UTILIZAÇÃO DE MAPAS DE KOHONEN PARA A ANÁLISE EXPLORATÓRIA DO PERFIL DE CONTAMINAÇÃO DO LEITE MATERNO BRASILEIRO COM BIFENILAS POLICLORADAS

**Cláudia Hoffmann Kowalski^{1*}; Gilmare Antônia da Silva²; Ronei Jesus Poppi³;
Helena Teixeira Godoy¹; Fabio Augusto³**

¹ Departamento de Ciência de Alimentos (DCA), Faculdade de Engenharia de Alimentos (FEA), Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), CP 6121, CEP 13083-862, Campinas, SP, Brasil.

² Departamento de Química (DEQUI), Instituto de Ciências Exatas e Biológicas (ICEB), Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), CEP 35400-000, Ouro Preto, MG, Brasil.

³ Departamento de Química Analítica (DQA), Instituto de Química (IQ), Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), CP 6154, CEP 13084-971, Campinas, SP, Brasil.

* claukowalski@gmail.com

(Manuscrito a ser submetido para publicação em periódico de circulação nacional)

Abstract

Polychlorinated biphenyls (PCB) are spread worldwide as a contaminant of air, water, soil, sediments and food. Due to their tendency to accumulate in matrixes with high lipid content, the contamination of the breast milk with these compounds is a serious issue, mainly to the newborn. To establish the correlation between analytical results *versus* data as lifestyle, economical and social status, city and age is a hard work due to the quantity of variables to consider. Chemometric tools as Kohonen Neural Network is appropriated to realize this kind of exploratory analysis. Kohonen proposed an approached using self-organizing maps that allow the representation of the complexes data in two dimensions. This way, it is possible to identify similar individuals by simple visual inspection of the map. In this study, milk samples from 193 breastfeeding mother of 4 Brazilian regions (south, southeast, northeast and north) were collected. The PCB were extracted by *headspace* solid phase microextraction and analyzed by gas chromatography with electron capture detector. Each donor filled a questionnaire with 35 questions about habits, breastfeeding, characteristic of the city that life between others. The Kohonen Neural Network was used to correlate the chromatographic areas of the PCB and the responses obtained to the questionnaire. It was possible to correlate the occurrence of different PCB congeners in the breast milk with: (a) the region of the Brazil that the breastfeeding live, (b) the nearness to an industry, (c) the nearness to a contaminated river, (d) the type of milk (colostrums, foremilk and hindmilk) and (e) the number of gestations. In the studied data, no correlation was observed between the PCB responses and diet habits of the donor either age or economic and social status.

Keywords: polychlorinated biphenyls; breast milk; Brazil; exploratory analysis; Kohonen neural network; gas chromatography; solid-phase microextraction.

1. Introdução

As bifenilas policloradas (PCB) são compostos organoclorados xenobióticos formados a partir da substituição de átomos de hidrogênio por átomos de cloro nos anéis da molécula da bifenila (Cairns et al., 1986; Erickson, 1992; Breivik, et al., 2002a). O número e a posição dos átomos de cloro na molécula determinam suas propriedades físicas, químicas e toxicológicas (WHO, 1993; Lehmler, et al., 2002).

Eles foram amplamente utilizados em escala mundial por aproximadamente seis décadas (1930-1993), quando foram produzidos mais de 1,3 milhões de toneladas (Breivik, et al., 2002a). Foram muito utilizados como fluido dielétrico em transformadores e capacitores, fluidos hidráulicos, óleos lubrificantes, tintas e pesticidas, dentre outras aplicações (Cairns, et al., 1986; WHO, 1993; Pelizzari, 1995; Breivik, et al., 2002b). Em 1966, Jensen e colaboradores detectaram pela primeira vez, a presença de PCB no meio ambiente. Desde então, a comunidade científica tem investigado os níveis de contaminação ambiental, bem como o grau de toxicidade deste produto para os seres vivos, especialmente o homem, já que este se encontra no topo da cadeia alimentar, sendo por isso, o mais propenso a bioacumular esses compostos (Da Costa, 2004).

Os PCB chegaram ao meio ambiente pela deposição intencional ou acidental em solos, rios, lagos, lagoas e aterros sanitários de óleos, detritos contaminados ou artefatos como antigos transformadores e capacitores. Também, por volatilização, a partir dos locais de produção, uso e armazenamento e, ainda, durante o processo de incineração de lixo urbano que contenha artefatos ou detritos contaminados com PCB (Lauber, 1986).

Nos seres humanos, os PCB são rapidamente absorvidos pelo trato gastrointestinal e distribuídos e acumulados no fígado e tecido adiposo (WHO 2003), sangue (Schisterman et al., 2005) e gordura do leite (Noren and Meironyte, 2002). Eles também se difundem facilmente pela placenta e se acumulam no feto (WHO, 2003). Sendo assim, o recém-nascido já foi exposto aos PCB durante a gestação e continua sendo exposto durante a amamentação. Conseqüentemente,

essas crianças terão níveis muito maiores de PCB que os adultos (WHO, 2000), estando propensas a problemas hepáticos, imunossupressão, neuropatias, aumento de risco de melanoma maligno (Pelizzari et al., 1997), distúrbios respiratórios e do sistema nervoso central (WHO, 1993), alterações imunológicas (Lu et al., 1985) e endócrinas (Brower, 1999).

Em resposta aos efeitos adversos observados em sistemas vivos e humanos, a produção e uso de PCB foi restrita e banida na Europa e América do Norte durante os anos 70 (Jaraczewska et al., 2006). No Brasil, a comercialização do PCB bem como sua utilização como fluidos dielétricos em novos capacitores e transformadores foi proibida em 1981 (Nogueira et al., 1987).

Como já foi visto anteriormente, o leite humano é considerado um importante fluido biológico a ser monitorado quanto à presença de Poluentes Orgânicos Persistentes (POP), devido as suas características de acúmulo na cadeia alimentar (Jensen and Slorach, 1991). No caso dos PCB, a concentração encontrada no leite materno é, em média, de quatro a dez vezes maior do que aquelas encontradas no sangue (WHO, 1993). Dentre os principais fatores que influenciam os níveis de PCB no leite humano destacam-se o teor de lipídios, o tempo decorrido a partir do início da lactação, a idade e peso da mãe, o número de filhos, a origem e o local de residência, os hábitos alimentares, a sazonalidade, o tabagismo, a quantidade de leite e a exposição ocupacional (WHO, 1993, Harris, 2001).

Os PCB normalmente estão presentes nos seres humanos na ordem de ppb (partes por bilhão) sendo necessários métodos bastante eficientes para a extração e sensíveis para a detecção. A cromatografia gasosa com detector de captura de elétrons (GC-ECD) é usualmente empregada para a separação e detecção de isômeros de PCB. Previamente às análises por GC-ECD, procedimentos de preparação das amostras são necessários para isolar os PCB da matriz.

A microextração em fase sólida (SPME) foi introduzida por Arthur & Pawliszyn (1990) como uma técnica de preparação de amostra livre de solventes.

Ela tem sido extensivamente usada para uma grande variedade de compostos e matrizes (Augusto and Valente, 2002), inclusive para a determinação de PCB em amostras ambientais (Montes et al., 2006; Penalver et al., 1999) e leite humano (Kowalski et al., 2007).

Segundo Silva et al (2008), como a técnica de HS-SPME é mais rápida e simples que outras técnicas similares, mais amostras tem sido processadas, gerando uma quantidade maior de dados a serem interpretados. Sendo assim, tem se tornado cada vez mais popular o uso ferramentas estatísticas, como a Análise de Componentes Principais (PCA), para o tratamento de dados gerados por cromatogramas de HS-SPME (Bicchi et al., 1997).

No entanto, o PCA tem algumas limitações (Otto, 1999) como o fato de que na maioria dos casos é necessário trabalhar em espaços multidimensionais fornecidos pelas componentes principais (PC), dificultando a interpretação dos resultados e o agrupamento de amostras similares.

Em 1989, Teuvo Kohonen (Kohonen, 1989) introduziu o conceito de mapas auto-organizáveis. O desenvolvimento das redes de Kohonen como modelo neural foi inspirado no modo pelo qual informações sensoriais são mapeadas no córtex cerebral. Neste contexto, entradas sensoriais distintas são representadas por mapas computacionais topologicamente ordenados. Seu objetivo é descobrir padrões significativos ou característicos dos dados de entrada (Francisco, 2004).

Uma característica muito pertinente da Rede de Kohonen é que os mapas preservam a topologia de uma representação multidimensional dentro de um novo arranjo de dimensões bastante reduzidas de neurônios, especialmente o espaço bidimensional, sem perda da informação original.

A visualização e interpretação da rede de Kohonen vêm principalmente do fato de que o usuário pode assumir que todas as amostras posicionadas em um mesmo neurônio são consideradas semelhantes entre si, de acordo com o aspecto avaliado. Outro ponto é a possibilidade de formação de conjuntos de amostras que são consideradas possuírem as mesmas características avaliadas, devido à localização em neurônios próximos (neurônios vizinhos). Essa facilidade

de visualização da distribuição dos dados é uma de suas principais características, resultando em um método mais amigável de interpretação dos dados (Kohonen et al., 2008; Da Silva, 2007; Haykin, 2001; Vesanto et al., 2000).

2. Materiais e métodos

2.1 Comitê de Ética

O projeto intitulado “Desenvolvimento, validação e aplicação de metodologia analítica para determinação de bifenilas policloradas (PCBs) em leite materno coletado em Bancos da Rede Nacional de Leite Humano” foi encaminhado para o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP. Todos os procedimentos para o preenchimento da Folha de Rosto (FR) foram baseados na Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde e suas complementares (http://conselho.saude.gov.br/resolucoes/reso_96.htm). Sendo assim, o projeto recebeu como código de Folha de Rosto o FR-59732 e foi encaminhado para o CONEP (Conselho Nacional de Ética em Pesquisa) com o número CAAE (Certificado de Apresentação para Apreciação Ética) 0023.0.146.000-05. Maiores informações sobre o trâmite de aprovação do projeto estão disponíveis no SISNEP (Sistema Nacional de Informações sobre Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos), no link abaixo: http://portal.saude.gov.br/sisnep/pesquisador/extrato_projeto.cfm?CODIGO=59732

Após a aprovação pelo CONEP (Anexo 1), o projeto foi encaminhado para os Bancos de Leite Humano (BLH) de todo o Brasil para ser apreciado nas reuniões locais.

2.2 Bancos de Leite

Com o objetivo de ter uma boa representatividade sobre a contaminação do leite materno por PCB no Brasil, foi realizado contato com 26 bancos de leite de todas as regiões do país durante o ano de 2005 e 2006. Entretanto, inúmeros fatores, dentre eles a falta de funcionários para coletar separadamente os 200 mL

necessários para a pesquisa, etiquetar conforme nosso padrão e ajudar no preenchimento dos questionários da pesquisa, bem como do termo de consentimento, além da dificuldade de enviar as amostras para Campinas, dificultaram muito nosso trabalho. Por fim, o projeto foi aprovado em 10 BHL, sendo esses distribuídos da seguinte forma:

Região Sul:Santa Catarina:

- Hospital Infantil Joana de Gusmão, Florianópolis.
- Hospital Regional de São José Dr. Homero de Miranda Gomes, Florianópolis:
- Central de Incentivo ao Aleitamento Materno, Hospital Universitário, Universidade Federal de Santa Catarina (CIAM- HU-UFSC), Florianópolis.

Paraná:

- Hospital das Clínicas, Universidade Federal do Paraná (HC-UFPR), Curitiba.

Região Sudeste:São Paulo:

- Hospital Maternidade Leonor Mendes Barros, Belenzinho, São Paulo.
- Hospital Regional Sul, Santo Amaro, São Paulo.

Espírito Santo:

- Hospital Universitário Cassiano Antonio de Moraes, Universidade Federal do Espírito Santo (HUCAM-UFES), Vitória.

Minas Gerais:

- Centro de Atendimento à Mulher, Araxá.

Região Nordeste:Sergipe:

- Maternidade Hildete Falcão Batista, Aracaju.

Rio Grande do Norte:

- Maternidade Januario Cicco, Natal.

Maranhão:

- Hospital Universitário Materno Infantil, Universidade Federal do Maranhão, São Luis.

Região NorteAcre

- Maternidade Bárbara Heliodora, Rio Branco

O mapa da Figura 1 mostra a localização de cada um dos estados supracitados.



Figura 1. Mapa do Brasil: (1) Florianópolis, Santa Catarina, (2) Curitiba, Paraná, (3) Santo Amaro, São Paulo, (4) Belenzinho, São Paulo, (5) Vitória, Espírito Santo, (6) Araxá, Minas Gerais, (7) Aracajú, Sergipe, (8) Natal, Rio Grande do Norte, (9) São Luis, Maranhão e (10) Rio Branco, Acre.

- 2.3 Amostras

Os coordenadores dos BLH receberam todas as informações necessárias a respeito do projeto e repassaram essas informações para o funcionário (a) designado a conversar com as doadoras. As mães que concordaram em participar da pesquisa preencheram o Termo de Consentimento (Anexo 2) e em seguida o questionário (Anexo 3). Aproximadamente 200 mL do leite doado por cada mãe foi separado em frascos de vidro esterilizados, etiquetados e congelados até completar a coleta das 20 amostras.

Após essa fase, as amostras foram acondicionadas em caixas de isopor com gelo reutilizável (Gelox ®) e transportadas até a UNICAMP. O transporte das amostras de São Paulo e Vitória foi feito via terrestre, sendo as demais via aérea. Já na UNICAMP, elas foram acondicionadas em freezer a -20 °C até a análise.

2.4 Questionários

Questionários com 35 perguntas foram aplicados às mães (Anexo 2). Esses questionários continham perguntas sobre o tipo de leite, tempo de amamentação, número de gestações, como se dá a ordenha, dados sócio-econômicos, cidades nas quais a mãe morou e mora atualmente, consumo de diferentes alimentos, procedência da água que é ingerida, proximidade de rios, contaminação desses rios, proximidade de indústrias e possíveis desastres ambientais ocorridos na redondeza de suas residências.

No total, 200 mães preencheram esse questionário no entanto em muitos casos, eles estavam incompletos, rasurados ou mesmo rasgados.

2.5 Reagentes e Materiais

Padrões de PCB (IUPAC 28, 52, 74, 101, 118, 128, 138, 153, 156, 170, 180 e 187) foram obtidos da Accustandard (New Haven, CT, USA). O isooctano (grau pesticida) foi fornecido pela Mallinckrodt (Kentucky, PA, USA). Outros reagentes tais como metanol e NaCl P.A. foram obtidos da Merck (Darmstadt, Germany), e da Ecibra (São Paulo, Brazil), respectivamente. Água deionizada purificada através de um sistema Milli-Q system (Millipore, Bedford, MA, USA) também foi

utilizada. Gás hélio e nitrogênio foram obtidos da White Martins (Rio de Janeiro, Brazil).

A fibra para SPME usada neste estudo foi uma fibra comercial de polidimetilsiloxano (PDMS) com espessura de recobrimento de 100 μm , inserida em um *holder* apropriado fornecido da Supelco (Bellefonte, PA, USA). Foram utilizados frascos de vidro de 16 mL tampados com septos de teflon/silicone fornecidos pela Pierce (Rockford, IL, USA). Para controlar a temperatura das extrações foi utilizado um banho termostático (Cole Parmer, USA).

2.6 Microextração em fase sólida (SPME)

As amostras foram descongeladas e 5 mL de cada amostra foram transferidas imediatamente para frascos de 16 mL. Foram adicionados 1,8 g de NaCl e 210 μL de metanol. Na sequência, os frascos foram agitados magneticamente (1200 rpm) por 10 min para permitir o equilíbrio amostra/*headspace*.

As fibras de PDMS 100 μm utilizadas foram devidamente acondicionadas antes do uso, conforme instruções do fornecedor. Após o equilíbrio, as fibras foram expostas ao *headspace* dos frascos por 60 min a 95 °C. Depois da extração, elas foram expostas ao injetor do cromatógrafo a 280 °C para dessorção dos analitos. As fibras eram mantidas no injetor por 5 min, tempo necessário para uma total dessorção dos analitos. Para minimizar o efeito de memória era realizada uma análise do branco entre cada análise de amostras.

2.7 Análise cromatográfica

As análises cromatográficas foram realizadas em um cromatógrafo AutoSystemXL GC-ECD (Perkin-Elmer, Norwalk, CT) acoplado com uma coluna HP-1MS (100 % polidimetilsiloxano) 30 m x 0,32 mm x 0,25 μm . O injetor *split-splitless* foi operado no modo *splitless* e ajustado com um *liner* adequado para SPME. A temperatura do forno foi programada da seguinte forma: 40 °C por 2 min, aumentando numa vazão de 30 °C min^{-1} até 190 °C, mantido por 5 min, então

aumentando numa vazão de $5\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ até $220\text{ }^{\circ}\text{C}$, mantido por 5 min e finalmente numa vazão de $20\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ até $300\text{ }^{\circ}\text{C}$, mantido por 1 min. As temperaturas do injetor e detector foram $280\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $320\text{ }^{\circ}\text{C}$, respectivamente. O gás carreador foi hélio com 99,999 % de pureza, a uma vazão de 1.3 mL min^{-1} , e o gás make-up foi o nitrogênio.

2.8 Tratamento dos dados

Para a análise dos dados foram utilizados os valores de área dos picos correspondentes aos PCB analisados. Esses dados foram inseridos em dois programas para o tratamento de dados:

- Pirouette 3.11 (Woodinville, WA): para cálculos de Análise de Componentes Principais (PCA), *website* www.infometrix.com
- MatLab 6.5 (The MathWorks, Natick, MA): para cálculos das Redes de Kohonen através do Toolbox para MatLab de rede neural artificial de Kohonen, que está disponível para domínio público no *website* <http://www.cis.hut.fi/projects/somtoolbox/>

Os dois tipos de análise exploratória utilizados objetivaram a separação de grupos de amostras conforme o tipo e o grau de contaminação por PCB e ainda verificar se existe alguma correlação entre esses dados e os dados obtidos nos questionários.

Nos dois casos, o conjunto de dados foi autoescalado ao longo das variáveis. No autoescalamento, os dados são centrados na média e divididos pela variância, obtendo um novo conjunto de dados. Esse procedimento é importante quando todas as variáveis analisadas têm o mesmo grau de importância e por isso, não é interessante desprezar resultados de áreas pequenas. Sem esse pré-processamento das variáveis, áreas muito grandes teriam uma influência grande no modelo e as áreas menores seriam ignoradas, anulando assim o estudo de qualquer correlação dessas áreas pequenas com os resultados obtidos nos questionários aplicados às mães.

Os mapas de Kohonen foram criados, inicializados e treinados com diferentes arquiteturas. Foi escolhida uma estrutura hexagonal e uma forma planar para a apresentação dos mapas. Foram treinados mapas com diferentes arquiteturas (4 x 4 a 12 x 12 neurônios, conforme o grupo de amostras) já que a capacidade de discriminação da rede é dependente do número de unidades selecionadas para definir o mapa.

3. Resultados e discussão

Para facilitar a interpretação dos resultados, foi feita uma análise de componentes principais (PCA) com as 193 amostras coletadas e os 12 PCB analisados, totalizando uma matriz 193 x 12.

Através do PCA verificou-se que sete componentes principais (PC) foram necessárias para explicar 96 % da variabilidade dos dados. A Figura 2 mostra o gráfico de scores de PC1 x PC2. A amostra 39, localizada na extrema direita da PC1, foi a mais contaminada dentre todas as analisadas, apresentando altos níveis dos PCB 52, 74, 153 e 180 totalizando $13.86 \mu\text{g.L}^{-1}$ de PCB total. Essa amostra foi obtida de uma doadora da cidade de São Paulo, que sempre viveu nesta mesma cidade e que está amamentando pela primeira vez. Essas informações indicam possíveis correlações entre os resultados analíticos e dados como (1) o acúmulo de PCB no organismo da mãe devido ao tempo de vida numa cidade altamente industrializada, e (2) a liberação de maiores quantidades de PCB na primeira amamentação. Essas correlações serão discutidas mais adiante.

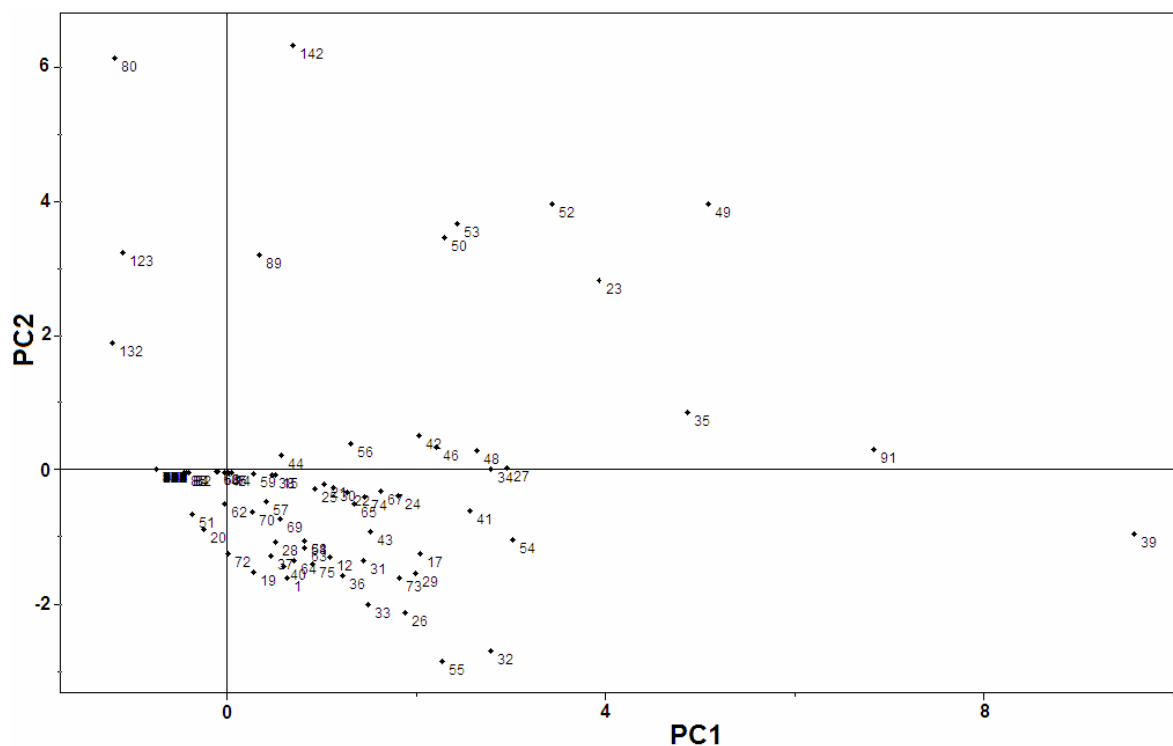


Figura 2. Gráfico de scores do PCA. PC1 *versus* PC2.

Analisando a Figura 2 vemos um grande número de amostras localizadas no quadrante inferior direito. Comparando com a Figura 3, vemos que esse grupo contém amostras contaminadas com os PCB 170, 180, 153 e 52, sendo que as amostras contaminadas com o PCB 170 ficaram alocadas mais à esquerda, tanto que as amostras 20 e 51 localizadas no quadrante inferior esquerdo referem-se a amostras que continham somente o PCB 170. No quadrante superior esquerdo encontramos um pequeno grupo de amostras contaminadas com os PCB 128 e 187, e logo à direita amostras que continham além desses, o PCB 138 (amostras 89 e 142). Mais à direita, temos amostras contaminadas com os PCB 74, 153 e 52.

De forma geral, a PC1 alocou as amostras com os PCB 52 e 74 a extrema direita do gráfico e as contaminadas com os PCB 128 e 187 a extrema esquerda, sendo que as demais amostras ocuparam a região intermediária. Já a PC 2 conseguiu separar as amostras com os PCB 128, 138 e 187 na parte superior do

gráfico e com os PCB 170 e 180 na parte inferior. As amostras contaminadas com o PCB 153 ocuparam a região central do gráfico de scores. Essa dificuldade de separar grupos distintos de forma mais clara, ocorreu porque a maioria das amostras encontra-se contaminadas com mais de um PCB.

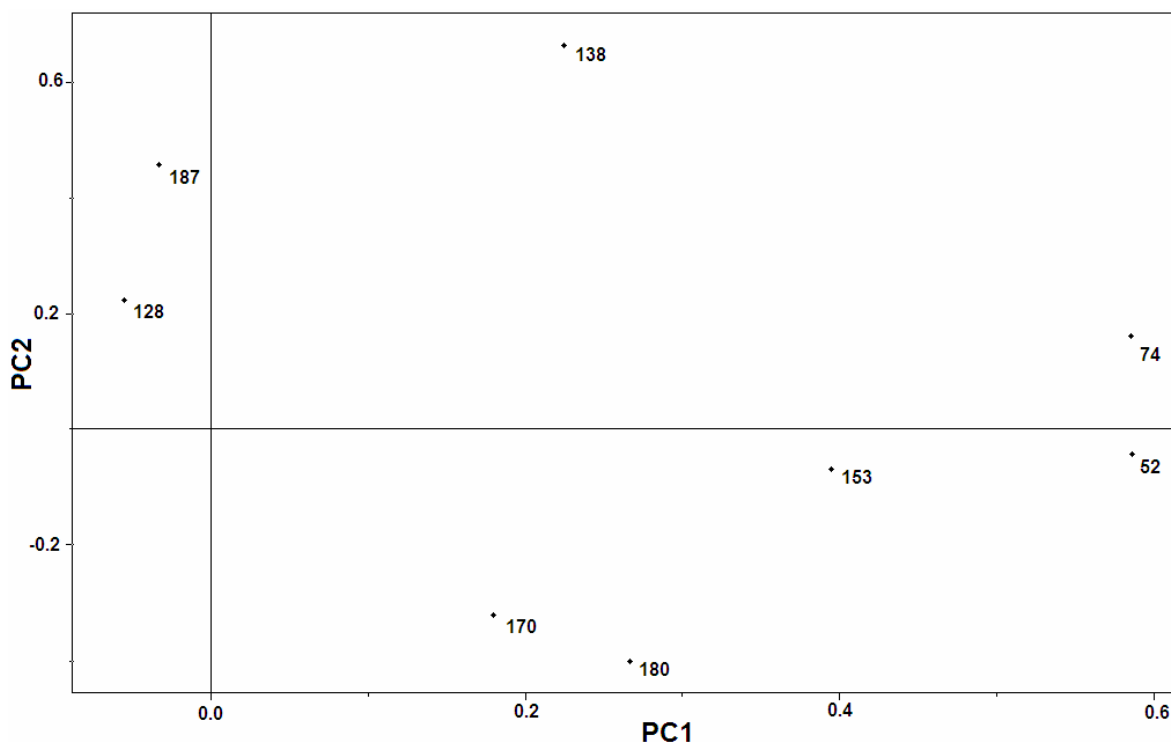


Figura 3. Gráfico de loadings do PCA. PC1 *versus* PC2.

Outra técnica bastante conhecida de análise exploratória é a Rede Neural de Kohonen. Comparando-a com a Análise de Componentes Principais (PCA) ela tem a grande vantagem de projetar todos os dados em um espaço bidimensional, sem perda da informação original. No caso do PCA os dados são projetados em espaços multidimensionais (no nosso caso, 7 PC) dificultando a visualização e interpretação dos gráficos gerados.

A rede de Kohonen foi primeiramente aplicada aos grupos de amostras (na maioria dos casos, grupos de 20 amostras) procedentes das 10 regiões estudadas para visualizar as semelhanças e diferenças dentro de cada grupo. A arquitetura da rede foi otimizada de modo a permitir uma distribuição adequada das amostras.

Dentre as várias arquiteturas testadas, uma arquitetura de 25 neurônios arranjados em hexágonos 5x5 garantiu uma melhor distribuição das amostras.

A Figura 4 mostra os agrupamentos formados entre as amostras em cada uma das regiões estudadas. Através dela é possível perceber que em Belenzinho/SP, Santa Catarina, Paraná e Rio Grande do Norte, várias amostras ficaram alocadas no mesmo neurônio, sendo estas as amostras nas quais não foram encontrados PCB. Em nenhuma das amostras do Acre, Maranhão e Minas Gerais foi encontrado PCB e por isso não foi necessário construir os mapas para essas regiões, já que todas as amostras ficariam alocadas no mesmo neurônio.

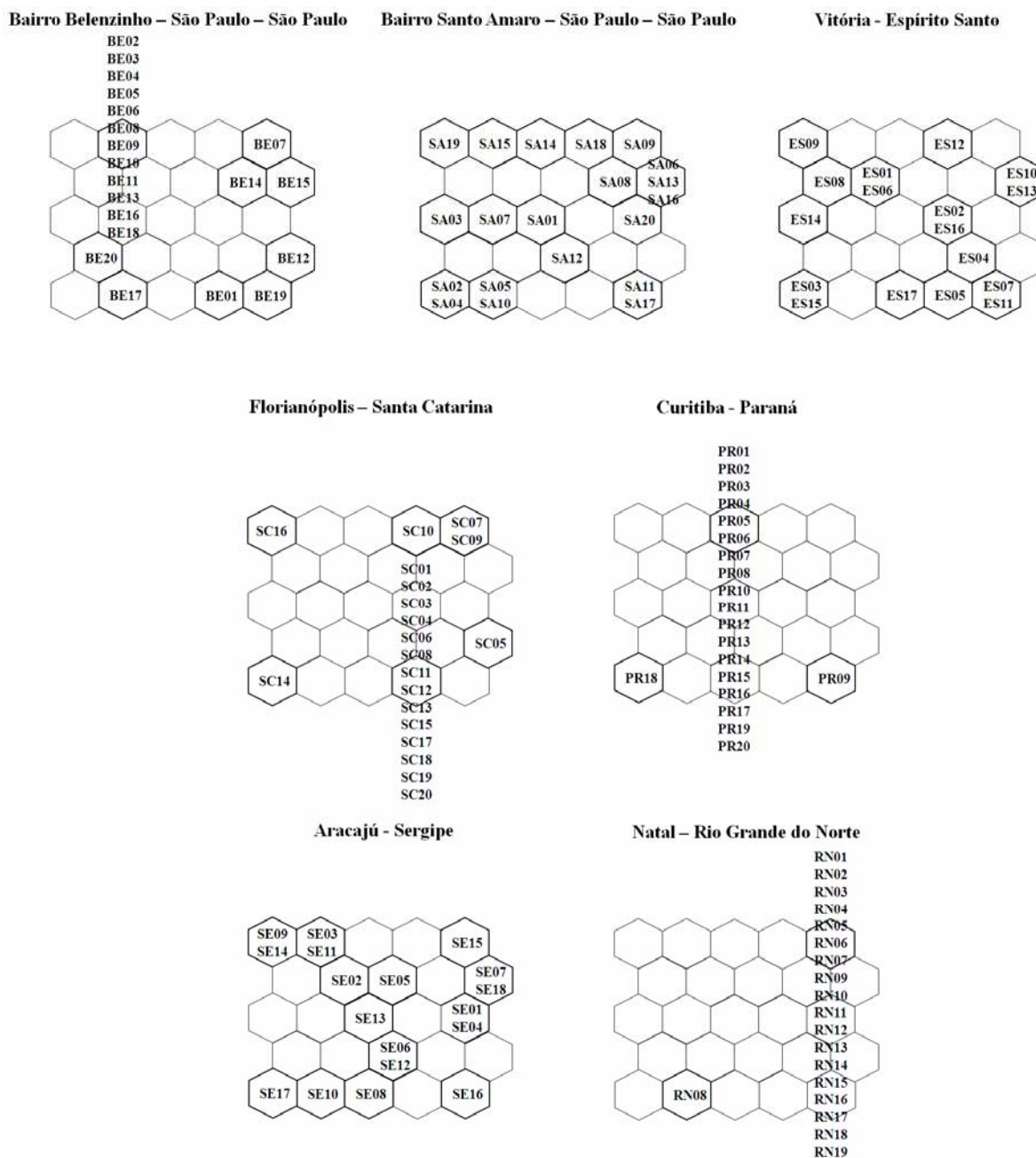


Figura 4. Perfil de distribuição das amostras nas respectivas cidades de origem após tratamento com rede neural de Kohonen.

Além disso, nos mapas de Santo Amaro/SP, Espírito Santo, Santa Catarina e Sergipe existem amostras contaminadas que se alocaram no mesmo neurônio

logo apresentam características químicas muito semelhantes no que diz respeito ao tipo e as concentrações de PCB encontrados. Essas informações foram confirmadas observando os dados originais.

Considerando o fato de que muitas amostras têm resultados muito parecidos ou mesmo idênticos à zero de área (logo, sem PCB), foi possível fazer uma redução da matriz de dados, sendo que das 193 amostras originais, somente 50 foram selecionadas para continuar os estudos. Além disso, foi feita uma seleção nas variáveis já que 4 PCB (PCB 28, 101, 118 e 156) não foram detectados em nenhuma das amostras coletadas. Desta forma, a matriz de 193x12 foi reduzida para uma matriz de 50x8, sem perda de informação.

As 50 amostras escolhidas foram renomeadas de M01 a M50 e novas arquiteturas foram treinadas objetivando uma melhor distribuição dessas 50 amostras. Arquiteturas de rede com 7x7 a 12x12 neurônios foram testadas, sendo que a rede escolhida foi a 7x7, pois essa permitiu uma eficiente distribuição das amostras na rede.

A Figura 5 mostra a distribuição das amostras e evidencia a formação de alguns conjuntos. Para interpretar a formação desses grupos foram observados os mapas de distribuição individual das variáveis, representados na Figura 6.

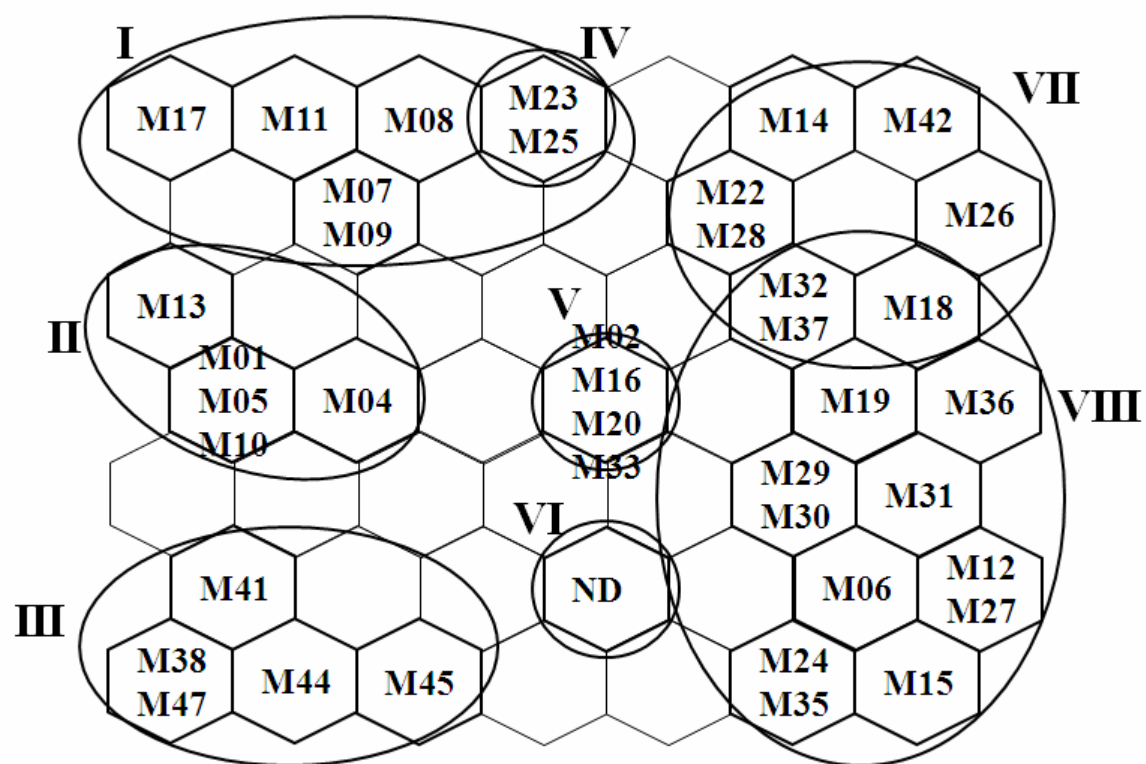


Figura 5. Perfil geral de distribuição de todas as amostras selecionadas, após tratamento com a rede neural de Kohonen.

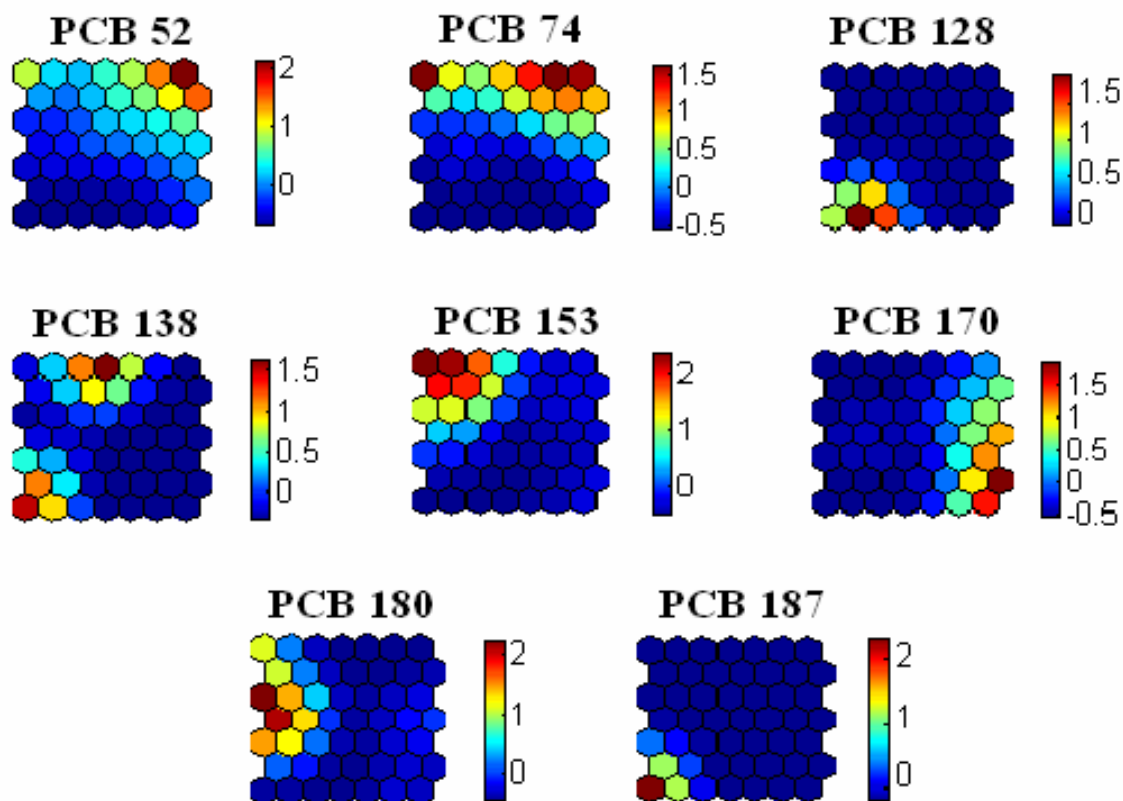


Figura 6. Mapas de distribuição individual das variáveis (PCB) utilizadas no tratamento pela rede de Kohonen.

Assim, através da escala de intensidade indicada na lateral de cada mapa da Figura 6, podemos ver que neurônios com tons avermelhados correspondem a neurônios que contêm amostras contaminadas com o PCB em questão. Por exemplo, quando analisamos na Figura 5 o neurônio que contém a amostra M17 (amostra 39 da Figura 2) vemos que esse neurônio tem uma coloração mais avermelhada para os PCB 52, 74, 153 e 180. De fato, quando observamos os resultados de contaminação de PCB verificamos que nesta amostra foram detectados os PCB 153 ($4.18 \mu\text{g.L}^{-1}$), PCB 52 ($6.19 \mu\text{g.L}^{-1}$), PCB 74 ($2.08 \mu\text{g.L}^{-1}$) e PCB 180 ($1.41 \mu\text{g.L}^{-1}$). Esse procedimento foi feito para as 50 amostras estudadas, sendo possível determinar quais amostras estão contaminadas com

quais PCB e com qual intensidade. Para facilitar essa discussão, oito conjuntos foram separados na Figura 5, considerando as intensidades de cada PCB mostradas na Figura 6:

Grupo 1: grupo caracterizado por amostras que contém o PCB 153, sendo que algumas contém também os PCB 52, 74, 138 e 180.

Grupo 2: grupo caracterizado pelo PCB 180, mas que contém algumas amostras que tem também o PCB 153.

Grupo 3: grupo caracterizado por amostras que contém somente os PCB 128, 138 e 187.

Grupo 4: grupo caracterizado por amostras que contém bastante PCB 138, mas também baixas quantidades dos PCB 153, 52 e 74.

Grupo 5: grupo que contém baixas quantidades do PCB 52.

Grupo 6: grupo de amostras nas quais nenhum PCB foi detectado.

Grupo 7: grupo caracterizado por amostras contaminadas com os PCB 52 e 74, contendo também algumas amostras contaminadas com o PCB 170.

Grupo 8: grupo caracterizado por amostras contaminadas com o PCB 170, sendo que muitas contém também o PCB 52 e 74.

Apesar dos grupos 7 e 8 não se separarem nessa arquitetura 7x7, é necessário manter um compromisso entre o número de neurônios na arquitetura e o número de amostras. Neste caso, temos 49 neurônios para 50 amostras. Arquiteturas com mais neurônios conseguiram separar esses dois grupos mas por outro lado, muitos agrupamentos bem definidos nessa estrutura se dividiram devido à maior quantidade de neurônios para se alocarem. Por exemplo, a arquitetura 9x9 separou o grupo 7 e 8, mas como contém 81 neurônios, muitas amostras se separaram dos seus grupos originais e ficaram isoladas, dificultando qualquer interpretação dos resultados.

Sendo assim, as informações contidas no mapa das amostras (Figura 5) e as informações contidas nos questionários que cada mãe preencheu na ocasião da coleta do leite (Anexo 2), foram cruzadas para fundamentar possíveis correlações entre esses dados.

Um total de 35 perguntas foram realizadas incluindo questionamentos sobre dados sócios econômicos, alimentares, de higiene, histórico da gestação, dentre outras. Muitas destas 35 perguntas não foram respondidas por algumas mães, ou por negligência do Banco de Leite responsável ou da própria mãe doadora. Mesmo assim, todas as perguntas respondidas pelas 50 doadoras selecionadas foram cruzadas uma a uma com a distribuição das amostras na Figura 5.

Desta forma, foi verificado que as respostas de cinco perguntas poderiam justificar as semelhanças e diferenças das amostras apontadas pelo mapa. São elas: tipo de leite, número de filhos, região do país, rios próximos a residência e indústrias próximas a residência. Dentre as outras perguntas, nenhuma correlação foi observada. Na Figura 7 temos uma representação da Figura 5, mas considerando as respostas obtidas nos questionários.

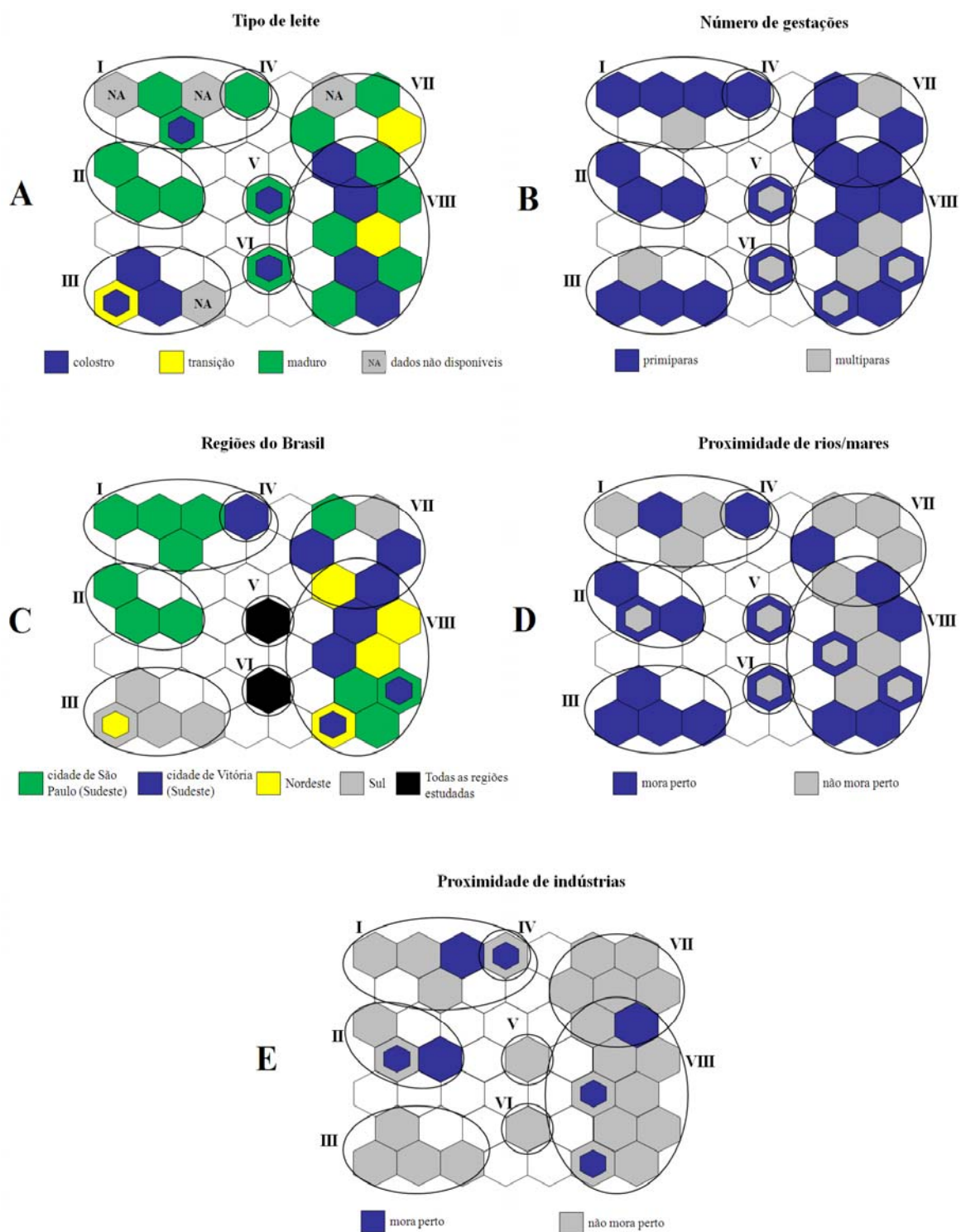


Figura 7. Perfil de distribuição das respostas obtidas nos questionários nos mapas da rede de Kohonen: Em A, a distribuição para o tipo de leite, em B, para o número de gestações que a mãe já teve, em C, para a região do país onde as amostras foram coletadas, em D para a proximidade com rios e em E, para a proximidade com indústrias.

Tipo de leite (coloostro x transição x maduro)

É conhecido que a composição do leite materno varia muito conforme o tempo decorrido a partir do início da lactação. Nos primeiros dias após o parto ocorre a produção de uma secreção chamada de colostro. Após esse período até aproximadamente a segunda semana é produzido o leite de transição que depois passa a ser chamado de leite maduro. O colostro é um líquido viscoso e amarelado de alto valor nutritivo e densidade, que contém leucócitos, imunoglobulinas, lactoferrinas entre outros fatores de proteção (Forsyth, 1995). Quando comparado ao leite maduro, o colostro contém mais vitaminas lipossolúveis, minerais e aproximadamente 10 % mais proteínas. Por outro lado, contém menos gordura e vitaminas hidrossolúveis que o leite maduro, sendo que a porcentagem de gordura pode variar de 1-2 % na fase do colostro até 4-5 % no leite maduro (Lopes, 1996). A elevada concentração de proteínas no colostro pode aumentar a excreção de compostos tóxicos como os metais pesados, que muitas vezes apresentam-se na forma de metaloproteínas. Já compostos tóxicos de caráter mais lipofílico como os PCB estão mais propensos a estarem presentes no leite maduro. Matheson (1990) observou que a concentração de poluentes orgânicos persistentes (POP) aumenta progressivamente ao aumento da quantidade de triglicerídeos nos glóbulos de gordura. No meio científico há algumas controvérsias quanto a essa tendência, porém vários estudos demonstram que o colostro apresenta níveis mais baixos de HCH, DDT, PCB e dioxinas do que o leite maduro (Jensen and Slorach 1991; Czaja et al., 1999). Em geral, a mulher lactante pode perder 25% do total acumulado dessas substâncias, transferindo-as para a criança durante o período da amamentação. Crianças amamentadas recebem uma média diária desses compostos duas vezes maior do

que os adultos, considerando o seu baixo peso corpóreo (Van Leeuwen et al., 2000).

Na Figura 7A é possível identificar como cada grupo está composto, considerando o tipo de leite fornecido pela mãe. É importante ressaltar ainda que das 50 amostras analisadas, 50 % foram amostras de leite maduro, 6 % de transição, 32 % de colostro e 12 % das mães não responderam.

O grupo II da Figura 7A é composto por amostras de leite maduro contaminadas com altos níveis do PCB 180. Esse PCB contém 7 átomos de cloro na sua molécula e é sabido que quanto maior a cloração, maior a lipossolubilidade. Aliado a este fato, a posição dos substituintes dificulta a biotransformação deste PCB, quando comparado com outros PCB (Georgii et al., 1995). Através dessa perspectiva fica fácil entender porque altas concentrações deste PCB foram encontradas em amostras de leite maduro. O Grupo I é caracterizado por amostras contaminadas com o PCB 153, que juntamente com o PCB 180 e 138 são comumente encontrados no leite materno. Os PCB 138 e 153 (grupos I e IV) têm estrutura química muito parecida entre si e também estão presentes em amostras de leite maduro principalmente. Já o grupo III é composto basicamente por amostras de colostro e é caracterizado pela presença dos PCB 128, 187 e 138, sendo os dois primeiros classificados como ligeiramente solúveis em água, portanto apresentam-se um pouco mais solúveis no colostro do que os demais. Das 16 amostras de colostro, 43 % estão localizadas nos grupos V e VI (baixos níveis do PCB 52 e sem contaminação, respectivamente), sendo que dentre as amostras de leite maduro, somente 28 % estão nestes grupos.

Número de gestações (primíparas x multíparas)

Sabe-se que a lactação é um importante processo para eliminar compostos organoclorados do organismo da mãe (Czaja et al., 2001). Hong et al. (1994) indicam que os fatores básicos que afetam a concentração destes compostos no leite incluem a idade da doadora, o número de filhos e a duração de cada amamentação. Outros estudos demonstram que a excreção desses compostos

durante a lactação é muito maior que a ingestão desses componentes com a dieta (Jensen and Slorach, 1991) o que comprova o grande acúmulo destes compostos nos tecidos. Em relação ao número de gestações, vários estudos mostram uma diminuição na excreção de PCB da 1ª para a 2ª gestação (Skaare and Polder, 1990, Spicer and Kereu, 1993, Vaz et al, 1993, Czaja, 2001). Czaja (2001) verificou também se o intervalo entre as gestações influencia na eliminação dos PCB e verificou que mães que tiveram um intervalo curto entre a 1ª e 2ª gestação (8 meses) eliminaram quantidades bem menores desses compostos na 2ª gestação do que as mães cujo intervalo entre gestações foi de 2 anos. Isso demonstra um re-acúmulo relativamente rápido destes compostos nos tecidos em 2 anos.

O mapa da Figura 7B apresenta as informações sobre o número de gestações de cada mãe. A maioria das 50 mães selecionadas eram primíparas (78 %) sendo as restantes multíparas. Observa-se que os grupos I, II, III, IV e VI são predominantemente compostos de amostras de leite de mães primíparas. No geral, as amostras de mães primíparas apresentaram maior contaminação mas não foi possível correlacionar a presença de determinado congênere de PCB com o fato de ser 1ª e 2ª gestação. Isso provavelmente ocorre porque a mesma fonte de PCB que contaminou a mãe na 1ª gestação, continuará contaminando o leite na 2ª gestação, em quantidades menores ou não, dependendo do intervalo entre as gestações.

As mães foram questionadas também sobre o tempo que estão amamentando mas somente 56 % delas responderam a essa pergunta. Por isso não foi possível estabelecer qualquer correlação entre essa informação e os mapas.

Regiões do Brasil

Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), em novembro de 2007 a população do Brasil atingiu 183,9 milhões de habitantes (IBGE, 2008), sendo que aproximadamente 140 milhões moram em áreas urbanas

(censo 2000). O Brasil é o 5º maior país do mundo, tanto em extensão como em contingente populacional (Brasil, 2008).

Nesta pesquisa procurou-se coletar amostras de leite das mais variadas regiões para visualizar de forma mais abrangente a contaminação por PCB no país. Para isso, foram selecionadas cidades altamente industrializadas e populosas como São Paulo, mas também cidades pouco populosas como Araxá, cidades costeiras como Natal e cidades da região amazônica como Rio Branco.

A Figura 7C mostra a distribuição da contaminação conforme a região do país. Para facilitar a discussão dos resultados e também a visualização dos dados no mapa, as cidades foram agrupadas na legenda conforme a região do país que pertencem. As amostras de São Paulo e Vitória ficaram separadas na legenda porque mesmo que fazem parte da mesma região do Brasil (sudeste), elas tiveram comportamentos bem diferentes e, além disso, havia o interesse de comparar os 2 bairros da cidade de São Paulo. A numeração das amostras (Figura 4) foi montada na seguinte sequência:

M01 – M06: Belenzinho/SP

M07 – M17: Santo Amaro/SP

M18 – M29: Vitória/ES

M30 – M37: Aracajú/SE

M38 – M42: Florianópolis/SC

M43 – M43: Rio Branco/AC

M44 – M46: Curitiba/PR

M47 – M48: Natal/RN

M49: Araxá/MG

M50: São Luís/MA

Através do mapa 7C, é possível concluir que as amostras provenientes de São Paulo se caracterizaram principalmente pela presença dos PCB 153 e 180, que devido à alta estabilidade química, são os mais comumente encontrados no leite humano (Jaraczewska, et al., 2006; Norén and Meironyté, 2000; She et al., 1998). Dois bairros da cidade de São Paulo foram estudados, sendo que somente

uma amostra de leite de Belenzinho não estava contaminada com nenhum PCB. Em relação as 11 amostras selecionadas de Santo Amaro, 85 % estavam contaminadas com o PCB 153, e algumas com os PCB 180, 170, 52 e 74. Já em Belenzinho, o PCB mais encontrado foi o PCB 180. Através dos dados originais vemos que o grupo I (menos o grupo IV) é composto exclusivamente de amostras de Santo Amaro, bem como o grupo II é composto predominantemente de amostras de Belenzinho.

Santo Amaro e Belenzinho são dois bairros próximos, o primeiro localizado as margens do Rio Pinheiros e o segundo as margens do Rio Tietê, sendo que o primeiro deságua no segundo. Ambos os rios começaram a ser poluídos na década de 40, quando tem início o processo de industrialização da grande São Paulo e hoje estão passando por processos de revitalização. Mesmo assim, o Rio Pinheiros ainda recebe efluentes de inúmeras indústrias além dos dejetos de milhares de famílias, e o Rio Tietê, até a bem pouco tempo atrás recebia afluentes com o esgoto industrial das grandes fábricas da região do ABC paulista (Fundaj, 2008, Bitar, 2000).

Hoje, a maioria das indústrias estão sendo transferidas para o interior do estado de São Paulo, mas a contaminação por elas gerada continua no meio ambiente da capital. Em 2005, a Companhia Estadual de Tecnologia e Saneamento Ambiental (CETESB) interditou vários poços profundos na região de Santo Amaro por causa da confirmação da contaminação da água subterrânea e superficial com substâncias cloradas. Isso é mais preocupante quando consideramos que nesta região há uma das grandes represas responsáveis pela distribuição de água da região metropolitana. Almeida et al (2007) relataram que entre 250.000 a 300.000 t de Ascarel ainda estão sendo utilizados no Brasil, sendo a maioria na grande São Paulo. Além disso, muitos casos de vazamento de óleo contendo Ascarel já foram confirmados em São Paulo nas últimas décadas, sendo que muitos deles ocorreram em estações de energia elétrica inativas.

Em 1987, na grande São Paulo foram encontrados níveis de PCB da ordem de 2 mg kg^{-1} , o dobro do índice médio encontrado pela OMS em cidades

industrializadas (Nogueira et al., 1987). Segundo o autor, a falta de um sistema eficiente de fiscalização contribui para a destinação inadequada desta fonte de poluição e, por este motivo, dentre outros, níveis elevados de PCB serão encontrados, provavelmente, entre habitantes de outras grandes cidades brasileiras.

Dentre todas as amostras analisadas, a amostra M17, também procedente de Santo Amaro, foi a mais contaminada, totalizando $13,86 \mu\text{g.L}^{-1}$ dos PCB 153, 180, 52 e 74. Esses congêneres, juntamente os PCB 101, 118 e 156 foram comercializados e distribuídos ao redor do mundo numa mistura conhecida como Aroclor® ou Ascarel (Monsanto, USA).

Sendo assim, é possível afirmar que no caso de São Paulo, o grau de industrialização e poluição da cidade está altamente correlacionado com a contaminação do leite materno.

Diferentemente de São Paulo, Vitória é uma cidade litorânea que possui dois importantes portos de exportação, que juntamente com indústrias siderúrgicas e de mineração suportam a economia local.

No mapa 7C visualizamos como as amostras de Vitória se distribuíram quanto à contaminação. Em ordem decrescente temos o PCB 52 (83.3 %), 74 (66.7 %) (grupo VII), 170 (50 %) (grupo VIII) e ainda os PCB 153 e 138 (grupo IV) em algumas amostras, ao contrário das amostras de São Paulo, onde predomina os PCB 153 e 180. Esse fato pode ser explicado se considerarmos que existe uma tendência desses PCB menos clorados, como o PCB 52 e 74, se encontrarem na água e no ar, enquanto os mais clorados estão no solo (Rissato, 2006). Assim, como se trata de uma cidade litorânea, é possível que exista uma maior exposição da população local a este tipo de PCB, inclusive por contato com a pele e inalação.

Além disso, como já foi citado anteriormente, as indústrias siderúrgicas são uma das bases da economia de Vitória. Almeida et al (2007) relatam que das 250.000 a 300.000 t de Ascarel ainda usados no Brasil, aproximadamente 50 % (em torno de 120.000 t) encontra-se em indústrias petroquímicas e siderúrgicas. O

uso de Ascarel em grandes indústrias como as siderúrgicas se dá principalmente em sistemas fechados, como fluídos dielétricos em transformadores e capacitores. Nessa aplicação, as misturas mais usadas são Aroclor 1242, 1254 e 1260, que além de outros PCB, contém os PCB 52, 74, 138 e 170. Aliado a essas informações, 4 doadoras (33.3 %) cujo leite estava contaminado responderam que moram próximo a indústrias. Destas, 2 (M18 e M24) moram perto de siderúrgicas, 1 (M28) perto de uma metalúrgica e 1 (M23) perto de uma produtora de luvas, sendo que essa última descreveu a presença de odores desagradáveis vindos da indústria. Curiosamente, essas mesmas 4 doadoras responderam que moram perto de rios, o que pode indicar possível contaminação com efluentes das indústrias.

As amostras do nordeste tiveram um comportamento parecido com as de Vitória. Dentre as coletadas em Aracaju, todas se situaram nos grupos VII e VIII, ou seja, apresentam contaminação com os PCB 52, 74 e 170, reforçando a tese de que PCB menos clorados se encontram em águas de superfície ou subterrâneas, ou seja, a probabilidade de encontrar esses PCB em cidades litorâneas ou banhadas por muitos rios é maior. A única amostra contaminada de Natal (M47) continha os PCB 138 e 187, sendo procedente da única doadora que mora próxima da uma indústria.

As amostras das duas capitais estudadas da região sul (Curitiba e Florianópolis) tiveram um comportamento muito semelhante. Ambas se caracterizaram pela presença dos PCB 128, 138 e 187. A única amostra com um comportamento diferente foi a M42 que estava contaminada com altas quantidades dos PCB 52 e 74.

Nas cidades de Rio Branco, São Luís e Araxá nenhuma das amostras analisadas estava contaminada. Rio Branco localiza-se na região amazônica, sendo que a economia é movimentada praticamente só pela pecuária. Já São Luís caracteriza-se por ser uma cidade litorânea, com muitos manguezais, pouco industrializada e voltada principalmente ao turismo. Por sua vez, Araxá é uma cidade do interior de Minas Gerais, muito conhecida por suas águas medicinais,

sendo essa a base da economia local, juntamente com a extração de nióbio. Nenhuma dessas três cidades tem histórico de grandes desastres ambientais, contaminação com substâncias cloradas ou mesmo crescimento industrial desenfreado, por isso podemos considerar os resultados analíticos obtidos bem coerentes com as informações sobre a região do país na qual a amostra foi coletada.

Proximidade de rios/mares

Como foi visto no item anterior, todas as amostras dos grupos I e II (menos grupo IV) foram doadas por mães que vivem na cidade de São Paulo. Na figura 7D visualizamos que a maioria dessas mães respondeu que mora perto de algum rio, provavelmente os rios Pinheiros e Tietê, nas regiões de Santo Amaro e Belenzinho, respectivamente.

Todas as doadoras de amostras alocadas no grupo III e IV também responderam que moram perto de algum rio ou mar.

Apesar da grande maioria das mães não responderem o questionamento sobre a contaminação dos rios e mares próximos às suas casas, é possível inferir que existe uma forte correlação entre a contaminação das amostras de leite e a proximidade com rios e mares.

Proximidade de indústrias

As atividades industriais são importantes fontes de exposição ambiental e ocupacional aos PCB. Bennett (1983) relatou que a concentração média dos PCB nas áreas rurais é aproximadamente 10 x inferior que nas áreas industriais.

Dentre as mães pesquisadas, poucas moram perto de indústrias, e dentre estas, a maioria mora em São Paulo e Vitória. Três doadoras de São Paulo (amostras M01, M04 e M08) responderam que moram próximo a indústrias têxtil, metalúrgica e frigoríficos, respectivamente. Em Vitória foram citadas proximidade com indústrias siderúrgicas (M18 e M24), metalúrgica (M29) e produtora de luvas (M23). Nas demais regiões do Brasil estudadas (sul, norte e nordeste) nenhuma

mãe informou sobre a existência de indústrias na proximidade da sua residência. Mesmo assim, há grande probabilidade de que a contaminação das amostras de Florianópolis e Curitiba por exemplo, seja em decorrência da poluição dos rios e mares com dejetos industriais antes dos mesmos entrarem nas cidades estudadas.

4. Conclusões

A análise exploratória tem sido uma ferramenta muito importante para avaliar similaridades e diferenças em um grupo de indivíduos (amostras). Nestes termos, o PCA e mais eficientemente a rede neural de Kohonen, foram utilizadas para obter maiores informações sobre a contaminação do leite materno no Brasil por PCB. Foi possível identificar que os recém-nascidos mais expostos a esses contaminantes durante a amamentação são os que cujas mães moram nas grandes cidades brasileiras, principalmente São Paulo e/ou próximo a rios ou mares poluídos. Foi ainda verificado que maiores quantidades de PCB são geralmente encontradas nas amostras de leite maduro. Também, maiores quantidades de PCB foram encontrados no leite de mães que estão amamentando pela primeira vez, o que implica que o primeiro filho normalmente será mais exposto que os demais. Sendo assim, o tratamento matemático proposto possibilitou identificar alguns pontos de atenção no que se refere a esse problema, que dificilmente seriam obtidos através de métodos tradicionais.

5. Referências bibliográficas

1. Cairns, T., Doose GM, Forberg JE, Jacobson RA, Siegmund EG., 1986. Analytical chemistry of PCBs. In: Waid, J. S., ed. PCBs and the environment. Boca Raton: CRC Press.
2. Erickson, M.D., 1992. Analytical Chemistry of PCBs. Heidelberg:Springer-Verlag.
3. Breivik, K., Sweetman, A., Pacyna, J.M., Jones, K.C., 2002a. Towards a global historical emission inventory for selected PCB congeners – a mass

- balance approach. 1. Global production and consumption. *Science of the Total Environment*. 290, 181-198.
4. WHO, 1993. Polychlorinated biphenyls and terphenyls: Environmental Health Criteria 140. 2. ed. Geneva: World Health Organization.
 5. Lehmler, H. J.; Parkin, S.; Robertson, L. W., 2002. The three-dimensional structure of 3,3',5'-trichloro-4-methoxybiphenyl (PCB) derivative. *Chemosphere*, 46, 485-488.
 6. Pellizari, V. H., 1995 Aspectos moleculares e fenotípicos de bactérias isoladas do ambiente e envolvidas na biodegradação de bifenilos policlorados – PCBs. Tese de Doutorado, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.
 7. Breivik, K., Sweetman, A., Pacyna, J.M., Jones, K.C., 2002b Towards a global historical emission inventory for selected PCB congeners – a mass balance approach. 2. Emissions. *Science of the Total Environment*. 290, 199-224.
 8. Da Costa, J.G., 2004. Degradação de bifenilos policlorados (PCBs) e ácidos clorobenzóicos por bactérias aeróbias isoladas de ambientes contaminados. Tese de Doutorado, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo.
 9. Lauber, J. D., 1986. Disposal and destruction of waste PCBs. In: WAID, J. S. (Ed.). *PCBs and the environment*. Boca Raton: CRC Press.
 10. WHO, 2003. Polychlorinated Biphenyls: Human Health Aspects. Concise International Chemical Assessment Document; 55, Geneva: World Health Organization.
 11. Schisterman, E.F.; Whitcomb, B.W.; Louis, G.M.; Louis, T.A., 2005. Lipid Adjustment in the Analysis of Environmental Contaminants and Human Health Risks. *Environ. Health Perspect.*, 113, 853-857.
 12. Noren, K.; Meironyte, D.; 2002. Certain organochlorine and organobromine contaminants in Swedish human milk in perspective of past 20–30 years. *Chemosphere*, 40, 1111-1123.

13. WHO, 2000. Air Quality Guideline. 2, 1-21, Copenhagen: World Health Organization.
14. Pellizari, V. H.; Rodrigues, J. M., 1997. Biodegradação de PCBs. In: Melo, I. S.; Azevedo, J. L. (Eds.). Microbiologia ambiental. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente.
15. Lu, Y.C.; Wu, Y.C., 1985. Clinical findings and imunological abnormalities in Yu-Cheng patients. Environ. Health Perspect., 59, 17-29.
16. Brower, A., 1999. Characterization of potential endocrine-related health effects at low-dose levels of exposure to PCBs. Environ. Health Perspect., 107, 639-649.
17. Jaraczewska, K., Voorspoels, S., Kaluba-Skotarczak, A., Drews, K., Schepens, P., 2006. Distribution of polychlorinated biphenyls, organochlorine pesticides and polybrominated diphenyl ethers in human umbilical cord serum, maternal serum and milk from Wielkopolska region, Poland. Sci. Total Environ. 372, 20-31.
18. Nogueira, D. P., Souza, J.M.P., Colacioppo, S., Gomes, J.R., Brandao, J.B., Souza, M.L.A., 1987. Acúmulo de policloreto de bifenila na população da grande São Paulo, Brasil. Rev. Saúde Públ., 21, 279-290.
19. WHO, 2001. Report of the expert consultation on the optimal duration of exclusive breastfeeding. 28-30, Geneva: World Health Organization.
20. Jensen, A.A.; Slorach, S.A., 1991. Chemical contaminants in human milk. Boca Raton: CRC Press.
21. Harris, C.A., Woolridge, M.W., Hay, A.W.M., 2001. Factors affecting the transfer of organochlorine pesticide residues to breastmilk. Chemosphere, 43, 243-256.
22. Arthur, C.L.; Pawliszyn, J., 1990. Solid Phase Microextraction with Thermal Desorption Using Fused Silica Optical Fibers. Anal. Chem., 62, 2145-2148.
23. Augusto, F., Valente, A.L.P., 2002. Applications of solid-phase microextraction to chemical analysis of live biological samples. Trends Anal. Chem., 21, 428-438.

24. Montes, R., Ramil, M., Rodriguez, I., Rubí, E., Cela, R., 2006. Rapid screening of polychlorinated biphenyls in sediments using non-equilibrium solid-phase microextraction and fast gas chromatography with electron-capture detection. *J. Chromatogr. A*, 1124, 43-50.
25. Penalver, A., Pocurull, E., Borrull, F., Marcé, R.M. 1999. Trends in solid-phase microextraction for determining organic pollutants in environmental samples. *Trends Anal. Chem.*, 18, 557-568.
26. Kowalski, C.H., Silva, G.A., Poppi, R.J., Godoy, H.T., Augusto, F. 2007. Neuro-genetic multioptimization of the determination of polychlorinated biphenyl congeners in human milk by headspace solid phase microextraction coupled to gas chromatography with electron capture detection. *Anal. Chim. Acta*, 585, 66-75.
27. Silva, G.A., Augusto, F., Poppi, R.J., 2008. Exploratory analysis of the volatile profile of beers by HS–SPME–GC. *Food Chemistry* 111, 1057–1063.
28. Bicchi, C. P., Panero, O. M., Pellegrino, G. M., Vanni, A. C., 1997. Characterization of roasted coffee and coffee beverages by solid phase microextraction – gas chromatography and principal component analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 4680–4686.
29. Otto, M., 1999. *Chemometrics – Statistics and Computer Application in Analytical Chemistry*. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GMBH.
30. Kohonen, T., 1989. *Self-organization and associative memory*. 3 ed. SPRINGER VERLAG: BERLIN.
31. Francisco, C.A.C., 2004. *Rede de Kohonen: Uma ferramenta no estudo das relações tróficas entre espécies de peixes*. Dissertação de Mestrado, Departamento de Matemática, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná.
32. Kohonen, T.I.A.E., Himberg, J., Parhankangas, J., Vesanto, J. *SOM Toolbox*. Disponível em <http://www.cis.hut.fi/>, acesso em 05 de agosto de 2008.

33. Da Silva, G.A., 2007. Utilização de Métodos Quimiométricos em Cromatografia Gasosa com Microextração em Fase Sólida. Tese de doutorado. Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo.
34. Haykin, S., 2001. Redes Neurais – Princípios e prática. 2 ed. BOOKMAN: Porto Alegre.
35. Vesanto, J., Himberg, J., Alhoniemi, E., Parhankangas, J., 2000. SOM Toolbox for Matlab 5. Report A57.
36. Conselho Nacional de Saúde. Disponível em http://conselho.saude.gov.br/resolucoes/reso_96.htm, acesso em 05 de setembro de 2008.
37. Sistema Nacional de Ética em Pesquisa (Sisnep). Disponível em http://portal.saude.gov.br/sisnep/pesquisador/extrato_projeto.cfm?CODIGO=59732, acesso em 05 de setembro de 2008.
38. Infometrix. Disponível em www.infometrix.com, acesso em 30 de agosto de 2008.
39. Toolbox para MatLab de rede neural artificial de Kohonen. Disponível em <http://www.cis.hut.fi/projects/somtoolbox/>, acesso em 30 de agosto de 2008.
40. Forsyth, J.S., 1995. The relationship between breast-feeding and infant health and development. *Proceedings of the Nutrition Society*, 54, 407-418.
41. López, M., 1996. La Succión, Instinto Básico. *Vitanatur*, 27, 4-6.
42. Matheson, I., Foss, P.O., Skaare, J.U., 1990. Fat content xenobiotic concentrations in human milk: validation of an enzymatic assay of milk fat. *Pharmacol. and Toxicol.* 67, 19-21.
43. Jensen, A.A., Slorach, S.A., 1991. *Chemical Contaminants in Human Milk*. Boston, MA: CRC Press.
44. Czaja, K., Ludwicki, J.K., Góralczyk, K., Struciński, P., 1999. Effect of changes in excretion of persistent organochlorine compounds with human breast milk on related exposure of breast-fed infants. *Arch Environ Contam Toxicol.*, 36, 498–503.

45. Van Leeuwen, F.X.R., Feeley, M., Schrenk, D., Larsen, J.C., Farland, W., Younes, M., 2000. Dioxins: WHO's tolerable daily intake (TDI) revisited. *Chemosphere* 40, 1095–1101.
46. Georgii, S., Bachour, G.H., Elmadfa, I., Brunn H., 1995. Congeners in human milk in Germany from 1984-85 and 1990-91. *Bull Environ. Contam. Toxicol.* 54, 541-545.
47. Czaja, K., Ludwicki, J.K., Goralczyk, K., Strucinski, P., 2001. Relationship between two consecutive lactations and fat levels in persistent organochlorine compound concentration in human breast milk. *Chemosphere* 43, 889-893.
48. Hong, C.S., Xiao, H., Casey, A.C., Bush, B., Fitzgerald, E.F., Hwang, S.A., 1994. Mono-ortho and mon-ortho-substituted polychlorinated biphenyls in human milk from Mohawk and control women: Effects of maternal factors and previous lactation. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 27, 431-437.
49. Skaare, J.U., Polder, A., 1990. Polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides in milk of Norwegian women during lactation. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 19, 640-645.
50. Spicer, P.E., Kereu, R.K., 1993. Organochlorine insecticide residues in human breast milk: A survey of lactating mothers from remote area in Papua New Guinae. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 50, 540-546.
51. Vaz, R., Slorach, S.A., Hofvander, Y., 1993. Organochlorine contaminants in Swedish human milk: studies conducted at the National Food Administration 1981-1990. *Food Additives and Contaminants*, 10, 407-418.
52. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Disponível em http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=1065&id_pagina=1, acesso em 03 de setembro de 2008.
53. Portal do Governo Brasileiro. Disponível em http://www.brasil.gov.br/pais/sobre_brasil/, acesso em 03 de setembro de 2008.

54. Jaraczewska, K., Lulek, J., Covaci, A., Voorspoels, S., Kaluba-Skotarczak, A., Drews, K., Schepens, P., 2006. Distribution of polychlorinated biphenyls, organochlorine pesticides and polybrominated diphenyl ethers in human umbilical cord serum, maternal serum and milk from Wielkopolska region, Poland. *Sci. Total Environ.* 372, 20-31.
55. Norén, K., Meironyté, D., 2000. Certain organochlorine and organobromine contaminants in Swedish human milk in perspective of past 20–30 years. *Chemosphere*, 40, 1111-1123.
56. She, J., Petreas, M.X., Visita, P., McKinney, M., Sy, F.J., Winkler, J.J.K., Hooper, K., Stephens, R.D., 1998. Congener-specific analysis of PCBs in human milk from Kazakhstan. *Chemosphere*, 37, 431-442.
57. Fundação Joaquim Nabuco (FUNDAJ), Ministério da Educação. Disponível em http://www.fundaj.gov.br/docs/tropico/desat/renata_andrade.pdf, acesso em 03 de setembro de 2008.
58. Bitar, O.Y., Iyomasa, W.S.H., Cabral, M.Jr., 2000. Geotecnologia, Tendências e Desafios, São Paulo Perspect., 14, 78-90.
59. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB). Disponível em http://www.cetesb.sp.gov.br/noticentro/2005/11/23_jurubatuba.htm, acesso em 06 de setembro de 2008.
60. Almeida., F.V., Centeno, A.J., Bisinoti, M.C., Jardim, W.F., 2007. Substâncias Tóxicas Persistentes (STP) no Brasil. *Quim. Nova*, 30, 1976-1985.
61. Rissato, S.R., Galhiane M.S., Ximenes, V.F., Andrade R.M.B., Talamoni, J.L.B., Libânio M., Andrade, M.V., Apon, B.M., Cavalari, A.A., 2006. Organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in soil and water samples in the Northeastern part of São Paulo State, Brazil. *Chemosphere*, 65, 1949-1958.
62. Bennett, B.G., 1983. Exposure of man to environmental PCBs an exposure commitment assessment. *Science of the Total environment*, 29, 101-111.

ANEXO 1

Comissão de Pesquisa 2005

Campinas, 31 de maio de 2005

O protocolo de pesquisa "DESENVOLVIMENTO VALIDAÇÃO E APLICAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA DETERMINAÇÃO DE BIFENILOS POLICLORADOS (PCBs) EM LEITE MATERNO COLETADO EM BANCOS DA REDE NACIONAL DE LEITE HUMANO" da pesquisadora Claudia Hoffmann Kowalski, foi aprovado pela Comissão de Pesquisa do DTG/FCM/UNICAMP

Atenciosamente,



Prof. Dra. Lúcia Helena Costa Paiva

Presidente da Comissão de Pesquisa
Departamento de Tocoginecologia - DTG/FCM/UNICAMP

Comissão de Pesquisa-FCM-DTG-UNICAMP
Rua Alexander Flemming, 101 - Cidade Universitária Zeferino Vaz - Campinas/SP
Fones: (019) 3788-9402/3788-9403

ANEXO 2**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

“Desenvolvimento, validação e aplicação de metodologia analítica para determinação de bifenilas policloradas (PCBs) em leite materno coletados em bancos da Rede Nacional de Leite Humano”.

Investigador principal: Cláudia Hoffmann Kowalski

OBJETIVO DA PESQUISA:

Eu entendo que fui convidado(a) a participar de um projeto de pesquisa, cujo objetivo geral é desenvolver uma metodologia capaz de identificar a presença de bifenilos policlorados (PCBs) em leite humano.

JUSTIFICATIVA DA PESQUISA:

Esses estudos poderão levantar dados que possibilitarão um conhecimento mais aprofundado sobre a contaminação do leite humano com esses compostos tóxicos provenientes principalmente de alimentos de origem marítima (peixes). Autorizo a Faculdade de Engenharia de alimentos da UNICAMP a utilizar o leite excedente as necessidades do meu filho para o que for necessário. Entendo que a participação é voluntária e que eu posso me recusar a participar de qualquer pesquisa. O meu material será utilizado apenas para este estudo.

Se tiver qualquer dúvida sobre o estudo poderei procurar a aluna de doutorado Cláudia Hoffmann Kowalski, fone: (0xx19)3788-4023/3010, pesquisadora responsável pelo estudo ou Profa. Dra. Helena Teixeira Godoy, fone: (0xx19)3788-4024, orientadora do projeto. Posso desistir de participar desse estudo em qualquer momento e se tiver reclamação sobre qualquer procedimento do estudo poderei procurar a secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, telefone (0xx19) 3788-8936.

O sigilo será mantido durante todo o estudo através da utilização de um código para a identificação dos indivíduos participantes e que toda a informação médica, assim como o resultados dos testes genéticos decorrentes desse projeto de pesquisa serão submetidos aos regulamentos das instituições participantes, referentes ao sigilo da

informação médica. Se os resultados ou informações fornecidas forem utilizados para fins de publicação científica, nenhum nome será utilizado.

PROCEDIMENTOS: a coleta das amostras será feita pelas próprias mães ou será realizada por profissional treinado e devidamente habilitado para realizar esse procedimento.

Eu confirmo que _____ me explicou o objetivo do estudo, os procedimentos que serão realizados, os riscos, desconforto e possíveis vantagens advindas desse projeto de pesquisa. Eu li e/ou me foi explicado, assim como compreendi esse formulário de consentimento e estou de pleno acordo em participar desse estudo.

Nome do participante

Assinatura do participante

RESPONSABILIDADE DO PESQUISADOR:

Eu expliquei a _____ o objetivo do estudo, os procedimentos requeridos e os possíveis riscos e vantagens que poderão advir do estudo, usando o melhor do meu conhecimento. Eu me comprometo a fornecer uma cópia desse formulário de consentimento ao participante ou responsável. Declaro que todo o material e dados obtidos serão utilizados apenas neste protocolo de pesquisa e que esta foi submetida à aprovação prévia do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP e da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa.

Assinatura do pesquisador

ANEXO 3**PESQUISA DE PCB EM LEITE HUMANO****Questionário para doadoras – Protocolo de Pesquisa**

Data da coleta: __/__/__

Ficha doadora nº _____

Banco de Leite: _____

1. Cidade: _____

2. Doação: ☐ rotina ☐ eventual ☐ exclusiva3. Tipo de leite: ☐ colostro ☐ transição ☐ maduro**Dados sócio-econômicos**4. Moradia ☐ própria ☐ alugada5. Possui ☐ água encanada ☐ esgoto ☐ fossa
☐ rede elétrica ☐ geladeira ☐ freezer**Dados complementares**6. Número de gestações: ☐ primeira ☐ não

7. Tempo que está amamentando: _____

8. Quantos anos mora na cidade? _____

9. Cidade em que morou durante a maior parte da vida: _____

Ordenha e doação10. Doadora: ☐ nova ☐ já cadastrada

11. Cuidados que você tem durante a ordenha:

☐ higiene das mãos ☐ higiene das mamas ☐ cabelos presos☐ máscara ☐ gorro ☐ outro: _____

12. Onde realiza a ordenha:

☐ casa ☐ BLH ☐ outro: _____13. Que frasco é utilizado: ☐ Esterilizado em casa ☐ fornecido pelo BLH14. Acondicionamento: ☐ refrigerado ☐ congelado15. Tipo de ordenha: ☐ manual ☐ bomba manual
☐ bomba elétrica16. Condição da mãe: ☐ internada ☐ não-internada

Alimentação das mães

Escala:

- (0) nunca
- (1) raramente (1 vez por mês)
- (2) as vezes (uma vez por semana)
- (3) freqüentemente (+ de uma vez por semana)
- (4) sempre (todos os dias)

Alimentos avaliados:

- | | | |
|-------------------------|----------------------------|-------------------------------|
| 17. () peixe água doce | 18. () peixe água salgada | 19. () crustáceos e moluscos |
| 20. () aves | 21. () carne bovina | 22. () leite |
| 23. () ovos | 24. () cereais | 25. () hortaliças |

Água ingerida:

- | | | |
|--------------------------------|-----------------------------|----------------------|
| 26. () água tratada (clorada) | 27. () água poço artesiano | 28. () água rio |
| 29. () água mineral | 30. () água poço (bica) | 31. () água fervida |

32. Você já morou/mora perto de rios ou mares? Se sim, a qualidade dessa água era/é boa para consumo? Teve/tem atividades de pesca no local?

_____.

33. Você já morou/mora perto de alguma indústria? _____.

34. Que tipo de indústria? _____.

35. Você sabe de algum acidente ambiental (p. ex. vazamento de óleo) provocado pela indústria? Se sim, por favor detalhe o ocorrido.

_____.

CONCLUSÕES GERAIS

Os resultados obtidos neste trabalho confirmaram, de uma forma bem mais abrangente e a nível nacional, o que alguns pesquisadores já tinham observado em algumas cidades brasileiras, de forma isolada: os PCB estavam presentes em muitas das amostras de leite materno analisadas, indicando a contaminação dessas mães e dos seus recém-nascidos. As quantidades encontradas estavam abaixo das encontradas na maioria dos países, mas não há como saber se suficientemente ínfimas a ponto de não causar nenhum efeito no recém-nascido, já que inúmeras variáveis interferem nesse processo, como características da mãe, do recém-nascido, do ambiente em que vivem etc.

A Microextração em Fase Sólida demonstrou ser uma técnica muito pertinente para a extração desse tipo de analito, mas suas condições experimentais devem ser sempre otimizadas, preferencialmente de forma multivariada. O uso do planejamento Doehlert e em seguida estratégias quimiométricas sofisticadas, como a Rede Neural Bayesiana e Algoritmos Genéticos, mostraram-se eficazes e relevantes para a otimização e determinação simultânea dos 12 PCB estudados. A melhor condição experimental, dada pelo algoritmo genético foi: concentração de NaCl de $0,36 \text{ g mL}^{-1}$, temperatura de extração de $95,0 \text{ }^{\circ}\text{C}$, tempo de extração de 60 minutos e adição de $210 \text{ }\mu\text{L}$ de co-solvente metanol.

A validação ou estudo das figuras de mérito identificou que o método é linear na faixa de 1 a $16 \text{ }\mu\text{g L}^{-1}$, com $r > 0,9884$. A precisão foi avaliada em quintuplicata e os valores de RSD observados foram menores que 12 % para todos os PCB. A recuperação foi adequada (71 a 127 %) e os limites de quantificação ficaram entre $0,45 \text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ e $2,42 \text{ }\mu\text{g L}^{-1}$.

A Rede Neural de Kohonen apresentou-se como uma excelente ferramenta para a análise exploratória dos dados obtidos nesta pesquisa, possibilitando estabelecer algumas correlações importantes. Por exemplo, identificou-se que nos grandes centros como São Paulo e Vitória, a porcentagem de amostras contaminadas foi bem maior que nas regiões menos industrializadas. Os mapas

de Kohonen também mostraram que amostras com maior quantidade de gordura (leite maduro), em geral apresentavam maiores quantidades de PCB, principalmente dos mais persistentes como o PCB 180. Também verificou-se que recém-nascidos de mães que amamentavam pela primeira vez estavam sendo mais expostos aos PCB, já que receberam todo o acúmulo deste composto durante os anos de vida da mãe. Ainda observou-se que mães que moravam na proximidade de rios ou mares poluídos ou com suspeita de poluição, bem como mães que moravam perto de indústrias, no geral estavam com leite mais contaminado que as demais. Esperava-se encontrar alguma correlação entre a contaminação do leite e a dieta da mãe (principalmente se a dieta fosse rica em peixe, carne e produtos lácteos, identificados como principais fontes de contaminação segundo a literatura) mas essa correlação não foi observada.