



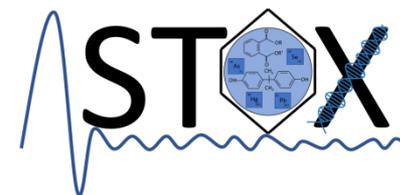
Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto



Determinação de éteres de difenilas polibromadas (PBDEs) em alimentos de origem animal empregando cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GCMS)

Professor Dr. Fernando Barbosa Junior

Laboratório de Toxicologia Analítica e de Sistemas



Ribeirão Preto, 2021

Contaminantes emergentes

- *United States Geological Survey – USGS, 2014*

Substâncias químicas sintéticas ou naturais, que não são comumente monitorados no ambiente, mas que possuem a capacidade de contaminá-lo e causar riscos à saúde humana e ao ecossistema

Poluentes orgânicos persistentes

- **Alta estabilidade;**
- **Transporte de longo alcance;**
- **Distribuição em todos compartimentos ambientais;**
- **Alta solubilidade em lipídios;**
- **Biocumulação e biomagnificação na cadeia alimentar.**

Retardantes de chama

- **Medida de segurança na prevenção de incêndios;**
- Eletroeletrônicos, têxtil, automobilística e construção civil;
- 175 substâncias – halogenados e não halogenados;
- Retardantes de chama bromados – 20 % do total utilizado no mundo.

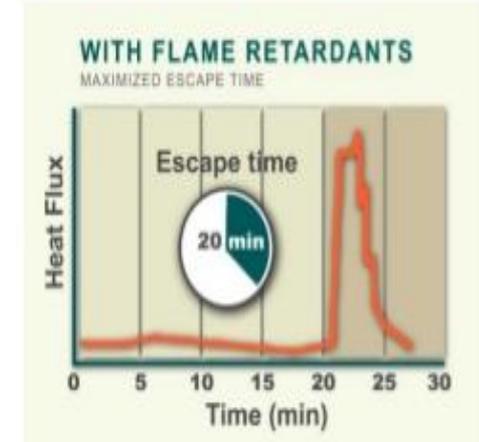
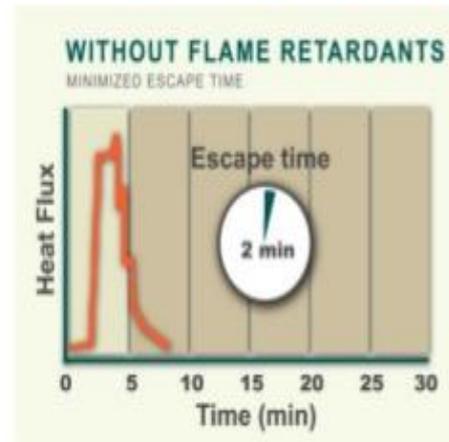
Preventing room fires



Em incêndios, 77% das vítimas morrem devido à inalação de fumaça



Tempo de fuga sobe de **2** para **20** minutos



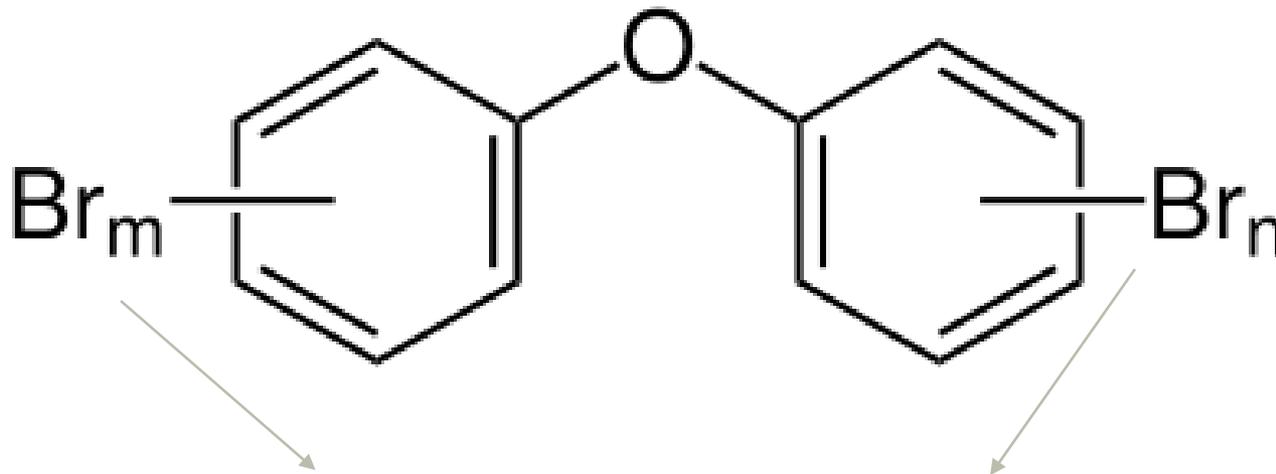
Éteres de difenilas polibromadas - PBDEs

- Baixo custo e alta eficiência contra a propagação da chama;
- **Mecanismo de ação:**



- Halogênios – Interferem na formação de radicais oxigênio.

Éteres de difenilas polibromadas - PBDEs



2 a 10 átomos de Br

- 209 possibilidades – congêneres de PBDEs.

(EFSA, 2011; Cruz et al., 2017; Annuniação et al., 2018; Fromme, 2018).

Éteres de difenilas polibromadas - PBDEs

- **Características estruturais e propriedades físico-químicas:**
 - Baixa pressão de vapor;
 - Hidrofóbicos (log Kow 5,9 - 10);
 - Importância toxicológica e ambiental: Congêneres de baixo peso molecular (tri a hexa-BDE).

Exposição humana aos PBDEs

- **Exposição ocupacional;**
- **Dieta;**
- **Inalação e ingestão de poeira do ar interior;**
- **Absorção dérmica;**
- **Efluentes contaminados – descarte inadequado.**

Exposição humana aos PBDEs

- **ROTAS DIETÉTICAS:**
- **Alimentos de origem animal e com alto teor lipídico;**
- **Peixes, frutos do mar, carnes, ovos, leites e derivados.**

- Ausência de valores de LMR em alimentos – EFSA, 2011;
-

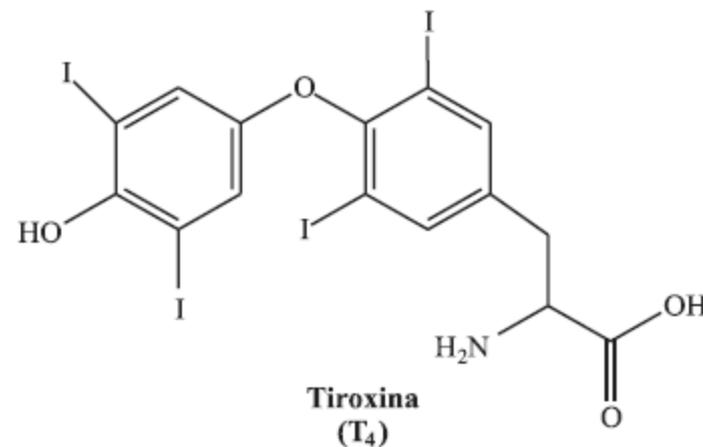
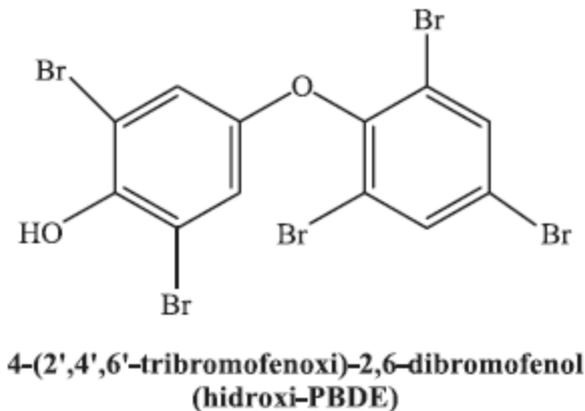
Toxicidade

- Hepatotoxicidade;
- Neurotoxicidade;
- Embriotoxicidade;
- Desregulação endócrina e imunológicas.
- **Alterações de células cerebrais fetais e padrões comportamentais em crianças;**
- **Redução da fecundidade em mulheres.**

(Rahman et al., 2001; Costa et al., 2008; Pestana, 2008; US. EPA, 2011; He et al., 2008; Shao et al., 2008; Hu et al., 2010)

Toxicidade

- Potenciais desreguladores endócrinos – agonistas e antagonistas de receptores de andrógenos;
- Alterações nos níveis de hormônios da tireóide – metabólitos de PBDEs apresentam semelhança estrutural à tiroxina (T4).



(PESTANA et al., 2008)

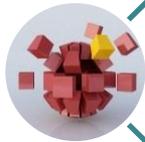
Contaminação ambiental

- PBDEs: lixões, queima de lixo, descarte de plásticos, depósitos de carros, tecidos. São usados em filmes que recobrem vidros.
- Leite materno é a maior fonte de PBDEs para recém nascidos



Chronicle / Lea Suzuki

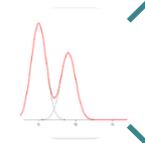
Etapas do processo analítico



Amostragem



Preparo de amostras



Identificação/quantificação



Processamento dos resultados



Avaliação dos resultados

Porque é necessário o preparo das amostras?

- **Alimentos - Amostra não apropriada para análise direta....**
- Muito suja – contém outros componentes na matriz que interferem na análise
- Muito diluída – analitos não estão concentrados suficientemente para permitir a detecção
- Matriz não compatível com a coluna ou com o sistema cromatográfico ou de espectrometria de massas

Métodos de preparo de amostra para determinação de PBDEs em alimentos

- Extrair, isolar e pré-concentrar os analitos;
- *Clean up*;
- Matriz compatível com o sistema de instrumentação;
- Aumento da seletividade e sensibilidade;
- Diminuição do efeito matriz;
- Escolha da técnica: propriedades físico-químicas.



(Covaci et al., 2010; Reiner et al., 2014; Borges et al., 2015; Annuniação et al., 2018)

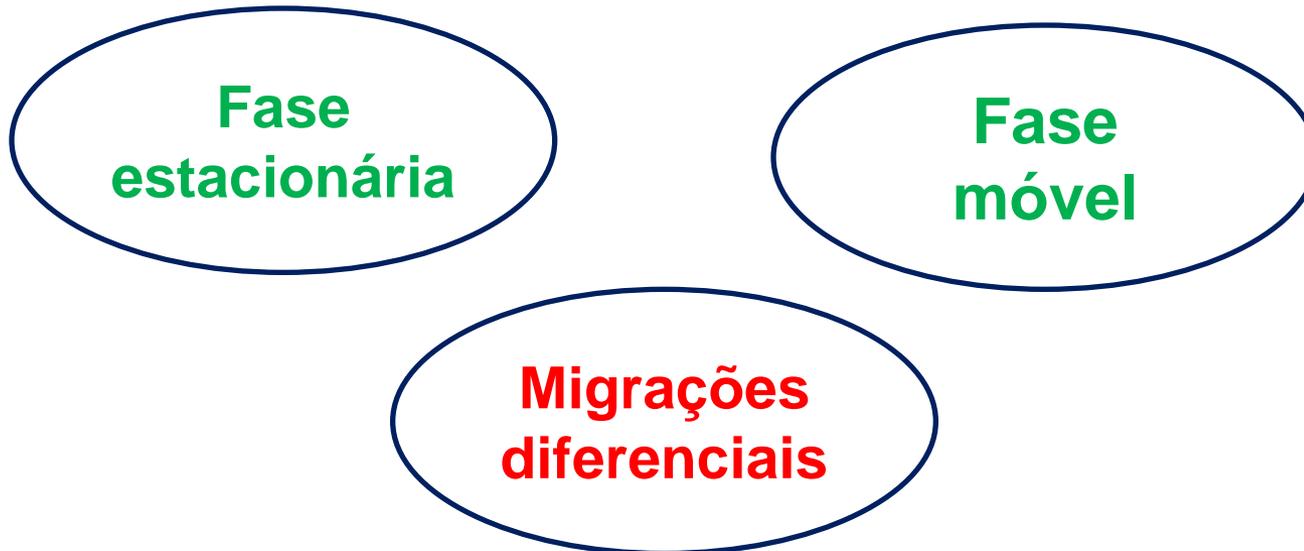
Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

O que é Cromatografia?



Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

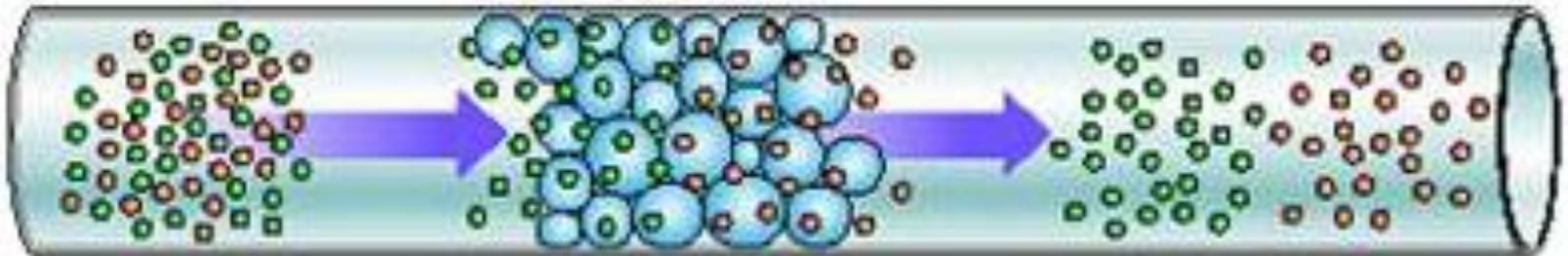
É um método físico-químico de **separação** dos componentes de uma mistura, realizada através da distribuição desses componentes em duas fases, que estão em contato íntimo.



❖ Cromatografia Gasosa

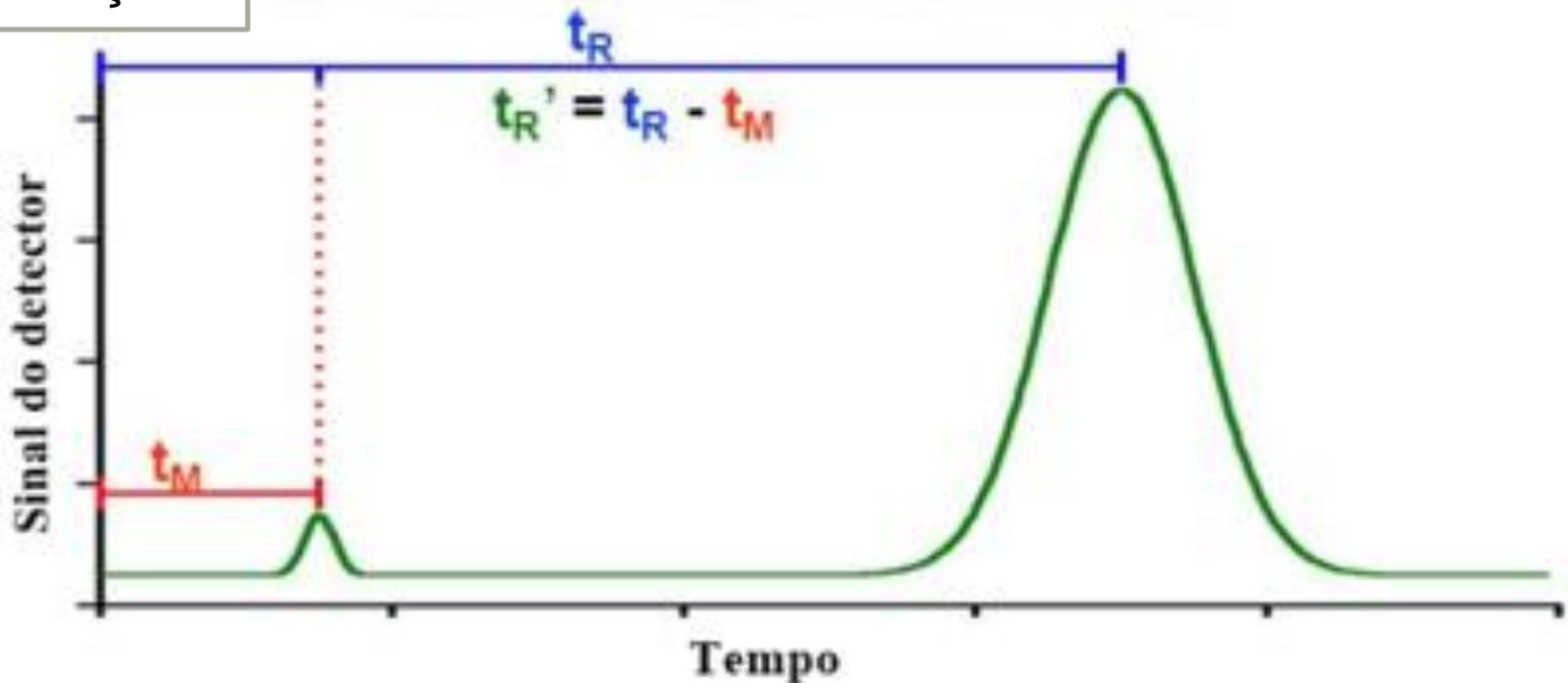
Cromatografia Gasosa

- Gás inerte
- Interação com **fase estacionária**

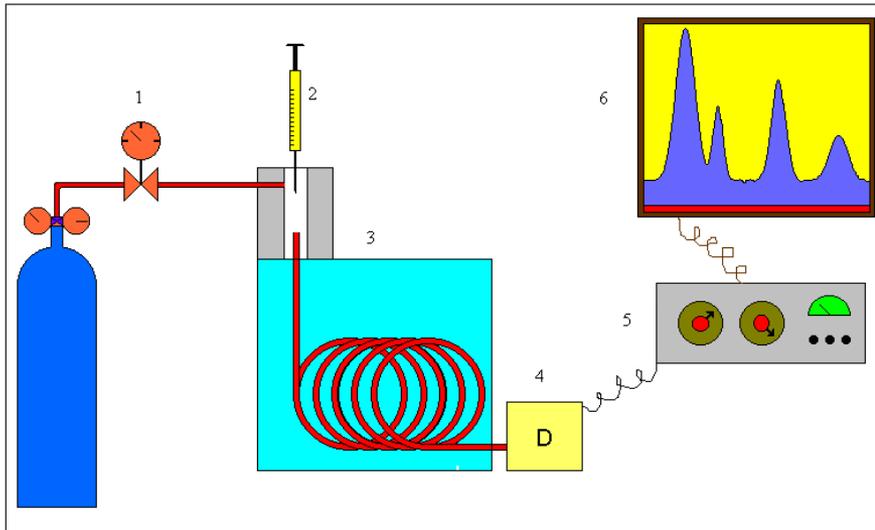


Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

Tempo de retenção



Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas



CG é aplicável para separação de compostos voláteis e que são termicamente estáveis

FM não interage com a amostra

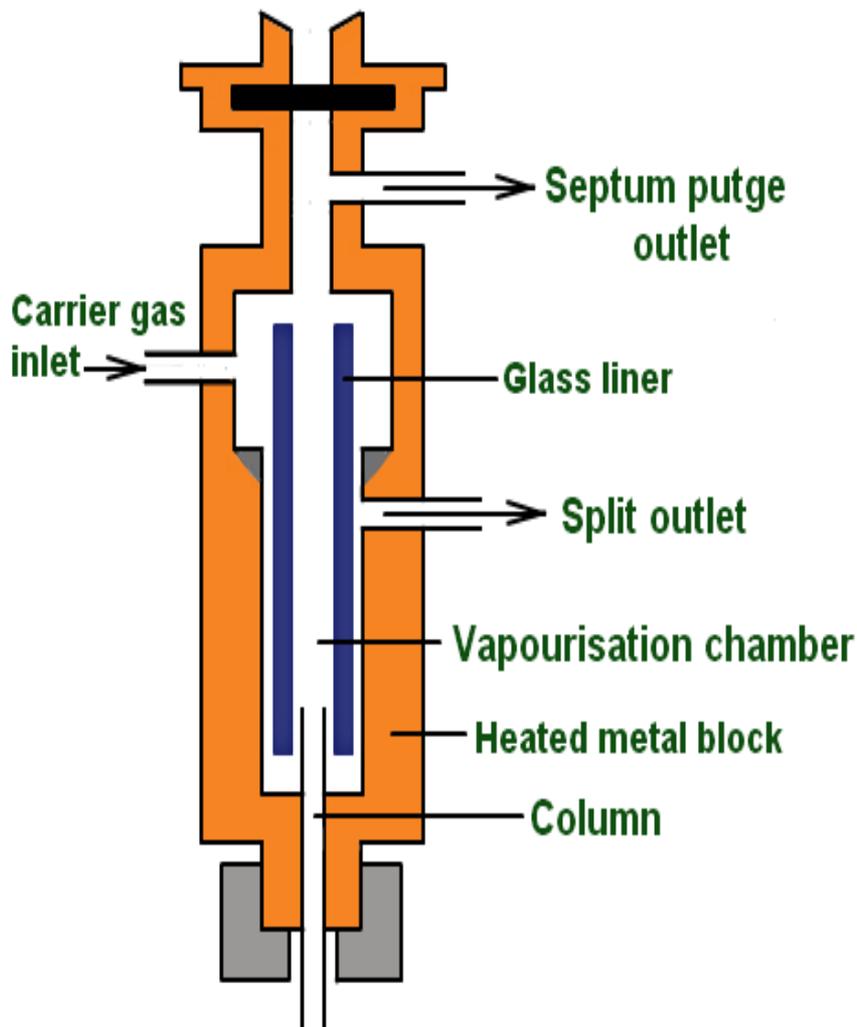


Gás de arraste

- ✓ **INERTE:** Não deve reagir com a amostra, fase estacionária ou superfícies do instrumento
- ✓ **PURO:** Deve ser isento de impurezas que possam degradar a fase estacionária

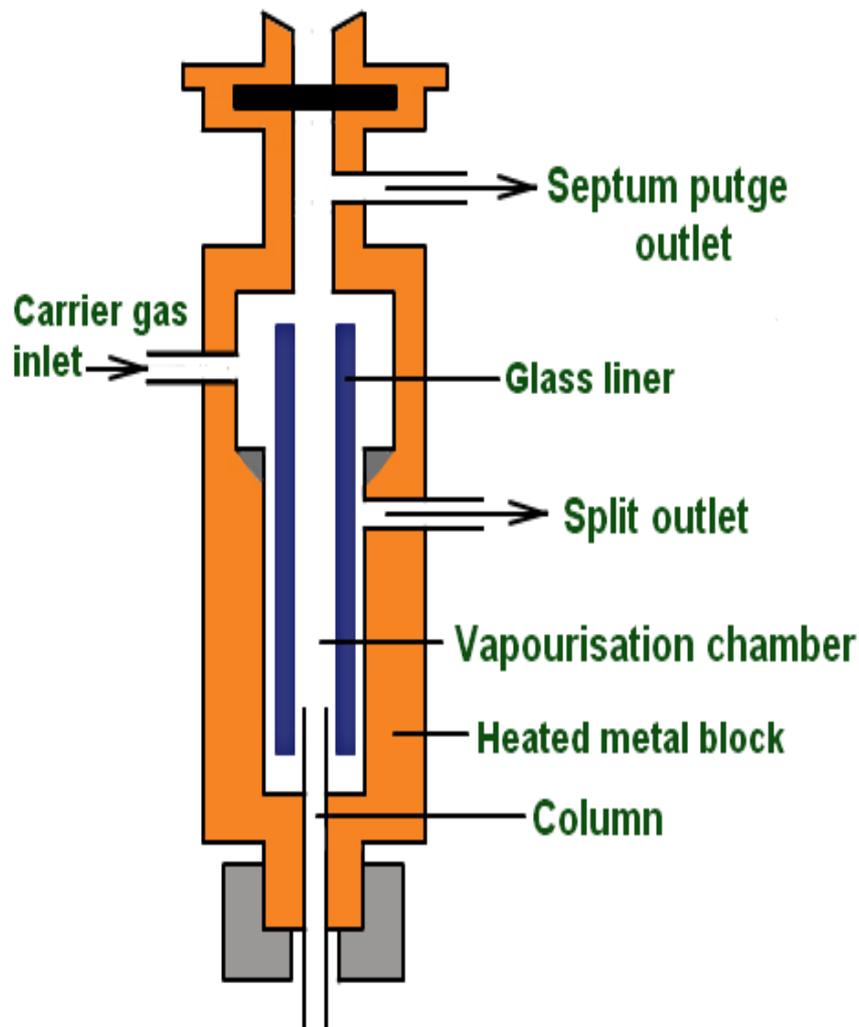
❖ Injetores split / splitless

- ✓ Vaporiza amostra (solvente + compostos alvo)
- ✓ Mistura vapor com fase móvel (gás de arraste)
- ✓ Transfere vapor para dentro da coluna



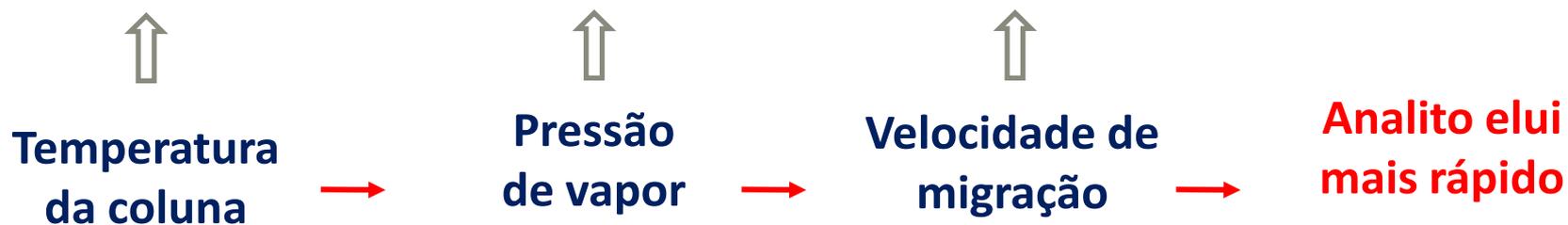
❖ Injetores split / splitless

TEMPERATURA DO INJETOR Deve ser suficientemente elevada para que a amostra vaporize imediatamente, mas sem decomposição

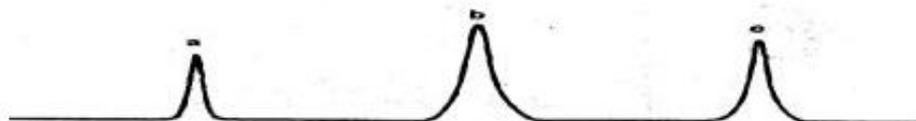
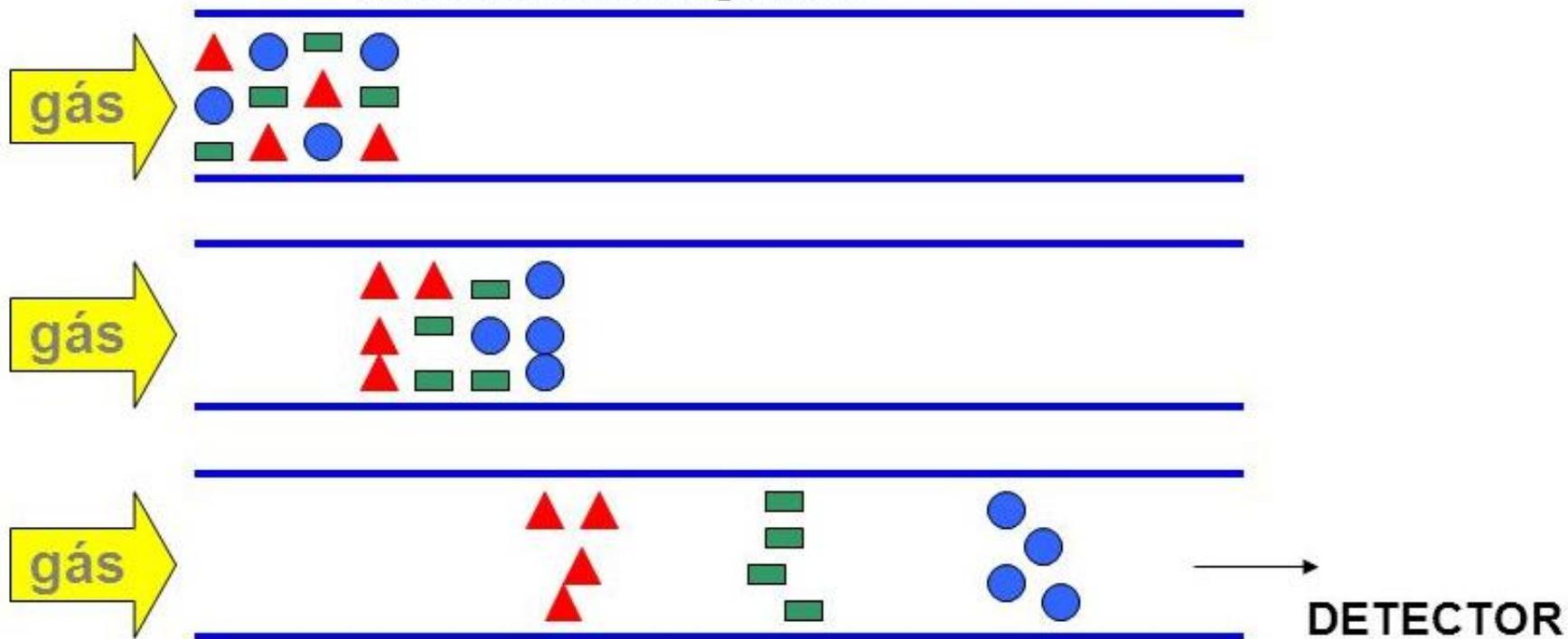


A separação cromatográfica é influenciada:

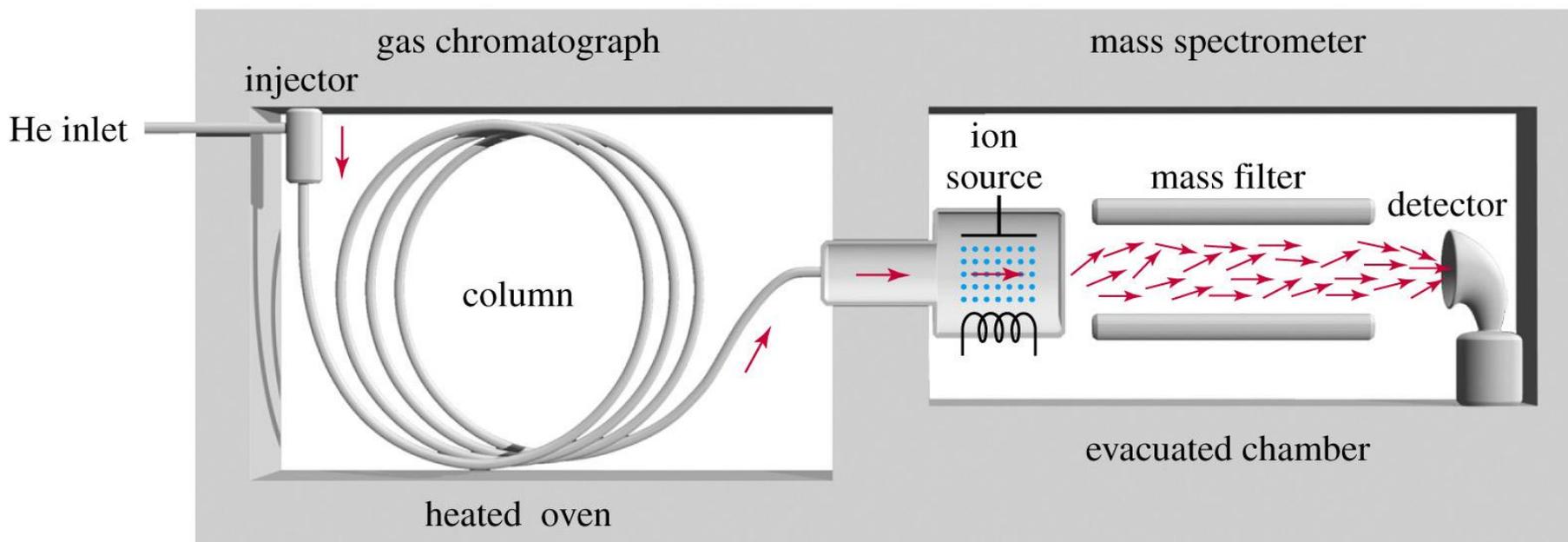
- ✓ Estrutura química do analito
- ✓ Fase estacionária
- ✓ Temperatura da coluna



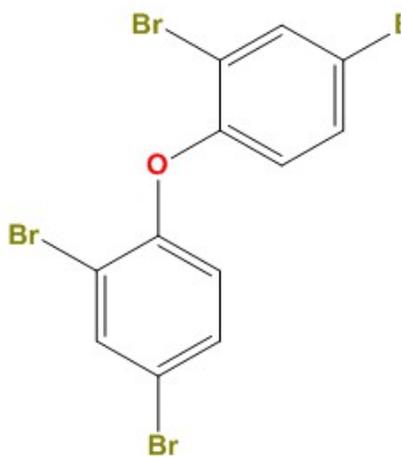
Coluna cromatográfica



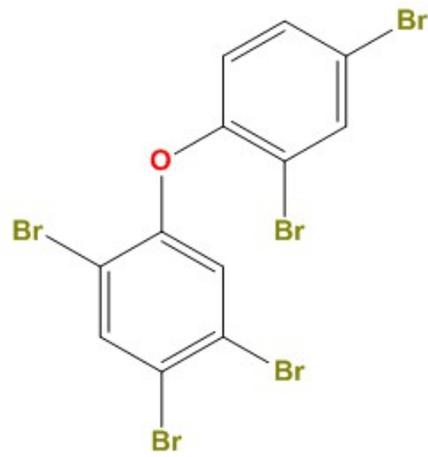
❖ Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas



❖ Determinação de PBDEs em amostras de alimentos de origem animal



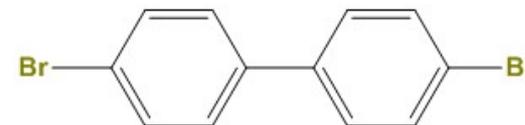
**Tetra – BDE
BDE- 47**



**Penta – BDE
BDE- 99**



**Hexa – BDE
BDE- 153**



**Padrão Interno
4,4-dibrodifenil**

Preparo das amostras



Homogeneização



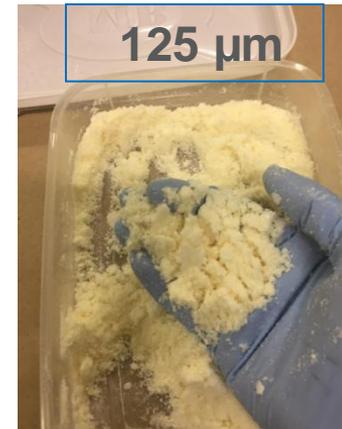
Liofilização



Moinho analítico



125 μ m

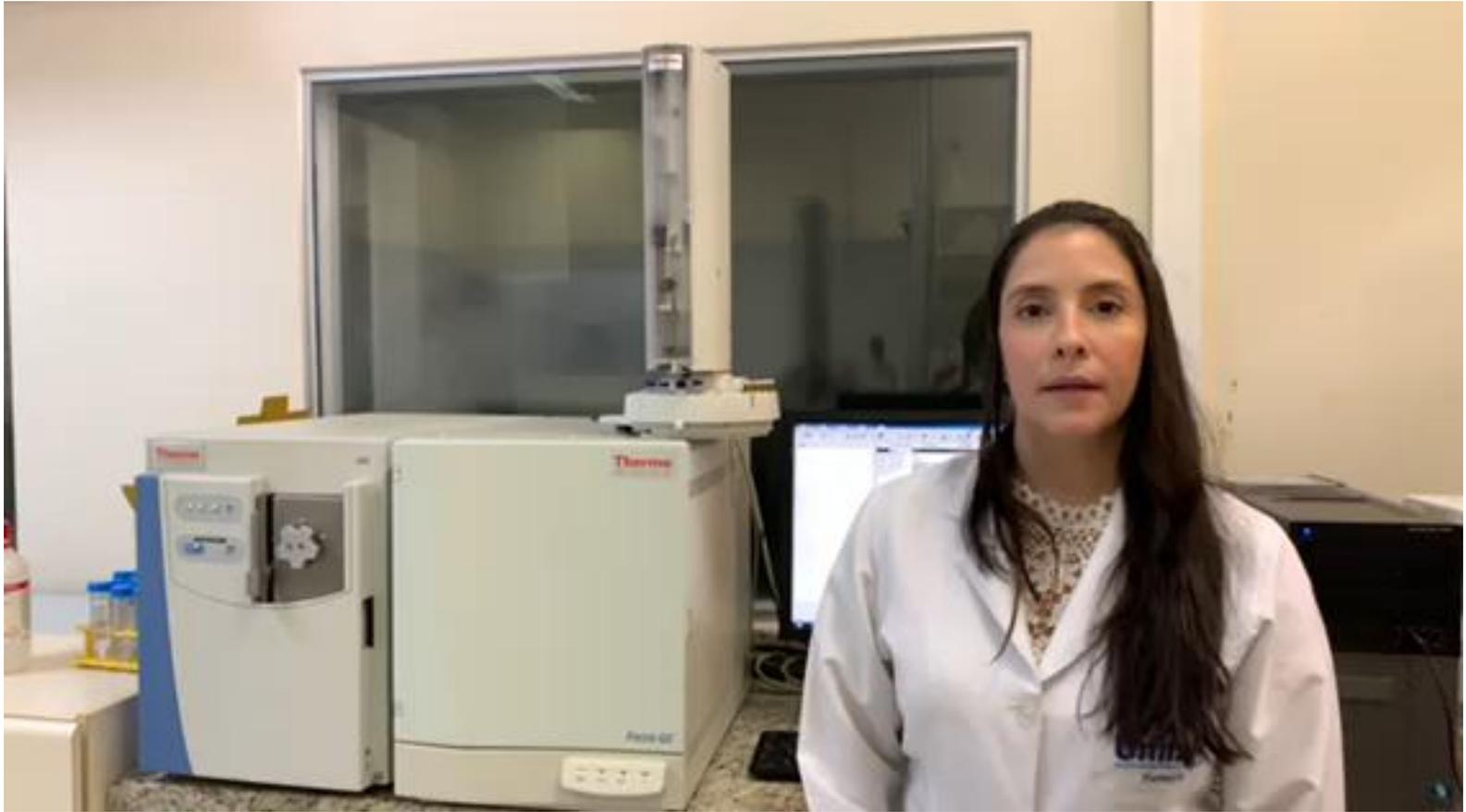


Tamisação

Técnica de preparo de amostra desconhecida

1. Pesar 100 mg de amostra desconhecida em tudo falcon de 15 mL + 50 μ L de solução de padrão interno
2. Acrescentar 4 mL de solução de Hexano – ultrassom 15 minuto
3. Acrescentar 2 mL de ácido sulfúrico concentrado – ultrassom 15 minutos
4. Centrifugar 10 minutos
5. Separar o sobrenadante e adicionar 1 mL em vial para posterior injeção no GCMS
6. Injetar 2 μ L no sistema cromatográfico
7. Calcular os resultados utilizando a curva de calibração
8. Discutir os resultados encontrados em relatório

Análise Instrumental - GCMS



Condições instrumentais

- Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas com analisador do tipo quadrupolo.

Tabela 1: Temperaturas de aquecimento do forno

Rate (°C/min)	°C	Hold time (min)
	100	2
8	200	0
10	290	3
10	300	-

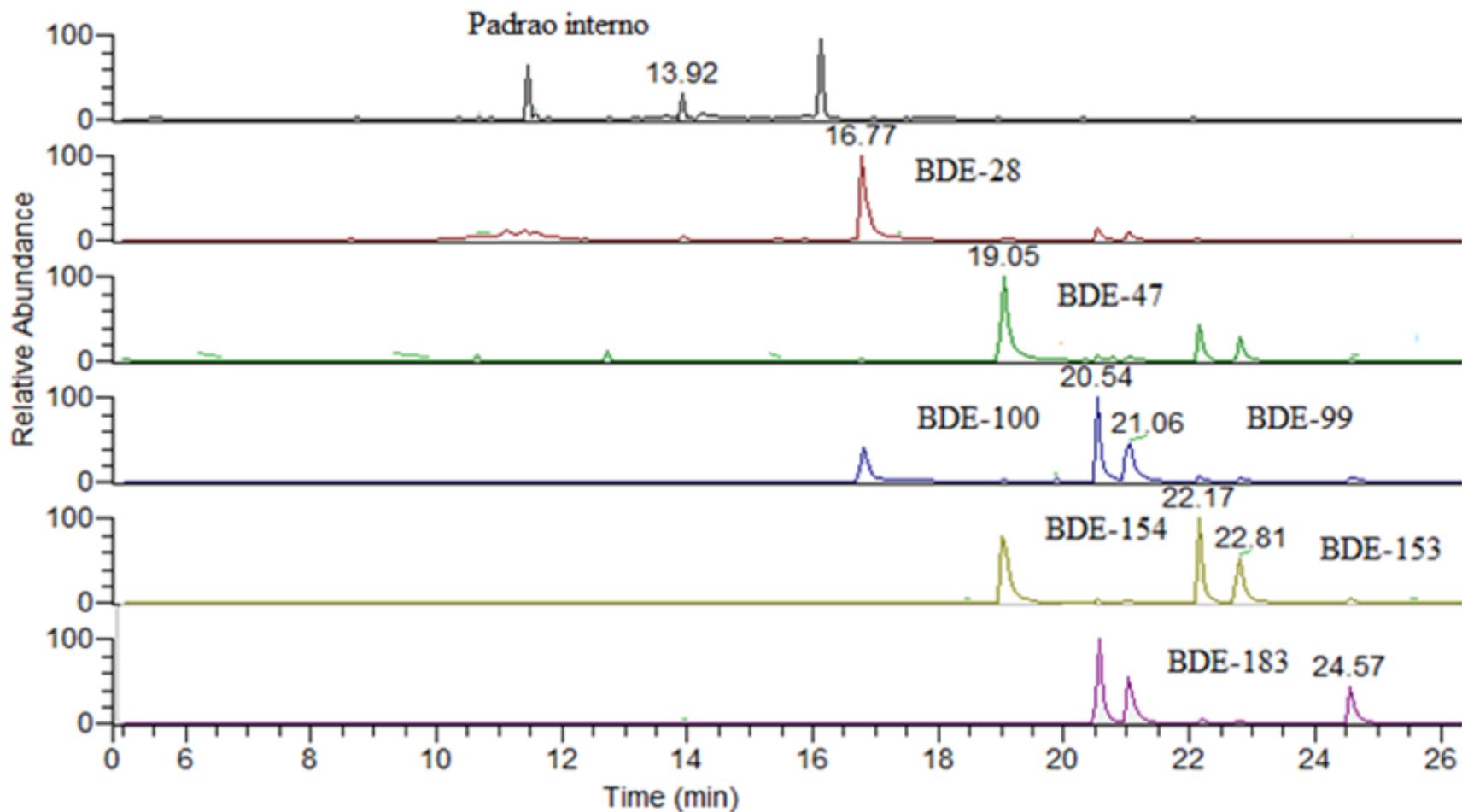


Figura 5: Amostra de leite fortificada com padrões na concentração de 50 ng/g amostra.

❖ Determinação de PBDEs em amostras de alimentos de origem animal

➤ ***Curva de calibração – padrões analíticos – Accustandard®***

0,92 a 100 ng/g de amostra fresca

■ **BDE-47:** $y = 0,011x + 0,1058$ $R^2 = 0,9923$

■ **BDE-99:** $y = 0,018x - 0,1029$ $R^2 = 0,9935$

■ **BDE-153:** $y = 0,02x - 0,0011$ $R^2 = 0,9917$

- **RESULTADOS: área relativa = área padrão/área padrão interno**

- **Amostra 1: BDE-47: 0,452**
- **BDE-99: abaixo do limite de detecção**
- **BDE-153: 0,123**

- **Amostra 2: BDE-47: 0,356**
- **BDE-99: 0,099**

- **Amostra 3: BDE-47: 0,282**
- **BDE-99: 0,085**
- **BDE-153: 0,332**

➤ **Relatório**

- *Quais as principais características de um poluente orgânico persistente? Cite exemplos de amostras ambientais e biológicas que são adequadas nas determinações desses POPs.*
- *Qual a concentração quantificada dos **BDEs -47, -99 e -153** nas amostras analisadas?*
- *Qual a importância da determinação de PBDEs em amostras de alimentos lipofílicos como os peixes e outros pertencentes a cadeia alimentar aquática?*

➤ **Relatório**

- *Seria possível a determinação de PBDEs em amostra de água?*
- *Diante da ausência de legislação brasileira quanto a presença desse contaminante em alimentos, em sua opinião qual a importância das determinações desses compostos em diferentes matrizes?*



➤ **Relatório**

➤ **marilia.cosouza@gmail.com**



Obrigada!

