

MARCO ANTONIO MOTA DA SILVA

**ESTUDO DA MIGRAÇÃO DOS
PRESERVANTES DE MADEIRA EM
CONTATO COM OS ALIMENTOS**

TESE APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-
GRADUAÇÃO EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA DO
INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE E QUALIDADE EM
SAÚDE.

ESTUDO DA MIGRAÇÃO DOS PRESERVANTES DE MADEIRA EM CONTATO COM OS ALIMENTOS

MARCO ANTONIO MOTA DA SILVA

Orientadoras:

Dra. Shirley de Mello Pereira Abrantes

Dra. Helena Pereira da Silva Zamith

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA (PPGVS)
INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE E QUALIDADE EM SAÚDE (INCQS).
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ (FIOCRUZ)

PPGVS/INCQS
RIO DE JANEIRO
2007

INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE E QUALIDADE EM SAÚDE-
INCQS

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ-FIOCRUZ

TESE SUBMETIDA À COMISSÃO EXAMINADORA COMPOSTA PELO CORPO DOCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA DO INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE E QUALIDADE EM SAÚDE DA FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ E POR PROFESSORES CONVIDADOS DE OUTRAS INSTITUIÇÕES, COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR

Aprovada por:

Prof.^{ca}. Dra Shirley de Mello Pereira Abrantes, (INCQS)

Prof.^{ca}. Dra Helena Pereira da Silva Zamith, (INCQS)

Prof. Dr. Alexandre Pinto Corrado., (USP-R.P./INCQS)

Prof. Dr. Aderval Severino Luna, (UERJ)

Prof Dr. Thomas Manfred Krauss, (INCQS)

RIO DE JANEIRO, RJ – BRASIL

DEZEMBRO DE 2007

DA SILVA, MARCO ANTONIO MOTA

ESTUDO DA MIGRAÇÃO DOS PRESERVANTES DE
MADEIRA EM CONTATO COM OS ALIMENTOS/Marco
Antonio Mota da Silva. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ,
2007

XVI, 141 p., il., tab.

Dissertação em Vigilância Sanitária, Prog. Pós-
graduação em Vigilância Sanitária/INCQS, 2007.

Orientadoras: Dra. Shirley de Mello Pereira Abrantes e
Dra. Helena Pereira da Silva Zamith.

1. Eletroforese Capilar, 2. Ensaio Cometa, 3. Preservantes de Madeira,
4. Ensaio de Migração.

I. Título.

Um cientista raramente se inclinará a crer que o curso dos eventos possa ser influenciado pela oração, ou seja, por um desejo dirigido a um ser sobrenatural (...). Por outro lado, todos os que estão seriamente enganados na ciência alcançam a convicção de que as leis da Natureza manifestam um espírito que é vastamente superior ao homem, e que frente ao qual nós, com nossa modesta força, devemos nos curvar

Humildemente.

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS:

A Deus pelo dom da vida.

A meu pai, “que é PRATA FINA” e minha mãe, “que é OURO PURO”, “e eu sou *filho* desta essência” obrigado pelo amor que me foi depositado e por sempre terem me apoiado e me proporcionado as ferramentas necessárias para aqui chegar, sempre com muito incentivo e carinho.

As minhas orientadoras, Shirley de Mello Pereira Abrantes e Helena Pereira da Silva Zamith pela dedicação e pelos ensinamentos, pois sempre apresentaram muita clareza para solucionar as dúvidas surgidas no decorrer do trabalho, e por todo aprendizado a que me foi proporcionado, meus sinceros agradecimentos.

*“A Professora que te ensina
Tu soubeste aprender
Trabalhaste muitos anos
Para hoje receber”*

Mestre Raimundo Irineu Serra (O Cruzeiro- nº50, 2)

A todos os companheiros de bancada do Laboratório de Análise de Contaminantes (LAC), do departamento de química do INCQS, Paula, Ana Carla, Juliana, Fábio & Gilva. Um agradecimento especial ao Vinícius Nery pelo companheirismo demonstrado durante as análises no eletroforese capilar.

As companheiras de bancada do Laboratório de Mutagenicidade do departamento de farmacologia e toxicologia do INCQS, Telma pela colaboração no início dos trabalhos, Claudete, Mirian. Um agradecimento especial a Taline Conde pela dedicação e carinho durante o ensaio Cometa, tirando a parte das agulhadas....

Ao Prof Thomas Krauss pela colaboração durante as análises utilizando o equipamento de cromatografia gasosa acoplado ao detector seletivo de massas (CG-DSM). Obrigado pelas sugestões.

A Maria Helena Wohlers do laboratório de pesticidas pela colaboração durante as análises utilizando o equipamento de cromatografia gasosa acoplado ao detector por captura de elétrons (CG-DCE).

Ao Renato, da manutenção, por ter sido sempre tão solícito nos momentos de apuros e desespero com o eletroforese capilar. Obrigado pela sua boa vontade.

À coordenação do Curso de pós-graduação em vigilância sanitária, pela confiança que me foi depositada. As professoras Tereza Santos e Maria Helena.

A todo corpo docente do PPGVS/INCQS pelos ensinamentos transmitidos no transcorrer do curso.

Aos funcionários da secretária de pós-graduação Simone, Gisele e Pedro e por terem sido sempre tão prestativos.

A todos os amigos da turma de 2003 da PPGVS que tornaram as disciplinas mais descontraídas e prazerosas. A amiga Marília (*in memoriam*) que a sua luz continue sempre a brilhar esteja aonde estiver. E um especial agradecimento à amiga Márcia Sarpa por ter sido sempre tão companheira e uma grande incentivadora do meu trabalho.

Aos amigos e colegas de profissão do HCE por terem colaborado nos momentos em que precisava ajustar a vida profissional com a vida acadêmica o meu muito obrigado, ao Maj Raílton, Cap Felga, Cap Dilsinete, ao Carreira, Aline, Carolina Rinaldi e Azevedo o meu carinho e apreço a todos vocês.

E a todas as outras pessoas que contribuíram de forma direta ou indireta para realização deste trabalho.

***“...Agradeço a todos seres
Que são deste rebanho”...***

Pad. Sebastião-Nova Jerusalém (nº 23,1)

RESUMO

Tese apresentada ao programa de pós-graduação em vigilância sanitária como parte dos requisitos para obtenção do grau de doutor (D.Sc.)

ESTUDO DA MIGRAÇÃO DOS PRESERVANTES DE MADEIRA EM CONTATO COM OS ALIMENTOS

Marco Antonio Mota da Silva; (2007)

Orientadoras: Dra Shirley de Mello Pereira Abrantes, Departamento de Química, INCQS-FIOCRUZ-Rio de Janeiro

Dra Helena Pereira da Silva Zamith, Departamento de Farmacologia e Toxicologia, INCQS-FIOCRUZ-Rio de Janeiro

Os preservantes de madeira são todas e quaisquer substâncias usadas para evitar o apodrecimento da madeira por microorganismos tornando-a resistente ao ataque e desenvolvimento de organismos xilófagos. Neste trabalho estudou-se como substâncias de interesse o pentaclorofenol e o cobre-8-quinolinolato, substâncias potencialmente tóxicas ao homem. Este trabalho visa avaliar a situação dos materiais de madeira em contato com alimentos em relação aos seus preservantes. Através do desenvolvimento de uma metodologia analítica capaz de determinar os preservantes de madeira e estimar a exposição do ser humano a essas substâncias e seus efeitos toxicológicos. Utilizamos o ensaio de migração para verificação da transferência destas substâncias contidas nas amostras para o solvente simulante, e a eletroforese capilar para determinação e quantificação das substâncias. Além do ensaio Cometa usado para verificar e identificar se substâncias estudadas tiveram atividade genotóxica, identificando possíveis carcinógenos humanos. Nos resultados pôde-se constatar a presença do pentaclorofenol e quantificá-lo nas amostras de palitos de picolé, mas não foi possível determinar a presença do cobre-8-quinolinolato nas amostras. Nos ensaios toxicológicos podemos verificar o efeito genotóxico somente para o cobre-8-quinolinolato, apresentando resultados estatisticamente significativos em relação ao controle, porém este mesmo efeito não pode ser observado para o pentaclorofenol. Com a realização deste projeto, mediante a identificação, determinação quantitativa e avaliação toxicológica das substâncias utilizadas como preservantes de madeira pode-se contribuir através de um estudo interdisciplinar, para atuação eficaz da vigilância sanitária no Brasil.

ABSTRACT

Thesis presented to program of post-graduation in surveillance sanitary as a fulfillment of the requirements for degree of doctor (D.Sc.)

STUDY OF MIGRATION WOOD PRESERVATIVES IN CONTACT WITH FOODSTUFF

Marco Antonio Mota da Silva; (2007)

Supervisor: Dra Shirley de Mello Pereira Abrantes, Department of the Chemistry INCQS-FIOCRUZ-Rio de Janeiro

Dra Helena Pereira da Silva Zamith, Department of the Pharmacology and Toxicology, INCQS-FIOCRUZ-Rio de Janeiro

The wood preservatives are all substances used to avoid the rottenness of wood by microorganisms, turn it resistant to attack and development xylophagous microorganisms. In this work studied like substance of interest the pentachlorophenol and copper-8-quinolinolate, substances potentially toxic. This work aim to evaluate the situation of the wood materials in contact with foodstuff in relation at yours preservatives. It through development of an analytical methodology to be able determine the wood preservative and to estimate human being exposure these substances and your toxicology effects. We use the migration assay to check by transfer these substances contained in the sample to food through simulated solvent and capillary electrophoresis to determine and quantification of the substances. Moreover the Comet assay was used to check and identify genotoxic effect these substances, identifying possible humans carcinogens. The results could it see the presence of the pentachlorophenol and quantify it in the samples popsicle stick, it was not possible to determine the presence of the copper-8-quinolinolate in the samples. In the toxicology assay could check the genotoxic effect only to Copper-8-Quinolinolate, presenting results statistically significant in relation control however this same effect was not observed to pentachlorophenol. With the realization this project, by means of identification through capillary electrophoresis and toxicological evaluation of the PCP can be donating through of a interdisciplinary study for effective actions of the Sanitary Surveillance in the Brazil.

Lista de Siglas & Abreviaturas

ACGIH: American Conference of Governmental Industrial Hygienists

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATSDR: Agency for toxic Substances and Disease Registry

BEI: Biological Exposure Indices

C8Q: Cobre-8-quinolinolato

CFR: Code Federal Regulations (FDA)

CG-DCE: Cromatografia gasosa acoplada ao detector por captura de eletrons

CG-DIC: Cromatografia gasosa acoplada ao detector por ionização por chama

CG-DSM: Cromatografia gasosa acoplada ao detector seletivo de massa

CHO: Células de pulmão de hamster chinês

CP: Ciclofosfamida

DMSO: Sulfóxido de metila

EDTA dissódico: Ácido Etilenodiamino Tetracético dissódico

HTC: Células de hepatoma de rato

IARC: International Agency for Research on Cancer

IBAMA: Instituto Brasileiro e dos Recursos Naturais Renováveis

LD: Limite de detecção

LQ: Limite de Quantificação

MMA: Ministério do Meio Ambiente

MMS: Metanosulfonato de metila

MS: Ministério da Saúde

p.c.: peso corpóreo

PBS: Solução salina tamponada de fosfato (“Phosphate Buffered Saline”)

PCF: Pentaclorofenol

POP: Procedimento Operacional Padrão

TLV: Thershold Limit Values

TRIS: tris (hidroximetil) aminometano

Triton X-100: t-octilfenoxipolietanol

U.S FDA: U.S. Food and Drugs and Administration

U.S. EPA: U.S. Environmental Protection Agency

UA: Unidades Arbitrárias

V-79: Células de ovário de hamster chinês

SUMÁRIO:

1. INTRODUÇÃO.....	01
1.1. Classificação dos agentes tóxicos	06
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	08
2.1 Pentaclorofenol (PCF).....	08
2.1.1 Identidade.....	08
2.1.2 .Aplicações.....	09
2.1.3 A presença do PCF nas indústrias de celulose e papel.....	12
2.1.4 Legislação sobre o PCF.....	14
2.1.5 Toxicologia do PCF.....	17
2.1.6 Classificação toxicológica quanto a carcinogenicidade.....	27
2.2 Cobre-8-Quinolinolato (C8Q).....	31
2.2.1 Identidade.....	31
2.2.2 Aplicações.....	31
2.2.3 Legislação sobre o C8Q	32
2.2.4 Efeitos Toxicológicos.....	35
2.2.5 Eliminação em Plantas e Animais.....	36
2.2.6 Carcinogenicidade, Mutagenicidade e Genotoxicidade.....	37
2.2.7 Mecanismo de ação.....	38
2.2.8 Classificação quanto a carcinogenicidade.....	38
2.3 Eletroforese Capilar.....	39
2.3.1. Definição Geral	39
2.3.2 Aplicações da Técnica.....	40
2.3.3 Funcionamento da eletroforese capilar.....	41
2.3.4 Instrumentação.....	42
2.3.5 Vantagens & Desvantagens.....	44
2.3.6 Modos de separação.....	44
2.4 Reação de Derivatização.....	48
2.5. Ensaio de Migração.....	50
2.6 Ensaio Cometa.....	54
2.6.1 Definição geral.....	54
2.6.2 Princípios e aplicações da técnica.....	55

3.OBJETIVOS.....	56
3.1 Objetivo geral.....	56
3.2 Objetivos específicos.....	56
3.3 Vigilância Sanitária.....	57
4.MATERIAL & MÉTODOS.....	59
4.1 Material.....	59
4.1.1 Solventes Orgânicos.....	59
4.1.2 Reagentes Químicos.....	59
4.1.3 Colunas para Eletroforese Capilar.....	59
4.1.4 Padrões Analíticos.....	59
4.1.5 Insumos e Soluções do Ensaio Cometa.....	60
4.1.6 Equipamentos.....	61
4.1.7 Amostras.....	61
4.2 Eletroforese capilar.....	62
4.2.1 Condicionamento do Capilar.....	62
4.2.2 Construção da curva analítica.....	62
4.2.3 Condições experimentais aos métodos analíticos.....	62
4.3.Reação de Derivatização.....	63
4.4 Ensaio de Migração.....	65
4.5 Ensaio Cometa.....	67
4.5.1 Expressão dos resultados em experimentos <i>in vitro</i>	71
4.5.2 Critérios para Avaliação e Interpretação dos resultados.....	72
4.5.3 Ensaio Cometa do PCF.....	72
4.5.4 Ensaio Cometa do C8Q em células sanguíneas.....	73
4.5.5 Ensaio Cometa do C8Q em células HTC.....	76
5. Resultados & Discussão.....	79
5.1 Análise do PCF.....	79
5.1.1 Construção da curva analítica por eletroforese capilar.....	79
5.1.2 Linearidade do método analítico por eletroforese capilar.....	81
5.1.3 Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ) para análise do PCF por eletroforese capilar.....	86
5.2 Análise das amostras.....	87
5.2.1 Análise por eletroforese capilar.....	87

5.2.2	Análise do espectro de Ultravioleta (UV).....	90
5.2.3	Análise por cromatografia gasosa acoplada ao detector por captura de elétrons (CG-DCE).....	94
5.2.4	Análise por cromatografia gasosa acoplada ao detector seletivo de massas (CG-DSM).....	96
5.2.5	Quantificação estimada do PCF nas amostras por eletroforese capilar	101
5.2.6	Estimativa de exposição ao PCF.....	102
5.3	Análise do C8Q.....	104
5.4	Análise toxicológica.....	106
5.4.1	Ensaio de Citotoxicidade do PCF.....	106
5.4.2	Ensaio Cometa do PCF.....	108
5.4.3	Ensaio de citotoxicidade em células sanguíneas do C8Q.....	112
5.4.4	Ensaio de citotoxicidade em células HTC do C8Q.....	113
5.4.5	Ensaio Cometa do C8Q em células sanguíneas.....	114
5.4.6	Ensaio Cometa do C8Q em células HTC.....	117
6.	Conclusão.....	120
7	Perspectivas Futuras.....	122
8.	Referências Bibliográficas.....	123
ANEXOS	138

Índice de Tabelas:

TABELA 1: Valores para classificação toxicológica dos agentes químicos.....	06
TABELA 2: Concentração do PCF em diferentes órgãos e tecidos.....	18
TABELA 3: Classificação do IARC quanto a avaliação de carcinogenicidade para seres humanos.....	30
TABELA 4: Lista dos Simulantes de Alimentos.....	51
TABELA 5: Classificação dos alimentos para efeito de embalagem.....	51
TABELA 6: Condições para os ensaios de migração em embalagens.....	52
TABELA 7: Solventes simulantes indicados para cada tipo de alimento.....	53
TABELA 8: Teste para normalidade dos resíduos.....	82
TABELA 9: Teste para homogeneidade da variância dos resíduos.....	82
TABELA 10: Teste de autocorrelação dos resíduos.....	83
TABELA 11: Teste da significância da regressão e o desvio da linearidade.....	84
TABELA 12: Resumo da avaliação estatística.....	85
TABELA 13: Índice de confirmação através dos espectros das substâncias.....	93
TABELA 14: Análise quantitativa para o PCF em nossas amostras.....	101
TABELA 15: Resumo das doses orais de referência (DOR).....	102
TABELA 16: Ensaio de citotoxicidade do PCF em células sanguíneas humanas.....	107
TABELA 17: Ensaio Cometa do PCF em células sanguíneas humanas.....	108
TABELA 18: Ensaio de citotoxicidade do C8Q em células sanguíneas humanas...	112
TABELA 19: Ensaio de citotoxicidade do C8Q em células HTC.....	113
TABELA 20: Ensaio Cometa do C8Q em células sanguíneas humanas.....	115
TABELA 21: Ensaio Cometa do C8Q em células HTC.....	117
ANEXO I: Avaliação da carcinogenicidade <i>in vivo</i> do PCF.....	138
ANEXO II: Avaliação da mutagenicidade do PCF em <i>Salmonella typhimurium</i>	139
ANEXO III: Avaliação da mutagenicidade do PCF em células de mamíferos <i>in vitro</i>	140
ANEXO IV: Avaliação da atividade promotora de tumor <i>in vivo</i> do PCF.....	141

Índice de Figuras:

Figura 1: Estrutura molecular do PCF.....	08
Figura 2: Rota metabólica do PCF.....	20
Figura 3: Estrutura molecular do C8Q.....	31
Figura 4: Princípio da zona eletroforética.....	40
Figura 5: Figura ilustrativa sobre o funcionamento da eletroforese capilar.....	41
Figura 6: Reação de Acetilação dos Clorofenóis com anidrido acético.....	49
Figura 7: Fotografia do ensaio de migração.....	66
Figura 8: Fotografia do ensaio de migração.....	66
Figura 9: Fluxograma contendo as etapas de execução do ensaio Cometa.....	67
Figura 10: Fotomicrografia de célula apresentando classe 0 de dano ao DNA.....	69
Figura 11: Fotomicrografia de célula apresentando classe 1 de dano ao DNA.....	70
Figura 12: Fotomicrografia de célula apresentando classe 2 de dano ao DNA.....	70
Figura 13: Fotomicrografia de célula apresentando classe 3 de dano ao DNA.....	70
Figura 14: Curva analítica do PCF.....	80
Figura 15: Gráfico da reta para determinação do LD e LQ.....	86
Figura 16: Eletroferograma da solução padrão de PCF (A) e da amostra de palitos de picolé (B) solvente simulante, etanol/H ₂ O 95 % v/v.....	88
Figura 17: Eletroferograma da solução padrão de PCF (A) e da amostra de palitos de picolé (B) solvente simulante, etanol/H ₂ O 50% v/v.....	89
Figura 18: Eletroferograma da solução padrão de PCF (A) e da amostra de palitos dedentes (B) solvente simulante, etanol/H ₂ O 95 % v/v.....	90
Figura 19: Espectro em três dimensões da solução padrão de PCF 100 mg/L.....	91
Figura 20: Eletroferograma do solvente simulante (etanol/H ₂ O 50%) amostra palitos de picolé.....	92
Figura 21: Espectros da solução padrão de PCF e do solvente simulante etanol/H ₂ O 50% v/v.....	93
Figura 22: Cromatograma da solução padrão de PCF 50 mg/L.....	95
Figura 23: Cromatograma da solução de migração.....	95
Figura 24: Cromatograma da solução padrão de PCF derivatizado 1mg/L.....	98
Figura 25: Cromatograma da solução da amostra derivatizada.....	98
Figura 26: Espectro do padrão de PCF derivatizado 1mg/L (modo SCAN).....	99
Figura 27: Espectro da amostra derivatizada (modo SIM).....	99

Figura 28: Eletroferograma da solução padrão de C8Q(A) e da amostra de palitos de picolé (B) solvente simulante, etanol/H₂O 50% (v/v).....	104
Figura 29: Ensaio Cometa do PCF em células sanguíneas humanas <i>in vitro</i>.....	109
Figura 30: Ensaio Cometa do PCF em células sanguíneas humanas <i>in vitro</i>.....	109
Figura 31: Ensaio Cometa do C8Q em células sanguíneas humanas <i>in vitro</i>.....	115
Figura 32: Ensaio Cometa do C8Q em células sanguíneas humanas <i>in vitro</i>.....	116
Figura 33: Ensaio Cometa do C8Q em células HTC <i>in vitro</i>.....	118
Figura 34: Ensaio Cometa do C8Q em células HTC <i>in vitro</i>.....	118

1.INTRODUÇÃO:

Uma das principais funções das embalagens é proporcionar ao consumidor um alimento com o mesmo nível de qualidade dos produtos frescos ou recém preparados, devido a sua capacidade de protegê-lo contra agentes deteriorantes, infectantes ou sujidades. Ela atua como uma barreira que protege o produto do contato direto com o ambiente, evitando contaminações, manuseio inadequado, falta de higiene e perda das características organolépticas, além de proporcionar ao alimento um aumento entre o tempo de produção até o seu consumo (tempo de vida de prateleira do alimento). Mesmo apresentando todas estas vantagens existe um problema que muitas vezes não é levado em consideração que é o uso de substâncias utilizadas na fabricação de materiais em contato com os alimentos.

A transferência de substâncias presentes em materiais em contato com os alimentos, já é conhecida há algum tempo e descrita na literatura por MURPHY (1992), LEHR (1993). Algumas substâncias utilizadas como aditivos em materiais e artigos que entram em contato com alimentos estão sendo regulamentadas pelos órgãos oficiais COMMUNITIES OF EUROPEAN (1994), de forma a estabelecer os limites de migração.

Muitas são as substâncias utilizadas como matéria-prima na fabricação de embalagens para alimentos, tais como: vidro, metal, plásticos, papel e madeira, e muitas das vezes são utilizados aditivos, que seriam substâncias coadjuvantes usadas na fabricação de determinadas embalagens. Essas substâncias consideradas como aditivos estão listadas, de forma permitida na confecção de materiais, que podem entrar em contato com alimentos e nesta lista estão estabelecidos os seus níveis aceitáveis no material.

Geralmente, os tipos de madeira utilizados na confecção de materiais, que entram em contato com os alimentos são de baixa qualidade e de fácil deterioração.

Por isto existe uma necessidade de que este material sofra um processo de preservação. Normalmente o processo de preservação de madeiras que entram em contato com os alimentos são realizados de duas maneiras:

1. Secagem em estufa.
2. Tratamento químico

O tratamento químico se dá pela utilização de substâncias químicas capazes de provocar a indisponibilidade dos nutrientes celulares da madeira, tornando-a resistente ao ataque e desenvolvimento de microorganismos e insetos xilófagos, a estas substâncias denominamos de preservantes, pois têm a função de aumentar a vida útil [www.unb.br/prof_alexandre/als_preserv.pdf].

Os processos de aplicação dos preservantes podem ser divididos, de uma forma geral em duas categorias:

- Processos com pressão (impregnação profunda da madeira permeável).
Aplicação dos preservantes através de autoclave - Usinas de preservação de madeiras
- Processos sem pressão (impregnação superficial da madeira).
Aplicação dos preservantes por pincelamento, aspensão ou imersão da madeira.

Os critérios de seleção para preservantes e métodos de aplicação exigem, obrigatoriamente, o conhecimento das condições de agressividade biológica que a madeira está sujeita quando empregada além da sua resistência natural e permeabilidade. Vale ressaltar que através da preservação das madeiras é possível aumentar significativamente a vida útil das peças em serviços. Tal fato contribui diretamente com a conservação ambiental, uma vez que oferece uma redução da exploração das matas nativas.

•Tipos de preservantes de madeira:

Dependendo do tipo de solvente utilizado na diluição da solução preservativa, teremos três tipos de preservantes.

- **Oleosos:** Produtos essencialmente representados pelos derivados do alcatrão de hulha, com destaque ao creosoto, que é obtido pela destilação do alcatrão de hulha, o qual por sua vez é um subproduto recuperado no processo de obtenção do coque siderúrgico. A composição química desses dois compostos (Creosoto e o Alcatrão) é bastante complexa, contendo mais de uma centena de substâncias orgânicas [JANKOWSKY,1990].

- **Oleossolúveis:** Produtos contendo misturas complexas de agentes fungicidas e inseticidas, à base de compostos de natureza orgânica e/ou organometálicas, com destaque ao pentaclorofenol, que geralmente é utilizado em soluções oleosas a 5% m/v. Este preservante pode ter sua hidrofiliabilidade aumentada quando se encontra na forma de sal (pentaclorofenato de sódio). O pentaclorofenol deixou de ser produzido no Brasil na década de setenta, atualmente o produto que se encontra disponível no Brasil é importado e tem custo elevado. Este fato, aliado a toxicidade do produto ao ser humano e a legislação que impõe crescentes restrições ao uso de biocidas organoclorados, tem desestimulado o uso deste preservativo, embora seja um dos mais eficientes na proteção da madeira. Além do pentaclorofenol um outro preservante com introdução relativamente recente em nosso país é o cobre-8-quinolinolato, que é um dos poucos preservantes aprovado pelo FDA-US (Administração de Drogas e Alimentos - EUA) para tratamento de material que entre em contato com alimentos [JANKOWSKY,1990].

- **Hidrossolúveis:** Produtos contendo misturas mais ou menos complexas de sais organometálicos. A proporção que entram na composição de um preservativo é determinada através de cuidadosos estudos. As soluções aquosas desses sais, penetrando na madeira, sofrem reações de fixação, produzindo compostos insolúveis que dificilmente serão lixiviados, isto é, arrastados pela água ou umidade [JANKOWSKY, 1990].

Um produto químico para ser considerado como preservante de madeira deve apresentar as seguintes características:

a) Características essenciais:

- Ser tóxico restritamente aos organismos xilófagos, como fungos e insetos;
- Não ser de utilização perigosa no momento do tratamento;
- Ter alto efeito residual na madeira, isto é, ser quimicamente estável e resistir a perdas por evaporação e/ou lixiviação;
- Não alterar negativamente as propriedades físicas e mecânicas da madeira;
- Apresentar custos razoáveis a fim de assegurar a competitividade da madeira preservada em relação aos outros materiais.

b) Características “acessórias”:

- Se possível não conferir à madeira preservada toxicidade em relação ao homem (esta condição é imperativa para as madeiras de ambientes interno);
- Não aumentar a inflamabilidade nem a combustibilidade da madeira;
- Não conferir à madeira preservada, odores persistentes e não alterar a aparência natural da madeira ou impossibilitá-la de receber acabamento.

É uma tarefa quase que impossível reunir em um produto preservante, todas essas características mencionadas, conseqüentemente a escolha deve ser feita apoiada nas especificações existentes e na experiência acumulada na literatura disponível.

O preservante usado no tratamento da madeira deve possuir como característica acessória, ausência de toxicidade, porém em muitos casos, esta condição não é satisfeita, pois muitas substâncias utilizadas no tratamento das madeiras apresentam efeitos tóxicos ao homem e ao meio ambiente.

Este estudo visa abordar a determinação analítica de dois preservantes usados em madeiras, o pentaclorofenol e o cobre-8-quinolinolato, que entrem em contato com gêneros alimentícios, além do estudo da toxicidade dos mesmos, determinando os principais efeitos ao homem e ao meio ambiente, principalmente no que diz respeito aos resultados dos ensaios de carcinogenicidade e mutagenicidade.

A obrigatoriedade de realização dos ensaios toxicológicos é hoje válida para substâncias químicas das mais diversas classes, tais como agrotóxicos, domissanitários, fungicidas, inseticidas e aditivos alimentares, com as quais o homem entra em contato como usuário ou durante o processo de fabricação. A regulamentação do uso é feita através do Ministério da Saúde, Ministério da Agricultura e IBAMA [OGA,1996].

A toxicologia é a ciência que estuda os efeitos nocivos decorrentes das interações de substâncias químicas com o organismo. Entende-se por agente tóxico ou toxicante a entidade química capaz de causar dano a um sistema biológico, alterando seriamente uma função ou levando até mesmo à morte, sob certas condições de exposição. A toxicologia abrange uma vasta área de conhecimentos, onde atuam profissionais de diversas formações, para elucidação dos mecanismos de ação dos agentes tóxicos sobre os sistemas biológicos e para avaliação dos efeitos decorrentes dessas ações.

1.1 Classificação dos agentes tóxicos:

Os agentes tóxicos podem ser classificados de várias formas, levando-se em consideração, os órgãos alvos de toxicidade, tais como: fígado, rins, sistema hematopoiético, o seu uso (pesticida, solvente, aditivo alimentar), a sua origem (animal, vegetal, microbiana) e, os seus efeitos (câncer, mutação, dano ao fígado, etc.). Os agentes tóxicos podem também ser classificados quanto à forma física (gás, sólido ou líquido), mas a classificação mais utilizada pelos toxicologistas se dá em termos de toxicidade **aguda** e **crônica**. Adicionalmente, o sistema de classificação deve considerar além destas informações, também as propriedades químicas e biológicas dos agentes e o tipo de exposição que são usados para regulamentar e controlar esses agentes [KLAASEN, 1996].

A seguir, a Tabela1 mostra a classificação dos agentes químicos baseados nos valores das prováveis doses letais orais para humanos.

TABELA1: Valores para Classificação Toxicológica dos Agentes Químicos

Provável dose oral letal para humanos	
Classe toxicológica	Dose
Praticamente não tóxico	>15 g/kg (p.c.)
Levemente tóxico	5-15 g/kg (p.c.)
Moderadamente tóxico	0,5-5 g/kg (p.c.)
Muito tóxico	50-500 mg/kg (p.c.)
Extremamente tóxico	5-50 mg/kg (p.c.)
Supertóxico	< 5,0 mg/kg (p.c.) ¹

Fonte: Klaasen (1996)

¹ (p.c.): peso corpóreo.

Neste trabalho estudou-se como preservantes de interesse o pentaclorofenol e o cobre-8-quinolinolato, preservantes oleossolúveis, pois trata-se de substâncias que são potencialmente tóxicas ao homem e ao meio ambiente.

Este estudo visa abordar a determinação da migração para alimentos, através da eletroforese capilar desses preservantes em materiais de madeira que entrem em contato com gêneros alimentícios, além do estudo da toxicidade dos mesmos, principalmente no que diz respeito aos ensaios de carcinogenicidade e mutagenicidade.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA:

2.1 Pentaclorofenol (PCF)

2.1.1 Identidade:

Substância de massa molar igual a 266,3; fórmula molecular C_6Cl_5OH com aspecto incolor na forma de cristais, odor fenólico, ponto de fusão de 189-191°C e ponto ebulição na faixa de 309-310°C em 760 mm Hg, densidade de vapor de 1,98 a 22°C, solubilidade em água em 100 g de água: 0,5 mg em 0°C; 1,8 mg em 27°C; e 3,5 mg em 50°C. Solubilidade em 100g de metanol: 57 g em 20°C; pouco solúvel em etanol e facilmente solúvel em triclorobenzeno. O PCF é solúvel na maioria dos solventes orgânicos, não higroscópico, pKa de ácido fraco com valor igual a 4,71, não inflamável. Sob a forma de sal, como pentaclorofenato de sódio (Na-PCF) é bastante solúvel em água, CAS nº (87-86-5) [THE INDEX MERCK, 1996]. A seguir, a Figura 1 apresenta-se a estrutura do pentaclorofenol:

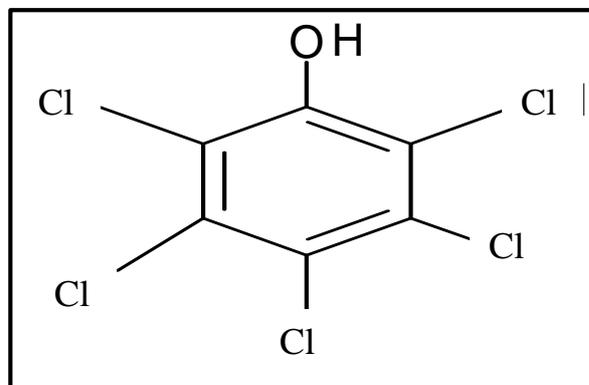


Figura 1: Estrutura molecular do pentaclorofenol.

2.1.2 Aplicações:

O pentaclorofenol (PCF) e o seu (Na-PCF) sal têm sido usados como algicida, moluscicida, bactericida, fungicida, herbicida, inseticida e preservante de madeira com uma variedade muito ampla de aplicações na indústria, agricultura e doméstica, embora nos últimos anos a maioria dos países desenvolvidos tem restringido a sua produção e o seu uso principalmente na agricultura e nas aplicações domésticas [WHO, 1987].

O PCF é um composto organoclorado, e como tal, os compostos organoclorados são substâncias tóxicas, persistentes e biocumulativas, o que constitui um grave risco para as pessoas e para o meio ambiente. Os organoclorados podem permanecer no meio ambiente dezenas de anos, alguns durante séculos e, como são muito estáveis e não se dissolvem em água, acabam por entrar na cadeia trófica, depositando-se no tecido adiposo dos seres vivos [SANTAMARTA, 2001].

Os organoclorados são também potenciais causadores de formação de dioxinas, termo usado para denominar uma família de compostos aromáticos. As dioxinas são tóxicas e atuam como se fossem hormônios naturais, sendo muito potente e em quantidades mínimas podem estimular, inibir ou até mesmo desregular intracelularmente os órgãos. A dioxina tem também uma ação cumulativa no nosso organismo. O PCF pode também estar presente na madeira, sendo utilizado para sua preservação protegendo-a do ataque de microorganismo. O uso e a aplicação do PCF para outras finalidades foi muito questionado durante os anos 80, pois nesta década ocorreram sérios acidentes, o que acarretou sérios problemas ambientais, gerando então, contradições sobre seu uso. Os acidentes que causaram maior impacto foram: O caso do Porto do Rio, o caso Rhodia em São Paulo e denúncias de contaminação de camas de aviários descritos abaixo como fatos marcantes que ocorreram no Brasil envolvendo o PCF.

❖ O Caso do Porto do Rio

Em 1984, chegou ao porto do Rio de Janeiro um carregamento de PCF, importado da China, sendo que as embalagens estavam muito avariadas. Por este motivo, foi feita a transferência deste produto para novos vasilhames, realizado por vários estivadores vestidos apenas com calções, sem máscaras, luvas e óculos. Durante o processo de transferência ocorreu a inalação de PCF sob forma de poeira enquanto que os corpos cobertos de suor absorveram o PCF pela pele. Tendo como resultado final a morte de três operários por intoxicação. Após este acontecimento o PCF ficou conhecido como “Pó da China”, portanto posterior a este trágico acidente surgiu o "Regulamento do Transporte Rodoviário de Produtos Perigosos", através do Ministério dos Transportes. Em 1988, este regulamento foi revisto e ampliado, através do Decreto 96.044 de 18/05/88, que se encontra em vigor até a presente data [<http://www.riosvivos.org.br/arquivos/660712871.doc>].

❖ O Caso Rhodia

A Rhodia em 1976 comprou a empresa Clorogil S.A em Cubatão, que já produzia o PCF, e o Na-PCF, além de outros compostos organoclorados, porém, menos de dois anos depois da compra, foi suspensa a produção de PCF e do Na-PCF. Nesse mesmo ano começaram a ser encontrados depósitos desse material em solos na região de Samaritá e depois em Cubatão, Posteriormente através de testes de aerofotometria, feito pela empresa indicou a presença de outros depósitos, os quais começaram a ser removidos. Desta forma, nesse mesmo ano foi construída uma estação de espera em São Vicente para recebimento deste material. Após este acidente, a Rhodia decidiu não mais retomar a produção do PCF e do Na-PCF.

Também, em 1987, visando a destruição destas substâncias foi construído um incinerador, onde foram queimadas cerca de 70 mil toneladas de resíduos até junho de 1993. Mesmo após o cumprimento de todas as medidas impostas pela fábrica para o controle do PCF, em 1993, o Ministério Público solicitou por ordem judicial o fechamento da fábrica de Cubatão por completo.

A CETESB (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental) exigiu que a Rhodia descontaminasse e tratasse todo o solo e lençol freático da fábrica contaminado pelos seus depósitos que comprometeram de forma irreversível o meio ambiente rico e biodiversificado, formado pelo estuário, manguezais, restingas e pelo complexo formado por florestas de Mata Atlântica, ecossistemas afins e integrados [<http://www.riosvivos.org.br/arquivos/660712871.doc>].

❖ *Contaminante X Consumidor:*

O IDEC (Instituto de Defesa do Consumidor) realizou uma pesquisa sobre denúncia de contaminação de maravalhas. As maravalhas são utilizadas como cama de aviário sendo empregadas na forração do chão das granjas, suspeitou-se então que as mesmas estariam sendo contaminadas por agrotóxicos. Adicionalmente verificou-se também que duas marcas de adubos à base de esterco de aves estariam contaminadas pelo agrotóxico PCF e dois outros preservantes de madeira (tribromofenol e tribromoanisol). Esta pesquisa foi realizada com o objetivo de se obter elementos que indicassem a possibilidade de contaminação por agrotóxicos e pedir providências às autoridades. A denúncia recebida pelo IDEC ponderava que a contaminação da madeira da maravalha poderia se estender aos animais e aos alimentos produzidos com o citado adubo. Além disso, outros produtos poderiam estar sendo contaminados pelos resíduos dos preservantes através do uso de caixas de madeiras contaminadas, utilizadas no transporte de frutas e verduras, e de utensílios que entram em contato direto com os alimentos.

O IDEC decidiu realizar análises em quatro marcas de adubos à base de esterco de aves comercializadas. Além disso, foram comparadas e analisadas sete marcas de carnes de frangos congeladas de grandes empresas nacionais. Os resultados demonstraram que nenhuma das amostras de carne de frango apresentava resíduos dos preservantes acima do nível ou superior ao limite de detecção do método LD= 7,5 µg/kg.

Há poucos estudos epidemiológicos em humanos, no que diz respeito a contaminação destes preservantes de madeira. Ainda não existe na legislação brasileira estabelecido um Limite de Máximos de Resíduos (LMR) em alimentos para o PCF, assim como nas principais agências internacionais, cada país possui sua própria dotação [<http://www.sbrt.idict.br>].

2.1.3 A presença do PCF nas indústrias de Celulose e Papel

O PCF, como dito anteriormente pode aparecer na indústria de celulose e de papel associado a madeira ou como um subproduto do branqueamento, devido a processos de cloração. Até a década de 70 a principal seqüência de branqueamento utilizada era a convencional, a qual utiliza o gás cloro como principal agente alvejante, porém a partir da década de 80 até os dias atuais, as entidades ligadas ao meio ambiente começaram a se preocupar cada vez mais com a contaminação do meio ambiente surgindo conseqüentemente, normas ambientais cada vez mais severas para aqueles que coloquem em risco a saúde humana e o meio ambiente. Desta forma iniciou-se o questionamento sobre o uso da seqüência convencional de branqueamento, devido principalmente a formação dos compostos organoclorados como subproduto da reação. Estas substâncias são altamente tóxicas ao meio ambiente e originam-se da ligação dos grupos fenólicos presentes na lignina com o cloro [RABELO, 2001].

❖ Preservação da madeira:

A degradação da madeira por insetos ou microrganismos é uma etapa fundamental na reciclagem de nutrientes dentro de um ecossistema, colaborando para o equilíbrio entre a diversidade de formas vivas existentes na natureza, porém esta degradação prejudica a aplicação da madeira para uso industrial, tanto na fabricação de móveis, quanto na produção de papel. Sendo assim, devemos evitar este fenômeno, mas nem sempre é possível modificar as condições que favoreçam a degradação da madeira, como por exemplo, através da diminuição da umidade da madeira, sendo então, necessário a aplicação de preservantes.

A atividade básica para o tratamento desta madeira consiste na introdução de substâncias que retardam o processo natural de deterioração causada por organismos, como bactérias, fungos, insetos, e outros. Essas substâncias, denominadas preservantes, devem ser tóxicas aos citados organismos, porém não devem afetar a fauna e flora da região onde é tratada a madeira.

Os principais preservantes usados são os fungicidas e inseticidas, sendo que a maior parte deles são da família dos organoclorados. O PCF é um fungicida óleo-solúvel, dissolvido em óleo combustível num teor de 5% m/m. Começou a ser usado comercialmente como preservante de madeira em 1936. Por vários anos, o PCF em conjunto com o seu sal sódico (Na-PCF) foi usado como o principal e um dos mais eficientes fungicidas, porém na década de 80, com o aumento das campanhas ambientais, através dos diferentes meios de comunicação, verificou-se que o PCF continha impurezas perigosas, com até 0,1 % m/m de policlorodibenzodioxinas e com 1 a 5 % m/m de fenoxifenóis policlorados. O PCF isolado e estas últimas impurezas são responsáveis pela difusão diária de dioxinas para o ambiente. A difusão de dioxinas decorre da exposição à luz solar e da incineração, de produtos tratados com PCF. Em virtude da sua toxicidade, o PCF é objeto de diversas restrições em mais de trinta países [RABELO, 2001].

2.1.4.Legislação sobre o PCF:

No Brasil a Resolução do CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente) nº 05, de 20 de novembro de 1985, inclui entre as atividades potencialmente poluidoras o transporte, estocagem e uso do PCF e do Na-PCF [<http://www.lei.adv.br/005-85.htm>]. Posteriormente, a Resolução do CONAMA nº 014, de 18 de março de 1986, que referenda a resolução anterior, proíbe o uso deste produto para qualquer fim industrial [<http://www.lei.adv.br/014-86.htm>].

Na Legislação Brasileira para Agrotóxicos, a Lei nº 7.802, de 11 de Julho de 1989 e o Decreto nº 98.816 de 11 de janeiro de 1990, impõem que o registro de toda substância que se enquadre no conceito de agrotóxico, seus componentes e afins, deve atender as exigências dos órgãos federais pertencentes aos Ministérios do Meio Ambiente (MMA), da Saúde (MS) e da Agricultura (MA). Numa discussão entre os três Ministérios, levantou-se a necessidade de uma reavaliação do PCF, tendo em vista sua alta toxicidade. Isto levou a sua proibição pelo MS para atender as tendências absorvidas pelo país quando foi assinada a Convenção de Estocolmo, a qual tem o objetivo de proteger a saúde humana e o meio ambiente dos efeitos danosos dos poluentes orgânicos persistentes. [<http://www.mma.gov.br>].

Uma solução apresentada seria a de modificar a legislação específica para preservantes de madeira, cuja responsabilidade cabe ao MMA, porém, tendo em vista que madeireiras já possuíam grandes estoques de PCF, provavelmente, devido às facilidades nas importações e da característica da licença emitida pelo Ministério do Meio Ambiente, estabeleceu-se um impasse, criado pela dificuldade de se fazer o descarte dessa grande quantidade de PCF existente no país.

Grandes prejuízos e falta de estrutura suficiente para incinerar grandes quantidades de PCF foram fatos que contribuíram para esse impasse, já que, a incineração descontrolada de PCF, gera substâncias mais tóxicas do que ele, como, as dioxinas, por exemplo.

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) estabeleceu em reunião realizada em 09 de maio de 2002, a necessidade do aperfeiçoamento das ações do controle sanitário na área de alimentos visando a proteção da população e a importância de compatibilizar a legislação nacional com a de outros países do Mercosul com respeito à embalagem e equipamentos em contato com alimentos, estabeleceu a adoção da seguinte resolução: “Nas embalagens e equipamentos celulósicos em contato com alimentos não devem ser detectadas bifenilas policloradas em níveis iguais ou superiores a 5mg/kg nem **pentaclorofenol** em níveis iguais ou superiores a 0,10mg/kg de papel [BRASIL, 2002]”.

O PCF aparece numa relação da ANVISA, onde foram publicadas a “Relação de monografias dos ingredientes agrotóxicos, domissanitários e preservantes de madeira”. O emprego encontra-se autorizado conforme descrito na monografia, disponibilizado no seguinte endereço eletrônico [<http://www.anvisa.gov.br/toxicologia/monografias/p44.pdf>].

A monografia que trata do PCF o classifica como:

- a) Classe: Fungicida;
- b) Classe toxicológica: I (Extremamente tóxico);
- c) Utilização: uso como preservante de madeira: Uso exclusivo para tratamento de madeiras destinadas para dormentes, postes, cruzetas, mourões para cercas rurais, esteios e vigas, com necessidade de registro no Instituto Brasileiro e dos Recursos Naturais Renováveis- (IBAMA);
- d) Contaminantes de importância toxicológica para o ingrediente ativo e seu limite máximo: Dioxinas totais= 0,1 mg/kg.

A Agência de Administração de Drogas e Alimentos dos EUA (FDA/USA) agência responsável pela regulamentação e fiscalização dos medicamentos e alimentos, a partir de dados gerados pelo Centro para Alimentos Seguros e Nutrição Aplicada (CFSAN/ FDA) mantém um programa conhecido como Programa de Avaliação dos Aditivos de Alimentos (PAFA), que contém informações regulatórias e químicas relativas a um número superior a 3000 substâncias mencionadas no título 21 do Código Federal de Regulamentações (21 CFR), fascículos 175, 176, 177 e 178. Estes fascículos tratam dos artigos em contato com os alimentos, e incluem componentes adesivos e componentes de revestimento (Fascículo 175), componentes de papéis e papelão (Fascículo 176), polímeros (Fascículo 177), e adjuvantes e produção de adjuvantes e sanitizantes (Fascículo 178). Em geral estas substâncias que podem estar em contato com os alimentos como parte da embalagem ou do processamento, não são intencionais e não são adicionadas diretamente aos alimentos, não sendo consideradas efetivamente componentes dos alimentos [<http://www.cfsan.fda.gov/>].

No Fascículo 178 o PCF aparece como aditivo indireto de alimentos na parte referente aos preservantes de madeira. O FDA limita a utilização do PCF e do Na-PCF, na qual não deverá exceder a 50 µg/g na madeira tratada [21 CFR 178.3800]. A mesma agência complementa mencionando que os preservantes devem ser seguramente usados sobre artigos de madeiras que se destinam ao uso em embalagens e transporte de produtos agrícolas. Segundo o 21 CFR 178.3800 os preservantes são preparados a partir de substâncias bem caracterizadas e devem ser aplicadas em quantidades que não exceda a aquela necessária para a realização do seu efeito técnico protegendo a madeira da putrefação e mofo.

2.1.5 Toxicologia do PCF:

a) Mecanismo de Ação:

O PCF causa o desacoplamento do ciclo da fosforilação oxidativa nas mitocôndrias nas células, o que aumenta notadamente a taxa metabólica basal e a temperatura corpórea. O sítio de ação do PCF parece ser a membrana celular. O estado hipermetabólico é resultante da desordem do metabolismo aeróbico que é caracterizado pelo hipertermia, que leva ainda a uma taquicardia, taquipnéia, hiperemia, acidose metabólica [CLAYTON & CLAYTON, 1994].

Experimentos *in vitro* demonstraram que o PCF na faixa de concentração de 10^{-6} a 10^{-2} M pode causar inibição da fosforilação oxidativa, inibição da adenosina trifosfatase mitocondrial e da miosina, inibição da fosforilação glicolítica, inativação das enzimas da cadeia respiratória e provocar danos as mitocôndrias [CLAYTON & CLAYTON, 1994].

b) Efeitos em seres humanos:

O PCF pode afetar nocivamente a saúde dos trabalhadores envolvidos na produção ou no seu uso. Doenças respiratórias, alterações neurológicas, erupções cutâneas, dor de cabeça, náusea e fraqueza têm sido relatados em trabalhadores expostos e envolvidos na produção e na aplicação de PCF. Sintomas similares têm sido descritos em moradores de casas tratadas internamente com PCF. O contato prolongado ou freqüente com a solução ou com o pó pode causar dermatites ou sintomas sistêmicos incluindo danos ao sistema circulatório e ao coração podendo levar a morte. Tais sintomas estão também associados com a exposição a outros compostos da família dos clorofenóis [WHO, 1987].

c) Toxicocinética:

Absorção: O PCF e o Na-PCF são muito bem absorvidos a partir da exposição pelas vias dérmica, oral e inalatória.. A letalidade do PCF foi aumentada quando foi administrado em um veículo oleoso. A absorção de substâncias tais como o PCF que possui substancial solubilidade lipídica através da membrana e da pele é aumentada pela presença dos hidrocarbonetos presentes no solvente, causando um aumento na eficiência de sua absorção. O PCF por via oral é rapidamente absorvido através do trato gastrointestinal. As intoxicações ocorrem principalmente pela inalação dos seus vapores durante o processo de produção, formulação e aplicação [OGA, 1996].

Distribuição: Depois de absorvido é distribuído no fígado, pulmões, rins, sangue, tecido adiposo e cérebro. O PCF é altamente ligado às proteínas plasmáticas (aproximadamente 95% do que foi absorvido). Estudos realizados em animais de laboratório demonstraram ser na urina onde primeiramente se alcança uma alta concentração de PCF, seguido do trato gastrointestinal [CLAYTON & CLAYTON, 1994].

Os níveis de Na-PCF foram medidos em uma criança que morreu a partir de uma absorção percutânea do mesmo como mostrados a seguir na Tabela 2:

TABELA 2: Concentração de PCF em diferentes órgãos e tecidos.

	Tecidos	Níveis de PCF (mg/100g)
1	Rins	2,8
2	Coração e vasos	2,1
3	Tecido adiposo	3,4
4	Glândula adrenal	2,7

MICROMEDEX, (2006)

Depois de absorvido, o PCF é distribuído pelo organismo acumulando-se especialmente no fígado, rins, coração, cérebro, adrenais, proteínas plasmáticas e nos tecidos gordurosos. Os órgãos que concentram a maior quantidade de PCF são o fígado e os rins.

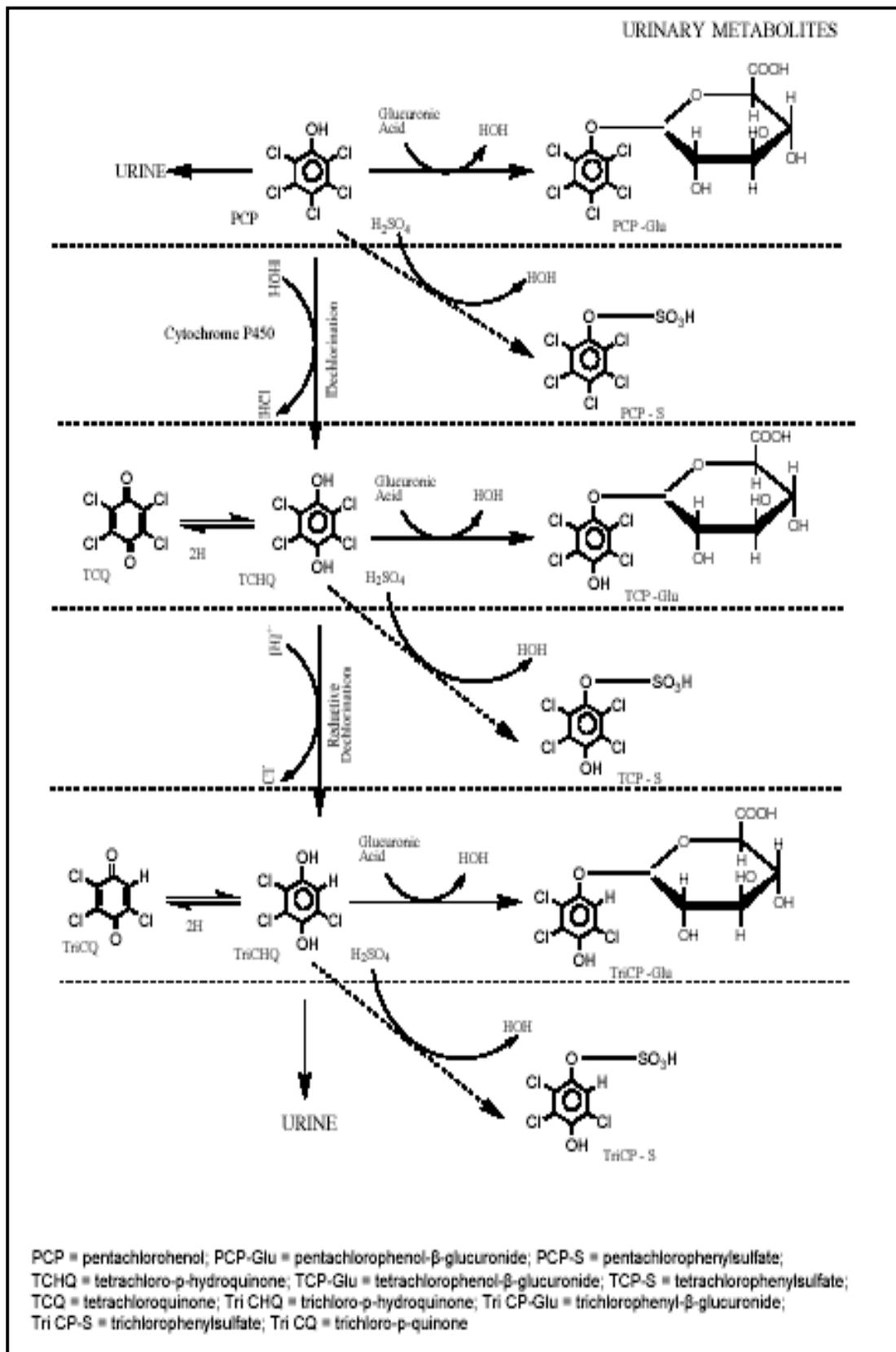
Segundo Proudfoot (2003) reportou através de um estudo realizado em tecidos *post-mortem* em 21 indivíduos e demonstrou que a concentração de PCF diminui na ordem de concentração no fígado, rins, cérebro, baço e tecido adiposo.

Metabolismo: Resultados a partir de estudos em humanos e animais indicaram que o PCF não é completamente metabolizado, como ficou evidenciado a partir de uma grande porção da dose administrada sendo excretada na urina sem sofrer alteração em todas espécies estudadas. O PCF é excretado principalmente pela urina sem alteração, porém é metabolizado em pequena extensão no fígado através da oxidação por decloração para formar tetraclorohidro-*p*-quinona. (TCHQ) e via conjugação com ácido glicurônico para formar o β -glicuronídeo do PCF (PCF-Glu) [ATSDR, 2001]. A seguir apresenta-se na Figura 2 a rota metabólica do PCF.

Excreção: A primeira via de eliminação ocorre pelos rins, com cerca de 80% sendo excretado através da urina. O PCF em concentrações na urina inferiores a 36 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ não parece estar associada a efeitos adversos. Quando o PCF é administrado por via oral maior proporção da dose aparece na urina sem alteração ou na forma de glicuronídeo, uma pequena proporção de PCF aparece nas fezes, quando administrado por via oral [JEF REYNOLDS, 2000].

A administração oral de pequenas doses de PCF (0,02-0,31mg de PCF/kg) com pureza de 90% a voluntários resultaram na excreção de 78% da dose administrada sem alteração e de 12 % conjugada ao ácido glicurônico na urina e nas fezes e não sendo detectado o THCQ [ATSDR, 2001].

O PCF é rapidamente eliminado a partir do sangue e tecidos sendo excretado principalmente na forma inalterada (cerca de 74%) ou na conjugada como glicuronato (cerca de 12%) através da urina. Também é excretado como TCHQ. O PCF possui meia vida plasmática de 15 h em ratos, 78 h em macacos, e de 30 a 50 h em humanos [KAMRIN,1997].



[ATSDR, 2001]

Figura 2: Rota Metabólica do PCF

c) Efeitos Clínicos:

Exposição Crônica: O envenenamento por via oral pode produzir anorexia, perda de peso, fraqueza, dor de cabeça e ansiedade.

Exposição Aguda: O envenenamento é caracterizado por dermatites, fraqueza, dispnéia, oligúria, e em casos severos podendo evoluir para o coma. A hipertermia é o fator determinante da morte como resultado de uma exposição elevada em humanos. A morte pode ocorrer em poucas horas após a exposição.

- Intoxicação por via dérmica: Irritação e dermatites geralmente ocorrem com concentrações superiores a 10%. Concentrações menores que 0,1 % não são causadoras dos sintomas descritos acima, mas contatos prolongados a pele podem produzir dermatites acneiformes [CLAYTON & CLAYTON, 1994].

A exposição crônica ao PCF tem sido descrita em trabalhadores de uma planta de tratamento de madeira, onde exibiram um aumento estatisticamente significativo de erupções severas da pele, que acredita ser causado por contaminantes do PCF (dioxinas e furanos) [ATSDR, 2001]. O PCF é absorvido diretamente por via dérmica sendo a penetração dérmica a mais perigosa via de exposição [ACGIH, 2005].

- Intoxicação por via oral: Indigestão, desconforto gastrointestinal e náuseas podem ocorrer em alguns casos de intoxicação, tem sido relatada inflamação da mucosa em autópsias [CLAYTON & CLAYTON, 1994]. Outros efeitos clínicos como perda de apetite, a anorexia pode aparecer com a intoxicação e a exposição crônica pode resultar numa pancreatite segundo Clayton & Clayton (1994).

Um caso foi registrado na literatura que descreve suicídio a partir da ingestão do PCF, mas a quantidade ingerida não foi especificada. A mais baixa dose letal em seres humanos para PCF (pureza não especificada) foi estimada em 1,0 grama (aproximadamente 1,70 mg/kg de peso corpóreo) [DRIESBACH, 1980].

O PCF após a ingestão pode causar a morte em animais experimentais que é consequência da hipertermia, parece não haver muita diferença na causa da morte nas diferentes espécies. Os valores DL_{50} foram de 80-120 mg/kg em ratos e de 117-177 mg/kg em camundongos, podendo esses valores sofrer algumas variações conforme a idade dos animais.

- Intoxicação por via inalatória: Bronquites e taquipnéia são os sintomas mais comuns pela intoxicação em humanos e animais. As crises de bronquites podem ocorrer quando a concentração na poeira ou no *spray* excede 1 mg/m^3 . Isto pode causar dor a trabalhadores que nunca foram expostos. Uma concentração de $2,4 \text{ mg/m}^3$ pode ser tolerável para aqueles anteriormente expostos. Em concentrações abaixo de $1,0 \text{ mg/m}^3$ existe apenas um pequeno efeito [CLAYTON & CLAYTON, 1994]. A taquipnéia é o sintoma de intoxicação em homens e animais e é o resultado do aumento da taxa metabólica. Nos casos de intoxicação grave, a taquipnéia pode ser seguida pela diminuição da respiração e hipotensão. Dispnéia tem sido reportado em trabalhadores de madeira que aplicaram PCF durante vários meses [HSDB, 2000].

A intoxicação aguda nos pulmões tem sido relatada em humanos a partir de uma exposição em períodos superiores a três semanas. Autópsias revelaram congestão e edema pulmonares e propagação intraalveolar hemorrágica dos pulmões [ATSDR, 2001].

e) Efeitos Hematológicos:

Incidentes com distúrbios predominantemente fatais foram encontrados em alguns casos após a exposição dérmica (nível e duração não especificados) ao PCF de grau técnico e ao PCF de pureza não definida. Trinta casos foram relatados de aplasia dos glóbulos vermelhos, ou pancitopenia severa com anomalia medular foram relatados em indivíduos usando produtos para preservação de madeira contendo PCF, oito dos quais resultaram em morte [ROBERTS, 1990]. Aplasia também foi diagnosticada em um indivíduo usando PCF na reforma de sua casa velha [RUGMAN & COSSTICK, 1990]. Um caso de hemólise intravascular foi atribuído ao uso de inseticida contendo PCF [HASSAN et al., 1985].

f) Efeitos Hepato patológicos:

Todos os dados existentes em relação a hepatotoxicidade do PCF em humanos estão relacionados à exposição dérmica. Vários estudos foram revisados referentes aos efeitos hepáticos, nos quais relacionam a exposição dérmica ao PCF, foram descritos em indivíduos expostos ocupacionalmente (trabalhadores) ou em atividades domésticas, usando soluções que contenham PCF, que o utilizam sem empregar as medidas apropriadas de precaução. Segundo Franco et al. (1986) a elevada presença de ácidos biliares no soro é um sensível indicador de disfunção hepática, além de elevados níveis plasmáticos de alanina aminotransferase e a aspartato aminotransferase encontrados em indivíduos expostos cronicamente ao PCF. As evidências de dano ao fígado foram observadas em um estudo epidemiológico em humanos adultos expostos ocupacionalmente ao PCF em uma planta de tratamento de madeira, a fazendeiros (pulverizadores de pesticidas [ATSDR, 2001].

g) Efeitos Nefro patológicos:

Todos os casos descritos referem-se a exposição ocupacional ou envenenamento acidental com a predominante via de exposição sendo a dérmica, mas a possibilidade de inalação não pode ser excluída. Os efeitos clínicos observados em uma criança de três anos de idade exposta ao PCF pela água de abastecimento contaminada por pesticidas doméstico foram a quebra do equilíbrio ácido-base e do equilíbrio metabólico evidenciado por uma acidose, aminoacidúria, cetonúria que sugerem a ocorrência de disfunção renal. Em outro caso clínico, nove crianças foram observadas acidose metabólica, proteinúria, aumento de uréia nitrogenada no sangue, após exposição ao PCF de composição não definida, produto comercial que não o de grau técnico, que era usado na lavanderia de um hospital como agente antimfofo [ATSDR, 2001].

h) Efeitos Dermatológicos:

Efeitos tóxicos sobre a pele de animais de laboratório causados pelo PCF têm sido descritos. Uma simples aplicação de PCF de pureza não especificada (1,111 mg/kg em 95% de álcool etílico ou em 150 mg/kg óleo de parafina) resultou em rudes mudanças tais como edema e inflamação permitindo o enrugamento, rachaduras, descamação e perda de pêlo. Foram observadas mudanças microscópicas nos quais incluem-se a atrofia, necrose e desaparecimento da camada superficial da pele e hiperqueratinização e hipertrofia dos folículos pilosos [ATSDR, 2001].

i) Efeitos Imunológicos:

Alterações nas funções imunes foram descritas em pacientes que foram expostos ao PCF por mais de seis meses (pesticidas contendo PCF), composição não definida [DANIEL, et al., 1995]. Outros efeitos clínicos puderam ser observados tais como imunossupressão funcional, ativadas pelas células-T, e desregulação das células B. O efeitos da exposição crônica ao PCF incluem a redução das células ligadas a imunidade.

Estudos *in vitro* tem mostrado o PCF como sendo uma substância imunotóxica a humanos e as células imunocompetentes [CLAYTON & CLAYTON, 1994].

j) Efeitos Neurológicos:

Numerosos sinais de toxicidade no sistema nervoso central têm sido descritos em casos clínicos individuais da exposição do PCF via contato dérmico e exposição por inalação. Os efeitos observados incluem delírios intermitentes e convulsões e irritabilidade [ATSDR, 2001]. Além de outros sintomas tais como, discenia; movimentos hipercinéticos, tremor, convulsões, reflexos das extremidades têm sido descritos por ingestões agudas, dores de cabeça em trabalhadores expostos durante a aplicação de solução à base de PCF em casas de madeiras [MICROMEDEX, 2007]. Foi constatado edema cerebral causada por intoxicação fatal, durante autópsia, isto pode ter sido resultado da hipertemia induzida pelo PCF [CLAYTON & CLAYTON, 1994].

j) Efeitos Reprodutivos:

Teratogênese: Crianças filhas de pais expostos ao PCF mostraram aumento das taxas de anomalias congênitas dos olhos, especialmente de catarata congênita. Aumento da anencefalia, assim como de anomalias da genitália [DIMICHARD et al., 1996]. Estudos em animais mostram que o PCF é embriotóxico e fetotóxico em ratos segundo Proctor et al., (1988). O PCF foi teratogênico em ratos, mas somente em altas doses que foram claramente tóxicas as mães, doses orais superiores a 50 mg/Kg [MICROMEDEX, 2007].

k) Carcinogenicidade:

Numerosos estudos vêm sendo realizados com o PCF em animais de laboratório assim como estudos epidemiológicos e em alguns casos, a exposição ao PCF parece estar associada a alguns tipos de sarcomas e linfomas de não Hodgkin [ATSDR, 2001]. O PCF é considerado como potencial carcinógeno humano por causa da sua similaridade estrutural com outros agentes carcinógenos [MICROMEDEX, 2007]. Ele é classificado pela EPA/ EUA como provável carcinógeno humano.

O PCF de grau técnico na concentração de 200 mg/kg de ração foi carcinogênico em camundongos B6C3F1 em machos e fêmeas conforme apresentado no Anexo I. Os principais sítios de tumores foram às glândulas supra-renais e o fígado. Os autores complementaram afirmando que a possível carcinogenicidade pode ter sido causada pelas impurezas do PCF [HATHAWAY et al., 1991].

Um amplo estudo com ratos foi realizado e seus resultados foram publicados por Mc Connell, (1989). Neste estudo, ratos da cepa B6F3F1 foram alimentados com dieta adicionadas com diferentes amostras de PCF (PCF de grau técnico e o Dowicide EC-7[®], formulação comercial do PCF). Os resultados demonstraram um efeito carcinogênico evidenciado pelo aumento da incidência de adenomas e carcinomas hepatocelulares, assim como de feocromocitomas adrenais e angiossarcomas de baço e fígado.

A incidência maior destes tipos de tumores foi observado nos machos, como uma incidência de 16% a cerca de 60% e de 2% a cerca de 20% em fêmeas. As concentrações de PCF adicionados a ração foram de 100 e 200 µg/mg do PCF e grau técnico e de 100, 200 e 600 µg/mg de EC-7[®]. Resultando em exposições médias de 18, 35 e 116 mg/kg p.c. Os autores sugeriram que o conteúdo de hexaclorodibenzodioxina, importante carcinógeno hepático, não foi responsável pelo aumento da incidência dos tumores no fígado mas sim o próprio PCF [McCONNELL, 1989 *apud* SEILER, 1991].

Esses dados foram aceitos pelo IARC (International Agency Research for Cancer) como critério como “evidência suficiente” da carcinogenicidade do PCF [IARC, 1990 *apud* SEILER, 1991].

l) Efeitos Genotóxicos:

Vários estudos *in vivo* e *in vitro* foram realizados para se investigar o potencial de genotoxicidade do PCF. Um aumento na formação de aductos de DNA foi observado no fígado de camundongos oralmente expostos ao PCF [UMEMURA, 1996], mas não nos rins e no baço [SAI-KATO et al., 1995].

Em outros ensaios *in vivo*, pouca evidência de genotoxicidade foi observada como os resultados apresentados em nossa revisão, nos Anexos I a IV apresentadas a seguir, com exceção dos ensaios conduzidos com as linhagens de camundongos B6C3F1 que apresentaram alguns resultados positivos.

m) Genotoxicidade dos Metabólitos do PCF:

Poucos estudos foram realizados sobre o potencial de genotoxicidade dos metabólitos do PCF. O Tetracloro-*p*-hidroquinona (TCHQ) induziu uma resposta mutagênica significativa em células de pulmão de hamster chinês (células V79) na ausência de ativação metabólica [JANSSON & JANSSON, 1991].

Num estudo realizado por Wang et al., (2001), o PCF e o THCQ, metabólito formado a partir da descloração oxidativa do PCF, foram avaliados quanto à hepatotoxicidade em ratos Sprague-Dawley e quanto aos mecanismos de morte celular em células de hepatoma humano (Hep G2).

Determinações do 8-epi-PGF2 α na urina e das enzimas alanina transferase e aspartato transferase foram empregadas como marcadores das peroxidação lipídica e do dano hepático. Os efeitos hepatotóxicos mais intensos foram observados em ratos tratados com THCQ do que com PCF. Nos experimentos *in vitro*, o PCF desacopla a fosforilação oxidativa, inativa enzimas da cadeia respiratória e causa dano às mitocôndrias. Espécies reativas de oxigênio podem estar envolvidas no mecanismo de intoxicação pelo THCQ, pois os níveis urinários de 8-epi-PGF2 α , e das atividades das duas enzimas induzidas pelo THCQ foram atenuadas pelo tratamento com vitamina E. Células apoptóticas foram observadas após o tratamento com o TCHQ e não com o PCF.

2.1.6 Classificação toxicológica quanto Carcinogenicidade:

Carcinogenicidade do PCF:

Esta classificação é feita segundo as principais agências internacionais que avaliam os dados toxicológicos:

IARC (International Agency Research for Cancer):

- Carcinogenicidade em humanos: Incidências anormais de câncer de pele, boca, lábios e faringe e de leucemia foram encontrados em trabalhadores de uma serralheria na Finlândia, porém o PCF representa somente a menor proporção dos Clorofenóis aos quais os trabalhadores foram expostos.
- Carcinogenicidade em animais de laboratório: O PCF foi testado em diferentes concentrações para se estudar a carcinogenicidade a partir da administração por via oral em dois experimentos independentes em camundongos. O aumento da incidência de adenomas hepatocelular foi verificado em fêmeas expostas a uma das concentrações da formulação de grau de técnico, Anexo I na dose de (200 ppm), na outra concentração com a maior dose (600 ppm) verificou-se o aumento da incidência de feocromocitoma da glândula supra-renal em machos. Um aumento foi observado em fêmeas expostas à formulação de grau técnico na dose alta de 600 ppm.

- Avaliação: Existem inadequadas evidências em humanos para a carcinogenicidade do PCF, mas em animais de laboratório existem evidências suficientes para carcinogenicidade do PCF.

- Classificação: O PCF é classificado pelo IARC como possível carcinógeno a humanos (Grupo 2B) conforme apresentado na Tabela 3, tabela de atividade promotora de tumor.

[<http://www-cie.iarc.fr/htdocs/monographs/vol53/10-pentachlorophenol.htm>].

ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry):

- Avaliação: Alguns estudos demonstraram um aumento no risco de câncer em trabalhadores expostos a altos níveis de PCF por um longo período. Aumentos da incidência de câncer no fígado, na glândula supra-renal e de tumores nasais, encontrados em animais de laboratório expostos a altas doses de PCF

[<http://www.astdr.cdc.gov/tfacts51.html>]

ACGIH (American Conference of Governmental Industrial Hygienists):

Recomendações ou diretrizes desenvolvidas pelo ACGIH para auxiliar no controle de riscos à saúde. Devem somente ser interpretadas e aplicadas por indivíduos treinados em higiene industrial. Define e estabelece parâmetros para valores de TLV (Threshold Limit Value)², que representa a concentração média de contaminante em mg/m³ de ar para 8 h de exposição por dia de trabalho e para 40 h por semana ao qual o trabalhador pode ser repetidamente exposto sem efeitos adversos.

- Classificação: Categoria de Carcinogenicidade Grupo A3.

Definições: Confirmada carcinogenicidade em animais de laboratório com desconhecida relevância a humanos. O agente é carcinogênico em animais de laboratório a doses relativamente altas pela via de administração, por mecanismos que podem não ser relevantes em relação à exposição de trabalhadores.

As evidências não sugerem que o agente seja um causador de câncer, exceto no caso de níveis de exposição e contaminação [ACGIH, 2003].

² TLV: Concentração da substância que a maioria dos trabalhadores pode ser expostos sem sofrer efeitos nocivos à saúde (ACGIH).

EPA (Environmental Protection Agency):

- Classificação: Categoria de carcinogenicidade Grupo B2, conforme apresentado na Tabela 3.

Definições: Provável carcinógeno humano, baseado em estudos que evidenciam a carcinogenicidade em animais de laboratório.

MAK (DFG- Deutsche Forschungsgemeinschaft, Commission for the Investigation of Health Hazards of Chemical Compounds in the Work Area – Federal Republic of Germany):

- Classificação: O PCF se enquadra na *categoria 2*.

Definição: Substâncias que são consideradas como sendo carcinogênicas ao homem pelo fato de apresentarem dados suficientes em estudos a prazo em animais ou por apresentarem limitadas evidências em animais confirmadas pelas evidências obtidas a partir de estudos epidemiológicos indicando que podem ter significativa contribuição ao risco de câncer. Dados limitados a partir de estudos em animais e confirmados por evidências de que a substância causa câncer por modo mecanismo de ação que é relevante ao homem e pelos resultados de testes *in vitro* e de testes a curto prazo em animais [DFG,2002].

NIOSH (National Institute for Occupational Safety and Health):

- Classificação: O PCF aparece como substância **não listada**, para esta instituição.

NTP (National Toxicology Program): Programa ligado ao Departamento de Saúde e de Serviços Humanos dos EUA:

- Classificação: O PCF aparece como substância **não listada**, para esta agência.

Classificação do IARC:

A seguir a Tabela 3, mostra a classificação de substâncias quanto a carcinogenicidade em humanos adotado pelo IARC.

TABELA 3: Classificação do IARC quanto a avaliação de carcinogenicidade para seres humanos.

GRUPO	EVIDÊNCIA	EXEMPLOS
1. Agente é carcinogênico.	Suficiente (humanos)	Arsênio, aflatoxina, benzeno, estrógenos, cloreto de vinila
2A. Agente é provavelmente carcinogênico.	Limitada (humanos) Suficiente (animal)	Benzoantraceno, bifenilapolicloradas (PCB), óxido de estireno
2B. Agente é possivelmente carcinogênico.	Limitada (humanos) Inadequada (humanos) Suficiente (animal)	TCDD, estireno e PCF
3. Agente não é classificável quanto a carcinogenicidade	-	DEHP, DEHA, diazepam
4. Agente é provavelmente não carcinogênico.	Inadequada (humanos) Inadequada (animais)	Caprolactama

Fonte: Klaasen: Chemicals Carcinogenesis (1996)

Terminologia usada pelo IARC:

- **Suficiente** evidência de carcinogenicidade indica que há uma relação causal entre o agente e o câncer humano.
- **Limitada** evidência de carcinogenicidade indica que uma interpretação causal é confiável, mas explicações alternativas, tais como acaso, tendências e variáveis que pudessem confundir não podem ser completamente excluídas.
- **Inadequada** evidência de carcinogenicidade indica que uma das três seguintes condições prevaleceram:
 - (1). Existência de poucos dados pertinentes.
 - (2). Os estudos disponíveis não excluem o acaso, tendência e variáveis que confundem.
 - (3). Estudos não mostrando evidência de carcinogenicidade.

2.2 Cobre-8-Quinolinolato (C8Q):

2.2.1 Identidade:

Substância com massa molar igual a 351,9 e fórmula estrutural de $C_{18}H_{12}CuN_2O_2$, é um sólido cristalino com coloração verde oliva, ponto de fusão de 270 °C, densidade igual a 1,63, solubilidade em água 0,07mg/L (pH=7, 25°C), praticamente insolúvel, em metanol 116mg/L, *n*-hexano <0,01mg/L. Substância quimicamente estável em pH 2,7-12, quimicamente inerte e estável à luz U.V. Nomes comuns do C8Q: oxina de cobre, oxina cobre. A seguir, apresenta-se na Figura 2 a estrutura do cobre-8-quinolinolato (C8Q), CAS nº 10380-28-6. [THE PESTICIDE MANUAL, 1994].

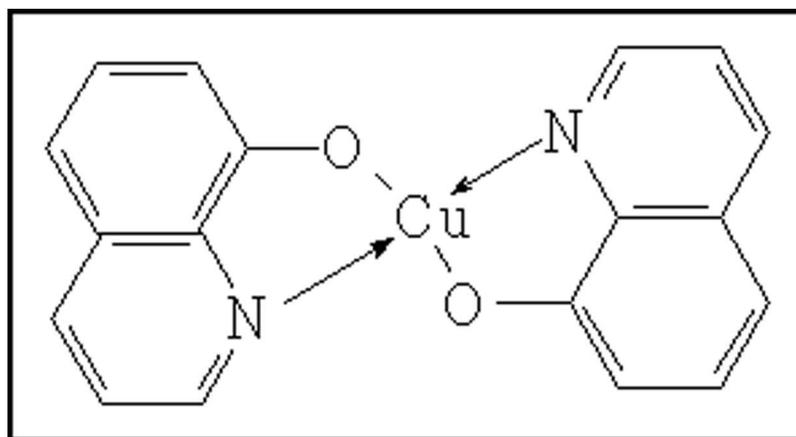


Figura 3: Estrutura molecular do cobre-8-quinolinolato (C8Q).

2.2.2 Aplicações:

A principal propriedade do C8Q é como fungicida, sendo usado no tratamento e controle de sementes para evitar a formação de manchas e de bolores em trigo. Usado como fungicida em sementes de girassol, feijão e ervilha para armazenamento em celeiros. Também usado como cicatrizante de ferimentos causados pela poda em árvores, a substância não apresenta fitotoxicidade quando usada diretamente, mas não deve ser utilizado em plantas sensíveis ao cobre. O C8Q pode ser utilizado em associação com outros fungicidas e inseticidas sem qualquer incompatibilidade [THE PESTICIDE MANUAL, 1994].

Uma outra classificação que aparece para o C8Q, é como **biocida** que segundo Abrantes et. al., (1998) são substâncias usadas no tratamento e na produção do papel para controlar o crescimento de fungos e bactérias nos produtos finais. Exceto para papéis muito especiais, papéis que entraram em contato com alimentos aonde os biocidas não são intencionais, pois podem ser carreados através do processo de produção do papel e, portanto tem potencial de migração para o alimento.

A atividade antifúngica do C8Q foi bem estabelecida usando-se métodos padronizados para se comparar à eficácia e discriminar as atividades dos padrões de Oxina (fungicida sem a presença do Cobre) e do Oxinato de Cobre, elucidar mecanismos de ação e estabelecer atributos de relevância aos diversos campos de ação. Ambos agentes mostraram ser ativos contra uma faixa ampla de diversos fungos das espécies de *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Rhizopus*, *Candida*, *Saccharomyces*. O oxinato de cobre é geralmente o fungicida mais ativo e de maior espectro e de ação mais rápida que a Oxina [NICOLETTI, et al., 1999].

2.2.3 Legislação sobre o C8Q:

O C8Q é relacionado pela ANVISA como substância com ação tóxica sobre animais e plantas, porém encontra-se registrado no Brasil e sendo autorizado seu uso em atividades agropecuárias.

A ANVISA determinou na publicação “Monografias dos ingredientes ativos de agrotóxicos, domissanitários e preservantes de madeira” a autorização do emprego do C8Q como preservante de madeira nas condições descritas na sua monografia [BRASIL, 2003].

A referida substância, C8Q, é descrita com o código C55-5 (Oxina-cobre), e descrita no Anexo II, disponibilizado no seguinte endereço [<http://www.anvisa.gov.br/toxicologia/index.htm>].

A monografia que trata do C8Q o classifica como:

a) **Classe:** Fungicida;

b) **Classe Toxicológica:** Classe IV;

c) **Uso como preservante de madeira:** Uso exclusivo para tratamento de madeiras destinadas para dormentes, postes, cruzetas, mourões para cercas rurais, esteios e vigas. Registro no Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis-IBAMA.

d) **Uso Agrícola:** autorizado conforme indicado, modalidade de emprego, aplicação foliar em diversas culturas seja para produtos de uso alimentar ou não, tais como: abacate, ameixa, agrião, batata, couve, coco, crisântemo, ervilha, fumo, goiaba, mamão, morango, pimentão, rosa, salsa, tomate e uva.

e) **Contaminantes:** Os níveis máximos de cobre devem obedecer a legislação específica para contaminantes em alimentos *in natura*, quando aplicável.

Intervalo de segurança: Sem restrições.

A Agência de Administração de Drogas e Alimentos dos EUA (FDA/USA) aprova o uso do C8Q como aditivo indireto de alimentos, como preservante de madeira podendo ser usado para o tratamento de embalagens de papel e papelão em contato com alimentos secos (21 CFR 176.170) ou em contato com alimentos aquosos e gordurosos [21 CFR 176.180].

O C8Q usado como preservante de madeira pode ser seguramente usado em artigos de madeira ou em embalagens, para transporte e acondicionamento de produtos agrícolas com objetivo de abastecimento [21 CFR 178.3800]

A Agência de Proteção Ambiental dos EUA (EPA/USA), admite que o C8Q seja isento de limite de uma tolerância quando usado como um ingrediente inerte (preservante) em produtos tratados tais como papéis e embalagens para produtos agrícolas. Quando o termo “inerte” não for colocado como referência de não toxicidade, o ingrediente pode ou não ser quimicamente ativo.

A Agência (EPA/USA) decidiu que não há dados para denominar o C8Q como substância tóxica pelas seguintes razões:

(1). O C8Q é registrado no Ato Federal sobre Rodenticida, Fungicida, Inseticida dos EUA (FIFRA/USA) como fungicida/preservante de madeira para (a) tratamento de madeiras incluindo a superfície que entra em contato com os alimentos (frutas e vegetais), com alimentos e rações para animais para proteger a madeira contra o mofo, bolor, apodrecimento e diminuir os fungos e o aparecimento de manchas causadas por fungos; (b) uso na agricultura como fungicida na proteção de diversas culturas agrícolas; (c) proteção contra o mofo e apodrecimento causados por fungos nas fábricas de papel e papelão.

(2). Os dados disponíveis na literatura indicam que o C8Q apresenta moderada toxicidade aguda em ratos quando administrado por injeção intraperitoneal apresentando resultados negativos em estudos de carcinogenicidade, e de fraca mutagenicidade em bactérias pelo teste de *Ames*.

De acordo com os dados apresentados e pelo fato do C8Q já possuir registro no FDA, como aditivo indireto de alimentos e como ingrediente ativo, e por ser também registrado no FIFRA/USA (Federal Insecticide, Fungicide and Rodenticide Act) como preservante de madeira, papelão e papel com intuito de armazenar e acondicionar frutas e vegetais. A EPA concluiu que o C8Q quando usado com critérios e obedecendo as boas práticas de agricultura, a substância pode ser usada não sendo necessário o estabelecimento do limite de tolerância para proteger a saúde pública. Entretanto a Agência (EPA/USA) propõe que seja estabelecido o limite de tolerância do C8Q [<http://www.epa.gov/fedrgstr/EPA-PEST/1996/June/Day-26/pr-774.html>]

2.2.4 Efeitos Toxicológicos:

(1). **Toxicidade aguda:** A toxicidade aguda oral (DL_{50}) para ratos é de 4700 mg/kg, enquanto para camundongos é de 9000 mg/kg [THE PESTICIDE MANUAL, 1994].

Baseado nestas informações podemos classificar o C8Q como sendo uma substância moderadamente tóxica e levemente tóxica, segundo a classificação estabelecida por Klaaseen, (2006) para camundongos, apresentado na Tabela 1.

(2). **Toxicidade Percutânea:** A toxicidade aguda percutânea foi determinada utilizando-se como órgãos alvos, a pele e os olhos de coelhos. A DL_{50} não foi detectada e o C8Q não demonstrou ser irritante à pele sendo levemente irritante aos olhos em testes feitos em coelhos [THE PESTICIDE MANUAL, 1994].

(3). **Efeitos Teratogênicos:** Não foram observados efeitos teratogênicos do C8Q [THE PESTICIDE MANUAL, 1994].

(4). **Efeitos Carcinogênicos e Genotóxicos:** Recentemente têm-se atribuído propriedades carcinogênicas a um composto muito próximo ao C8Q, ou seja, o **8-hidroxiquinolona**. Daí surgiu a necessidade de reavaliação da mutagenicidade/carcinogenicidade do C8Q. Foram feitos ensaios para se verificar a hepatocarcinogenicidade dessa substância em ratos. Observou-se que não houve alteração na morfologia das células hepáticas e no número de células proliferativas, mas houve uma redução no peso dos fígados. Os resultados sugerem que o C8Q não promoveu a hepatocarcinogenicidade em ratos, entretanto a atividade de γ -glutamyltranspeptidase foi aumentada em ratos tratados com o C8Q, implicando na toxicidade crônica hepática da substância em animais que foram tratados com C8Q. A toxicidade do C8Q em mamíferos deveria ser melhor avaliada. Outros mecanismos deveriam ser estudados para diminuir os riscos do C8Q ser um indutor de mutagenicidade e/ou de carcinogenicidade [You, et. al., 1999].

You et al., (2001) demonstraram que o C8Q, foi genotóxico em bactéria *Salmonella typhimurium* (cepa TA 100) e células de mamíferos V79 (células de pulmão de hamster Chinês) HL60 (células de leucemia promielocítica humanas) através de mecanismo conhecido como geração de espécies reativas de oxigênio. O efeito genotóxico do C8Q no ensaio de mutação gênica em bactérias (teste de Ames) ou no ensaio para verificação de dano no DNA (ensaio Cometa) em cultura de células foi bloqueado pela adição de vários antioxidantes. Os antioxidantes pirrolidinaditiocarbamato, *N*-acetilcisteína, Vitaminas C e E testados no estudo com o objetivo de se analisar a atenuação do efeito mutagênico induzido pelo C8Q. Os efeitos genotóxicos foram verificados através do teste Cometa e do teste de Ames. A partir do estudo concluiu-se que o C8Q induziu mutação gênica e dano global ao DNA.

(5). **Ecotoxicidade:** Ensaio realizado com trutas marrons como biosensores, mostrou que o valor de Concentração Letal média (CL₅₀) obtido após tratamento durante 48h foi de 0,2-0,3mg/L de C8Q. O C8Q não mostrou toxicidade a abelhas [THE PESTICIDE MANUAL, 1994].

2.2.5 Eliminação em Animais e Plantas:

(1). **Animais:** Em ratos, administrados por via oral, cerca de 58 a 62% do C8Q é excretado na urina e cerca de 25% é eliminado nas fezes depois de 72h. O principal metabólito presente é o 8-hidroxiquinolona além de pequenas quantidades de outros metabólitos do C8Q conjugados a glicuronídeos e a sulfatos, resultante do metabolismo hepático [THE PESTICIDE MANUAL, 1994].

(2). **Plantas:** O C8Q não penetra e não é removido depois de uma semana em folhas de alface após aplicação foliar e cerca de quatro semanas em maçãs. Os metabólitos não foram observados na superfície foliar após lavagem [THE PESTICIDE MANUAL, 1994].

2.2.6 Carcinogenicidade, Mutagenicidade e Genotoxicidade:

O IARC (International Agency for Research for Cancer) não classifica o C8Q como agente carcinógeno humano sendo enquadrado no **grupo 3** (não classificável quanto carcinogenicidade a humanos), conforme apresentado na Tabela 8.

Dados em animais: O IARC apresenta dados de testes realizados em animais em duas linhagens de camundongos através da administração oral e subcutânea. Embora um significativo aumento da incidência de reticulossarcoma celular tenha sido observado somente nos machos de uma linhagem nas quais foram administrados via subcutânea, nenhuma avaliação quanto a carcinogenicidade do C8Q pode ser feita baseado nestes dados.

Dados em Humanos: Não há relatos de casos ou estudos epidemiológicos disponíveis no que tange a contaminação do C8Q em humanos [IARC, 1998]. Disponível em [<http://monographs.iarc.fr/ENG/monographs/vol15/volume15.pdf>]

O IARC disponibiliza estudos sobre um dos metabólitos do C8Q, o 8-hidroxiquinolona (CAS nº 148-24-3). Este composto foi testado em camundongos e ratos por via oral, subcutânea e intravaginal e adicionalmente em camundongos foi aplicado na pele e implantado na bexiga.

Dados em animais: Resultados positivos foram obtidos na implantação de “pellets” na bexiga quando o 8-hidroxiquinolona foi incorporado em “pellets” com colesterol, mas foram negativos quando os “pellets” empregados eram à base de cera de parafina. A aplicação intravaginal em diferentes veículos a camundongos e ratos não aumentou significativamente a incidência de tumores quando comparados com os controles.

Nenhuma avaliação quanto a carcinogenicidade relativas ao 8-hidroxiquinolona pode ser feita baseada nos dados disponíveis.

Dados sobre o cobre quelado ao 8-hidroxiquinolona foram discutidos, mas devido ao fato de suas propriedades químicas e usos serem diferentes daquele do 8-hidroxiquinolona, não foram considerados pelo grupo de trabalho como uma substância potencialmente carcinogênica [IARC, 1998] disponível em [<http://monographs.iarc.fr/ENG/momographs/vol13/volume13.pdf>].

A BIBRA (The British Biological Research Association) considera o C8Q como sendo um fraco agente mutagênico pelos resultados apresentados no teste de *Ames* em bactérias e os estudos sobre carcinogenicidade foram negativos em camundongos, mas com uma suspeita de evidência de atividade carcinogênica, o que necessita de mais estudos [BIBRA, 1987].

2.2.7 Mecanismo de Ação:

A atividade antimicrobiana do C8Q é devida à presença do íon cobre. Os resultados sugerem que a atividade biocida do C8Q é originada a partir da formação do quelato de cobre que possui a atividade antimicrobiana. Os autores propõem um mecanismo aonde o quelato seria o componente com atividade microbiocida capaz de penetrar nas células [Liu et al., 1994].

2.2.8 Classificação quanto a carcinogenicidade:

Carcinogenicidade do C8Q:

As principais agências que regulamentam e estudam os aspectos toxicológicos das substâncias usadas como aditivos e pesticidas não mencionam o C8Q. As informações disponibilizadas pelo IARC já foram apresentadas acima.

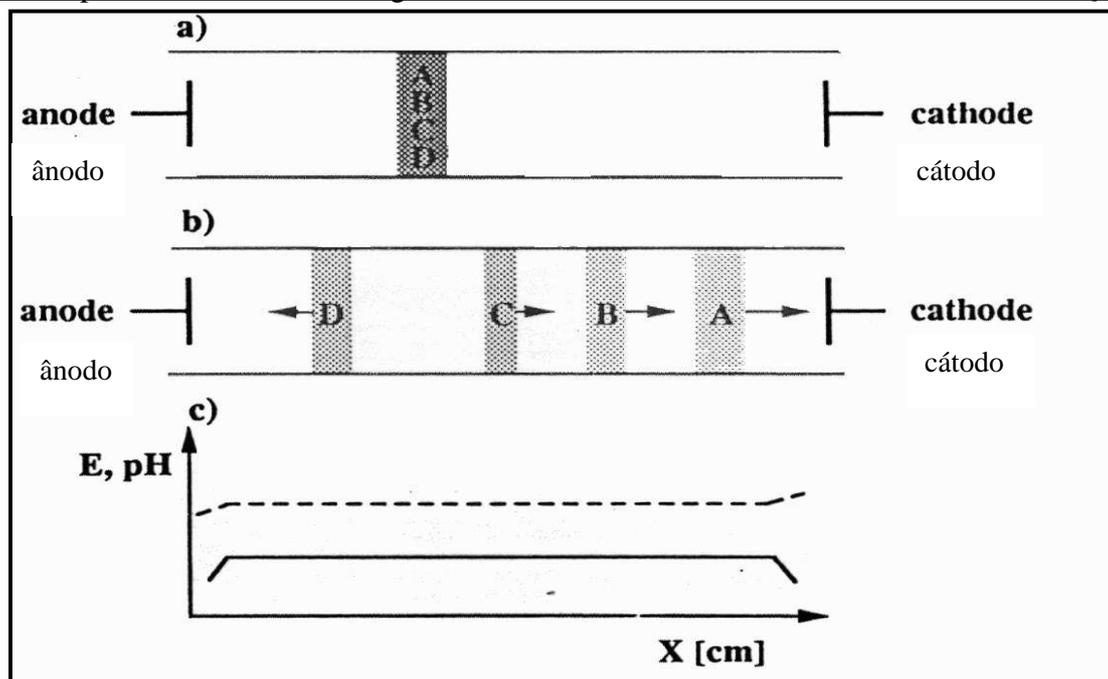
A EPA/USA ao tratar do C8Q menciona que não existem comprovadamente informações que tratam da carcinogenicidade do C8Q em seres humanos e existindo algumas evidências de carcinogenicidade em animais de laboratório.

2.3. Eletroforese Capilar:

2.3.1 Definição Geral:

O princípio da migração eletroforética é baseado na migração de moléculas carregadas em campo elétrico aplicado. As separações por eletroforese capilar são obtidas por migração diferencial dos solutos em um campo elétrico através de um tubo capilar cheio com solução aquosa tampão. Este movimento é governado pela mobilidade eletroforética dos íons, ela é definida como a velocidade média com que o íon move sob a influência de um campo elétrico. Os dois fatores principais que afetam a mobilidade são a força elétrica aplicada, que depende da carga do íon e da intensidade do campo elétrico, e a força friccional, que é a força exercida contra o movimento do íon na solução; uma alta intensidade de campo elétrico resulta em tempos analíticos pequenos, o que confere uma alta eficiência de separação [KUHR,1995].

Na eletroforese capilar a coluna e os reservatórios com os eletrodos devem estar cheios com a solução carreadora, que conduzirá a corrente elétrica e dará capacidade de tamponamento. A amostra, constituída de uma mistura de espécies iônicas ou ionizáveis, é introduzida neste tampão contínuo por uma das pontas do tubo, como zona inicial definida. Esta zona representará a descontinuidade do sistema [ABRANTES, 1998]. A seguir apresenta-se a Figura 4 que mostra o princípio da eletroforese.



ABRANTES, 1998

Figura 4: Princípio da zona eletroforética (a) estado inicial, (b) migração diferencial das zonas distintas, (c) o perfil da intensidade do campo (linha contínua) e pH (linha pontilhada) através da câmara de separação.

Com a influência do campo elétrico, as espécies iônicas do tampão carreador e da amostra migram para os eletrodos correspondentes: cátions em direção ao cátodo (ABC) e ânions (D) em direção ao ânodo, respectivamente. A alta concentração do tampão carreador determina as propriedades físicas tais como condutância e pH através do capilar. A influência da amostra é desprezada, portanto os componentes da amostra migram, com suas velocidades específicas e depois de algum tempo se separam em zonas distintas.

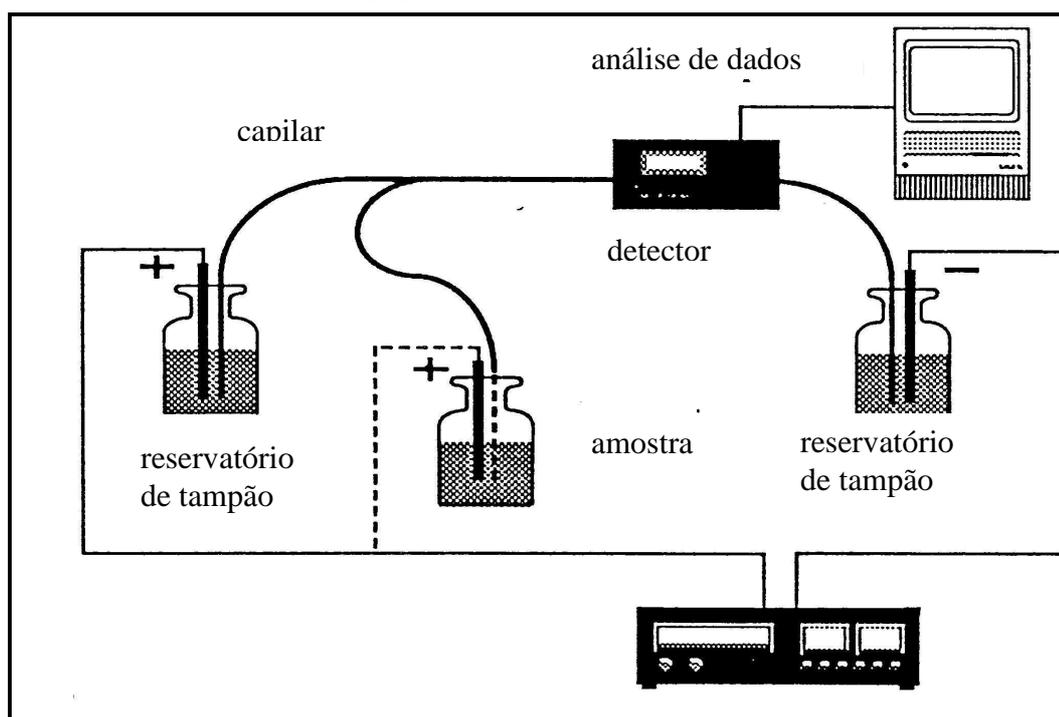
2.3.2 Aplicações da técnica:

A eletroforese capilar é uma técnica aplicável na determinação de uma grande variedade de substâncias, incluindo hidrocarbonetos aromáticos, vitaminas hidro e lipossolúveis, aminoácidos, íons inorgânicos, ácidos orgânicos, fármacos, catecolaminas, substâncias quirais, proteínas.

Uma característica que difere das outras técnicas de separação é sua capacidade de separar moléculas carregadas eletricamente de interesse tanto na indústria quanto em pesquisas [TAVARES, 1995].

2.3.3 Funcionamento da Eletroforese Capilar:

O equipamento de eletroforese capilar consiste de cinco unidades. Os reservatórios do ânodo e cátodo com os eletrodos correspondentes, a câmara de separação, o sistema de injeção e detector. Um tubo de capilar cheio com a solução tampão é colocado entre os dois reservatórios de tampão. O campo elétrico é aplicado por meio de dispositivo de fornecimento de alta tensão que pode gerar tensões de até 30 kV. A injeção da amostra é realizada pela troca do reservatório do tampão pelo reservatório da amostra. Um volume definido de amostra é introduzido no tubo por fluxo hidrodinâmico ou eletromigração. Um detector é colocado sobre a coluna e localizado no fim do capilar, oposto ao local da injeção. Se um tubo capilar de sílica é usado como sistema de separação, como é a maioria dos casos em eletroforese capilar, duas ações eletrocinéticas ocorrem sob o a influência do campo elétrico. A seguir apresenta-se uma Figura 5 que ilustra o funcionamento do equipamento de eletroforese capilar



ABRANTES, 1998

Figura 5: Figura ilustrativa sobre o funcionamento do equipamento de eletroforese capilar

A aplicação do campo elétrico provoca o movimento dos analitos em direção aos eletrodos. As separações em eletroforese capilar são baseadas na presença do fluxo eletricamente induzido, denominado fluxo eletrosmótico (FEO), um fenômeno eletroforético que gera o fluxo da solução dentro do capilar, que faz com que os solutos se movimentem em direção ao detector. Este fluxo pode reduzir significativamente o tempo de análise ou forçar o íon a reverter sua tendência de migração em direção ao eletrodo, pelo qual está sendo atraído, devido ao sinal de carga. [TAVARES, 1995]. Uma é a eletroforese propriamente dita, causada pela migração dos íons e a outra é a eletrosmose devido a carga imóvel das paredes do capilar decorrente da faixa de pH, de básico a fracamente ácido. [ABRANTES, 1998].

A separação é baseada somente na eletroforese, enquanto a eletrosmose causa um transporte líquido semelhante a uma bomba mecânica. O fluxo eletrosmótico em solução aquosa é na maioria das vezes direcionado para o cátodo, por causa disso a amostra é injetada no ânodo.

Os componentes da amostra migram com velocidade de migração diferentes, dependendo das suas densidades de carga, direção aos eletrodos correspondentes, mas eles podem ser empurrados em direção ao detector pelo fluxo eletrosmótico que normalmente tem velocidade superior a velocidade de migração dos íons [KUHR,1995].

2.3.4 Instrumentação:

a) **Capilares:** Os capilares podem ser de vidros, teflon (flexível, transparente no UV, porém não pode ser usado com alta voltagem), ou sílica fundida normalmente recoberta externamente com uma camada de proteção de poliamida, que produz uma melhora na resistência mecânica, uma vez que é extremamente frágil e se quebra com facilidade, uma pequena porção é removida a fim de se formar uma janela para a detecção, a janela é então alinhada ao centro óptico do detector. Os capilares são tipicamente de 25 a 100 cm de comprimento com 15 a 100 μm de diâmetro interno.

Nos instrumentos disponíveis comercialmente, os capilares são mantidos dentro de um dispositivo, denominado cassete, que facilita a inserção no instrumento e protege a janela delicada de detecção. A superfície interna do capilar pode ser quimicamente modificada por meio de ligações covalentes com diferentes substâncias. Estes recobrimentos são utilizados para uma grande variedade de propósitos, tais como reduzir a absorção da amostra ou mudar a carga iônica da parede do capilar [TAVARES, 1995].

Na eletroforese capilar diferentemente das técnicas cromatográficas (CG- cromatografia gasosa e CLAE- cromatografia líquida de alta eficiência), a amostra não é injetada e sim introduzida no capilar pelo lado mais distante do detector. Mesmo não sendo adequada a expressão “injeção” é constantemente utilizado. Os volumes típicos de injeção são de 10 a 100 nL. O modo de injeção mais empregado em eletroforese capilar é o denominado hidrodinâmico, onde o capilar é mergulhado em um frasco contendo a amostra o qual em seguida é pressurizado ou submetido ao vácuo ou erguido (efeito sifão) provocando a entrada de um certo volume de amostra no capilar [PRADO, 2003].

b) **Detectores:** O detector mais frequentemente utilizado em eletroforese capilar é o espectrofotométrico de absorção no UV/Vis devido à sua natureza quase universal, ou seja pode ser aplicado na detecção de várias classes de substâncias. A maioria dos instrumentos têm também detectores com conjunto de diodos disponíveis, o qual fornece um espectro de UV/Vis para cada substância detectada [CHEMKEYS, 2007].

A resposta do detector é registrada versus o tempo de migração, obtém-se assim um produto semelhante ao cromatograma da CLAE, no qual é chamado de eletroferograma. Os detectores para eletroforese capilar são do tipo diferencial e têm a característica de medir as diferenças entre as propriedades físicas das substâncias e as das soluções.

- ❖ Detectores seletivos medem uma propriedade específica da substância ou da classe de substância, como por exemplo:

_Absorvância no UV-VIS

_Fluorescência

_Fragmentação da substância por impacto de elétrons.

- ❖ Detectores não seletivos:

_Índice de refração

_Condutivímetro.

O acoplamento da eletroforese capilar com espectrometro de massas é usualmente empregado para dar informações estruturais dos analitos.

2.3.5 Vantagens & Desvantagens:

A eletroforese capilar oferece várias vantagens sobre a CLAE e outras técnicas cromatográficas devido ao pouco uso de solventes químicos, baixo custo das colunas em relação às colunas da CLAE, velocidade de análise e maior eficiência de separação. Entretanto existem algumas limitações da eletroforese capilar nas quais incluem sua baixa sensibilidade e limpeza freqüente das colunas. A faixa de aplicação da eletroforese capilar foi rapidamente expandida com o aproveitamento dos mesmos detectores utilizados em outros equipamentos, como a CLAE [PRADO, 2003].

2.3.6 Modos de separação:

Hoje em dia a eletroforese capilar é um nome genérico dado para uma série de técnicas de separação que envolve a aplicação de um campo elétrico em um capilar preenchido com uma solução tampão. As bases desta separação serão descritas a seguir.

1) **Eletroforese Capilar em Solução Livre (ECSL):** É o modo de eletroforese mais utilizada e usado para separação de solutos aniônicos e catiônicos. Na ECSL os anions e cátions migram em diferentes direções, mas eles são todos arrastados através do cátodo devido ao FEO, que possui um efeito maior do que a própria velocidade de migração do soluto (mobilidade). Numa análise preliminar os cátions eluem primeiro por causa da direção de migração que é a mesma do FEO, as soluções neutras não possuem mobilidades próprias, pelo fato de não possuírem cargas, elas seguem somente o FEO e eluem em seguida. Os anions eles migram por último pois eles migram no sentido oposto ao FEO [TAVARES, 1997].

2) **Eletroforese Capilar em Gel (ECG):** O seu uso está baseado na separação de macromoléculas biológicas tais como oligonucleotídeos, fragmentos de DNA e proteínas. A separação é realizada pelo preenchimento do capilar com peneiras como matriz, poliacrilamida, agarose, ou mesmo soluções de polímeros lineares. Onde o principal mecanismo de separação está baseado nas diferenças de tamanhos dos solutos que migram através dos poros dos polímeros. Íons menores migram mais rapidamente enquanto que os solutos maiores ficam mais tempo retidos. Além disso, o gel previne a adsorção do soluto nas paredes do capilar e ajuda a eliminar a eletroosmose. Entretanto, o gel deve possuir certas características, tais como ser estável termicamente e ter uma faixa de tamanho dos poros apropriada, para poder ser um meio eletroforético adequado. Este meio está sujeito à limitação, pois as espécies neutras não migram através do gel, uma vez que o FEO é suprimido [TAVARES, 1997].

3) **Eletroforese Capilar com Focalização Isoelétrica (ECFI):** É usada para separar moléculas biológicas principalmente as proteínas, baseados nas diferenças dos pontos isoelétricos (PI). A ECFI é realizada pelo preenchimento do capilar de substâncias conhecidas como anfólitos, que são geralmente ácido poliméricos sintéticos (ex. poliaminoácidos, ácidos policarboxílicos ou ácidos polissulfônicos). A aplicação de um campo elétrico na mistura de anfólitos gera a formação de um gradiente de pH. Os anfólitos são mantidos em um meio onde se usa um cátodo com pH alto, geralmente hidróxido de sódio e um anodo com pH baixo, geralmente ácido fosfórico.

Os anfólitos e solutos migram até alcançar o ponto onde suas cargas serão neutras ($\text{pH}=\text{PI}$), pois quando eles atingem o seu PI (ponto de ionização) eles param de movimentar dentro do capilar e portanto não atingem a cela de detecção.

Este passo pode ser alterado de diferentes maneiras: Após a focalização, as zonas podem ser movidas no capilar em direção ao detector, por meio de pressão, que pode ser obtida por exemplo, elevando-se uma das extremidades. Alternativamente, após a focalização, a corrente do sistema é baixa, pois somente íons (OH^- e H^+) contribuem para a condutividade. Quando um sal, por exemplo cloreto de sódio, é adicionado no anólito (reservatório ácido) ou ao católito, os íons cloreto irão predominar e irão aumentar a condutividade. Pelo princípio da eletroneutralidade, íons sódio podem ser trocados por prótons no tubo, gerando um gradiente desbalanceado. Isso causa a migração dos íons em direção ao detector [TAVARES, 1997].

4) Eletrocromatografia Capilar Micelar (ECM): Inicialmente a ECM foi desenvolvida para a resolução de compostos neutros, os quais não podiam ser separados usando simplesmente a ECSL. Na ECM envolve eletrólitos contendo níveis relativamente altos de surfactantes, tais como dodecilssulfato de sódio (SDS). Acima de uma determinada concentração, denominada concentração micelar crítica (CMC) as moléculas de surfactante começam a agregar-se formando micelas, as micelas possuem uma estrutura tridimensional com metade hidrofóbicas do surfactante para o interior e a outra metade carregada para o exterior. A separação de moléculas neutras é baseada na interação hidrofóbica dos solutos com as micelas, resultando numa interação mais forte, os solutos maiores migram com as micelas. As micelas de SDS têm carga negativa e migram contra o FEO. Entretanto, o FEO é suficientemente forte para forçar as micelas a passarem pelo detector. Espécies carregadas positivamente são retardadas pela associação com as micelas carregadas negativamente, moléculas neutras têm uma partição entre as fases micelar e a fase aquosa do tampão e têm uma mobilidade intermediária, enquanto que as moléculas carregadas negativamente são repelidas pelas micelas. As separações são conduzidas em pH onde há um FEO apreciável, a seletividade da ECM pode ser controlada pela escolha do surfactante e também pela adição de modificadores ao tampão [TAVARES, 1997].

5) **Isotacoforese Capilar (IC)**: A principal diferença entre a IC e as outras técnicas em eletroforese capilar é que ela é realizada em um sistema de tampão descontínuo, são utilizados dois sistemas diferentes de tampão. A amostra é condensada entre os dois, um deles possui íons com uma maior mobilidade no sistema e é denominado dianteiro enquanto o outro com íons de mais baixa mobilidade no sistema é denominado terminador. Quando um campo elétrico é aplicado, os componentes da amostra começam a se separar em zonas de acordo com as suas mobilidades.

Quando um estado de equilíbrio é alcançado os componentes da amostra são separados em zonas, criando um estado fixo na qual a zona de solutos migra de maneira organizada e diminuindo sua mobilidade e todas migram com a mesma velocidade. Nesta técnica o eletroferograma obtido contém uma série de patamares (degraus) onde cada degrau representa uma zona de um analito. Ao contrário dos outros modos de eletroforese capilar onde a quantidade de amostra presente pode ser determinada pela área do pico, como também pela cromatografia, a quantificação pela IC está baseada principalmente na medida do comprimento da zona, que é proporcional à quantidade de substância presente [TAVARES, 1997].

6) **Eletrocromatografia Capilar (EC)**: A EC é fusão da CLAE e a eletroforese capilar. Na EC é utilizado colunas capilares empacotadas como fase estacionária similar a aquelas usadas em CLAE. Quando o campo elétrico é aplicado o FEO move a fase móvel através da coluna empacotada. A separação como na CLAE depende da partição entre as fases estacionárias e móveis. Isto permite uma eficiente separação dos compostos neutros com o tempo de análise muito curto [AGILENT TECHNOLOGIES, 2007].

2.4 Reação de Derivatização:

Dentre os vários métodos desenvolvidos para a análise do PCF em diferentes amostras, o método por cromatografia gasosa é o mais usado por causa da sua alta sensibilidade e boa resolução. A cromatografia líquida apresenta uma baixa resolução e é frequentemente afetada pela matriz das amostras. Embora para se determinar o PCF em baixas concentrações, necessita-se de uma etapa de preparação anterior as injeções na cromatografia gasosa [DOMENÕ, et al., 2005].

Esta etapa anterior às injeções é uma etapa de extração, já que a maioria dos métodos publicados para determinação de clorofenóis, incluindo o PCF, são focados para determinação dos clorofenóis em águas, em geral as análises dos clorofenóis em águas necessitam de uma etapa de extração líquido-líquido [EPA, 1995] extração em fase sólida [DOMENÕ, et al., 2005], entretanto a sonicação e o Soxhlet são principalmente utilizados para análise do PCF em madeira [BECKER, et al., 2002].

O PCF é o mais ácido da família dos fenóis tendo o pKa de 4,7. A fração da forma neutra do PCF depende do pH em solução. O hidrogênio da hidroxila ($\bullet\text{OH}$) é responsável pelas propriedades ácidas e é o responsável pela fixação sobre a superfície das madeiras através de ligação química a outros grupos funcionais como os encontrados nas ligninas, por exemplo. Os autores concluem que o PCF não está somente na superfície da madeira, mas também fixado na estrutura segundo BUHR et al., (2000).

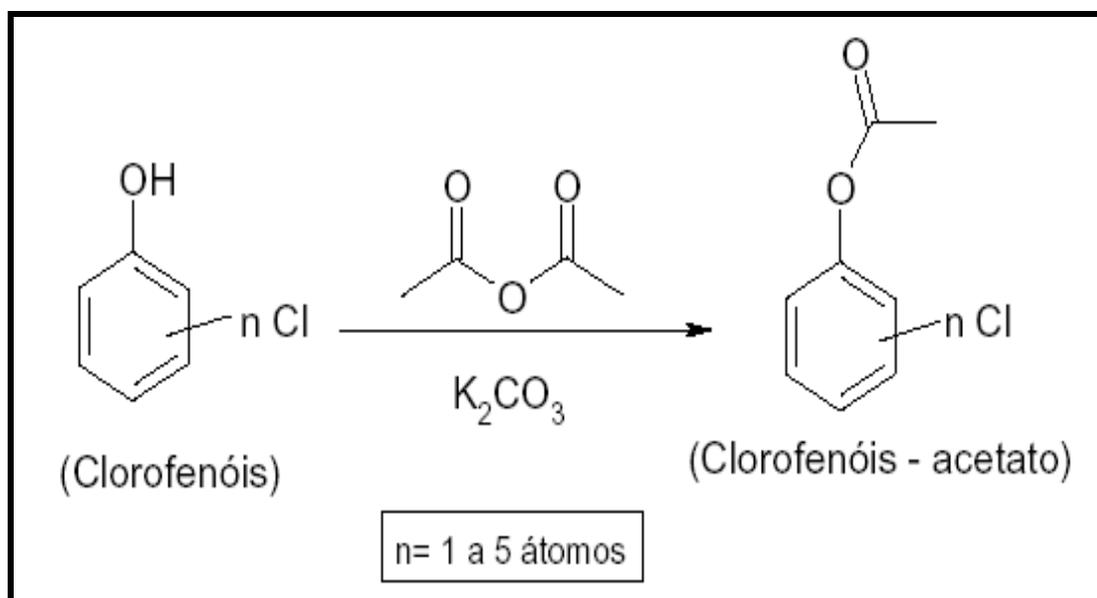
No pH 3,0 a fração da forma neutra está em quase 100%, enquanto em pH acima de 7,0 a espécie aniônica é predominante. Entre esses valores de pH, existe uma combinação de ambas as espécies presentes. Esta técnica se faz necessário pelo fato do PCF ser um composto orgânico hidrofóbico ionizável e é fortemente dependente do pH da fase aquosa [DOMENÕ, et al., 2005].

Estas propriedades podem causar problemas de adsorção no injetor e na coluna, obtendo-se assim cromatogramas com picos largos e com caudas que dificultam a separação cromatográfica.

A técnica de derivatização consiste na acetilação do PCF, é um dos procedimentos amplamente empregados para converter clorofenóis em compostos menos polares, aumentando-se assim a eficiência de extração e aumentando-se a sensibilidade do método para detecção em CG-DCE [DOMENÑO, et al., 2005].

Nos processos de acetilação, no qual partem de esterificação com anidrido acético, os clorofenóis podem ser convertidos em seus respectivos acetatos diretamente em soluções aquosas por simples reação em meio aquoso com anidrido acético, em pH alcalino. Segundo SARTORI (2007) este método apresenta algumas vantagens destacando-se a rapidez do processo, os produtos são extraídos da água com um bom rendimento, além de possibilitarem uma melhor eficiência por determinação cromatográfica, por apresentarem uma maior resposta a alguns detectores.

A seguir na Figura 6 apresenta-se a reação de acetilação dos Clorofenóis com anidrido acético, em nosso trabalho esta reação foi usada para acetilar o PCF. Então em nosso estudo iremos considerar o “n” igual a 5, o que corresponde ao número de átomos de cloro na molécula estudada.



SARTORI (2007)

Figura 6: Reação de acetilação dos clorofenóis com anidrido acético

2.5 Ensaio de Migração:

O ensaio utilizado para extração dos preservantes das amostras no estudo, será feito através do ensaio de migração. Segundo Crosby, 1981: “Migração é definida como sendo a transferência de substâncias da embalagem para os alimentos”. As substâncias que são transferidas ao alimento como resultado do contato ou da interação entre o alimento e o material da embalagem são freqüentemente reconhecidas como *migrantes*, e usualmente consistem em substâncias de baixa massa molar.

A migração pode ser dividida de duas maneiras: a migração global e a migração específica. A migração global refere-se à transferência ou à quantidade total de todos os componentes que migram da embalagem para o alimento, portanto a migração engloba a transferência de todas as substâncias para o alimento, sendo elas tóxicas ou não.

A migração específica diz respeito apenas a transferência de uma ou mais substâncias identificáveis, que apresentam interesse particular. Esse interesse pode ser devido a suas características toxicológicas ou organolépticas, não sendo levado em consideração a quantidade total de outros migrantes que passam para o alimento [CROSBY, 1981].

A utilização de substâncias simples que simulem o poder extrativo do produto alimentício (solvente simulante) é a solução para racionalizar a análise em questão. Um simulante verdadeiro deve satisfazer duas condições básicas:

- Apresentar o mesmo poder extrativo que o alimento simulado.
- Permitir a análise adequada da migração.

A Tabela 4 apresenta a lista dos solventes simulantes aprovada em nosso país [BRASIL, 2001].

Tabela 4: Lista dos simulantes de alimentos

SIMULANTE A	Água
SIMULANTE B	Solução a 3% (p/v) de ácido acético em água destilada
SIMULANTE C	Solução a 15 % (v/v) de etanol em água destilada ou na concentração mais próxima do real de uso
SIMULANTE D	Azeite de Oliva refinado; alternativa: n-heptano

Além da classificação do tipo de simulante a ser utilizado temos ainda uma outra classificação para distribuir os alimentos para efeitos de embalagem. A Tabela 5.

apresenta a lista para os tipos de alimentos [BRASIL, 1999].

Tabela 5: Classificação dos alimentos para efeito da embalagem.

Tipo I	Alimentos aquosos não ácidos (pH>5)
Tipo II	Alimentos aquosos ácidos (pH<5)
Tipo III	a) Alimentos aquosos não ácidos contendo óleo ou gordura b) Alimentos aquosos ácidos contendo óleo e gordura
Tipo VI	Alimentos oleosos ou gordurosos
Tipo V	Alimentos alcoólicos (contendo álcool superior a 5%(v/v))
Tipo VI	Alimentos sólidos secos ou de ação extrativa pouco significativa

Além do solvente simulante, deve-se ter mente o tempo de contato e a temperatura a que esses alimentos são submetidos no decorrer do seu processamento, armazenagem até chegar ao consumidor. Partindo deste princípio toma-se como base para os ensaios de migração, descritos na Resolução nº 105, às condições a serem seguidas em nosso estudo estão apresentadas na Tabela 6 [BRASIL, 1999].

Tabela 6: Condições para os ensaios de migração em embalagens
[Brasil,1999].

Condições de contato no uso real	Simulante A água destilada	Simulante B ácido acético a 3%(m/v)	Simulante C etanol a 15 % (v/v)	Simulante D N-heptano	
				Azeite de oliva refinado	
Conservação (contato prolongado t>24h T<5°C 5°<T<40°C)	5°C-10dias 40°C-10 dias	5°C-10 dias 40°C-10 dias	5°C-10 dias 40°C-10 dias	5C-10dias 40°C-10dias	5°€30min 20°€30min
Contato breve à temperatura ambiente (2h<t<24h)	40°C-24h	40°C-24h	40°C-24 h	40°C-24h	20°€15 min
Contato momentâneo à temperatura ambiente (t<2h)	40°C-2h	40°C-2h	40°C-2h	40°C-2h	20°€15 min
Elaboração 40°C<T<80°C. 80°C<T<100° C T>100°C	80°C-2h	80°C-2h	80°C-2h	80°C-2h	40°€15 min
	100°C-30min	100°C-30min	-----	100°C-30 min	50°€15 min
	120°C-30min	120°C-30min	-----	120°C-30 min	60°€15 min

Os ensaios de migração dos preservantes serão realizados submetendo os materiais de madeira ao contato com soluções que simulem alimentos, sejam do tipo aquosos ou gordurosos, além de simular líquidos fisiológicos como a saliva.

A seguir apresenta-se a Tabela 7 que estabelece os solventes simulantes para cada tipo de alimento.

TABELA 7: Solventes simulantes indicados para cada tipo de Alimento
[BRASIL, 1999]

ALIMENTO	SIMULANTE*
TIPO I	A
TIPO II	B
TIPO III a	A, D
TIPO III b	B, D
TIPO IV	D
TIPO V	C
TIPO VI	Nenhum ou ocasionalmente, A, B, C, ou D, dependendo do tipo do alimento.

*A, B, C e D segundo a Tabela 4.

2.6 Ensaio Cometa:

2.6.1 Definição Geral:

O ensaio Cometa é realizado sob condições alcalinas ($\text{pH} > 13$), pois nestas condições é possível detectar danos ao DNA em células simples e neste pH aumenta-se a migração do DNA durante a eletroforese, devido a formação dos sítios alcalinos lábeis. Geralmente o DNA é desnaturado e sem injúria a valores acima de 12,0 por causa da quebra das pontes de hidrogênio entre a fita dupla do DNA [TICE et al., 2000].

Através desta técnica é possível uma avaliação de dano e reparo do DNA em células proliferantes e não proliferantes a nível individual, a detecção de diferenças intercelulares e o emprego de amostras celulares extremamente pequenas. O ensaio Cometa trata-se de numa técnica eletroforética em microgel onde as células são embebidas em gel de agarose em lâmina para microscopia, sendo posteriormente lisadas, e são submetidas a um campo elétrico sob condições alcalinas e coradas com uma substância fluorescente com afinidade pelo DNA. As células que apresentam danos crescentes no DNA mostram migração aumentada de DNA cromossômico do núcleo em direção ao ânodo que se assemelha a um cometa (vide Figura 13). A extensão de migração do DNA indica a quantidade de quebras de DNA nas células [SPEIT G. & HARTMANN A., 1999].

É uma técnica sensível, reproduzível, simples e rápida para detecção da presença de quebras da fita única de DNA e de lesões em sítios álcalis sensíveis em células de mamífero “*in vitro*” e “*in vivo*”. O ensaio Cometa possui muitos campos de aplicação e tem sido usado para identificar substâncias com atividade genotóxica, tais como biocidas, aditivos de alimentos, agroquímicos, substâncias industriais e farmacêuticas. O ensaio Cometa pode ser usado para identificar possíveis mutágenos e carcinógenos humanos, através da avaliação de dano ao DNA. Trata-se de uma técnica que comparada com outros ensaios de genotoxicidade oferece muitas vantagens que serão listadas a seguir:

- (1) Apresenta grande sensibilidade para detecção de baixos níveis de dano ao DNA.
- (2) Cada ensaio requer um pequeno número de células.
- (3) Baixo custo, flexibilidade, fácil aplicação.
- (4) Operacionalidade para conduzir o estudo usando pequenas quantidades da substância teste.
- (5) O experimento necessita de um curto tempo para sua realização.
Os resultados do ensaio cometa são aceitos e válidos como uma metodologia padronizada por agências regulatórias e por estudiosos do assunto [TICE, et al. 2000].

Por que ensaio **Cometa**?

O ensaio é realizado em uma cuba de eletroforese onde se aplica um ddp (diferença de potencial), que deslocará as moléculas carregadas sob a influência do campo elétrico externo proporcionando migração dos fragmentos de ácido nucléico em direção ao anodo. A cauda do cometa consiste de fragmentos provenientes da quebra do DNA que migram mais livremente no gel de agarose quando submetidos a um campo elétrico durante a eletroforese [POP n° 65.3330.011, 2007].

2.6.2 Principais Aplicações da Técnica:

O ensaio pode ser usado em diversos campos da toxicologia genética, e existem diversas aplicações do potencial da técnica de ensaio cometa:

- (1). Testes de genotoxicidade “in vitro” (cultura de células) e “in vivo” (em animais de laboratório, em trabalhadores expostos a substâncias genotóxicas).
- (2). Pesquisa de dano e reparo do DNA.
- (3). Biomonitoramento ambiental e monitoramento populacional humano no que tange a substâncias genotóxicas.

3. OBJETIVOS:

3.1 Objetivo Geral:

Este trabalho visa avaliar a situação dos materiais de madeira em contato com alimentos em relação aos seus preservantes com objetivo de se estudar a migração desses preservantes e avaliação da sua genotoxicidade.

3.2 Objetivos Específicos:

1. Desenvolver uma metodologia analítica por eletroforese capilar para determinação da migração dos preservantes para os alimentos.
2. Estimular um programa de monitoramento com a Vigilância Sanitária para estimar a qualidade dos materiais de madeira que entram em contato com alimentos.
3. Investigar na literatura a interação dessas substâncias no organismo humano.
4. Estimar a exposição do ser humano a essas substâncias.
5. Estudar a genotoxicidade das substâncias PCF e C8Q através do ensaio cometa.
6. Propor uma regulamentação para materiais de madeira em contato com alimentos.

3.3 Vigilância Sanitária:

A Vigilância Sanitária é definida como um conjunto de ações capazes de eliminar, diminuir ou prevenir riscos à saúde e de intervir nos problemas sanitários decorrentes do meio ambiente, produção e circulação de bens e prestação de serviços de interesses da saúde [Tambelini & Câmara, 2002].

O seguinte projeto objetiva-se acima de tudo em relacionar-se com programa já existentes nas Vigilâncias Sanitária, seja na esfera municipal, estadual ou federal. Participando de programas importantes que tratam do uso de pesticidas, neste podemos incluir os preservantes de madeira, informando os trabalhadores sobre os riscos e problemas causados pela exposição. Informar sobre o uso indiscriminado dessas substâncias nas embalagens e o risco de migração para os alimentos.

O PCF e C8Q tiveram sua utilização como pesticidas, nesse contexto a avaliação toxicológica destas substâncias é importante para a ação da vigilância sanitária, estabelecendo parâmetros de segurança relativos à utilização desses compostos, bem como de programas e ações de controle, cientificamente embasados em técnicas aplicáveis. A exposição humana aos pesticidas resulta tanto do consumo de alimentos, quanto pelo contato direto, no caso da exposição ocupacional dos aplicadores rurais e manipuladores [http://www.anvisa.gov.br/toxicologia/residuos/rel_anual_2004.pdf].

Os resíduos de pesticidas presentes nos alimentos podem representar risco para a saúde da população. Como apresentado no relatório do Projeto de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA), que visa avaliar a qualidade dos alimentos em relação à contaminação por pesticidas, a grande maioria das culturas investigadas no Brasil foi positiva para a presença de resíduos de pesticidas acima dos níveis toleráveis, daí a importância de um estudo que tem por finalidade levantar dados e informações sobre estas substâncias com relevância toxicológica.

Com o desenvolvimento da Vigilância Ambiental em Saúde (VAS), que diz respeito às doenças que estejam relacionadas ao ambiente ecológico-social; no tocante ao consumo de produtos/mercadorias, cujos resíduos produzem modificações na natureza que afetem à saúde: como a Vigilância da Saúde dos Trabalhadores que se refere a conhecimento dos processos produtivos que possam poluir os sistemas ecológicos-sociais. A Vigilância Ambiental deve ser incluída como prioridade porque é necessário identificar as situações de risco que antecedem os considerados efeitos adversos à saúde. Ausência deste tipo de informação, dependendo do objeto da vigilância, não deixa alternativa senão o desenvolvimento de metodologias/tecnologias para identificação dos poluentes em amostras dos diversos compartimentos ambientais [Tambelini & Câmara, 2002].

O Brasil não possui informações detalhadas sobre a utilização desta substância e é desconhecido os níveis de exposição a que estamos sujeitos. Atualmente o Brasil não dispõe de um regulamento técnico que trate de embalagens e materiais de madeira que entrem em contato com os alimentos,

O seguinte projeto possui grande potencial de aplicabilidade nas ações de Vigilância Sanitária, sendo os seus resultados considerados válidos e podendo gerar parcerias com programas específicos das Vigilâncias Sanitárias, para que no futuro se possa contribuir através de um estudo interdisciplinar, para uma atuação mais eficaz da Vigilância Sanitária no Brasil.

4. MATERIAL & MÉTODOS:

4.1 Material:

4.1.1 Solventes orgânicos: (para análise de resíduos):

- Etanol;*
- Metanol;*
- n-heptano;*
- Acetona;*
- Ciclohexano;*
- Anidrido Acético para análise, procedência: Merck;
- Todos os solventes orgânicos usados com grau de pureza para CLAE- procedência: Merck.

4.1.2 Reagentes químicos:

- Carbonato de potássio/ Carbonato de Sódio, procedência: Merck;
- Sulfato de Sódio anidro granulado para análise, procedência: Merck;
- Tampão Tetraborato de sódio ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$) 20 mM pH=9,3 procedência : (Agilent);
- Água UltraPura procedência : (Agilent);
- Solução de Hidróxido de Sódio (0,1 N) procedência : (Agilent).

4.1.3 Colunas para eletroforese capilar:

- Coluna de sílica fundida nas seguintes dimensões, 75 μm de diâmetro interno, parte de entrada de amostra com 56cm de comprimento efetivo e parte de saída de amostra com 8,5cm.
- Coluna de sílica com 50 μm de diâmetro interno e 56 cm de comprimento efetivo.
- Célula de Detecção de Alta Sensibilidade (HSDC) procedência: (Agilent)

4.1.4 Padrões analíticos:

- Pentaclorofenol 98% de pureza (Sigma).
- Cobre-8-quinolinolato 98% de pureza (Chemservice)

Os padrões analíticos devem possuir certificação de análise e pureza desejável, para que a metodologia de determinação dos preservantes de madeira possa ser confiável.

4.1.5 Insumos e Soluções do Ensaio Cometa:

- NaOH procedência: Merck;
- EDTA dissódico procedência: Isofar
- Tris base -Tris (hidroximetil)-aminometano- procedência: Merck ;
- Triton X-100- (t-Octilfenoxipolietoxi etanol) -procedência: Merck
- Dimetilsulfóxido-99,5% (DMSO): procedência Sigma;
- Etanol Absoluto (99%)- procedência: Merck;
- Agarose de baixo ponto de fusão- Seaplate GTG-PMC 50112- procedência: Sigma;
- Solução de heparina sódica 5000 UI/mL- Liquemine[®];
- Solução salina tamponada de fosfato sem Cálcio e Magnésio (PBS);
- Solução tampão alcalina para eletroforese (NaOH 300mM/EDTA 1mM);
- Solução de Lise, solução de Sarcosinato de Sódio disponível no POP n° 65.3330.011;
- Solução tampão para neutralização disponível no POP n° 65.3330.011;
- Solução corante de brometo de etídio (200 µg/mL), procedência: Aldrich, disponível no POP n° 65.3330.011;
- Solução de Metanosulfonato de metila (MMS-800 µM), procedência: Aldrich; disponível no POP n° 65.3330.011.
- Solução de meio de cultura, MEM completo, disponível no POP n° 65.3330.011.
- Solução de Tripsina 0,15%, disponível no POP n° 65.3330.011.
- Solução de Ciclofosfamida (CP), procedência Aldrich, disponível no POP n° 65.3330.011.

4.1.6 Equipamentos:

- Eletroforese Capilar (HP 3D-CE Hewlett-Packard) Cromatógrafo à gás com detector por captura de elétrons (CG-DCE Hewlett-Packard-6890)
- Cromatógrafo à gás acoplado ao detector seletivo de massas (CG-DSM 6890N-5973N Hewlett-Packard).
- Fonte de eletroforese horizontal (Bio Rad).
- Cuba horizontal de eletroforese (Bio-Rad DNA SUB CELL)
- Microscópio de Fluorescência (Nikon).

4.1.7 Amostras:

As amostras analisadas em nosso estudo foram adquiridas no comércio local e também foram fornecidas por algumas indústrias do ramo de alimentos, sendo composta de material de madeira que entra em contato direto com o alimento, por exemplo, palitos de picolés, espetos de madeira (usados em churrasco), caixas e caixotes utilizados no acondicionamento e transporte de gêneros agrícolas.

Algumas análises foram feitas em palitos de dente de madeira pelo fato de ser um material que está em contato direto com os seres humanos a fim de se avaliar se algum preservante poderia migrar do material através da saliva.

4. Material & Métodos:

4.2 Eletroforese Capilar:

A metodologia analítica utilizada em nosso trabalho foi à *eletroforese capilar* por solução livre. Esta metodologia se mostrou bastante eficiente para determinação analítica dos preservantes de madeira.

4.2.1 Condicionamento do Capilar:

Antes de cada corrida é realizado o condicionamento do capilar, através da passagem de NaOH 0,1 M por dois minutos, seguido da passagem de água (Ultrapura®-Agilent) por cinco minutos antes da corrida da amostra. E no final do dia a coluna é lavada com água ultrapura novamente durante trinta minutos.

4.2.2 Construção da Curva Analítica:

Para a construção da curva analítica foi preparada uma solução estoque usando padrão analítico do PCF dissolvido em Metanol para CLAE. Preparando-se solução com concentração final de 1,0014 mg/mL. A solução estoque foi mantida ao abrigo da luz e sob a temperatura de -5°C , durante os trabalhos para a construção da curva. A faixa de concentração foi de 2,01; 4,02; 6,04; 8,05; 10,07 mg/L. As soluções foram injetadas em triplicata e considerou-se a área corrigida, na qual se divide a área do eletroferograma pelo tempo de migração da amostra.

4.2.3 Condições Experimentais aos Métodos Analíticos:

a) Eletroforese capilar:

Foi usado o equipamento de eletroforese capilar, modelo 3D CE, Hewlett Packard (HP), foi usado como solução carreadora, o tampão Tetraborato de sódio ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$) a 20 mM, pH 9,3 (Agilent/ Reagentes.). Condições para injeções no equipamento, a pressão foi ajustada em 50 mBar/4s, a temperatura foi de 20°C , para uma tensão aplicada de 30 kV, o comprimento de onda do detector de UV em 214 nm. A coluna eletroforética utilizada como tubo de separação, com 56 cm de comprimento efetivo e 50 μm de diâmetro interno (Agilent).

b) Cromatógrafo a gás com detector por captura de elétrons (CG-DCE):

As condições analíticas de separação pelo CG-DCE foram: Temperatura do injetor e detector de 210°C e 300°C, respectivamente. Coluna 5 % fenil metil siloxano - HP 5MS de 30m de comprimento; 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25µm de espessura de filme, nas temperaturas de 80°C (0 min) @30°C/min 180°C (8 min) @2°C/min 200°C (5 min) @6°C/min 280°C (15 min). Vazão de gás carreador (Hélio) = 1,2 mL/min, vazão da purga do septo = 2,1 mL/min, vazão total = 64,1 mL/min, vazão do gás “make-up”(Nitrogênio) = 60 mL/min, injeção “splitless” = 0,75 min.

c) Cromatógrafo a gás com detector seletivo de massas (CG-DSM):

As amostras foram injetadas ao volume de 2µL, modo de injeção “split/splitless” pulsado, a temperatura do injetor foi de 250°C, o gás de arraste foi o Hélio (99.999%) com razão de vazão 1,0 mL/min, modo fluxo constante. A coluna capilar HP-5MS com 60 m X 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura de filme. A programação da temperatura do cromatógrafo foi de temperatura inicial 80°C (10 min) @20°C/min 160°C (0 min) @4°C/min 200°C (2 min) @40°C/min 280°C (5 min), tempo total de corrida de 24 min. Para determinação analítica o DSM foi operado em modo seletivo de íons (SIM), selecionando os íons qualificadores para a substância de interesse.

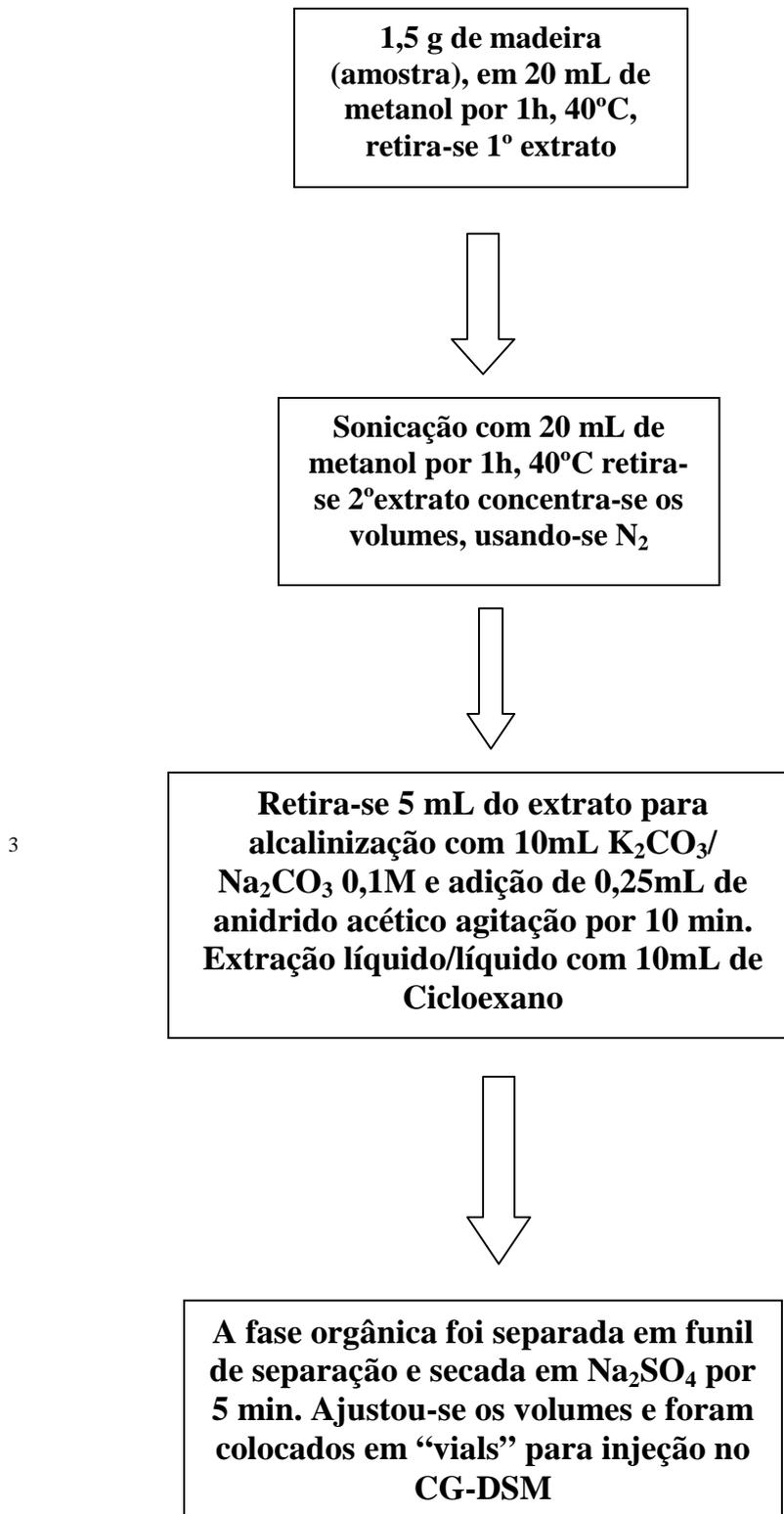
4.3 Reação de Derivatização:

Para determinação do PCF em madeira, vários métodos têm sido publicados, onde a maioria das técnicas são baseadas na extração da matriz seguidas pela análise por alguma técnica analítica (CG-DCE) ou (CG-DSM) [BUHR et al., 2000]. Em nosso trabalho foi escolhido uma técnica de extração a partir das nossas amostras. As amostras utilizadas no estudo foram trituradas com o auxílio de um moinho industrial, mas antes as amostras passaram por um criotratamento, onde as amostras foram imersas em nitrogênio líquido segundo BARLET et al., (1998).

Apresenta-se o fluxograma contendo todas as etapas seguidas para a reação de derivatização em nossas amostras.

Fluxograma: Técnica de extração e derivatização segundo

BECKER et al. (2002)



³ Adaptado ao método de Buhr, et al., (2000).

4.4 Ensaio de migração:

A situação ideal seria avaliar o potencial de migração no próprio alimento que esteve em contato com o material. Esse procedimento, porém torna-se impraticável, uma vez que a concentração de migrantes é normalmente baixa e a complexidade química da maioria dos alimentos interferiria na dosagem dos mesmos. Uma regra básica adotada na determinação da concentração de migrantes foi o uso de solventes que simulem os alimentos (solventes simulantes), nas condições de teste. Foram ainda estipuladas condições de extração, na natureza de contato entre o material de embalagem e o solvente simulante e o tipo de alimento [ABRANTES,1998].

Em nosso trabalho utilizaremos o ensaio de migração para determinação dos preservantes de madeira. As amostras foram colocadas em placas de Petri, mantendo-se uma relação entre área das amostras (cm^2) por volume de solvente simulante (mL), em contato com os solventes simulantes. Para esta relação nos baseamos na Resolução nº 105 que preconiza que a relação do volume de simulante com a área de material em contato/volume fique compreendida entre 2 e 0,5 cm^2/mL , na temperatura selecionada; e foi colocado em contato na temperatura de ensaio pelo tempo indicado [BRASIL, 1999]. Os solventes simulantes usados possuíam a seguinte composição (Etanol/Água 50% e 95% v/v), para uma superfície de 50 cm^2 utilizou-se 50 mL de solvente de acordo com a Comissão da Comunidade Européia (1994).

Os ensaios de migração dos preservantes foram também realizados submetendo as amostras (palitos de dentes) em contato com soluções que simulem líquidos fisiológicos como a saliva, os ensaios de migração utilizando uma solução que mimetize a saliva humana, o ensaio foi realizado com uma solução com a seguinte composição (4,2 g de bicarbonato de sódio; 0,5 g de cloreto de sódio e 0,2 g de carbonato de potássio em 1 litro de água destilada, pH 9) que permaneceu em contato com as amostras a 37°C por até 4 horas em ultra-som [COMMUNITIES OF EUROPEAN, 1994].

A seguir apresentam-se fotografias do ensaio de migração realizado em nosso laboratório, o Laboratório de Análise de Contaminantes (LAC), do Departamento de Química do INCQS:

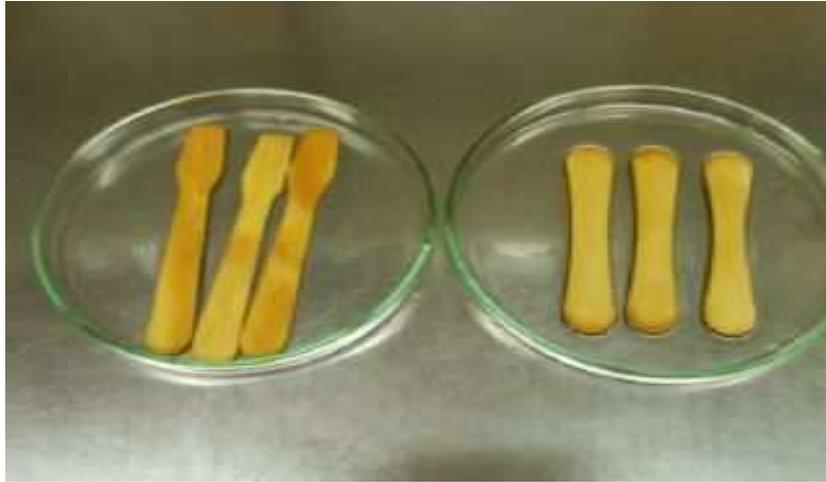


Figura 7: Fotografia do ensaio de migração usando palitos de picolé (50cm²) e solvente simulante (Etanol/H₂O 95:5), tempo de contato 10 dias e temperatura de 5°C



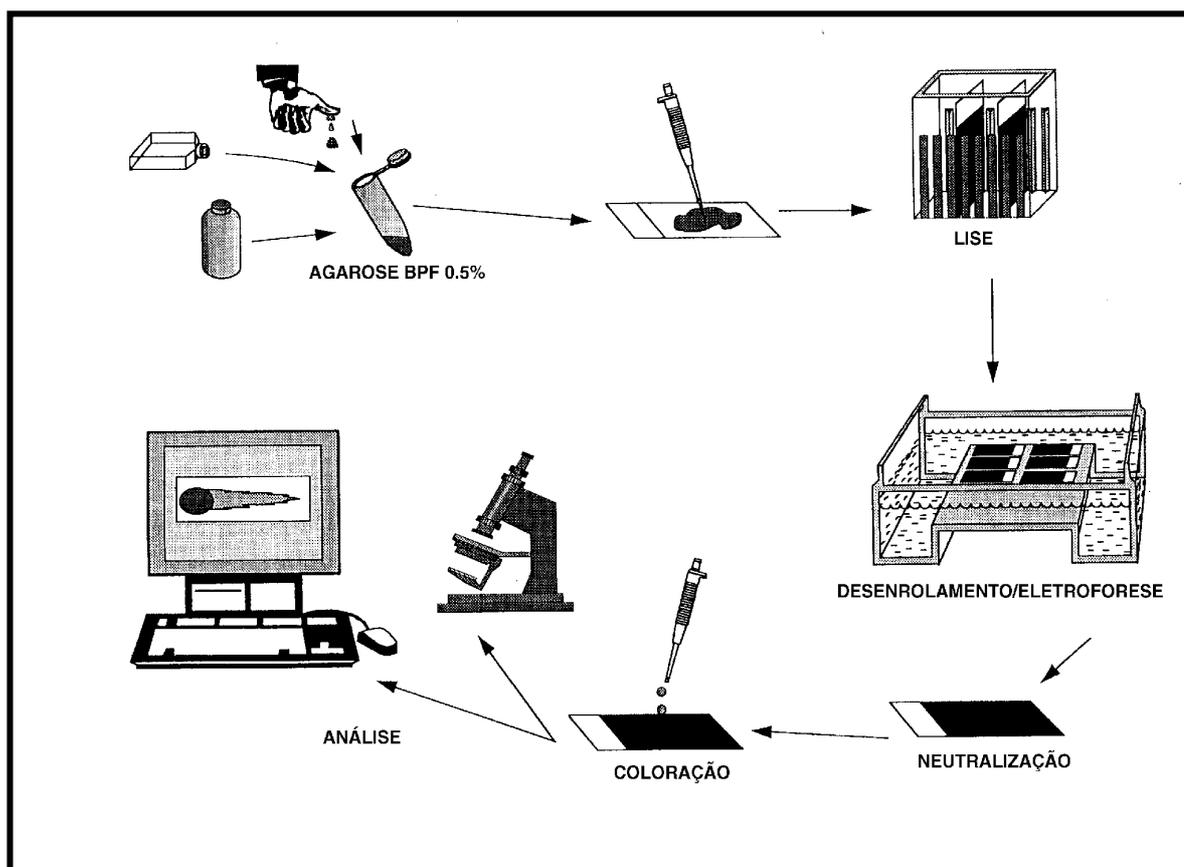
Figura 8: Fotografia do ensaio de migração usando palitos de picolé (50cm²) e solvente simulante (Etanol/H₂O 50:50), tempo de contato 10 dias e temperatura de 5°C

4.5 Ensaio Cometa:

O ensaio Cometa é um ensaio que nos dá um bom prognóstico para identificar possíveis substâncias mutagênicas e com atividade carcinogênica em animais, incluindo em humanos, pois detecta danos nas fitas de DNA, e quebras nos sítios álcali-labéis [Singh et al., 1988 *apud* Ozaki et al., 2004].

O ensaio Cometa foi o ensaio escolhido para determinação da genotoxicidade do PCF e do C8Q. O ensaio cometa foi realizado segundo as diretrizes estabelecidas no POP (Procedimento Operacional Padrão) do INCQS nº 65.3330.011, 2007.

A Figura 9, a seguir apresenta de forma esquematizada as diferentes etapas envolvidas na realização do ensaio Cometa:



HARTMANN .& SPEIT. (1997)

Figura 9: Fluxograma contendo as etapas de execução do ensaio Cometa

1. Seleção das células a serem utilizadas no experimento e preparação da camada inferior das lâminas com agarose de ponto de fusão normal (1,5%);
2. Preparação da segunda camada das lâminas contendo (5 μ L) da suspensão celular em (120 μ L) de agarose de baixo ponto de fusão (0,5%) seguido da colocação de lamínula sobre a lâmina. Após a solidificação da agarose as lamínulas foram retiradas;
3. Colocação das lâminas na solução de lise (II), por no mínimo uma hora, para rompimento das membranas e exposição do núcleo celular. A solução de lise (II) foi preparada a partir da solução de lise (I) armazenada à temperatura ambiente e contendo NaCl 2,5 M, EDTA 100 mM, Tris 10mM a pH 10. A solução de lise final (II) foi preparada adicionando-se 1 mL de Triton X-100 e 10 mL de DMSO a 89 mL da solução de lise (I). Esta solução foi mantida sob refrigeração a 4°C por 60 min antes do seu uso;
4. Desenrolamento e eletroforese do DNA. Tampão de eletroforese NaOH 300 mM, EDTA 1mM. Para cada corrida preparou-se 1500 mL desta solução aquosa contendo 45 mL de NaOH 10N e 7,5 mL EDTA 200mM. A solução foi preparada com água previamente resfriada e mantida na geladeira por, pelo menos, 2h antes do experimento. O tratamento alcalino ocorreu durante 20 min em cuba horizontal em banho de gelo seguido pela eletroforese durante 20 min aplicando-se uma tensão elétrica de 25 V (0.86 V/cm) e 300mA. Todos os procedimentos foram realizados sem a incidência direta da luz;
5. Neutralização das lâminas. Após a eletroforese as lâminas foram neutralizadas com tampão Tris (0,4 M), pH 7,5;
6. Secagem e Armazenamento das lâminas. Após a neutralização e a remoção cuidadosa do excesso de tampão, as lâminas foram imersas numa cubeta com álcool absoluto 99% v/v por 10 min.

O excesso do solvente foi retirado e as lâminas foram secas durante a noite em posição horizontal à temperatura ambiente, até o momento da coloração;

7. Coloração das lâminas. Adicionou-se 30 μL de solução de brometo de etídio (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) preparada a partir de uma solução estoque de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (mantida à temperatura ambiente) e em seguida foram colocadas lamínulas sobre as lâminas;

8. Na análise microscópica do DNA corado pelo brometo de etídio em microscópio de fluorescência com aumento de 400 X avaliou-se a extensão da migração do DNA em 100 células por cultura para cada concentração da substância, de acordo com o tamanho da cauda dos cometas em 04 classes (0 a 3), da seguinte forma:

- ✓ Classe 0: Ausência de cauda.
- ✓ Classe 1: Pequena cauda .
- ✓ Classe 2: Grande cauda.
- ✓ Classe 3: Totalmente danificado (cabeça do cometa muito pequena, com praticamente todo o DNA na cauda).

A seguir, fotomicrografias das diferentes classes de dano ao DNA de células sanguíneas humanas:



Figura 10: Classe 0 de dano ao DNA



Figura 11: Classe 1 de dano ao DNA



Figura 12: Classe 2 de dano ao DNA

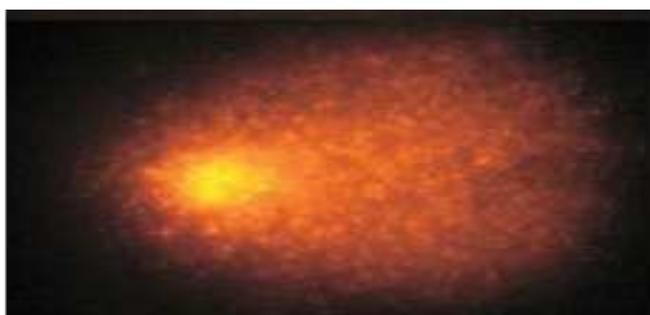


Figura 13: Classe 3 de dano ao DNA

4.5.1 Expressão dos Resultados em experimentos *in vitro*:

a) Para cada grupo experimental, por suspensão celular o dano ao DNA foi expresso em unidades arbitrárias (UA) para 50 células de cada lâmina, de acordo com a seguinte fórmula:

$$UA = [(M_0 \times 0) + (M_1 \times 1) + (M_2 \times 2) + (M_3 \times 3)]$$

Onde: UAT= número de unidades arbitrárias totais.

M_0 = número de células com classe de dano 0

M_1 = número de células com classe de dano 1

M_2 = número de células com classe de dano 2

M_3 = número de células com classe de dano 3

b) Foi calculado o número total de UA por 100 células analisadas/concentração/cultura, somando-se os números de UA obtidos nas duas lâminas;

c) Calcula-se para cada concentração, para cada experimento, o valor médio de UA das duas culturas em replicata de acordo com a seguinte fórmula:

$$UAc = \frac{UAc_1 + UAc_2}{2}$$

Onde: UAc= Valor médio de unidades arbitrárias do grupo controle e grupo tratado

UAc_1 = número de unidades arbitrárias da 1ª cultura

UAc_2 = número de unidades arbitrárias da 2ª cultura

4.5.2 Critérios para Avaliação e Interpretação dos resultados:

Resultados de teste positivo *in vitro*:

1. Aumento na migração do DNA relacionado à concentração ou dose e um correspondente aumento significativo em uma ou mais concentrações ou doses;
2. Avaliar a possibilidade de que o dano ao DNA possa estar associado com a citotoxicidade em cada concentração positiva;
3. Empregar a análise estatística monocaudal como auxílio na avaliação dos resultados do ensaio, mas não como único fator determinante para se identificar uma resposta positiva;
4. Considerar a natureza da curva de concentração-resposta e a distribuição intercelular do dano ao DNA em cada concentração;
5. Resultados positivos no ensaio Cometa *in vitro* indicam que a substância testada induz dano ao DNA em células de mamífero *in vitro*;
6. Resultados positivos do ensaio Cometa *in vivo* indicam que a substância testada induz dano ao DNA *in vivo* no tecido alvo investigado;

A reprodutibilidade em experimentos independentes é considerada a mais forte evidência para resultados positivos [POP nº 65.3330.011, 2007].

4.5.3 Análise Estatística:

As diferenças entre os valores médios de UA obtidos para os grupos controle e de cada concentração nas duas culturas em replicata foram testadas empregando-se o teste de Student de dados agrupados monocaudal, a um nível de significância de $p=0,05$ e de $p=0,01$ [POP nº 65.3330.011, 2007].

4.5.4 Ensaio Cometa do PCF:

O ensaio cometa foi realizado com o propósito de se avaliar a genotoxicidade do PCF. Antes da execução do ensaio Cometa realizou-se o ensaio de viabilidade celular em células sanguíneas humanas, mediado pelo diacetato de fluoresceína (FDA) e o brometo de etídio.

O presente ensaio teve como objetivo estabelecer o grau de viabilidade celular após tratamento com o PCF para definir as faixas de concentrações do PCF a serem testadas no ensaio Cometa.

As células sanguíneas foram tratadas por 2 h a 37 °C com DMSO 5% v/v e foram obtidas através de doadores por punção venosa sendo retirados 10 mL de sangue tratados com 800 µL de heparina (5000 UI/mL), a fim de se evitar a coagulação do sangue. O tratamento das células foi realizado em tubos de microcentrífuga (1,5 mL), contendo 475 µL da suspensão celular e 25 µL do solvente DMSO para o controle solvente. Ao controle celular foram adicionados somente 500µL da suspensão celular ao tubo de microcentrífuga e para as suspensões celulares tratadas com o PCF, foram adicionadas 475µL da suspensão celular e 25 µL das diferentes soluções de PCF 200 a 1880 µg/mL (750 a 7058 µM) em DMSO. As concentrações finais de PCF em DMSO 5% v/v foram de 10 a 94 µg/mL (38 a 353µM).

O efeito do solvente (DMSO 5%) foi avaliado comparando-se o seu efeito citotóxico em relação às culturas celulares sem tratamento (controle celular).

A solução de corante de FDA (30 µg/mL) e brometo de etídio (8 µg/mL) foi preparada a partir da adição de 30 µl de FDA (5 mg/mL), 200 µl de brometo de etídio (200 µµg/mL) em 4,8 mL de PBS, no dia do experimento de acordo com POP nº 65.3330.011, (2007). No ensaio de viabilidade celular tratou-se 100 µl da suspensão celular com 100 µl da solução corante, após homogeneização adicionou-se 50 µL à lâmina microscópica e cobriu-se com lamínula.

Na avaliação microscópica avaliou-se 200 células por concentração testada em microscópio de fluorescência a um aumento de 400X.

- As células viáveis apresentam fluorescência verde;
- As células mortas apresentam os núcleos corados em laranja;
- As células perdendo a viabilidade celular contêm grânulos citoplasmáticos verdes e um núcleo laranja.

Segundo Henderson et al., (1998) deve-se evitar no ensaio Cometa concentrações que determinem valores superiores a 30% de decréscimo de viabilidade celular quando comparadas com as culturas controles. Os resultados foram expressos em percentual de decréscimo de viabilidade celular.

Depois da definição da faixa de concentrações pelo ensaio de viabilidade celular realizou-se o ensaio Cometa em células sanguíneas humanas. As células sanguíneas foram tratadas durante 2 h a 37°C com DMSO 5% v/v (controle solvente) e com sete concentrações de PCF em DMSO 5% na faixa de 17 a 94 µg/mL (64 a 353µM). Nas mesmas condições experimentais descritas no ensaio de viabilidade celular foram definidos como grupos experimentais: controle celular (sem tratamento), controle solvente (DMSO 5%), controle positivo (MMS 160 µM), metanosulfonato de metila que é um mutágeno de ação direta na concentração. No controle positivo foram adicionados 50µL de MMS (800 µM) em PBS a 200 µL da suspensão celular. As etapas de execução do ensaio estão descritas na seção 4.5 ítem dois a sete. Foram preparadas duas culturas para cada grupo experimental e duas lâminas por cultura e durante a avaliação microscópica foram analisadas 50 células por lâmina, resultando num total de 200 células por concentração. Todas as etapas realizadas durante o preparo das lâminas foram realizadas com as luzes do laboratório apagadas para se evitar danos adicionais ao DNA.

4.5.5 Ensaio Cometa do C8Q em células sanguíneas:

Para o C8Q foi realizado o mesmo protocolo experimental como nos ensaios de viabilidade celular e no Cometa do PCF em células sanguíneas humanas.

No ensaio de viabilidade celular mediado pelo FDA e brometo de etídio foram utilizadas células sanguíneas humanas heparinizadas obtidas de doadores como descrito anteriormente. O tratamento foi realizado durante 2 h a 37°C com DMSO 5% (controle solvente) e com nove concentrações de C8Q em DMSO 5% na faixa de 0,25 a 40 µg/mL (1 µM a 114 µM).

Após a avaliação dos resultados obtidos no ensaio de viabilidade celular, foi estabelecida a faixa de concentrações a ser usada no ensaio Cometa. Para o ensaio Cometa utilizamos oito concentrações, pois no ensaio de viabilidade celular uma das concentrações (114 µM) causou decréscimo de viabilidade celular acima de 30%.

Após estabelecidas as faixas de concentrações para o ensaio cometa, as células sanguíneas foram tratadas por 2 horas a 37°C com DMSO 5% (controle solvente), com oito concentrações diferentes de C8Q em DMSO 5% na faixa de 0,25 a 30 µg/mL (0,7 a 85 µM), e controle positivo (MMS 160 µM). Foi realizado o mesmo protocolo como no ensaio para o PCF.

4.5.6 Ensaio Cometa em células HTC:

A maioria das biotransformações por detoxificação envolve reações oxidativas que podem produzir metabólitos reativos os quais podem induzir a efeitos genotóxicos [MAISTRO et al., 2004]. Os hepatócitos têm sido um excelente modelo para estudo de substâncias genotoxificantes, porque como sistema celulares possuem completa competência metabólica para bioativação de xenobióticos. As culturas primárias de hepatócitos de ratos têm sido extensivamente usadas para detecção de dano ao DNA a partir de substâncias com potencial genotóxico usando o ensaio Cometa, este tipo de estudo é utilizado para substância que necessitam de bioativação [MONTEITH & VANSTONE, 1995].

O preservante C8Q foi também testado quanto à genotoxicidade no ensaio Cometa em células de hepatoma de rato (*Rattus norvegicus*) HTC (*Hepatoma Tissue Culture*) provenientes do banco de células da UFRJ. Trata-se de células metabolicamente competentes amplamente empregadas em estudos nos quais se deseja investigar a influência da metabolização hepática na toxicidade de substâncias químicas e biológicas *in vitro* [LI, 1994].

Tal estudo se justifica pelo fato de que se tem atribuído ao 8-hidroxiquinolona, um dos metabólitos do C8Q, prováveis atividades mutagênicas e carcinogênicas segundo You et al., 2001, o que tem estimulado a necessidade da reavaliação da mutagenicidade e carcinogenicidade do C8Q. As células HTC, metabolicamente competentes, por apresentarem níveis adequados de atividade enzimática de oxidases de função mista, condição essencial para ativação de compostos pro-mutagênicos [KRAHN, 1983]. Potencialmente poderiam metabolizar o C8Q produzindo o 8-hidroxiquinolona.

Em nosso experimento as culturas de células HTC em monocamada foram mantidas em estufa a $37 \pm 1^\circ \text{C}$ com $5 \pm 1\%$ CO_2 em meio essencial mínimo (MEM) completo com sais de Earle suplementado com 10% m/v de soro fetal bovino, sulfato de estreptomicina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), penicilina G potássica (100 UI/mL) e L-glutamina (2 mM) segundo HARTMANN .& SPEIT, (1997) *apud* POP n° 65.3330.011, (2007).

Para o experimento preparou-se uma suspensão celular contendo 140×10^3 células/mL em MEM completo. A cada um dos seis orifícios de uma placa de cultura tipo LIMBRO (diâmetro: 35 mm) foram adicionados 3 mL da suspensão celular e em seguida, as células foram cultivadas durante 24 h em estufa nas condições descritas acima.

No ensaio de viabilidade celular mediado pelo FDA e brometo de etídio as soluções de C8Q em DMSO foram preparadas na faixa de 3,2 a 405 $\mu\text{g/mL}$ (8,9 a 1150 μM) e o tratamento das culturas realizado em duplicatas a partir da adição de 30 μL das soluções acima e do solvente DMSO ao volume de 2970 μL de MEM completo durante 2 h a 37 ± 1 °C em estufa com 5 ± 1 % CO_2 . As concentrações finais de C8Q em DMSO 1% foram de 0,03 a 4,0 $\mu\text{g/mL}$ (0,09 a 12 μM).

O efeito do solvente (DMSO 1%) foi avaliado comparando-se o seu efeito citotóxico em relação às culturas celulares sem tratamento (controle celular).

Após o período de tratamento em estufa nas condições supracitadas, removeu-se o meio, lavou-se a monocamada com 3 mL de solução de PBS resfriada em banho de gelo, e após a remoção do PBS, adicionou-se 100 μL de uma solução de tripsina 0,15 % m/v com EDTA 0,08 % m/v em PBS. Após cerca de 3 a 5 min à temperatura ambiente, suspendeu-se suavemente as células com 200 μL de MEM completo de modo a se obter aproximadamente 1×10^6 células/mL.

Após a avaliação dos resultados no ensaio de viabilidade celular estabelecida como faixa de concentrações no ensaio Cometa as oito concentrações utilizadas no ensaio de viabilidade celular, uma vez que não houve decréscimo de viabilidade celular acima de 30% em nenhuma das concentrações testadas.

Para o ensaio Cometa as soluções de C8Q foram preparadas na faixa de 8,9 a 1150 μM e foram adicionadas 30 μL de C8Q nos orifícios das placas para o tratamento com as células (diluição 1:100), mas antes da adição dos 30 μL da solução de C8Q, serão retirados 30 μL da solução do meio das placas para que se mantenha o mesmo volume final. Deve-se evitar encostar a ponta da micropipeta na placa a fim de que se evite a retirada das células juntamente com a solução.

O ensaio Cometa do C8Q foi em seguida realizado seguindo o mesmo protocolo de tratamento como no ensaio de viabilidade celular. Utilizou-se como controle positivo uma solução de ciclofosfamida (CP) em PBS na concentração final de 9,0 mM, pois trata-se de uma substância que também necessita de ativação metabólica para se ter efeito ao DNA. A CP é considerada como sendo um mutágeno fraco. Isto ocorre graças à capacidade que a CP possui de estabilizar as quebras do DNA [MONTEITH & VANSTONE, 1995].

5.RESULTADOS & DISCUSSÃO:

A eletroforese capilar é uma técnica que está se desenvolvendo rapidamente e se mostra promissora para análise de muitas substâncias relacionadas, como substâncias proibidas em alimentos. Contudo o uso da eletroforese capilar para análise de materiais em contato com os alimentos ainda não está completamente investigado e explorado, o fato é que a eletroforese capilar tem potencial óbvio para a análise dos componentes multifuncionais, freqüentemente necessários aos estudos de migração.

Neste capítulo serão apresentados e discutidos os resultados obtidos no desenvolvimento das metodologias analíticas utilizando a eletroforese capilar para determinação do PCF e C8Q em materiais de madeira em contato com os alimentos.

5.1 Análise do PCF:

5.1.1 Construção da Curva Analítica por Eletroforese Capilar:

Na etapa de quantificação estabeleceu-se uma relação entre o sinal do detector e a quantidade da substância (PCF). Os fatores de respostas foram estabelecidos e usados de acordo com a sensibilidade do detector, na qual consiste na determinação da relação da resposta do eletroforese capilar às várias concentrações do PCF.

Segundo VALENTE SOARES (2004), elaborar uma curva analítica é uma das etapas mais simples de uma análise. No entanto, a exatidão dos resultados repousa na confiabilidade da curva elaborada. Preparação e diluição das soluções padrão e das amostras são geralmente as maiores causas de erros. Durante a calibração podem aparecer: (a) Erros Sistemáticos (determinados); (b) Erros Aleatórios (indeterminados); Erros devidos ao uso de uma matriz para o padrão diferente da matriz das amostras (Erros determinados e indeterminados).

A seguir apresenta-se na Figura 14 a curva analítica construída para determinação quantitativa do PCF em nossas amostras, com introduções de alíquotas com as seguintes concentrações: 2,01; 4,02; 6,04; 8,05; 10,07 mg/L em triplicatas, considerando área corrigida, na qual se divide a área do eletroferograma pelo tempo de migração da amostra.

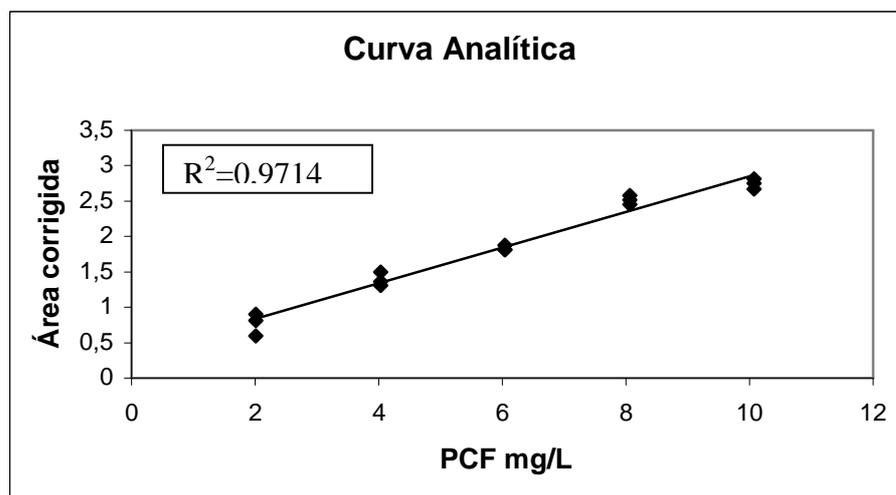


Figura 14: Curva Analítica do PCF

Na construção da curva analítica utilizou-se o aplicativo “Analyte” (Microsoft Excel versão 5.0/Chemical-1991), para determinação do limite de detecção do método, além de uma planilha para análise dos resultados. Esta planilha foi baseada no trabalho de Souza (2007), para o tratamento estatístico da linearidade dos dados, onde se mostrou uma importante ferramenta.

5.1.2 Linearidade do Método Analítico por Eletroforese Capilar:

O PCF pode ser analisado de forma linear e a faixa de concentração analisada foi de 2,01 a 10,07 mg/L. Os testes de linearidade da curva analítica foram realizados pelo método dos mínimos quadrados ordinário, segundo Souza & Junqueira (2005). Os autores definem a linearidade como sendo: “A capacidade do método em obter resultados confiáveis proporcionais a concentração do analito”.

Quando se faz o ajuste da curva analítica pelo método dos mínimos quadrados ordinários várias hipóteses relacionadas aos resíduos devem ser avaliadas tais como: (normalidade, independência e homocedasticidade). A linearidade do método foi calculada através dos testes de premissas de linearidade, ou seja:

- Teste Ryan-Joiner para avaliação de normalidade dos resíduos;
- Teste de Brown-Forsythe para avaliar homogeneidade;
- Teste de Durbin-Watson para autocorrelação dos resíduos;
- ANOVA para avaliar a regressão e o desvio da linearidade.

Os dados dos referidos testes estão apresentados e agrupados nas Tabelas 8, 9, 10, 11, 12:

- **Teste de Ryan-Joiner:**

O teste de Ryan-Joiner verifica a normalidade dos resíduos, os resíduos estão ordenados e plotados contra a porcentagem de pontos correspondentes a partir de uma distribuição normal padrão [SOUZA & JUNQUEIRA, 2005]. O teste de Ryan-Joiner testa a hipótese nula de que os resíduos seguem uma distribuição normal (os desvios da normalidade não são significativos). A estatística deste teste é o coeficiente de correlação do gráfico. A hipótese nula é rejeitada quando o coeficiente de correlação calculado é menor que os valores críticos estabelecidos para estes coeficientes [SOUZA, 2007]. O “Req” representa o resíduo calculado pela nossa planilha enquanto o “Rcrit” representa o resíduo crítico para os nossos dados com intervalo de confiança de 95%. Em nosso estudo os resíduos obedecem a uma distribuição normal, os pontos estão distribuídos próximos a curva.

Tabela 8: Teste para Normalidade dos Resíduos

(Teste de Ryan-Joiner)

Req	0,99
Rcrit ($\alpha = 0,05$)	0,94

A partir desta avaliação podemos partir para o próximo teste.

- **Teste de Brown-Forsythe:**

Este teste é utilizado para avaliar a homocedasticidade, confrontando a hipótese nula de que as variâncias dos resíduos não diferem entre si (há homocedasticidade), contra a hipótese alternativa de que as variâncias dos resíduos são diferentes (há heterocedasticidade). Se o valor para o teste “t” não exceder o valor crítico para o “ t_{tab} ” ($t < t_{tab}$) há indicação de homocedasticidade [SOUZA, 2007]. Os resultados obtidos nas planilhas indicam a homocedasticidade de nossos dados.

Tabela 9: Teste da Homogeneidade da Variância dos Resíduos

(Teste de Brown-Forsythe)

Variância Combinada	1,74E-02
t_L calculado	-1,02E+00
$t_{tabelado}$ ($\alpha = 0,05$)	2,16E+00
p	3,27E-01

- **Teste de Durbin-Watson:**

A autocorrelação dos resíduos da regressão é verificada pelo teste de Durbin-Watson, que confronta a hipótese nula de que não há correlação dos resíduos (os resíduos são independentes) com a hipótese alternativa de que há correlação dos resíduos (os resíduos não são independentes). O valor da estatística do teste de Durbin-Watson varia com os valores, variam de zero a quatro com média de dois. Se o valor calculado converge para dois, significa que não há correlação, ou seja, os resíduos são independentes. Quando o valor se afasta de dois para zero ou para quatro a autocorrelação aumenta. Geralmente, valores entre 1,5 e 2,5 podem ser utilizados como pontos de corte inferior e superior. Para cada conjunto de dados há dois limites críticos d_L (limite inferior) e d_U (limite superior). Se o valor de d está entre estes dois limites, o teste é inconclusivo. Valores de $d < d_L$ indicam autocorrelação e rejeição da hipótese nula, enquanto valores de $d > d_U$ indicam independência dos resíduos e não rejeição da hipótese nula [SOUZA, 2007]. Para este teste foi aplicado um nível de confiança de 95% ($p= 0,05$). Em nosso estudo o d calculado foi maior que o d_U (limite superior) demonstrando a independência dos resíduos.

Tabela 10: Teste de Autocorrelação dos Resíduos

(Teste de Durbin-Watson)

d (calculado)	1,76
d_L (Limite Inferior) $\alpha = 0,05$	1,08
d_U (Limite Superior) $\alpha = 0,05$	1,36

• **Teste para análise da regressão e da Linearidade do método:**

Para realizar o teste de significância da regressão e do desvio da linearidade, a variabilidade total das respostas é decomposta em soma dos quadrados dos resíduos da regressão (em torno da regressão). A soma de quadrados dos resíduos da regressão é então separada em soma de quadrados do desvio da linearidade (falta de ajuste ao modelo) e a soma de quadrados do erro puro. A Tabela 12 para análise de variância para o teste é construída a partir de equações inseridas na planilha de Souza, (2007).

A estatística deste teste é a razão entre as variâncias, que segue a distribuição de F com graus de liberdade correspondentes. Para avaliação da significância da regressão, é testada a hipótese nula de que a regressão linear não é significativa. A hipótese nula é rejeitada quando a estatística F estimada for maior que o valor crítico ($p > 0,05$). Para avaliação da significância do desvio da linearidade, a hipótese nula de que o modelo linear simples é correto (não há desvio de linearidade) é confrontada com a hipótese alternativa de que o modelo linear não é correto (há desvio da linearidade). A hipótese nula é rejeitada quando a estatística F estimada for maior que o valor crítico ($p > 0,05$). Um desvio da linearidade significativo indica que o modelo é inadequado. Atenção deve então ser dedicada para descobrir onde e como esta inadequação ocorre. Desvio da linearidade não significativo indica que não existem razões para duvidar da adequação do modelo [SOUZA, 2007].

Tabela 11: Teste de significância da regressão e o desvio da linearidade

ANOVA da Regressão e Teste de Desvio de Linearidade (Falta de Ajuste)

fonte	G.L.	SQ	MQ	F	p
regressão	1	7,75E+00	7,75E+00	4,41E+02	2,05E-11
resíduos	13	2,29E-01	1,76E-02		
Ajuste	4	1,38E-01	3,46E-02	3,46E+00	5,65E-02
total	14	7,98E+00			

A Tabela 12 apresenta os resultados para os testes anteriormente apresentados, ela nos apresenta os valores críticos para o teste de significância da regressão ($p < 0,001$) e o valor crítico referente a desvio da linearidade ($p > 0,05$).

Tabela 12: Resumo da Avaliação Estatística

Homogeneidade de variância	
Há Homocedasticidade	$p > 0,05$
Regressão e Teste de Desvio de Linearidade	
A regressão é significativa	$p < 0,001$
Não há desvio de Linearidade	$p > 0,05$
Autocorrelação dos Resíduos ($\alpha = 0,05$)	
Não há autocorrelação	$d > dU$
Teste de Normalidade ($\alpha = 0,05$)	
Segue a Normal	$Req > Rcrit$

5.1.3 Limite de Detecção (LD) e Limite Quantificação (LQ) para a análise do PCF por Eletroforese Capilar:

O LD é a menor quantidade do analito, presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas [BRASIL, 2003]. Enquanto o LQ é definido como a menor concentração do analito que pode ser quantificada na amostra com exatidão e precisão aceitável sob as condições de análises estabelecidas [BRASIL, 2003]. A seguir apresenta-se na Figura 15 o gráfico contendo o intervalo de confiança, para o LD e LQ em nosso estudo. Esta relação foi obtida através da curva construída com os valores das áreas corrigidas versus as concentrações das alíquotas, aonde foi feita a utilização do recurso estatístico da planilha eletrônica do Analyte (Microsoft Excel versão 5.0/Chemical-1991), baseado nas formulações de Miller & Miller, (1986).

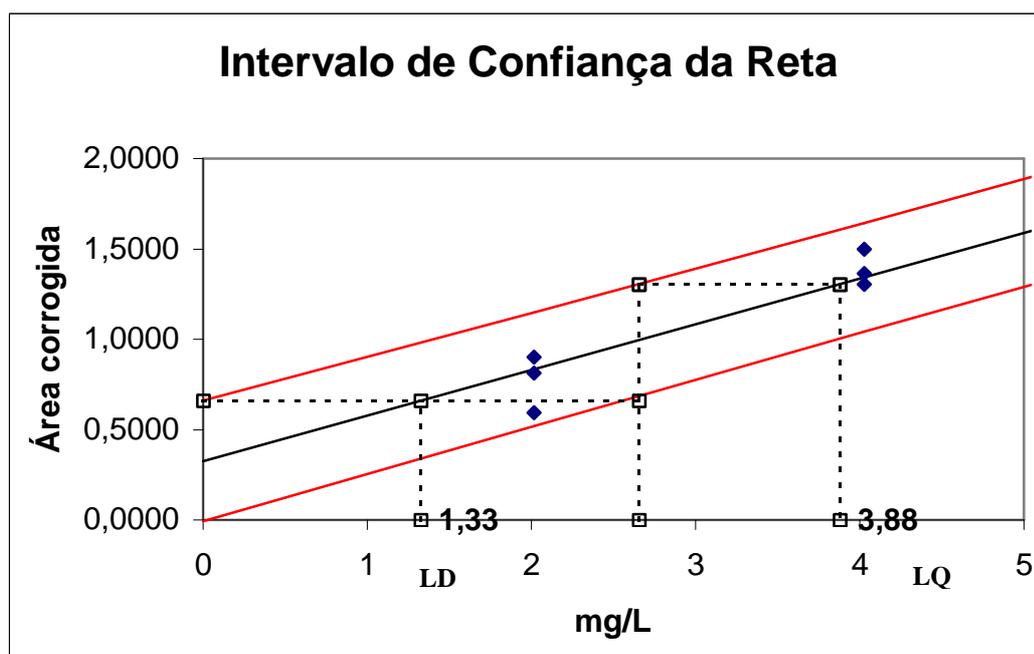


Figura 15: Gráfico da reta para determinação do LD e LQ

5.2 Análise das Amostras:

O ensaio de migração se mostrou bastante eficiente para estudo dos possíveis contaminantes nos alimentos, como pode ser comprovado pela presença do PCF no solvente simulante. Esses resultados vêm corroborar o trabalho de Choi et al., (2002), que utilizaram a técnica de migração em papéis e papelões a fim de detectar a presença de possíveis contaminantes, usando como solvente simulante água destilada. Os autores detectaram a presença de vários contaminantes dentre eles o PCF, que pode ser detectado através de (CG-DIC/ cromatografia gasosa acoplado ao detector por ionização em chama), enquanto nesse trabalho foi utilizada uma outra metodologia analítica para detecção dos preservantes de madeira. No ensaio de migração utilizou-se como solvente simulante uma mistura hidroalcoólica de acordo com a Comissão da Comunidade Européia (1994), etanol em água destilada a 95% e 50% v/v, obedecendo aos critérios de temperatura e tempo de contato conforme as diretrizes da Portaria nº 177- [BRASIL, 1999]. Esta Portaria aprova o Regulamento Técnico "Disposições Gerais para Embalagens e Equipamentos Celulósicos em Contato com Alimentos" e seus Anexos, neste trabalho foi feita uma adaptação já que em nossa legislação ainda não temos disponível regulamentos técnicos que abordem os materiais de madeira que entram em contato com os alimentos nas amostras descritas anteriormente.

5.2.1 Análise por Eletroforese Capilar:

Nos últimos anos a eletroforese capilar por fluxo livre tornou-se uma das mais notáveis técnicas de separação na análise de um grande número de espécies químicas, caracterizada pela alta eficiência, e tempo reduzido de análise, [TURNES et al., 1996]. Conforme foi descrito na parte sobre o detalhamento da metodologia das condições experimentais, a análise do PCF foi feita por eletroforese capilar através de introdução hidrodinâmica da amostra no modo em solução livre.

As amostras foram injetadas e seus tempos de migração foram comparados aos tempos de migração da solução padrão, as amostras que apresentaram o mesmo tempo de migração da solução padrão necessitaram de outras análises confirmatórias, que possam identificar aquela substância como sendo o PCF, pois somente com os tempo de migração não teríamos uma análise muito conclusiva.

A seguir apresentam-se nas Figuras 16, 17 e 18 dois eletroferogramas por figura, um eletroferograma representando a solução padrão de PCF e o outro representando o nosso solvente simulante em diferentes ensaios de migração, as amostras utilizadas foram palitos de picolé e palitos de dentes.

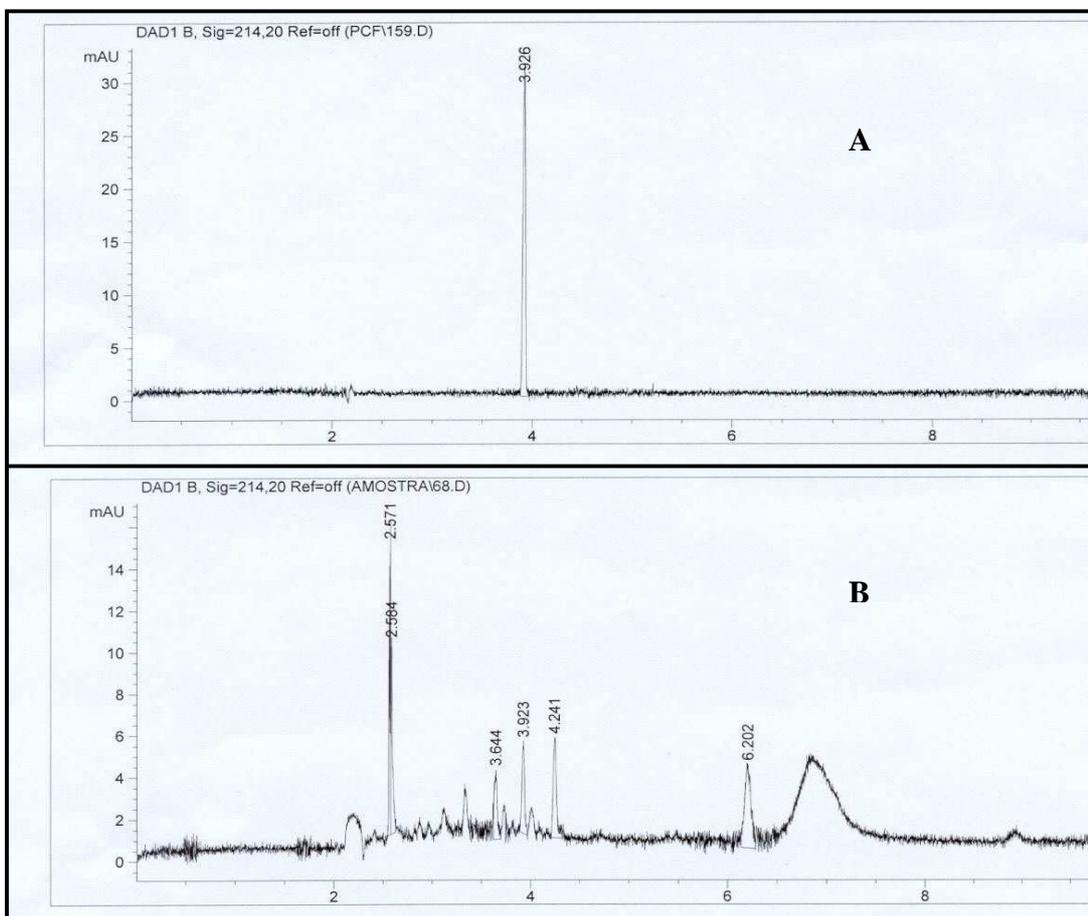


Figura 16: Eletroferograma da solução padrão de PCF 50 mg/L (A) e da amostra palitos de picolé (B) solvente simulante, etanol/H₂O 95% v/v, tempo de contato 10 dias e temperatura de 5°C

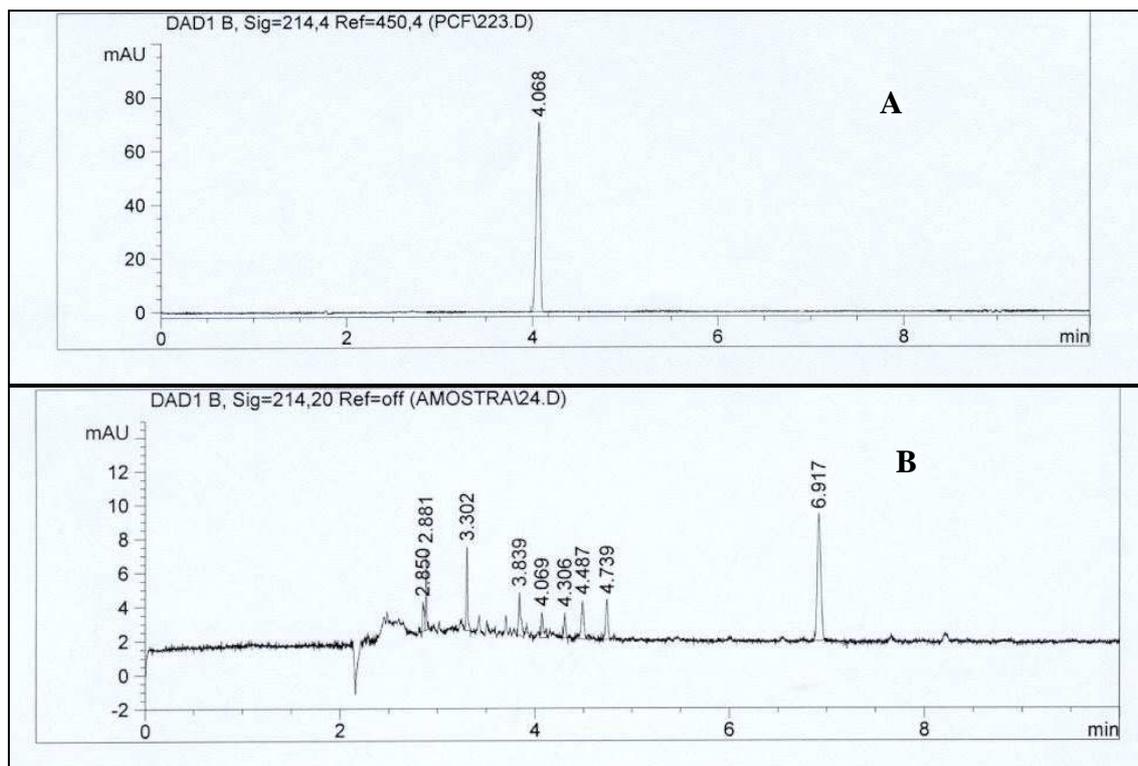


Figura 17: Eletroferograma da solução padrão de PCF 50 mg/L (A) e da amostra palitos de picolé (B) solvente simulante, etanol/H₂O 50% (v/v), tempo de contato 10 dias e temperatura de 5°C

Segundo Li et al. (1996) a separação por eletroforese capilar é baseada na diferença das mobilidades eletroforéticas dos solutos. Embora a técnica de eletroforese capilar seja uma excelente técnica para separação é necessário avaliar as condições experimentais cuidadosamente para se alcançar o máximo da separação seletiva. O comprimento e o diâmetro do capilar, a tensão aplicada, concentração do tampão e temperatura são fatores importantes na eficiência da separação e no tempo de análise. A eficiência da mobilidade eletroforética pode ser modificada pela otimização das seguintes variáveis descritas anteriormente, a fim de se alcançar a mais alta resolução entre os solutos migrantes. Podemos observar no eletroferograma de nossas amostras uma eficiente separação dos picos ali presentes, no qual apareceram diversos outras substâncias no eletroferograma, por ser tratar de uma matriz complexa.

Os nossos resultados corroboram com os resultados de Turnes et al., (1996) na qual a eletroforese capilar usando o sistema de detecção espectrofotométrica por conjunto de diodo (DAD) permitiu o controle da pureza dos picos assim como a confirmação da identidade dos picos de PCF.

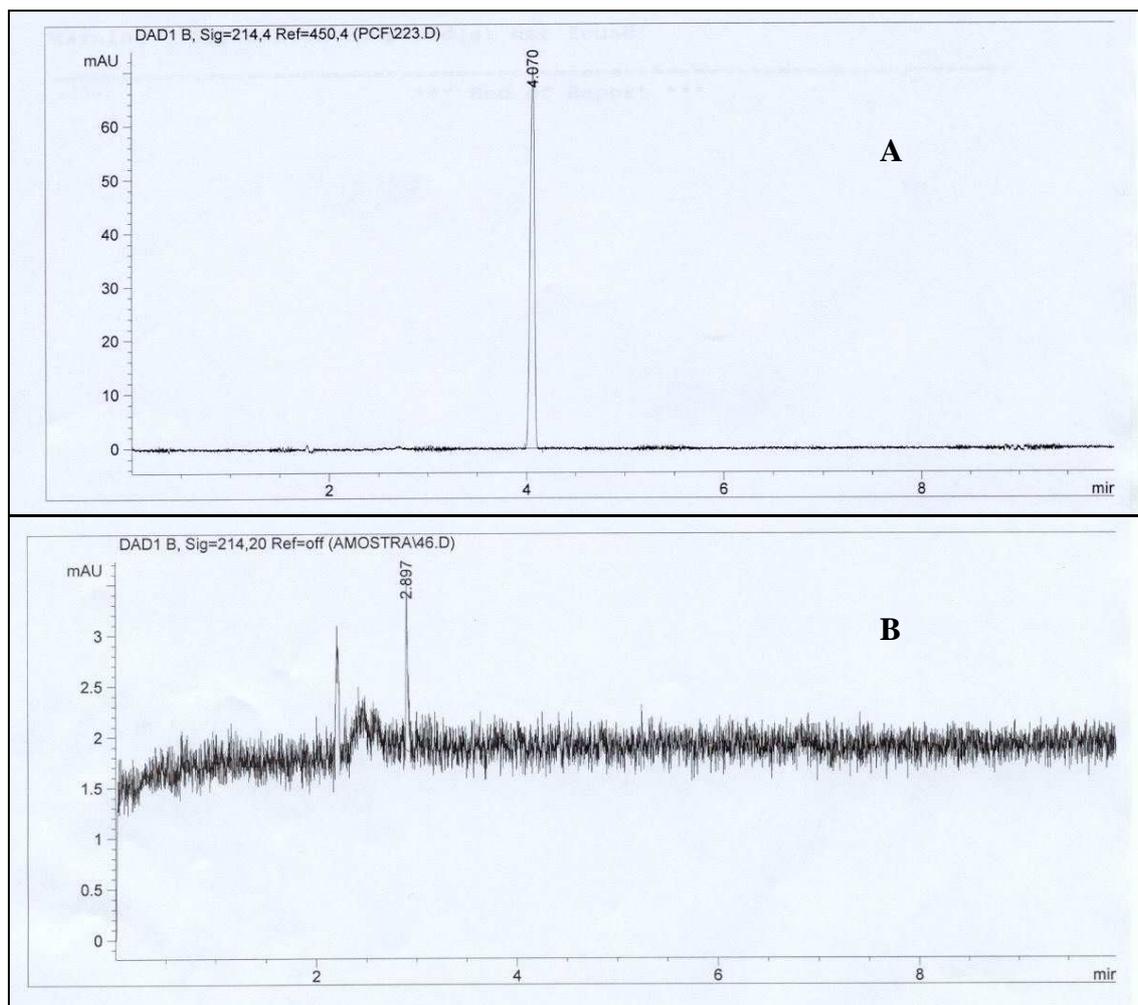


Figura 18: Eletroferograma da solução padrão de PCF 50 mg/L (A) e da amostra de palitos de dente (B) em solvente simulante, etanol/H₂O 95% v/v, tempo de contato 10 dias e temperatura de 5°C

Nesta amostra não houve confirmação nos tempos de migração entre a solução padrão e a amostra utilizada no estudo.

5.2.2 Análise do espectro de ultra violeta (UV):

O detector espectrofotométrico por conjunto de díodo (DAD) é uma excelente ferramenta para comprovação da identidade da substância química.

Foram introduzidas diferentes soluções padrões, a fim de compor um banco de dados, com as possíveis substâncias que poderiam estar presentes em nossas amostras, dentre elas diferentes organoclorados e seus isômeros posicionais, alguns desses também utilizados na preservação de materiais de madeira, tais como: 2, 3, 5, 6 tetraclorofenol (TCF); 2, 3, 4, 5- TCF; 2, 3, 4, 6- TCF; 2, 3, 5 triclorofenol (TCF); 2, 4, 5-TCF; 2, 4, 6 TCF. Estas substâncias irão formar uma “biblioteca” de espectros no equipamento.

A partir disto poderíamos fazer uma análise qualitativa sobre a presença do possível contaminante em nossas amostras, através da seleção do pico presente no eletroferograma, temos a formação do seu espectro no UV. Então é feita uma análise comparativa com as substâncias presentes na biblioteca de espectros do equipamento. E o equipamento nos fornece uma tabela na qual ela compara o espectro fornecido com aquele presente no banco de dados do equipamento quanto mais próximo de mil, maior a possibilidade de se confirmar sobre a presença do possível contaminante em sua amostra.

A seguir apresenta-se na Figuras 19 o espectro da solução padrão de PCF 100 mg/L, em três dimensões (3D).

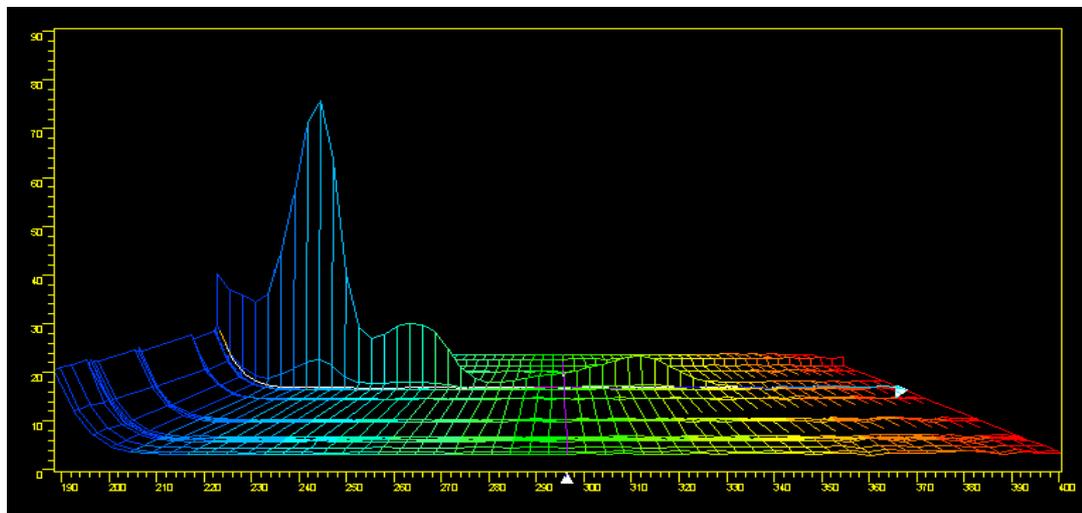


Figura 19: Espectro em três dimensões da solução padrão de PCF 100 mg/L

Foi realizada uma análise comparativa entre o espectro da solução padrão e um espectro específico da solução de solvente simulante da amostra. A seguir apresentaremos na Figura 20 o eletroferograma do solvente simulante da amostra composta por palitos de picolé.

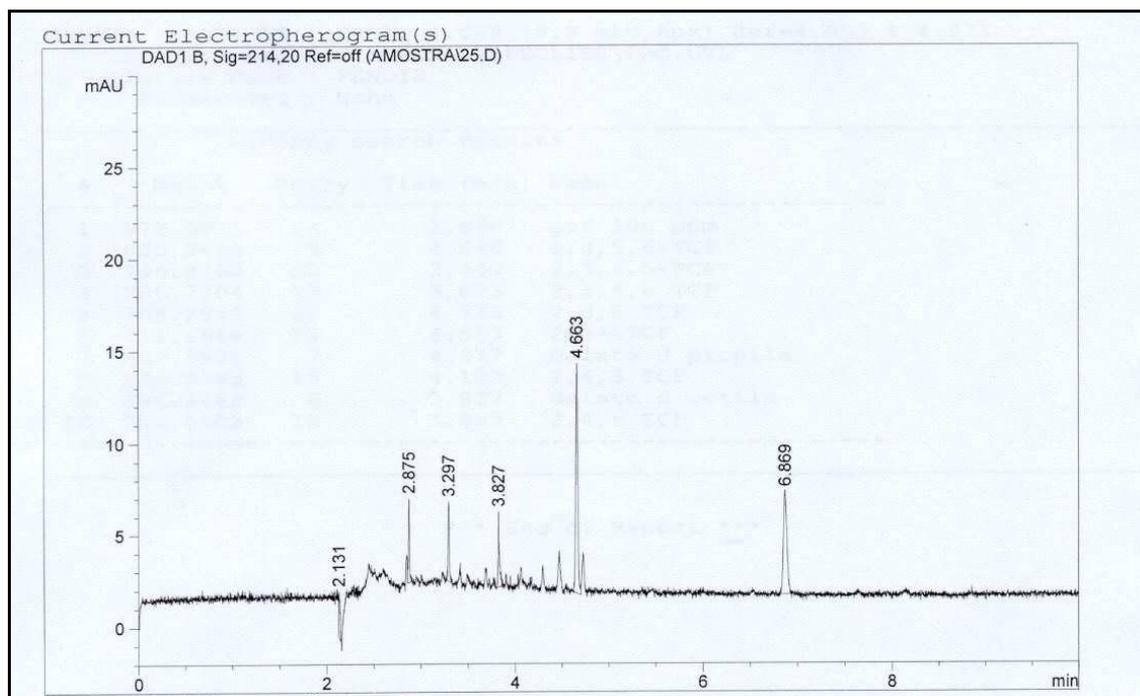


Figura 20: Eletroferograma do solvente simulante Etanol/H₂O 50 %, palitos de picolé

Conforme apresentado na Figura 20 foi selecionado o pico com tempo de migração de **4.663** min, pelo fato de que este pico possui o mesmo tempo de migração da solução padrão de PCF.

A seguir apresentaremos na Figura 21 uma análise comparativa dos espectro sobrepostos da solução padrão de PCF e do espectro do pico selecionado na Figura 20, além da Tabela 13 que apresenta o índice para confirmação das substâncias.

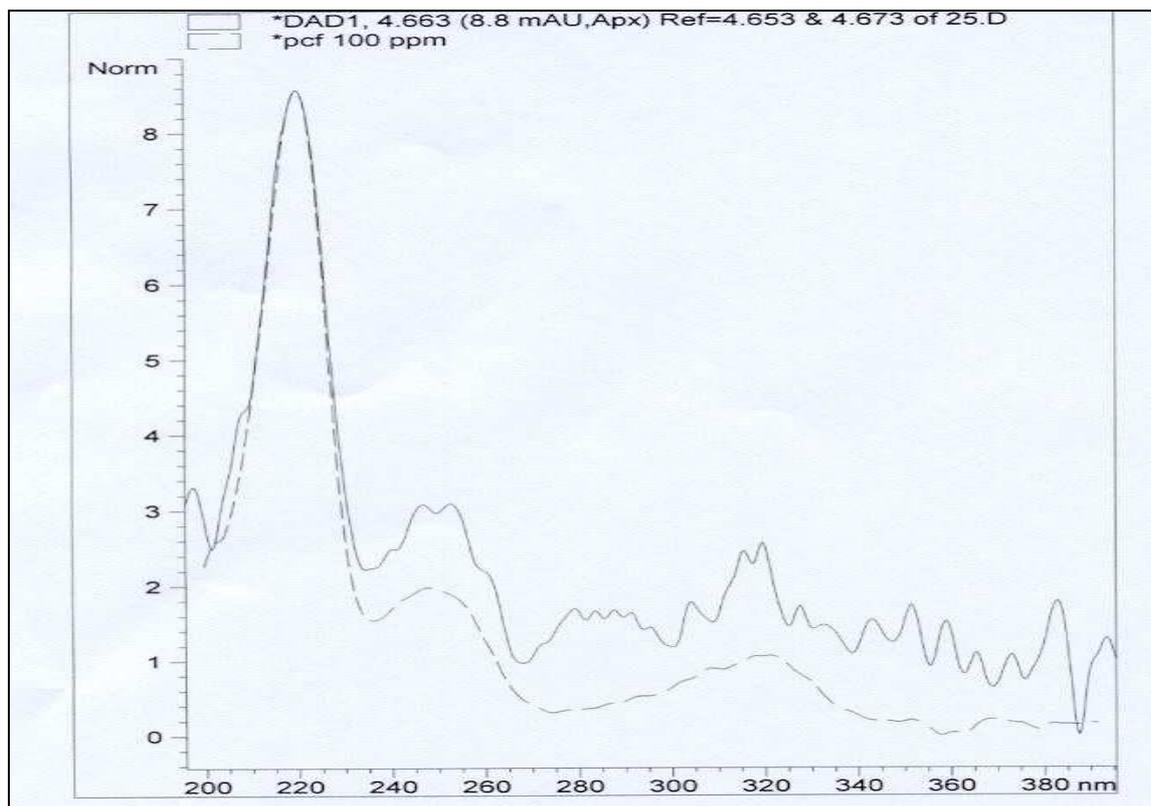


Figura 21: Espectros da solução padrão de PCF (linha contínua) e do solvente simulante, etanol/H₂O 50 % v/v, pico 4,663 min (linha tracejada).

Tabela 13: Índice de confirmação através dos espectros das substâncias

Search result of : DAD1, 4.663 (8.8 mAU, Apx) Ref=4.653 & 4.673
 Library used : C:\HPCHEM\SPECLIBS\LAC.UVL
 Library Name : FENOIS
 Parameters : None

Library search results

#	Match	Entry	Time [min]	Name
1	972.0841	10	3.860	pcf 100 ppm
2	880.8406	19	4.040	2,3,5,6-TCF
3	796.8790	20	3.747	2,3,4,5-TCF
4	756.7204	18	3.873	2,3,4,6 TCF
5	708.2949	17	4.733	2,3,5 TCF
6	611.6644	14	4.557	2-3-6TCF
7	592.9631	7	4.277	Galato d propila
8	590.9783	15	4.193	2,4,5 TCF
9	586.4482	6	3.827	Galato d octila
10	585.5602	12	3.883	2,4,6 TCF

Pode-se observar uma semelhança muito grande entre os espectros sobrepostos e o valor de **972.1** na Tabela 13 o que vem reforçar as nossas suspeitas, sobre a presença do PCF em nossas amostras.

Segundo Tsai & Her (1996), os tempos de retenção são frequentemente usados para identificação dos compostos, os tempos de retenção (tempos de migração) da eletroforese capilar não são tão reprodutíveis quanto os tempos de retenção da cromatografia gasosa e cromatografia líquida, então existe um enorme risco na identificação dos analitos baseados somente nos tempos de retenção. Conforme foi mencionado acima somente o tempo de migração não nos serviria como uma análise confirmatória da presença do contaminante PCF nas amostras. Foi a partir disto que se partiu para outras análises confirmatórias.

5.2.3 Análise por CG-DCE:

Domeño et al., (2005) utilizaram como metodologia analítica a CG-DCE para determinação do pentaclorofenol em embalagens celulósicas que entram em contato com os alimentos, onde o método envolvia uma técnica de extração do PCF. O procedimento otimizado foi aplicado para a análise do PCF em cinco amostras de papel virgem e reciclado. O conteúdo de PCF foi determinado por CG-DCE e se mostrou efetivo com o método proposto. Utilizamos a mesma técnica dos autores citados anteriormente para realização da determinação analítica confirmatória.

A seguir os cromatogramas obtidos pela CG-DCE, apresentados na Figura 22 e Figura 23 da solução padrão e da solução de migração, respectivamente.

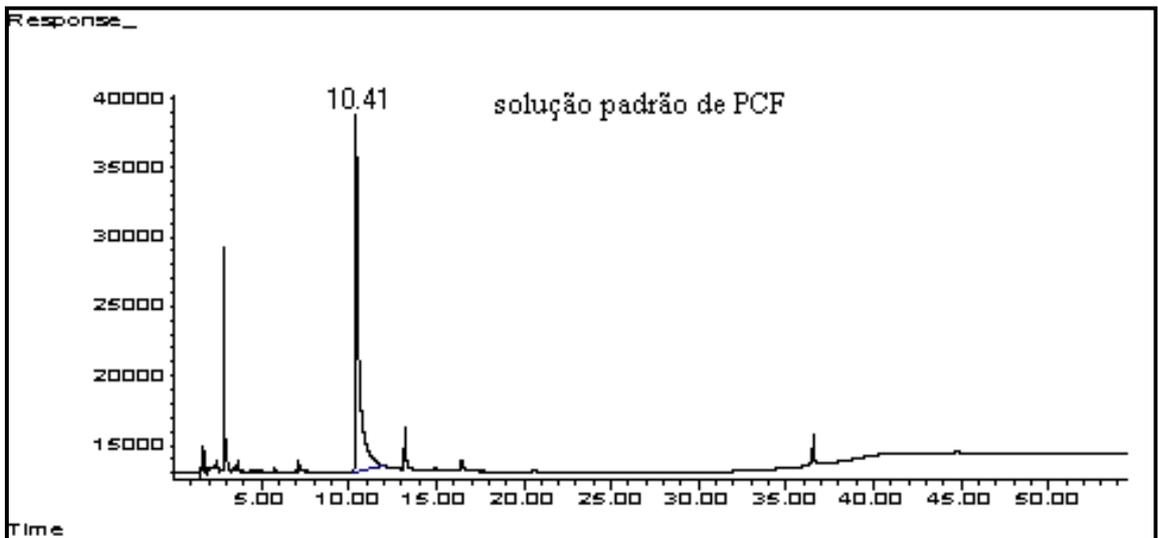


Figura 22: Cromatograma da solução padrão do PCF 50 mg/L

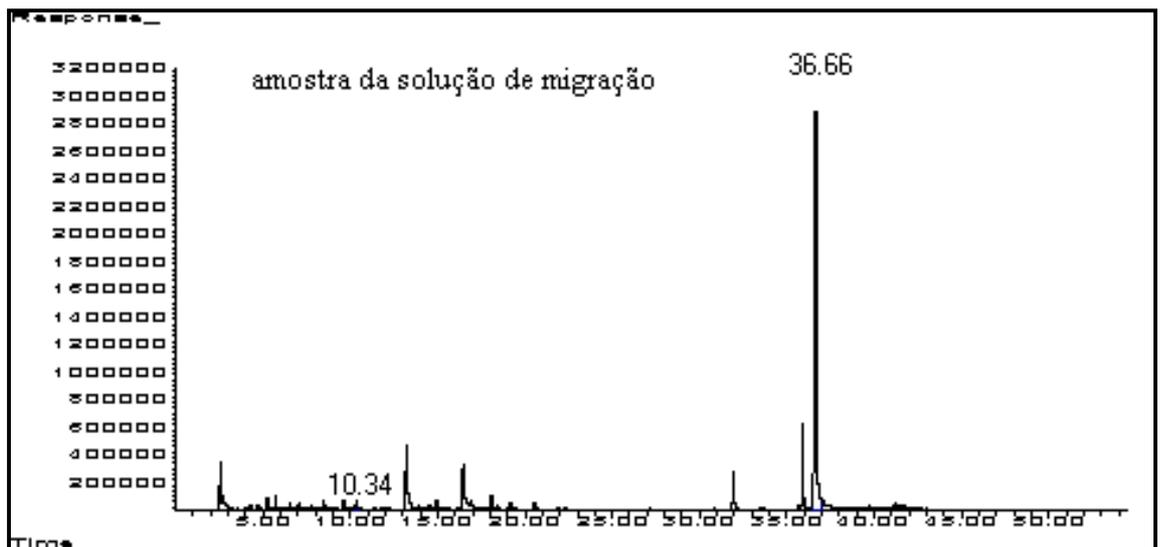


Figura 23: Cromatograma da solução de migração

Nossos resultados estão de acordo com os achados de Buhr et al., (2000) que utilizaram a CG-DCE como metodologia analítica sendo que os autores utilizaram a técnica de extração com posterior tratamento dos extratos antecedendo a determinação analítica. Neste nosso trabalho para determinação no CG-ECD foram analisados o solvente simulante diretamente dos nossos ensaios de migração.

Outros trabalhos descritos na literatura também reportam a utilização de CG-DCE para determinação de clorofenóis em diferentes tipos de materiais usados em embalagens. Segundo trabalho de Insa et al. (2004), os autores também utilizaram uma mistura hidroalcoólica, etanol em água 12% v/v para extração em fase sólida, seguido da determinação analítica de Tri-, Tetra- e PCF em um macerado de rolhas. Os autores ainda utilizaram da reação de derivatização por acetilação para tratamento das amostras antecedendo a introdução no equipamento de CG-DCE.

A nossa injeção foi direta sem nenhum tipo de tratamento prévio. De acordo com vários trabalhos descritos na literatura ao qual também utilizam a CG-DCE recomenda-se a utilização da técnica de derivatização por acetilação para o tratamento das amostras [BECKER, et al., 2002/ BUHR et al., 2000]. Neste trabalho obteve-se uma boa resolução dos picos sem a utilização da técnica de derivatização.

5.2.4 Análise por CG-DSM:

Segundo Tsai & Her (1996), a eletroforese capilar possui muitas aplicações, entretanto a informação fornecida por esta técnica frequentemente não é o bastante para uma identificação confiável dos analitos. A espectrometria de massa tem sido considerada como uma técnica ideal para detecção cromatográfica por causa do seu baixo limite de detecção, alta especificidade e abundante informação estrutural. Embora para algumas substâncias que sejam degradadas termicamente e não são voláteis não devendo assim ser analisadas diretamente pela CG-DSM, representando assim uma desvantagem da cromatografia frente a eletroforese capilar.

A eletroforese capilar aparece como uma excelente alternativa pela alta eficiência na separação e pode ser facilmente aplicada para substâncias não voláteis ou termicamente degradáveis. Alguns trabalhos reportam a análise em eletroforese capilar acoplada ao detector seletivo de massa (EC-DSM) para análise de contaminantes ambientais [TAKEDA et al., 2001].

Foram feitas algumas análises utilizando um cromatógrafo a gás acoplado a um detector seletivo de massas (CG-DSM), na tentativa de chegarmos a resultados mais conclusivos a respeito da presença do PCF em nossas amostras, além daqueles resultados obtidos nos eletroferogramas (tempo de migração) e nos cromatogramas (tempo de retenção). Os trabalhos da literatura que reportam a utilização do CG-DSM também mencionam o uso da técnica de derivatização. A derivatização por acetilação trata-se de uma técnica bastante específica para fenóis permitindo assim uma melhor seletividade ao método e, portanto melhor separação e sensibilidade para os fenóis [KAWAGUCHI et al., 2004].

A seguir apresenta-se alguns cromatogramas obtidos pela análise de nossas amostras no CG-DSM, na Figura 24 a solução padrão de PCF derivatizado e na Figura 25 e a solução da amostra derivatizada.

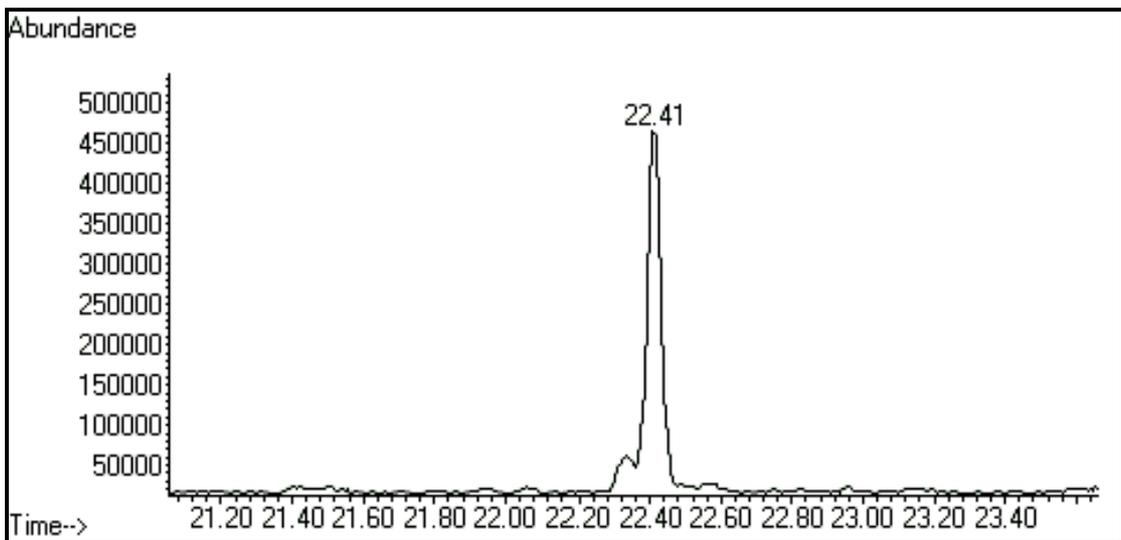


Figura 24: Cromatograma da solução Padrão de Pentaclorofenol derivatizado – 1 mg/L

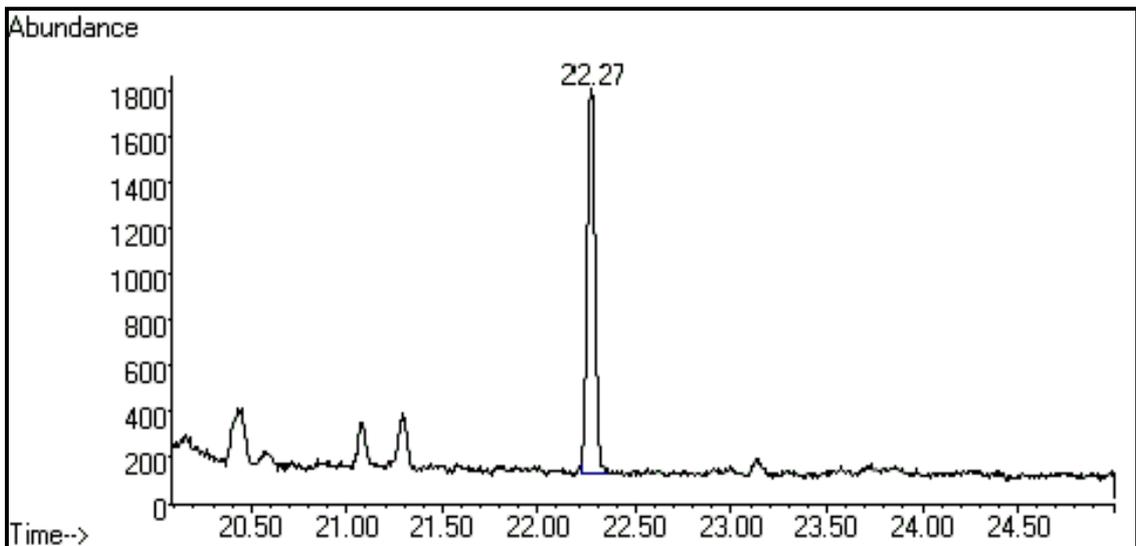


Figura 25: Cromatograma da solução da amostra derivatizada

Além dos cromatogramas, apresenta-se também os espectros de massa da solução padrão e da solução da amostra, contidos na Figura 26 e Figura 27.

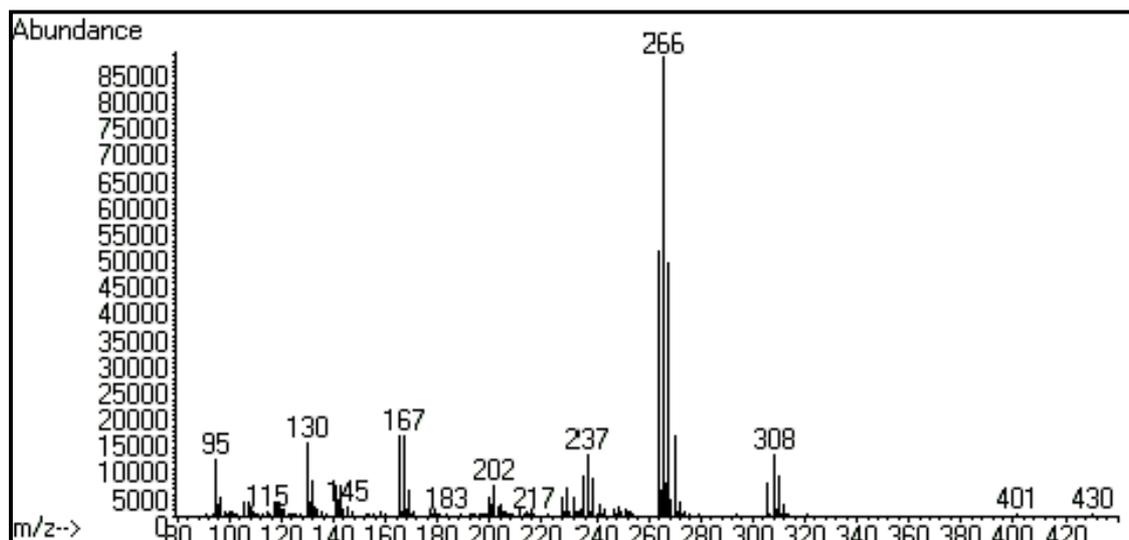


Figura 26: Espectro do padrão de Pentaclorofenol derivatizado – 1mg/L (modo SCAN).

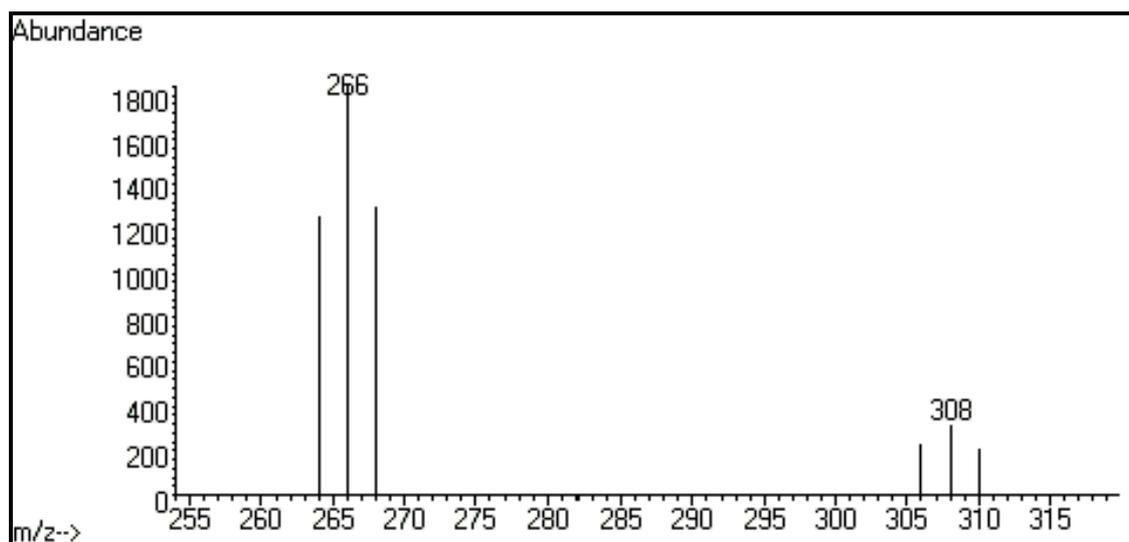


Figura 27: Espectro da amostra derivatizada (modo SIM)

Neste tipo de análise optou-se pela técnica de extração de nossas amostras, ao invés do ensaio de migração, seguido de um tratamento posterior antes da injeção propriamente dita, que foi a derivatização do PCF, ali presente.

Neste trabalho utilizamos a técnica de Becker et al., (2002) com adaptações para o método de Buhr, et al., (2000).

Com a técnica de derivatização conseguiu-se uma boa resolução e separação em nossas amostras conforme apresentado nos cromatogramas, (Figuras 24 e 25) o que vem corroborar com os trabalhos descritos na literatura que utilizam como metodologia analítica (CG-DSM), Kawaguchi et al. (2004) obtiveram uma boa separação de várias espécies de clorofenóis analisadas em diferentes tipos de amostras, águas de rios, águas de torneira e amostras de urina humana, usando a técnica de derivatização e metodologia analítica (CG-DSM). Os espectros de massa de Kawaguchi et al. (2004) vêm confirmar os nossos achados em termos dos picos de fragmentação do PCF.

Nesta análise foi feita a opção pelo modo (SIM- modo de monitoração dos íons selecionados) no espectrômetro de massa ao modo (SCAN) pelo fato do modo (SIM) ser mais seletivo ao PCF.

5.2.5 Quantificação Estimada do PCF nas Amostras por Eletroforese Capilar:

Após a construção da curva analítica o próximo passo foi o estudo para quantificação das amostras para a presença do PCF, o que pode ser confirmado em nossas análises. Para quantificação utilizamos o aplicativo “Analyte” como ferramenta de trabalho. Onde a área corrigida demonstrada pelo equipamento de eletroforese capilar após as introduções de nossas amostras foi aplicada na planilha do “Analyte” nos dando uma concentração a partir dos dados lançados para a construção da curva analítica conforme apresentado na Tabela 14:

Tabela 14: Análise quantitativa para o PCF em nossas amostras

<u>Amostras</u>	<u>Área corrigida</u>	<u>Concentração (mg/L)</u>
Palitos de picolé em Et-OH 50 % v/v	4,49	12,92

Para um estudo em embalagens podemos fazer um extrapolação considerando a densidade de cada líquido igual a unidade. Desta forma, as concentrações obtidas em mg/L são numericamente equivalentes a mg/kg [ABRANTES, 1998].

Neste ensaio utilizamos um volume de 50 mL da mistura etanol e água destilada 50% v/v e foi feita uma relação para se calcular o quanto aquela concentração demonstrada na Tabela 19, representaria no volume total de 50 mL, usados como solvente simulante. Conforme a determinação 12,92 µg está em 1,0 mL então para 50 mL teríamos uma massa de **0,65** mg. Foi levado em consideração que no estudo de migração foram usados três palitos como amostras, conforme apresentado nas Figura 7 e 8, então a massa encontrada deve ser dividida por três ($0,65 \text{ mg} / 3 = \mathbf{0,21}$ mg). Esta é a massa de PCF referente a um palito que migrou para o solvente simulante.

5.2.6 Estimativa de Exposição ao PCF:

O PCF é uma substância extremamente tóxica quando ingerido por humanos, a provável dose letal está em torno de 50 a 500 mg/kg (p.c.) para um adulto de 70 kg, conforme apresentado na Tabela 1 é considerado como sendo **muito tóxico**.

Segundo a EPA para se avaliar o risco de um efeito crônico é utilizado a dose oral de referência (DOR) que é expressa em mg/kg/dia. A DOR é definida como sendo uma estimativa de dose oral a qual uma população está diariamente exposta sem apresentar riscos perceptíveis de efeitos deletérios durante a vida [<http://www.epa.gov/iris/gloss8.htm>]. A seguir apresenta-se na Tabela 15, alguns valores para NOAEL, LOAEL e NOEL, segundo Schwetz et al., *apud* EPA, 1984.

Tabela 15: Resumo das Doses orais de referência (DOR).

Efeito crítico	Dose Experimental/ p.c.
Aumento do peso do fígado	NOAEL: 10 mg/kg/ dia
Estudo de toxicidade crônica em ratos	NOEL: 3 mg/kg/dia
Teratogenicidade subcrônica em ratos	NOEL: 3 mg/kg/dia
Fetotoxicidade em ratos durante gestação	LOAEL: 5 mg/kg/dia

NOAEL: Maior dose que não se observa efeito tóxico

LOAEL: Menor dose em que não se observa efeitos tóxicos.

NOEL: Nível de efeito não observado.

A dose de 3,0 mg/kg/dia foi a dose oral obtida no estudo crônico realizado em ratos, na qual não foi observado a ocorrência de efeitos tóxicos, sendo assim considerada como NOAEL crônica, esta dose foi empregada para o cálculo da dose de referência para exposição oral crônica do PCF.

A dose descrita acima é aceita como base para o cálculo da ingestão diária aceitável (IDA). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), define a IDA como sendo a quantidade de agente químico presente nos alimentos, expressado pelo peso corpóreo (p.c.), que pode ser ingerido diariamente por toda vida sem riscos perceptíveis à saúde [IPCS, 1987].

Para o cálculo da IDA utilizaremos a NOAEL dividido pelo fator de segurança $NOAEL=3,0 \text{ mg/p.c./dia}$, fator de segurança= 100 (10 para uma faixa de segurança quando se aplica a seres humanos, pois a dose deve ser dez vezes menos sensível aos humanos; e 10 pela extrapolação a partir de animais para humanos= 100) chega-se $IDA=0,03 \text{ mg/p.c./dia}$ para uma ingestão crônica de PCF. Assumindo que o peso médio de um homem é de 70kg, este valor da IDA é de $0,03 \times 70 = 2,1 \text{ mg/dia}$ [<http://www.epa.gov/iris/subst/0086.htm>].

O valor encontrado em nossas análises foi de **(0,21 mg)**. Ozaki et al., (2004) encontraram valores para o PCF na faixa de (0,054 - 0,11 $\mu\text{g/g}$) em papéis reciclados utilizados como embalagens de alimentos, os autores utilizaram a CG-DSM como metodologia analítica.

O nosso resultado é cerca de dez vezes inferior ao valor estimado da IDA para o PCF $2,1 \text{ mg/p.c./dia}$. O que não minimiza em nada o problema já que o PCF é uma substância classificada como fungicida para preservação de madeira, a serem usadas no campo e não deveria nunca estar presente num material que está em contato direto com o alimento.

De acordo com a Resolução nº 164 de 08 de agosto de 2006, a ANVISA vem acompanhando uma tendência mundial para o banimento desse ingrediente ativo. Foi feita uma reavaliação toxicológica e considerando a sua persistência ao meio ambiente e a sua toxicidade para homens e animais. A ANVISA determina que ficam proibidos todos os usos do ingrediente ativo PCF e seus sais no Brasil [BRASIL, 2006].

5.3 Análise do C8Q:

Em nossas análises não puderam ser confirmadas a presença do C8Q, de acordo com as nossas análises a metodologia de eletroforese capilar pode ser aplicada para determinação do C8Q.

A seguir apresenta-se na Figura 28 um eletroferograma com a solução padrão contendo o C8Q em confronto com um eletroferograma da solução solvente simulante, a amostra utilizada foi o palito de picolé com solvente simulante (Et-OH/H₂O- 50%).

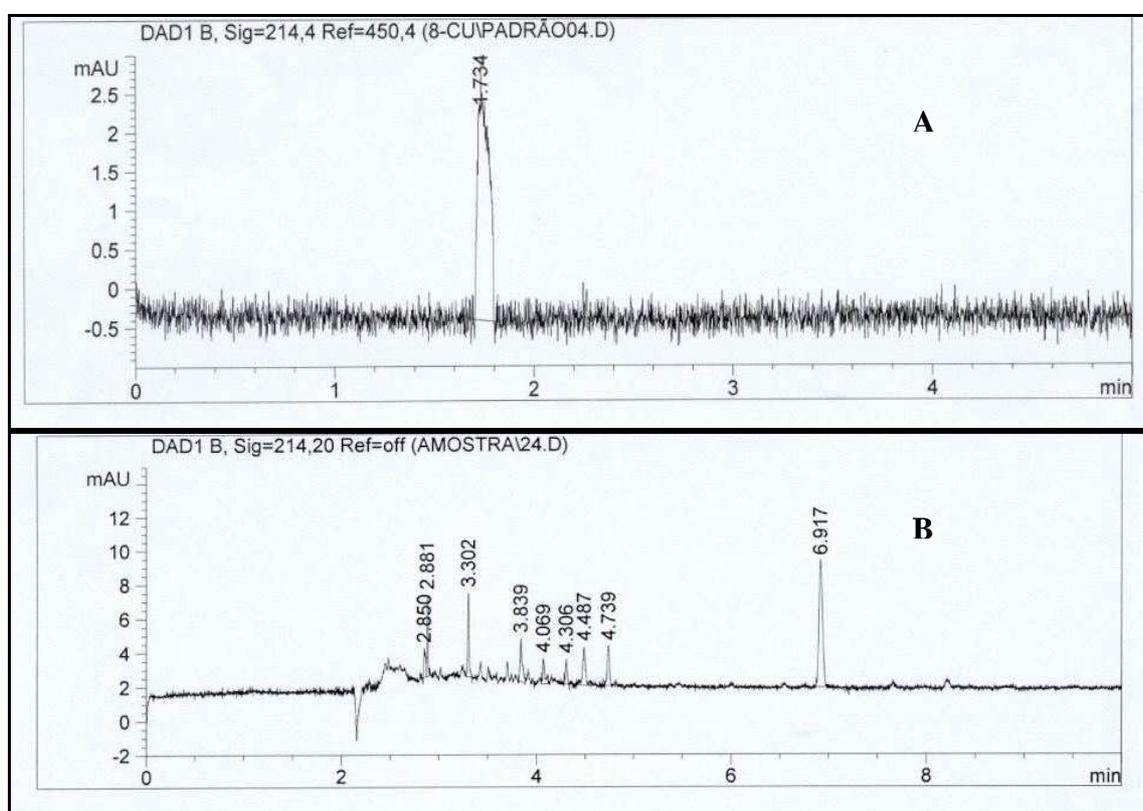


Figura 28: Eletroferograma da solução padrão de C8Q 10mg/L (A) e da amostra (B) palitos de picolé solvente simulante, etanol/H₂O 50% v/v.

Apesar de haver semelhança devemos estar atentos pois a escala que indica os tempos de migração das substâncias, para a solução padrão de C8Q o seu tempo de migração foi de 1,704 min e em nossas amostras não houve nenhum pico antes de 2 min.

Em nenhuma das amostras estudada houve o aparecimento de algum pico que fosse semelhante ao tempo de migração do C8Q, talvez pelo fato do alto custo desta substância o que inviabilizaria a sua utilização como preservante de madeira nas amostras estudadas.

5.4 Análise Toxicológica:

A seguir são mostrados os resultados dos ensaios de citotoxicidade, ensaio de viabilidade celular mediado pelo FDA (30 µg/mL) e brometo de etídio (8 µg/mL), e de genotoxicidade (ensaio Cometa) do PCF e C8Q, em células sanguíneas humanas *in vitro*. Adicionalmente para o C8Q, são mostrados os resultados do mesmo ensaio em células HTC. Estes ensaios foram realizados no laboratório de mutagenicidade do departamento de farmacologia e toxicologia do INCQS/FIOCRUZ.

5.4.1 Ensaio de Citotoxicidade do PCF:

Os efeitos toxicológicos induzidos pelo PCF têm sido estudados em diversos sistemas biológicos tanto *in vitro* como em *in vivo*. Os resultados de diferentes estudos sugerem que o PCF seja um composto altamente tóxico a plantas e organismos aquáticos, promotor carcinogênico em roedores [UMEMURA et al., 1999], além de desregulador endócrino e provável carcinógeno em humanos [IARC,1991]. O mecanismo celular da citotoxicidade deste composto organoclorado é ainda pouco compreendido [FERNÁNDEZ FREIRE et al., 2005].

A seguir na Tabela 16 são mostrados os dados referentes ao nosso ensaio de citotoxicidade:

TABELA 16: Ensaio de Citotoxicidade do PCF em células sanguíneas humanas após tratamento de 2 h

Grupos	Percentual de decréscimo de viabilidade celular
Controles	
Sangue	0%
DMSO 5%	6%
PCF 10 µg/mL (38µM)	6%
PCF 13 µg/mL (49 µM)	6%
PCF 17 µg/mL (64 µM)	7%
PCF 22 µg/mL (83 µM)	7%
PCF 29 µg/mL (109 µM)	9%
PCF 37 µg/mL (139 µM)	13%
PCF 48 µg/mL (180 µM)	14%
PCF 72 µg/mL (270 µM)	16%
PCF 94 µg/mL (353 µM)	25%

O PCF na faixa de concentrações de 38 a 109 µM não foi citotóxico quando comparado ao controle solvente (DMSO 5% v/v), com decréscimo de viabilidade celular (DVC) de 6% e foi citotóxico na faixa de 139 a 353 µM com valores de DVC de 13% a 25%, logo a mais alta concentração de PCF 353 µM causou DVC abaixo de 30%. Para o ensaio Cometa excluímos as duas concentrações iniciais de PCF 38 e 49 µM por apresentarem semelhante percentual de DVC (6%).

5.4.2 Ensaio Cometa do PCF:

O ensaio Cometa foi empregado para se avaliar o nível de dano ao DNA causado pelo PCF em células sanguíneas humanas e assim verificar a sua genotoxicidade. O PCF vem sendo descrito pelo Programa Nacional de Toxicologia dos Estados Unidos da América (NTP/USA) como sendo uma substância genotóxica.

A seguir apresentam-se na Tabela 17 e nas Figuras 29 e 30 os resultados do ensaio Cometa do PCF em células sanguíneas humanas *in vitro*.

TABELA 17: Ensaio Cometa do PCF em células sanguíneas humanas após o tratamento de 2 h

Grupos	Classes de Danos ao DNA			
	0	1	2	3
Sangue	75	24	1	0
DMSO 5%	74	13	7	6
PCF 17 µg/mL (64 µM)	78	8	10	4
PCF 22 µg/mL (83 µM)	94	4	1	1
PCF 29 µg/mL (109 µM)	74	8	10	8
PCF 37 µg/mL (139 µM)	66	29	3	2
PCF 48 µg/mL (180 µM)	57	25	8	10
PCF 72 µg/mL (270 µM)	44	33	11	12
PCF 94 µg/mL (353 µM)	58	28	6	8
MMS 160µM	8	46	42	4

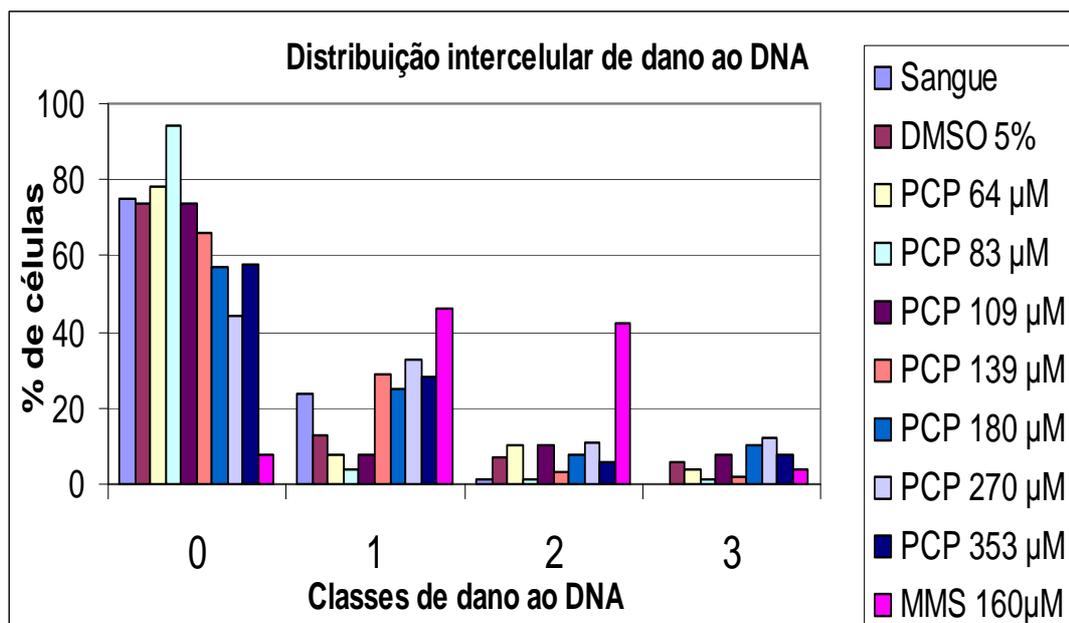


Figura 29: Ensaio Cometa do PCF em células sanguíneas humanas *in vitro*.

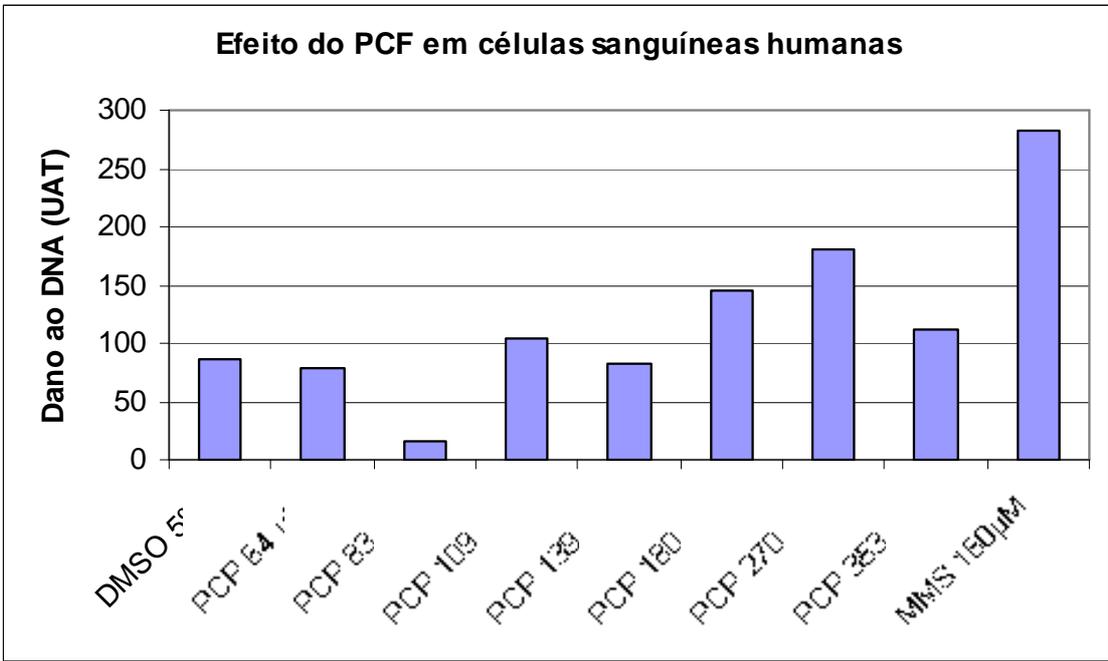


Figura 30: Ensaio Cometa do PCF em células sanguíneas humanas *in vitro*.

O PCF na faixa de concentrações testada de 17 a 94 µg/mL (64 a 353 µM) não induziu dano ao DNA estatisticamente significativo ($p > 0,05$) quando comparado ao controle DMSO 5% (solvente) não induzindo genotoxicidade *in vitro* em células sanguíneas humanas. O controle positivo (MMS 160 µM) induziu dano ao DNA altamente significativo ($p < 0,01$) demonstrando a sensibilidade do ensaio Cometa na detecção da genotoxicidade.

Contextualizando os resultados deste trabalho com os de Ozaki et al., (2004) que no ensaio Cometa do PCF em células promielocíticas de leucemia humanas (HL-60) detectou na concentração de 50 µg/mL (188 µM) alto nível de dano ao DNA em relação ao controle solvente (DMSO 1%), porém tal efeito porém estava associado a uma alta letalidade celular (49% de DVC). Ozaki et al., (2004) concluíram que o efeito detectado foi causado por apoptose e não por efeito direto ao DNA e o PCF foi considerado não genotóxico em células HL-60.

Pavlica et al., (2001) detectaram efeito genotóxico em hemócitos de *Dreissena polymorpha* Pallas, um molusco de água doce, em concentrações de PCF de 80, 100, 150 µg/l através do ensaio Cometa. Tal estudo foi realizado visando o monitoramento ambiental quanto a genotoxicidade das águas do rio Sava na cidade de Zagreb (Croácia).

Os resultados deste os de Ozaki et al., (2004) estão em discordância com os resultados de Pavlica et al., (2001), porém utilizamos sistemas celulares diferentes (células sanguíneas humanas e HL-60) tratadas por 2 h enquanto Pavlica et al., (2001) realizou um estudo *in vivo* tratando *D. polymorpha* Pallas durante 7 dias.

Pavlica et al., (2001) sugeriram como mecanismo de genotoxicidade o desacoplamento da fosforilação oxidativa mitocondrial causada pelo PCF, que inibe a síntese de ATP aumentando o consumo de oxigênio em animais tratados o que pode gerar uma maior produção de espécies reativas de oxigênio que podem causar quebras nas fitas de DNA.

Na avaliação da mutagenicidade do PCF em células de mamífero *in vitro* apresentado na Tabela 5 mostra que o PCF (6,25 a 50 µg/mL) na ausência e presença de ativação metabólica (hepatócitos de ratos) não induziu gênica no locus *hprt* em células V79 [JANSSON & JANSSON, 1986, HATTULA & KNUUTINEN, 1985]. Em células CHO o PCF (10 a 100 µg/mL) não induziu aberrações cromossômicas na ausência da mistura S9, porém foi mutagênico (10 a 80 µg/mL) na presença da mistura S9 de fígado de rato induzido pelo Aroclor 1254 [GALLOWAY et al., 1987].

No teste de Ames (Anexo II), o PCF em DMSO, na faixa de concentrações de 0,3 a 30 µg/placa na presença da mistura S9 de fígado de ratos induzidos pelo Aroclor 1254 não foi mutagênico nas cepas de *Salmonella typhimurium* TA 98, TA 100, TA 1535 e TA 1537 e foi também não mutagênico nas cepas TA 97A, TA 98 e TA 100, na ausência e na presença da mistura S9 quando testado em concentrações superiores de 2 a 200 µg/mL de PCF/placa [NCI/NTP, 1989; SEKINE et al., 1997].

Estudos realizados com o metabólito do PCF, o tetraclorohidroquinona-TCHQ, formado a partir da de cloração oxidativa do PCF induziu uma resposta mutagênica significativa em células de pulmão de hamster chinês (células V79) [JANSSON & JANSSON, 1991].

Adicionalmente Wang et al., (2001) verificaram em ratos Sprague-Dawley machos e em células de hepatoma humano (Hep G2) que a hepatotoxicidade do TCHQ foi mais acentuada do que a do PCF na indução de peroxidação lipídica. Espécies reativas de oxigênio podem estar envolvidas no mecanismo de intoxicação pelo TCHQ, pois os níveis urinários 8-epiPGF2α (relacionado a peroxidação lipídica) e as atividades das enzimas alanina e aspartato transaminases induzidas pelo TCHQ foram atenuados pelo tratamento com vitamina E (antioxidante).

Desta forma, para concluirmos sobre a genotoxicidade do PCF em células sanguíneas humanas é importante a realização do ensaio Cometa na presença de ativação metabólica

5.4.3 Ensaio de Citotoxicidade do C8Q em células sanguíneas:

A seguir na Tabela 18 apresentam-se os resultados do ensaio de citotoxicidade do C8Q em células sanguíneas:

TABELA 18: Ensaio de Citotoxicidade do C8Q em células sanguíneas humanas tratamento de 2 h

Grupos	Percentual de decréscimo de viabilidade celular
Controles	
Sangue	0%
DMSO 5%	4%
C8Q 0,25 µg/mL (0,7 µM)	4%
C8Q 0,5 µg/ml (1,4 µM)	5%
C8Q 1,0 µg/mL (2,8 µM)	5%
C8Q 2,0 µg/mL (5,7 µM)	11%
C8Q 4,0 µg/mL (11,3 µM)	12%
C8Q 8,0 µg/mL (22,7 µM)	13%
C8Q 20 µg/mL (56,8 µM)	28%
C8Q 30 µg/mL (85,4 µM)	36%
C8Q 40 µg/mL (113,6 µM)	64%

O C8Q na faixa de 0,7 a 2,8 µM não foi citotóxico, em relação ao controle solvente (DMSO 5%) com DVC de 4%. Considerável citotoxicidade foi observada na faixa de concentrações de 5,7 a 113,6 µM com valores de DVC de 11 a 64%. Nas duas últimas concentrações (85,4 a 113,6 µM) obtivemos valores de DVC de 36% e 64 % acima de 30%. A concentração de 85 µM por ter causado DVC de 36% próximo ao valor limite de 30% de letalidade celular [TICE et al., 2000]. Esta dose também foi incluída no ensaio Cometa.

5.4.4 Ensaio de Citotoxicidade do C8Q em células HTC:

A seguir apresentam-se na Tabela 19 os resultados do ensaio de citotoxicidade do C8Q em células HTC:

TABELA 19: Ensaio de Citotoxicidade do C8Q em células HTC
tratamento de 2 h

Grupos	Percentual de decréscimo de Viabilidade celular
Controles	
Sangue	4%
DMSO 1%	3%
C8Q 0,03 µg/mL (0,09 µM)	1%
C8Q 0,06 µg/ml (0,18 µM)	1%
C8Q 0,12 µg/mL (0,36 µM)	1%
C8Q 0,25 µg/mL (0,72 µM)	4%
C8Q 0,5 µg/mL (1,4 µM)	6%
C8Q 1,0 µg/mL (2,8 µM)	7%
C8Q 2,0 µg/mL (5,7 µM)	18%
C8Q 4,0 µg/mL (11,5 µM)	28%

O C8Q na faixa de concentrações de 0,03 a 0,25 µg/mL (0,09 a 0,72 µM) não foi citotóxico em relação ao controle solvente (DMSO 1%) com DVC de 3% sendo porém, citotóxico nas concentrações entre 0,5 a 4,0 µg/mL (1,4 a 11,5 µM) com valores de DVC de 6% a 28%, portanto abaixo do valor limite de 30% de letalidade celular. Conseqüentemente, para o ensaio Cometa em células HTC foram empregadas as oito concentrações de C8Q testadas no ensaio de citotoxicidade.

5.4.5 Ensaio Cometa do C8Q em células sanguíneas:

O C8Q é considerado como sendo um fungicida de baixa toxicidade aguda (DL₅₀ oral para ratos 4700 mg/kg, 9000 mg/kg para camundongos) e a dose de referência para exposição é de 0,05 mg/kg por dia. Alguns estudos têm demonstrado que o C8Q tem induzido genotoxicidade em bactérias e em células de mamífero através do mecanismo de geração de espécies reativas de oxigênio. No teste de Ames o C8Q causou mutações pontuais em *Salmonella typhimurium* TA 100 [YOU et al., 2001].

Segundo Moriya et al., (1983) estudos considerando a mutagenicidade do C8Q são limitados e inconclusivos. Devido à escassez de dados a respeito da genotoxicidade desta substância em células de mamífero, o ensaio Cometa é uma alternativa interessante para a detecção da presença de quebras de fita única e dupla de DNA e de lesões em sítios álcalis sensíveis podendo assim identificar possíveis mutágenos e carcinógenos humanos [ANDERSON et al., 1999].

Segundo o IARC que classifica e estabelece critérios quanto à carcinogenicidade das substâncias, o C8Q está enquadrado no Grupo 3, que de acordo com a Tabela 3, como um “agente não classificável quanto a carcinogenicidade” [IARC, 1977].

A seguir apresentam-se na Tabela 20 e nas Figuras 31 e 32 os nossos resultados obtidos através do ensaio Cometa:

TABELA 20: Ensaio Cometa do C8Q em células sanguíneas humanas após o tratamento de 2 h

Grupos	Classes de Danos ao DNA			
	0	1	2	3
Sangue	99	1	0	0
DMSO 5%	95	3	2	0
C8Q 0,25µg/mL (0,7 µM)	95	2	1	2
C8Q 0,5 µg/mL (1,4 µM)	95	2	2	1
C8Q 1,0 µg/mL (2,8 µM)	95	4	0	1
C8Q 2,0 µg/mL (5,7 µM)	82	6	9	3
C8Q 4,0 µg/mL (11,3 µM)	84	6	5	5
C8Q 8,0 µg/mL (22,7 µM)	74	15	7	4
C8Q 20 µg/mL (56,8 µM)	59	23	12	6
C8Q 30 µg/mL (85,4 µM)	34	36	15	15
MMS 160µM	0	16	20	64

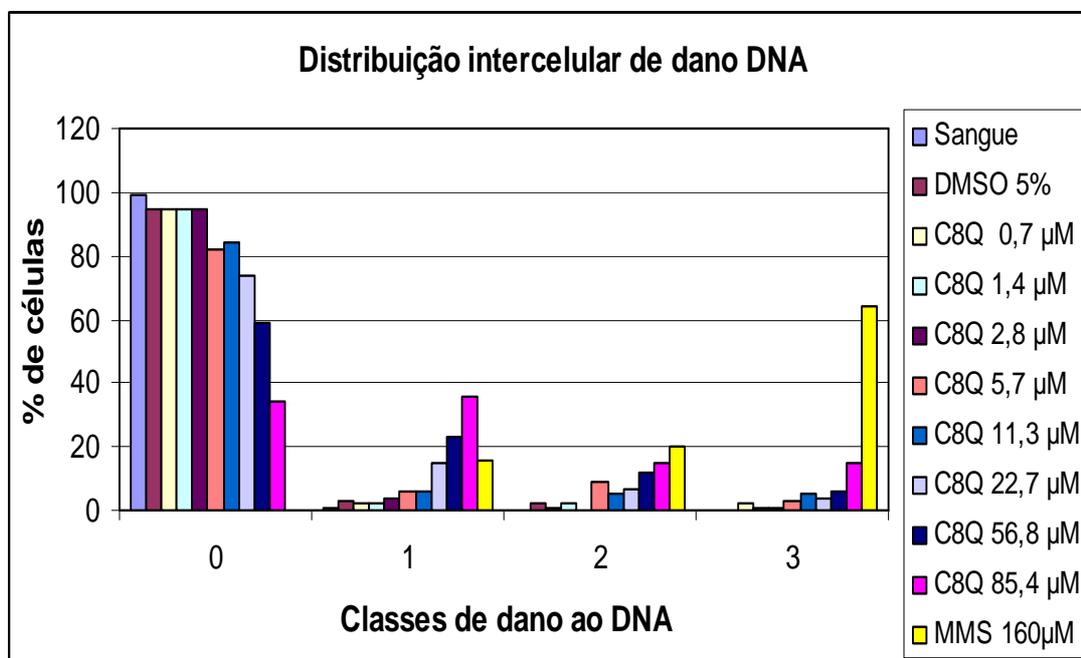


Figura 31: Ensaio Cometa do C8Q em células sanguíneas humanas *in vitro*.

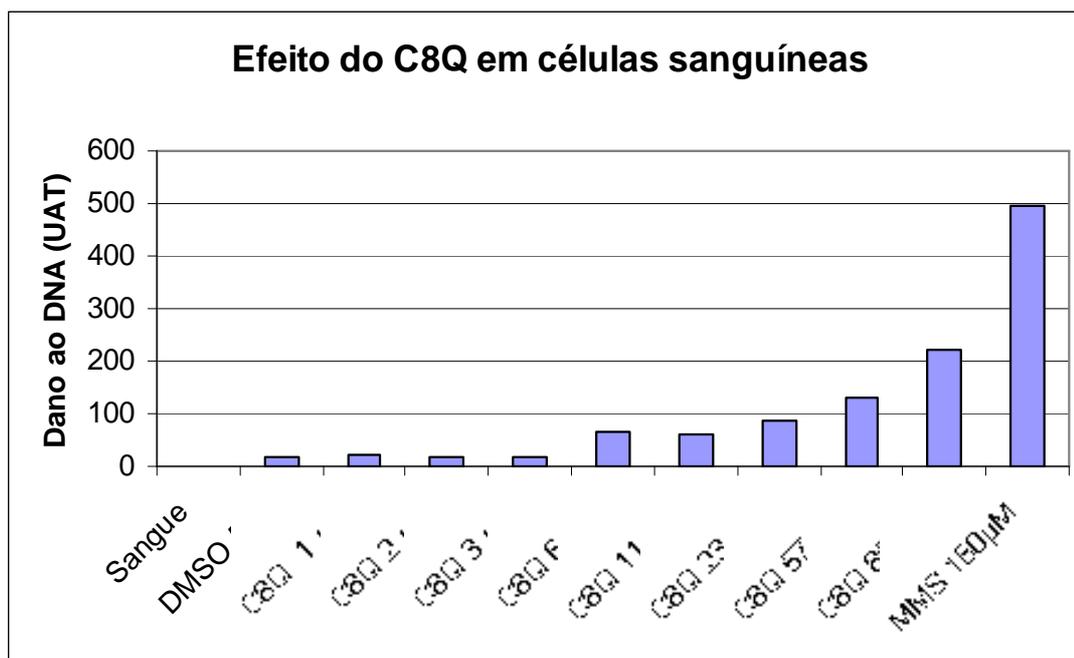


Figura 32: Ensaio Cometa do C8Q em células sanguíneas humanas *in vitro*.

O C8Q na faixa de concentrações testada de 2 a 30 µg/mL (5,7 a 85,4 µM) induziu dano ao DNA estatisticamente significativo ($p < 0,05$), pelo teste t de Student, quando comparado ao controle DMSO 5 % (solvente), induzindo a uma genotoxicidade *in vitro* em células sanguíneas humanas.

Os nossos resultados corroboram com os obtidos por You et al., (2001), que demonstraram a partir do ensaio Cometa do C8Q em células de mamífero, células V79 e HL-60 e no teste de Ames em bactérias *Salmonella typhimurium* (cepa TA100), que a genotoxicidade do C8Q ocorre pelo mecanismo de geração espécies reativas de oxigênio. O efeito genotóxico do C8Q no ensaio de mutação gênica em bactérias (teste de Ames) ou no ensaio de verificação de dano ao DNA (ensaio Cometa) em cultura de células foi bloqueado pela adição de vários antioxidantes tais como, N-acetilcisteína, Vitamina C e E.

A genotoxicidade do C8Q foi também muito questionada, pois o C8Q foi negativo em diferentes testes como em trocas entre cromátides irmãs e em aberrações cromossômicas, porém os resultados positivos obtidos no ensaio Cometa em células V79 e HL-60 foram atribuídos a You et al., (2001) a alta sensibilidade do ensaio Cometa na detecção de danos ao DNA, o que pode ser confirmado neste trabalho usando como modelo celular, células sanguíneas.

5.4.6 Ensaio Cometa do C8Q em células HTC:

Alguns estudos apontam uma substância estruturalmente semelhante ao C8Q, a 8-hidroxiquinolona sendo uma substância com atividade mutagênica e com potencial carcinogênico [YOU et al., 1999]. Na qual esta substância aparece como principal metabólito resultante do metabolismo hepático do C8Q [THE PESTICIDE MANUAL, 1994]. Daí surgiu a necessidade de reavaliação da mutagenicidade/carcinogenicidade do C8Q.

A partir desta contestação surgiu a necessidade de uma reavaliação da genotoxicidade do C8Q principalmente em sistemas celulares metabolicamente competentes, como as células HTC, potencialmente capazes de metabolizar o C8Q produzindo o 8-hidroxiquinolona.

A seguir apresentam-se na Tabela 21 e nas Figuras 33 e 34 os resultados obtidos no ensaio Cometa do C8Q.

TABELA 21: Ensaio Cometa do C8Q em células HTC após o tratamento de 2 h

Grupos	Classes de Danos ao DNA			
	0	1	2	3
Controle celular	91	8	1	0
DMSO 1%	86	12	2	0
PBS	96	2	1	1
C8Q 0,03 µg/mL (0,09µM)	94	4	2	0
C8Q 0,06 µg/mL (0,18 µM)	94	2	1	3
C8Q 0,12 µg/mL (0,36 µM)	94	3	0	3
C8Q 0,25 µg/mL (0,72 µM)	94	4	1	1
C8Q 0,5 µg/mL (1,4 µM)	96	3	1	0
C8Q 1,0 µg/mL (2,8 µM)	94	2	3	1
C8Q 2,0 µg/mL (5,7 µM)	77	20	1	2
C8Q 4,0 µg/mL (11,4 µM)	52	23	13	12
CP 9 mM	95	3	1	1

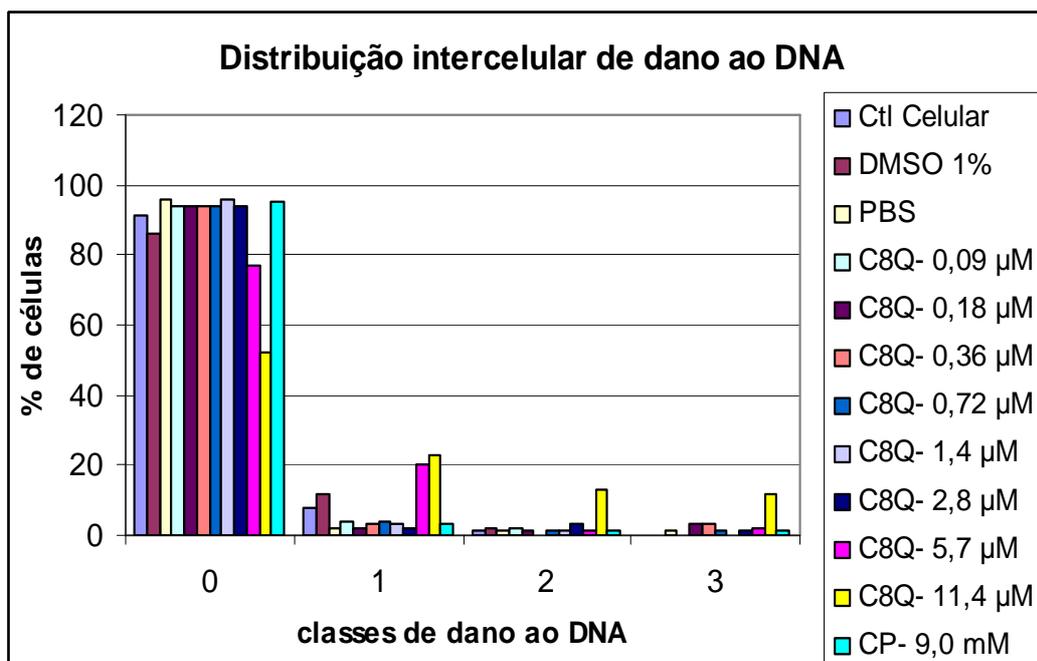


Figura 33: Ensaio Cometa do C8Q em células HTC *in vitro*.

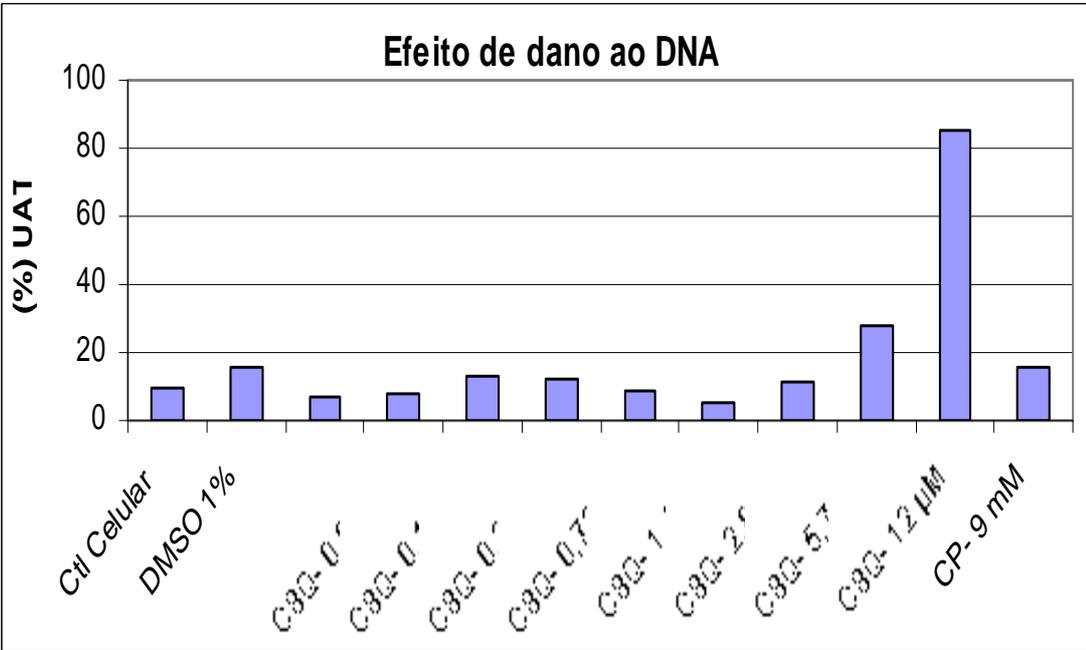


Figura 34: Ensaio Cometa do C8Q em células HTC *in vitro*.

Após a análise estatística pudemos verificar que o C8Q induziu a um dano estatisticamente significativo ($p < 0,05$) quando comparado ao controle DMSO 1 % (solvente), induzindo a uma genotoxicidade *in vitro* em células HTC. Nas concentrações de 4,0 µg/mL (12 µM) e 0,5 µg/mL (1,4 µM). Num estudo *in vivo* realizado por You et al., (1999) usando frações S9 de fígado de ratos o C8Q demonstrou um efeito na substituição do gene da histidina (his) em *Salmonella typhimurium* cepa (TA 100), e dano ao DNA em *Bacillus subtilis* e no teste de cromátides irmãs em células de ovário de hamster chinês (CHO). Entretanto o C8Q não induziu a resposta genotóxica nestes sistemas na ausência da fração S9, o que confirma a nossa suspeita sobre a atividade genotóxica de um dos metabólitos do C8Q.

6. CONCLUSÃO:

Este projeto é de extrema importância no que se refere ao uso dos preservantes de madeira, devido o fato da insuficiência de informações relacionadas à metodologia analítica e estudos envolvendo a genotoxicidade destes preservantes de madeira.

O ensaio de migração mostrou eficiência na transferência dos preservantes da madeira nos materiais estudados para o solvente simulante, possibilitando a análise no próprio solvente simulante, o ensaio de migração trata-se de ensaio de baixo custo e de fácil realização.

A metodologia analítica, de eletroforese capilar, possibilitou uma análise rápida, segura e eficiente dos preservantes de madeira, podendo ser realizada para quantificação do PCF nos artigos de madeira usados neste trabalho. O método proposto apresentou linearidade na faixa de concentração estudada para o PCF, possibilitando resultados confiáveis, e a determinação do limite de detecção do método.

O valor encontrado em nossas análises foi de 0,21 mg para o PCF, este valor é cerca de dez vezes inferior ao valor do índice de ingestão diária aceitável (IDA) calculado nesse trabalho. No entanto isto não minimiza em nada uma vez que esta substância não poderia aparecer neste tipo de material, pois como foi demonstrado através do ensaio de migração, existe a possibilidade da transferência destas substâncias dos materiais para alimento.

Além da técnica de eletroforese capilar podemos comprovar a presença do PCF com outras metodologias analíticas, tais como cromatografia gasosa com detector por captura de elétrons (GC-DCE) e cromatografia gasosa acoplada ao detector seletivo de massas (CG-DSM).

Neste trabalho não foi detectado em nenhum dos materiais estudados a presença do C8Q. Talvez seja pelo alto custo desta substância o que impossibilitaria a sua utilização em escala industrial.

Quanto a citotoxicidade em células sanguíneas humanas o C8Q na concentração de (5,7 μM) causou 13 % de DVC enquanto o PCF na concentração de (139 μM) causou 11 % de DVC, logo em termos molares o C8Q foi cerca de 24 vezes mais citotóxico do que o PCF.

O C8Q em células HTC na menor concentração citotóxica detectada 1,4 μM induziu a 6% de DVC foi em termos molares cerca de 4 vezes mais citotóxica do que a menor concentração tóxica do C8Q em células sanguíneas (5,7 μM) com DVC de 11%.

O PCF não foi genotóxico em células sanguíneas humanas *in vitro*, na faixa de concentração de 17 a 94 $\mu\text{g/mL}$ (64 a 353 μM) no ensaio Cometa na ausência de ativação metabólica.

O C8Q foi genotóxico em células sanguíneas humanas *in vitro* na faixa de concentração de 2 30 $\mu\text{g/mL}$ (5,7 a 85,4 μM) na ausência de ativação metabólica e em células HTC metabolicamente competentes apresentando uma concentração genotóxica de 4,0 $\mu\text{g/mL}$ (11,4 μM) no ensaio Cometa.

7. PERSPECTIVAS FUTURAS:

Em nosso trabalho temos a possibilidade de expandir ainda mais, seja na parte analítica como na parte toxicológica do nosso projeto. A seguir serão levantadas algumas hipóteses para futuros trabalhos seguindo a mesma linha de pesquisa desenvolvida neste projeto.

- Investigar nas amostras a presença de outros preservantes de madeira, diferente destes aqui estudados, pois nos eletroferogramas das amostras nota-se a presença de outros picos, investigar se poderiam ser outros preservantes de madeira;

- Avaliar nas amostras a quantidade de PCF pela técnica de derivatização e com isso fazer uma estimativa do percentual de migração do PCF que pode ser transferido para os alimentos

- Na parte toxicológica expandir os estudos com o PCF, no que diz respeito a ativação metabólica, já que foi investigado sobre os efeitos genotóxicos de um dos metabólitos do PCF, o tetraclorohidroquinona (TCHQ), usando células HTC da mesma maneira em foi feito com o C8Q.

- Estudar se outros preservantes usados no tratamento da madeira possuem efeito genotóxico;

- Usar o PCF e o C8Q em testes de mutagenicidade *in vitro*, como o teste de Ames.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

ABRANTES, S.; PHILO, M.; DAMANT, A.P.; CASTLE, L.; “Determination of Extractable in paper Food Packaging Materials Using Micellar Electrokinetic Chromatography” *J. Microcolumn Separations* 10(5): 387-391 (1998).

ABRANTES, S.M.P.; Uso da eletroforese capilar para a determinação da migração química em alimentos em contato com embalagens; Rio de Janeiro: Instituto de Química-UFRJ, 186p. Tese de doutoramento do curso de Pós-graduação em Química Orgânica, RJ (1998).

ACGHI: Threshold Limit Values (TLV) for Chemical Substances and Physical Agents and Biological Exposure Indices (BEI) American Conference of Governmental Industrial Hygienists Inc., Cincinnati, OH, (2003).

ACGIH: 2005 Threshold Limit Values (TLVs(R)) for chemical Substances and Physical Agents and Biological Exposure Indices (BEIs(R)), American Conference of Governmental Industrial Hygienists, Cincinnati, OH, 2005.

ANDERSON, D.; YU, T.W.; Mc GREGOR, D.B.; “Comet assay responses as indicator of carcinogen exposure” *Mutagenesis* 13:539-555 (1999).

ATSDR: Toxicological Profile for **PENTACHLOROPHENOL** (update:2001), Agency for Toxic Substance and Disease Registry, US Dept of Health and Human Service, disponível através do documento eletrônico <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp51-c3.pdf> acessado em 07/2007.

AGILENT TECHNOLOGIES, The principles of Capillary electrophoresis, disponível pelo endereço eletrônico em <http://www.chem.agilent.com/Scripts/generic.asp?lPage=833&indcol=N&prodcol=Y> acessado em 20 de setembro de 2007.

BECKER, R.; BUGE, H. G.; WIN, T.; “Determination of pentachlorophenol (PCP) in waste wood-method comparison by a collaborative trial” *Chemosphere* 47: 1001-1006 (2002).

BARLET, G.; BUGE, H.G.; GÖRNER, W.; WIN, T.; “Determination of Chlorine and Pentachlorophenol in Wood” *Fresenius J. Anal. Chem.*, 360:433-434 (1998).

BRASIL, Lei nº7.802 de 11 de julho de 1989, “Dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos das embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos e seus componentes afins e dá outras providências” publicada no Diário Oficial da União em 12 de julho de 1989.

BRASIL, Decreto nº 98.816 de 11 de janeiro de 1990, “Regulamenta a Lei nº 7.802 de 11 de julho de 1989”, publicada no Diário Oficial da União em 12/01/1990.

BRASIL, Ministério da Saúde, Secretária de Vigilância Sanitária, Portaria nº177 de 04 de março de 1999, Anexos, Regulamento Técnico: Disposições Gerais para Embalagens e Equipamentos Celulósicos que entrem em Contato com Alimento; Publicada no Diário Oficial da União em 08/03/1999.

BRASIL, Ministério da Saúde, Secretária de Vigilância Sanitária, Resolução nº 91, de 11 de maio de 2001, Anexos, Regulamentos Técnicos: Disposições Gerais para Embalagens e Equipamentos em contato com Alimentos. Publicado no Diário Oficial da União em 13/06/2001.

BRASIL, Ministério da Saúde, Secretária de Vigilância Sanitária, Resolução nº105, de 19 de maio de 1999, Anexos, Regulamentos Técnicos: Disposições Gerais para Embalagens e Equipamentos Plástico em Contato com Alimentos. Publicado no Diário Oficial da União em 20/05/1999.

BRASIL, Resolução RDC nº 130 de 10 de maio de 2002, “Alteras a Portaria nº 177/99, de 04 de março de 1999” publicada no Diário Oficial da União em 13/05/2002.

BRASIL, Ministério da Saúde, Secretária de Vigilância Sanitária, Resolução 165, de 29 de agosto de 2003. Anexos, Índice Monográfico Publicada no Diário Oficial da União em 02/09/ 2003.

BRASIL, Ministério da Saúde, Secretária de Vigilância Sanitária Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003, Determina a publicação do “Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos”. Publicada no Diário Oficial da União em 02/05/ 2003.

BRASIL, Ministério da Saúde, Secretária de Vigilância Sanitária, Resolução nº 164 de 18 de agosto de 2006. “Ficam proibidos todos os usos do Ingrediente Ativo Pentaclorofenol (PCF) e seus sais no Brasil”. Publicado no Diário Oficial da União em 21/08/2006.

BUHR, A.; GENNING C.; SALTHAMMER, T.; “ Trace analysis of pentachlorophenol (PCP) in wood and wood based products – comparison of samples preparation procedures” *Fresenius Journal Chemistry*, 367: 73-78 (2000).

CHEMKEYS, O seu site de química- Referência bibliográfica de documentos eletrônicos, www.chemkeys.com/bra/md/mds_11/elecav_4/aplica_2/aplica_2.htm arquivo consultado 07/2007.

CLAYTON, G. D.; CLAYTON, F.E.; Patty’s Industrial Higiene and Toxicology; v.2B. Toxicology, 4th ed, John Wiley & Sons, New York , NY pp (1605-1613) (1984).

CODE OF FEDERAL REGULATIONS, Title 21, Volume 3; Part 178, sub part D, Sec. 178.3800 Preservatives for wood-Food and Drugs Administration-FDA. Revised as of April 1, (2006)- www.accessdata.fda.gov/CFRsearch.cfm?FR=178.3800 arquivo consultado 06/2007.

COMMUNITIES OF EUROPEAN, commission Synoptic Document N.7 Draft of provisional list of monomer and additives used in the manufacture of plastics materials and coating intended to come into contact with foodstuffs Brussels. 301p. (document CS/PM/2356); (1994).

CHOI, J.O.; JITSUNARI, F.; ASAKAWA, F.; PARKS, H. J. & LEE, D.S. "Migration of surrogate contaminants in paper and paperboard into water through polyethylene coating layer" *Food Additives and Contaminants*, 19 (12):1200-1206 (2002).

CROSBY, N.T. "Food packaging materials; aspects of analysis and migration of contaminants, London: Applied Science ed., 190p, (1981).

DANIEL V.; HUBER W.; BAUER K.; *et al.*," Impaired *in-vitro* Lymphocyte response in patients with elevated Pentachlorophenol (PCP) blood levels" *Arch Environ Health* 50:287-292 (1995).

DFG: List of MAK and BAT Values, Report N°38, Deutsche Forschungsgemeinschaft, Commission for the Investigation of Health Hazard of Chemical Compounds in the Work Area, Wiley -VCH, Weinheim, Federal Republic of Germany, (2002).

DIMICHWARD H.; HERTZMAN C. & TESCHKE K.; "Reproductive effects of paternal exposure to chlorophenol wood preservatives in the Sawmill industry" *Scand J. Work Environ Health* 22:267-273 (1996).

DOMEÑO, C. MUNIZZA, G.; NERÍN, C.; "Development of a solid-phase microextraction method for direct determination of pentachlorophenol in paper and board samples: Comparison with conventional extraction method"; *Journal Chromatography A*, 1095: 8-15, (2005).

DRIESBACH, R.H.; Handbook of Poisoning: Preventions. Diagnosis and Treatment . 10th ed. Los Altos, CA: Lange Medical Publications, 364 (1980).

EPA (Environmental Protection Agency) Meted 8041, “Phenols by Gas Chromathography: Capillary Column Technique, Enviromental Protection Agency , Washington DC, 1995,p.1.

EPA (Environmental Protection Agency) vol. EPA/540/1-86/043, 33p. (1984), disponível no banco de dados TOXNET: <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-cgi-bin/sis/search/f?./temp/~S6rnYK:17:BODY>

FERNÁNDEZ FREIRE, P; LABRADOR, V; PÉREZ MARTÍN, J..M. HAZEN, M.J.; “ Cytotoxic effects in mammalian Vero cells exposed to pentachlorophenol ” *Toxicology* 210: 37-44 (2005).

FRANCO, G.; FONTE R.;TEMPINI, G., *et al.*.. “Serum bile acid concentrations as a liver function test in workers occupationally exposed to organic solvents” *Int Arch Occup Environ Health* 58:157-164 (1986).

GALLOWAY, S.M.; ARMSTRONG, M.J.; REUBEN, C.; COLMAN, S.; BROWN, B. CANNON C.; BLOOM, A.D.; NAKAMURA, F.; AHMED, M; DUKS, S.; RIMPO, J.; MARGOLIN, B.H.; RESNICK, M.A.; ANDERSON, B. and ZEIGER, E.; “Chromossome aberrations and sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells: Evaluations of 108 chemicals” *Environ. Mol. Mutagen.* 10 (suppl. 10): 1-175, (1987).

GOPALASWAMY, U.V.; & NAIR, C.K.K.; “DNA binding and mutagenicity of Lindane and its metabolites” *Environ. Contam Toxicol.* 49 (2): 300-305 (1992).

HARTMANN, A. & SPEIT, G.; “The contribution of citotoxicity to DNA effects in the single cell gel test (comet assay)” *Toxicology Letters*, 90:183-188 (1997).

HASSAN A.B.; HISELGMANN, H.;BASSAN H.M.; “Intravascular haemolysis induced by Pentachlorophenol” Br Med J. 291:21-22 (1985).

HATHAWAY G.J., PROCTOR N.H. & HUGHESJ.P.; “Chemical Harzards of the Workplace” 3rd ed. , Van Nostrand Reinhold Company , New York, NY, pp460-461 (1991).

HATTULA, M.L.; & KNUUTINEM, J. “Mutagenesis of mammalian cells in culture by chlorophenols , chlorocatecols and chloroguaicols” Chemosphere 14 (10): 1617-1625, (1985).

HENDERSON, L. ; et al.; “The ability of the comet assay to discriminate between genotoxins and cytotoxins” *Mutagenesis*, 13: 89-94, (1998).

HSDB: Hazardous Substances Data Bank. National Library of Medicine. Bethesda, M.D. (internet version), disponível por Thomson MICROMIDEX, Greenwood Village, CO (2000).

IARC, (International Agency Research for Cancer) vol.15; p.103, (1977) disponível em <http://monographs.iarc.fr/ENG/monographs/vol15/volume15.pdf> last updated: 26 March (1998): arquivo consultado em 07/2007.

IARC, (International Agency Research for Cancer) vol.13; p.101, (1977) disponível em <http://monographs.iarc.fr/ENG/monographs/vol13/volume13.pdf> last updated: 25 March (1998): arquivo consultado em 07/2007.

IARC, (International Agency Research for Cancer), Preamble In: Some Flame Retardants and Textile Chemicals, and Exposures in the Textiles Industry, IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans , vol.48, IARC, Lyon , pp.13-31 (1990).

IARC, International Agency Research for Cancer Research: Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans vol: 53, pp. 371-402 (1991) – disponível no banco de dados: <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search/f?.temp/~g2wybw:3:BODY> acessado em 21/05/2006.

- INSA, S.; SALVADÓ, V.; ANTICÓ, E.; “Development of solid-phase extraction and solid-phase microextraction methods for the determination of chlorophenols in cork macerate and wine samples”, *Journal of Chromathography A* 1047: 15-20, (2004).
- IPCS, International Programme on Chemical Safety, Principles for the safety assessment of food contaminants in food. WHO Environmental Health Criteria n°70 , Geneva: World Health Organization-(1987).
- JANKOWSKY, I.P.; Fundamentos da preservação de madeiras; USP/ESALQ; Departamento de Ciências Florestais; Documentos Florestais, Piracicaba (11):1-12,jun. (1990).
- JANSSON, K. & JANSSON V.; “ Inability of chlorophenols to induce 6-thioguanine- resistant mutants in V79 Chinese hamster cells” *Mutation Research*. 171 (2-3): 165-168 (1986).
- JANSSON, K. & JANSSON V.; “induction of mutation in v-79 Chinese Hamster cells by tetrachlorohydroquinone, a metabolic of Pentachlorophenol” *Mutation Research* 279: 205-208 (1992).
- JEF REYNOLDS: MARTINDALE: The Extra Pharmacopeia. The Pharmaceutical Press. London, U.K. (internet version); disponível por Thomson MICROMEDEX, Greenwood Village, CO (2000).
- KAMRIM, MICHAEL A. “Pesticides Profiles: Toxicity, Environmental Impact and Fate” Lewis Publishers, New York (1997).
- KAWAGUCHI, M.; ISHII, Y.; SAKUI, N.; OKANOUCI, N.; ITO,R.; SAITO,K.; NAKAZAWA, H.; “Stir bar sorptive extraction with *in situ* derivatization and thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry for determination of chlorophenols in water and body fluid samples” *Analytica Chimica Acta* (2004) – 533 (1):57-65- disponível em documento eletrônico www.elsevier.com/locate/aca

- KLAASEN, C. D.; AMDUR, M. O.; DOULL, J. Casarett & Doull's "Toxicology- The Basic Science of Poisons" International Edition. Fifth^{ed.} Mac Groxx-Hill Companies - New York (1996).
- KRAHN, D.F.; "Chinese hamster cell mutagenesis: a comparison of the CHO and V79 systems" *Annals New York Academy of Sciences* , 407:231-239 (1983).
- KUHR, W. Fundamentals of electrophoretic separations: Lecture 1 York: University York 18p. , Short course on capillary electrophoresis, aug 21-24 , Printed papers, (1995).
- LEHR, K.M.; WELSH, G.C.; BELL,C.D. e LICK, T.D. "The vapour-phase migration of styrene from general-purpose and high impact polystyrene into polystyrene into cooking oil"; *Food and Chemical Toxicology*, 31:793-798 (1993).
- LI, A.P.; "Primary hepatocyte as an *In Vitro* Toxicological System of Liver" In: GAD, S.C., ed- *In Vitro Toxicology*, New York, Raven Press, pp. 195-220 (1994).
- LI, G.; LOCKE, D.C.; "Nonionic surfactants for improving resolution of the priority pollutant phenols by micelle-modified capillary electrophoresis" *Journal Chromathography A*, 734: 357-365, (1996).
- LIU D.; MAGUIRE R.J.; PACEPAVICIUS G.J.; CAREY J.; "Microbial toxicity mechanism of copper-8-quinolinolate" *Env Toxicol and Water Quality*; 9(2): 95-101 (1994) disponível no banco de dados TOXNET em <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search/f?.temp/~D6BylC:60:BODY> acessado em out/2007.

- MAISTRO, E. L.; CARVALHO, J. C.T.; MANTOVANI, M. S.; “Evaluation of the genotoxic potencial of the *Caesaria sylvestris* extract on the HTC and V79 cells by the comet assay” *Toxicology in Vitro* 18: 337-342 (2004).
- MICROMEDEX[®] Healthcare Series: Document, Poisindex Managements: **PENTACHLOROPHENOL**, disponível em <http://www.thomsonhc.com/hcs/librarian/> acessado em 07/2007.
- MILLER, J.C.; MILLER, J.N.; “Statistics for Analytical Chemistry” Ellis Horwood Limited ; West Sussex-England, pp: 96-111 (1986).
- MONTEITH, D. K.; VANSTONE, J. “Comparison of DNA damage from genotoxicants using the microgel electrophoresis assay with primary cultures of rat and human hepatocytes” *Mutation Research* 345:79-86 (1995).
- MOORTHY B. & RANDEATH K.; “Pentachlorophenol enhances 9-hydroxybenzo[a]pyrene-induced hepatic DNA adduct formation in vivo and inhibits microsomal epoxide hydrolases and glutathione S-transferase activities in vitro: likely inhibition of epoxide detoxification by Pentachlorophenol.” *Arch Toxicol* 70:696-703 (1996).
- MORIYA, M.; OHTA, T.; WATANABE, T.; MIYAZAWA, K.; KATO, K.; SHIRAZU, Y.; “Further mutagenicity studies on the pesticides in bacterial reversion assay systems” *Mutation Research*, 116:185-216 (1983).
- Mc CONNEL E.E.; NTP (National Toxicology Program) Technical report on toxicology and carcinogenesis studies of PENTACHLOROPHENOL (Cas nº 87-86-5) in B6C3F1 mice (feed studies) Technical Report NTP: TR 349,5-11 and 83-86 (1989).
- MURPHY, P.G.; MACDONALD, D. A.; LICKYT.D. “The styrene migration from general-porpuse and high impact polysterene into solvents” ”; *Food and Chemical Toxicology*, 30:225-232, (1992).

NICOLETTI, G.; DOMALEWSKA, E.; BORLAND, R.; “Fungitoxicity of Oxine and Copper Oxinato: Activity spectrum, development of resistance and synergy” *Mycology Research* 103(9):1073-1084 (1999).

NCI/NTP Carcinogenesis Technical Report Series; National Cancer Institute/ National Toxicology Program; U.S. Department of Health and Human Services, TR-349 (1989).

OGA, SEIZI; “Fundamentos da Toxicologia” São Paulo: Ed. Atheneu-SP (1996).

OZAKI, A.; YAMAGUCHI, Y.; FUJITA, T.; KURODA, K.; ENDO, G.; “Chemical analysis and genotoxicological safety assessment of paper and paperboard used for food packaging”; *Food and Chemical Toxicology*, 42: 1323-1337 (2004).

PAVLICA, M.; KLOBUCAR, G.I.V.; MOJAS, N.; ERBEN R.; PAPEŠ, D.; “Detection of damage in haemocytes of zebra mussel using comet assay” *Mutation Research* 490 209-214 (2001).

POP n° 65.3330.011; *Ensaio Cometa*; Elaborado por: Helena Zamith;; palavras chaves: Ensaio SCG, Genotoxicidade, Dano ao DNA; rev.03; pg:1-61:(09/07/2007).

PRADO, M.A.; “Desenvolvimento e comparação de técnicas analíticas, CLAE e Eletroforese Capilar na determinação de corantes artificiais” Campinas, 116 fls- Dissertação de Doutorado – Curso de Pós-Graduação em Ciências dos Alimentos, UNICAMP- (2003).

PROCTOR N.H.; HUGHES J.P.& FISHMAN M.L.; “Chemical Hazards of the Workplace”; 2nd ed. JB Lippincott CO, Philadelphia , PA (1988).

PROUDFOOT, A. T.; Pentachlorophenol poisoning, *Toxicology Review*, 22:3-11 (2003).

- RABELO, M.S.; “Estudo de um caso de fechamento de circuito de processo Kraft com branqueamento TCF, com ênfase na caracterização, possibilidade de acúmulo e influência dos elementos não processuais” Florianópolis, 124fls.-Dissertação de Mestrado- Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química, UFSC- (2001).
- ROBERTS, H.J.; “Pentachlorophenol-associated aplastic anemi, red cell aplasia, leukemia and other blood disorders” *J. Fla Med Assoc.* 77:86-90 (1990).
- RUGMAN F.P. & COSSTICK R.; “Aplastic anemia associated with organochlorine pesticide: Case Reports and review of evidence” *J. Clin Pathol.* 43:98-101 (1990).
- SAI-KATO, T.; UMEMURA, T.; TAKAGI, A. *et al.*; “Pentachlorophenol-induced oxidative DNA damage in mouse liver and protective effect of antioxidants” *Food Chem Toxicol* 33: 877-882 (1995).
- SANTAMARTA, J. Trópico Especial: Por um futuro sem contaminantes orgânicos persistentes. Agroecologia e Desenvolvimento Rural Sustentável, Porto Alegre, v.2, n.1, p. 48-56, Jan./Mar. 2001.
- SARTORI, A.V. “Vigilância da qualidade da água para consumo humano” Rio de Janeiro, 88fls.-Dissertação de Mestrado-Curso de pós-graduação em Vigilância Sanitária/INCQS/Fiocruz (2007).
- SEILER, J.P.; “PENTACHLOROPHENOL” *Mutation Research*, 257:27-47 (1991}.
- SEKINE, K.; WATANABE, E.; NAKAMURA, J.; TAKASUKA, N.; KIM, D.J.; ASSAMOTO, M.; KRUTOVSKIKH, V.; BABATORIYAMA, H; OTA, T.; MOORE, M.A.; MASUDA, M.; SUGIMOTO, H.; NISHINO, H.; KAKIZOE, T. and TSUDA, H.; “Inhibition of azoxymethane-initiated colotumor by bovine lactoferrin administration in F344 rats” *JPN. J. Cancer Res.* 88 (6): 523-526 (1997).

- SOUZA, S.V.C.; “Procedimento para validação intralaboratorial de métodos de ensaio: Delineamento a Aplicabilidade em Análise de Alimentos” Minas Gerais- Belo Horizonte, Dissertação de Doutorado apresentada no Programa de pós-graduação em Ciências de Alimentos da Faculdade de Farmácia de UFMG, 296 fls. (2007).
- SOUZA, S.V.C; & JUNQUEIRA, R.G.; “A procedure to assess linearity by ordinary least squares method” *Analytica Chimica Acta*, 552:25-35 (2005).
- SPEIT, G. & HARTMANN, A. ; The Comet Assay (Single Cell Gel Test)- “A sensitive Genotoxicity test for detection of DNA damage and repair” In: Henderson, D.S. ed. *Methods in Molecular Biology: DNA Repair Protocols* N.J. Humana Press V.113, p.275-286, (1999).
- TAKEDA, S.; TANAKA, Y.; YAMANE, M.; SIROMA, Z.; WAKIDA, S.; TERABE, S. “Ionization of dichlorophenols for their analysis by capillary electrophoresis-mass spectrometry” *Journal Chromatography A*, 924:415-420 (2001).
- TAMBELINI, A. T.; CÂMARA, V.M.; *Vigilância Ambiental em Saúde: Conceitos, caminhos e interfaces com outros tipos de vigilância; Cadernos Saúde Coletiva*, Rio de Janeiro, 10 (1):77-93, (2002).
- TAVARES, M.F.M.; “Eletroforese Capilar: Conceitos básicos”; *Química Nova*, 19(2): 173-181, (1995).
- TAVARES, M.F.M.; “Mecanismos de Separação em Eletroforese Capilar”; *Química Nova*, 20(5): 493-511, (1997).
- THE PESTICIDE MANUAL: “A World Compendium 10^{ed} Surrey: British Crop. Council, 1341p. (1994).
- THE BRITISH INDUSTRIAL BIOLOGICAL RESEARCH ASSOCIATION, (BIBRA); *Toxicity Profile*, p.3, (1987); disponível em <http://toxnet.nlm.nih.gov/> arquivo consultado em 07/2007.

- THE MERCK INDEX: “An Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals” 12^{ed} New Jersey: Merck, Iv (1996).
- TICE, R. R.; AGURELL, E.; ANDERSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J.-C e SASAKI, Y.F.; “Single Cell Gel/ Comet Assay: Guidelines for in Vitro and In Vivo Genetic Toxicology Testing” *Environmental and Molecular Mutagenesis* 35:206-221 (2000).
- TSAI, C. Y. & HER, G.R.; “Capillary zone electrophoresis/electrospray mass spectrometry of priority phenols” *Journal of Chromatography A*, 743: 315-321 (1996).
- TURNES, M.I.; MEJUTO, M.C.; CELA, R.; “Determination of pentachlorophenol in water samples by capillary zone electrophoresis” *Journal Chromatography A*, 7333:395-404, (1996).
- UMEMURA, T.; SAI-KATO, K.; TAKAGI, A.; et al., “Oxidative DNA damage and cell proliferation in the livers of B6C3F1 mice exposed to Pentachlorophenol in their diet” *Fundam Appl Toxicol* 30:285-289 (1996).
- UMEMURA, T.; KAI, S. HASEGAWA, R.; SAI, K. KUROKAWA, Y. and WILLIAMS, G.M.; “Pentachlorophenol (PCP) produces liver oxidative stress and promotes but does not initiate hepatocarcinogenesis in B6C3F1 mice” *Carcinogenesis* 20 (6): 1115-1120 (1999).
- VALENTE SOARES, L.M.; “Como obter resultados confiáveis em cromatografia” Boletim Técnico nº19; Faculdade de Engenharia de Alimentos-UNICAMP- disponível em documento eletrônico <http://www.micotoxinas.com.br/boletim19.htm> acessado em 8/11/2004.
- WANG, Y.J.; LEE, C.C.; CHANG, W.C.; LIOU, H.B.; HO, Y.S.; “Oxidative stress and liver toxicity in rats and human heptoma cell line induced by Pentachlorophenol and its major metabolite Tetrachlorohydroquinone” *Toxicology Letters* 122: 157-169 (2001).

WHO; “International Programme on Chemical Safety – IPCS” ad. Environmental Health Criteria n°71 – World Health Organization, Geneva (1987).

YOU, B. Y.; WANG, Y. H.; KUO, M. L.; “Evaluation of genotoxicity and carcinogenicity on fungicide, copper-8-hydroxyquinolate, by short-terms tests”, Zhiwu Baohu Xuehui Huikan, 41(2), 119-130 (1999) – (*Journal written in Chinese*) ISSN: 0577-750X ABSTRACT disponível no banco de dados Scifinder arquivo consultado em 18/02/2005.

YOU, B. Y.; WANG, Y. H.; KUO, M. L.; “Role of reactive oxygen species in cupric 8-quinolinoxide-induced genotoxic effect” *Mutation Research* 491:45-56 (2001).

www.unb.br/prof_alexandre/als_preserv.pdf , arquivo consultado em 02/2006.

<http://www.riosvivos.org.br/arquivos/660712871.doc> arquivo consultado em 02/2006

<http://www.sbrt.idict.br> , arquivo consultado em 04/2007.

<http://www.lei.adv.br/005-85.htm> arquivo acessado em 06/2007.

<http://www.lei.adv.br/014-86.htm> arquivo acessado em 06/2007.

<http://www.mma.gov.br> arquivo acessado em 06/2007.

<http://www.anvisa.gov.br/toxicologia/monografias/p44.pdf> arquivo consultado em 06/2007.

<http://www.epa.gov/fedrgstr/EPA-PEST/1996/June/Day-26/pr-774.html> arquivo consultado em 07/2007.

<http://toxnet.nlm.nih.gov/> arquivo acessado em 07/2006.

<http://www-cie.iarc.fr/htdocs/monographs/vol53/10-pentachlorophenol.htm>

arquivo acessado em 07/2007.

<http://www.astdr.cdc.gov/tfacts51.html> arquivo acessado em 07/2007.

http://www.anvisa.gov.br/toxicologia/residuos/rel_anual_2004.pdf

arquivo

acessado em 07/2007.

<http://www.epa.gov/iris/gloss8.htm> arquivo consultado em 10/2007.

<http://www.epa.gov/iris/subst/0086.htm> arquivo consultado em 10/2007.

ANEXO I:- Avaliação da Carcinogenicidade *in vivo* do Pentaclorofenol.

Espécie/ Cepa Sexo	Via	Dose (ppm) na dieta; alimentação (semanas)	Tempo de estudo (semanas)	Local/ Tipo de lesão	Resultado	Referência
Camundongo/ B6C3F1 Fêmea	Oral	0;100; 200; (103)	103	Medula da glândula supra-renal: Feocromocitoma; Fígado: Adenoma e Carcinoma Hepatocelular	POSITIVO	NCI/ NTP Carcinogenesis Technical Report Series, U.S. Department of Health and Human Services, TR-349/ 1989
Camundongo/ B6C3F1 Fêmea	Oral	0;100;200;600; (103)	103	Medula da glândula supra-renal: Feocromocitoma ou Feocromocitoma Maligno; Sistema Circulatório: Hemangiossarcoma ; Fígado: Adenoma e Carcinoma Hepatocelular	POSITIVO	NCI/ NTP Carcinogenesis Technical Report Series, U.S. Department of Health and Human Services, TR-349/ 1989
Camundongo/ B6C3F1 Macho	Oral	0;100;200;600; (103)	103	Gland. Adrenal/Medula: Feocromocitoma ou Feocromocitoma Maligno;Fígado: Fígado: Adenoma e Carcinoma Hepatocelular	POSITIVO	NCI/ NTP Carcinogenesis Technical Report Series, U.S. Department of Health and Human Services, TR-349/ 1989
Camundongo B6C3F1/ Macho	Oral	0; 1200; (13)	42	-	NEGATIVO	Umamura, et al., 1999
Ratos/ F344/N Macho	Oral	0;200;400;600; (105)	105	-	NEGATIVO	NCI/ NTP Carcinogenesis Technical Report Series, U.S. Department of Health and Human Services, TR-483/ 1999
Ratos/ F344/N Macho	Oral	0;1000; (52)	105	Pele: Ceratocarcinoma	POSITIVO	NCI/ NTP Carcinogenesis Technical Report Series, U.S. Department of Health and Human Services, TR-483/ 1999
Ratos/ F344/N Fêmea	Oral	0;200; 400;600; (105)	105	-	NEGATIVO	NCI/ NTP Carcinogenesis Technical Report Series, U.S. Department of Health and Human Services, TR-483/ 1999

ANEXO I:- Avaliação da Carcinogenicidade *in vivo* do Pentaclorofenol.

Espécie/ Cepa Sexo	Via	Dose (ppm) na dieta; alimentação (semanas)	Tempo de estudo (semanas)	Local/ Tipo de lesão	Resultado	Referência
Ratos/ F344/N Fêmea	Oral	0;1000; (52) semanas	105	-	NEGATIVO	NCI/ NTP Carcinogenesis Technical Report Series, U.S. Department of Health and Human Services, TR-483/ 1999

* O Pentaclorofenol de grau de técnico utilizado nos estudos foi administrado aos animais por via oral através da dieta.

Pesquisa realizada e disponível no banco de dados sobre informações de pesquisa em carcinogênese química, do sistema TOXNET: (<http://toxnet.nlm.nih.gov/>) acessado em 07/2007.

ANEXO II:- Avaliação da mutagenicidade do Pentaclorofenol em *Salmonella typhimurium* (TESTE DE AMES).

Cepa teste	Ativação Metabólica	Método	Concentração final µg/placa	Resultado	Referência
TA98	S9 de ratos, (Aroclor 1254)	Pré- incubação	0,3-30 solvente: DMSO	NEGATIVO	NCI/ NTP Carcinogenesis Technical Report Series, U.S. Department of Health and Human Services, TR-349/ 1989
TA100	S9 de ratos, (Aroclor 1254)	Pré- incubação	0,3-30µg solvente: DMSO	NEGATIVO	NCI/ NTP Carcinogenesis Technical Report Series, U.S. Department of Health and Human Services, TR-349/ 1989
TA1535	S9 de ratos, (Aroclor 1254)	Pré- incubação	0,3-30µg solvente: DMSO	NEGATIVO	NCI/ NTP Carcinogenesis Technical Report Series, U.S. Department of Health and Human Services, TR-349/ 1989
TA1537	S9 de ratos, (Aroclor 1254)	Pré- incubação	0,3-30µg solvente: DMSO	NEGATIVO	NCI/ NTP Carcinogenesis Technical Report Series, U.S. Department of Health and Human Services, TR-349/ 1989
TA98	S9 de ratos, (Aroclor 1254)	Padrão	50- 100, Solvente: Acetona	POSITIVO	Gopalawamy, & Nair, 1992
TA98	-	Padrão	50- 100µg/placa. Solvente: Acetona	NEGATIVO	Gopalawamy, & Nair, 1992

ANEXO II: Avaliação da mutagenicidade do Pentaclorofenol em *Salmonella typhimurium* (TESTE DE AMES).

Cepa Teste	Ativação Metabólica	Método	Concentração final µg/placa	Resultado	Referência
TA97A	-	Padrão	2-200 solvente: DMSO	NEGATIVO	Sekine, et. al., 1997
TA98	-	Padrão	2-200 solvente: DMSO	NEGATIVO	Sekine, et. al., 1997
TA100	-	Padrão	2-200 solvente: DMSO	NEGATIVO	Sekine, et. al., 1997
TA97A	S9 de ratos, (Aroclor 1254)	Padrão	2-200 solvente: DMSO	NEGATIVO	Sekine, et. al., 1997
TA98	S9 de ratos, (Aroclor 1254)	Padrão	2-200 solvente: DMSO	NEGATIVO	Sekine, et. al., 1997
TA100	S9 de ratos, (Aroclor 1254)	Padrão	2-200 solvente: DMSO	NEGATIVO	Sekine, et. al., 1997

Pesquisa realizada e disponível no banco de dados sobre informações de pesquisa em carcinogênese química, do sistema TOXNET: (<http://toxnet.nlm.nih.gov/>) acessado em 07/2007.

ANEXO III: Avaliação da mutagenicidade do Pentaclorofenol em células de mamífero *in vitro*.

Tipo celular	Ensaio	Ativação Metabólica	Período experimental	Concentração final (µg/mL)	Resultado	Referência
Células ovário de hamster chinês (CHO)	Aberrações cromossômicas <i>in vitro</i>	-	14 h	10;30; 100	NEGATIVO	Galloway, et. al., 1987
Células ovário de hamster chinês (CHO)	Aberrações cromossômicas <i>in vitro</i>	S9 de ratos, (Aroclor 1254), com	14 h	3;10; 30; 100 2 h de tratamento	POSITIVO, aumento estatisticamente significante, mas não relacionado a dose.	Galloway, et. al., 1987
Células de ovário de hamster chinês (CHO)	Aberrações cromossômicas <i>in vitro</i>	S9 de ratos, (Aroclor 1254)	14 h	10; 60; 70; 80 2h de Tratamento	POSITIVO	Galloway, et. al., 1987
Pulmão de hamster chinês (V79)	V79 HPRT (6-tioguanina)	-	-	6,25-50	NEGATIVO	Jansson, & Jansson 1986
Pulmão de hamster chinês (V79)	V79 HPRT (6-tioguanina)	Hepatócitos primários de ratos	-	15 Solvente: Acetona	NEGATIVO	Hattula, & Knuutinen, 1985

Pesquisa realizada e disponível no banco de dados sobre informações de pesquisa em carcinogênese química, do sistema TOXNET: (<http://toxnet.nlm.nih.gov/>) acessado em 07/2007.

ANEXO IV: Avaliação da atividade promotora de tumor *in vivo* do Pentaclorofenol (PCF).

Espécie/ Cepa/ Sexo	Via/ Dose (PCF)	Carcinógeno	Via/ Dose (Carcinógeno)	Tecido alvo e tipo de lesão	Referências
Camundongos/ B6C3F1/ Macho	Oral/ 300ppm na dieta por 25 semanas iniciando 4 semanas depois da últimas dose do carcinógeno	Dietilnitrosamine	Oral/ 20 ppm em água por 13 semanas (duração do estudo 42 semanas)	Adenoma ou Carcinoma de Fígado	Umamura, et. al.,1999.
Camundongos/ B6C3F1/ Macho	Oral/ 600 ppm na dieta por 25 semanas iniciando 4 semanas depois da últimas dose do carcinógeno	Dietilnitrosamine	Oral/ 20 ppm em água por 13 semanas (duração do estudo 42 semanas)	Adenoma ou Carcinoma de Fígado	Umamura, et. al.,1999

Pesquisa realizada e disponível no banco de dados sobre informações de pesquisa em carcinogênese química, do sistema TOXNET: (<http://toxnet.nlm.nih.gov/>) acessado em 07/2007.