



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE  
ALIMENTOS (PPGCTA)**

**INVESTIGAÇÃO DA PRESENÇA DE RESÍDUO DE  
PENTACLOROFENOL EM GELATINA COMESTÍVEL POR  
CROMATOGRÁFIA A GÁS COM CAPTURA DE ELÉTRONS  
(CG/DCE)**

RAQUEL FIORI DE SOUZA

Porto Alegre, Brasil.

2008

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE  
ALIMENTOS (PPGCTA)**

**INVESTIGAÇÃO DA PRESENÇA DE RESÍDUO DE  
PENTACLOROFENOL EM GELATINA COMESTÍVEL POR  
CROMATOGRAFIA A GÁS COM CAPTURA DE ELÉTRONS  
(CG/DCE)**

RAQUEL FIORI DE SOUZA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como um dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Dr. Adriano Brandelli

Co-Orientador: Dr. Caciano Pelayo Zapata Noreña

Porto Alegre

2008

## CIP - CATALOGAÇÃO INTERNACIONAL NA PUBLICAÇÃO

S729i Souza, Raquel Fiori de

Investigação da presença de resíduo de pentaclorofenol em gelatina comestível por cromatografia a gás com captura de elétrons (CG/DCE) / Raquel Fiori de Souza. – Porto Alegre: UFRGS, 2008.

77 f.; il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Porto Alegre, RS – BR, 2008. Adriano Brandelli, Orient.; Noreña, Caciano Pelayo Zapata, Co-orient.

1. Agrotóxico 2. Pentaclorofenol 3. Gelatina 4. Embalagem  
5. Cromatografia gasosa I. Brandelli, Adriano, Orient. II.  
Noreña, Caciano Pelayo Zapata III. Título

CDU: 664

RAQUEL FIORI DE SOUZA  
Química - Pontifícia Universidade Católica do RS

**DISSERTAÇÃO**

Submetida como parte dos requisitos para obtenção do grau de  
MESTRE EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS.

Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA)

Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Porto Alegre, RS, Brasil.

Homologada em: 28.02. 2008

Por:

Prof. Dr. Adriano Brandelli  
Orientador – PPGCTA/UFRGS

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Erna Vogt de Jong  
Coordenadora do Programa de Pós  
Graduação em Ciência e Tecnologia  
de Alimentos (PPGCTA/UFRGS)

Prof. Dr. Caciano P. Z. Noreña  
Co-orientador – ICTA/UFRGS

Aprovada em: 28.02.2008  
Pela Banca Examinadora:

Prof. Dr. Renato Zanella  
Banca - LARP-UFSM

Prof. Dr. Alessandro O. Rios  
Banca – ICTA/UFRGS

Prof<sup>a</sup>. Dra. Isa Beatriz Noll  
Banca – ICTA/UFRGS

Prof. Dr. Adriano Brandelli  
Diretor do Instituto de Ciência e  
Tecnologia de Alimentos.  
ICTA/UFRGS

*A todos os meus familiares, amigos, colegas e estagiários que me apoiaram e incentivaram para a realização desta etapa da minha vida profissional.*

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Dr. Adriano Brandelli, meu orientador, pela contribuição e incentivo nas orientações da condução do trabalho;

Ao Prof. Dr. Caciano P. Z. Noreña, meu co-orientador, pelas sugestões e trocas de idéias contribuindo para a pesquisa;

À Prof<sup>a</sup>.Dra. Tânia M. Pizzolato por viabilizar a execução analítica no Instituto de Química da UFRGS e acima de tudo, aprimorar e acompanhar todo o desenvolvimento analítico do trabalho ;

À bolsista I sar Bolzan pela condução analítica desta pesquisa;

Às direções do IPB-LACEN e FEPPS pela possibilidade da realização deste trabalho no Laboratório de Análises de Resíduos de Agrotóxicos da Divisão de Análise de Produtos;

À colega Jupira de Fátima Pedroso de Souza pela amizade e consideração;

Às minhas estagiárias do Laboratório de Análises de Resíduos de Agrotóxicos do IPB-LACEN, todas que por este e outros períodos de trabalho, foram braços, pernas e tudo mais no laboratório, o meu sincero agradecimento;

Às minhas meninas do LAFERGS/FEPPS/RS, sempre em prontidão quando necessário, minha homenagem;

Aos demais colegas do IPB-LACEN/FEPPS, em destaque à Dra. Lúcia Diefenbach, colaborando nas difíceis traduções de texto;

Ao Pietro, meu filho, que na sua pouca idade soube compreender as horas de convivência furtadas pelo mestrado;

Ao meu marido e meus pais pelo apoio e demonstração de orgulho por esta realização;

Enfim, a todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram significativamente, construindo e não competindo, neste período de realização do projeto.

## RESUMO

Com as aplicações indiscriminadas de agrotóxicos e a falta de critérios na seleção destes, todo o ecossistema se torna comprometido, afetando também a saúde humana. A agricultura praticada em nosso país ainda é altamente dependente de agroquímicos, dentre os quais os fungicidas com função de largo espectro na eficácia do controle de uma variedade de fungos. Uma grande proporção da produção mundial destes fungicidas é o do pentaclorofenol, que é destinado ao uso como preservante da madeira e seus derivados, assim como, em processos de curtimento de couro e peles. A madeira e o couro por serem materiais de origem orgânica, sofrem deterioração por organismos xilófagos. Considerando que a celulose é a matéria prima utilizada na fabricação de embalagens de papel e papelão do gênero alimentício e que a produção da gelatina comestível é a partir do tecido conjuntivo (colágeno) extraído de peles, raspas de couro e osseína de mamíferos como suínos e bovinos, alimento este largamente consumido pela população infantil e como complemento nutricional dos desportistas, estes podem estar representando uma via de contaminação. A fim de se avaliar a incidência de resíduo de pentaclorofenol em gelatina comestível e a possibilidade da migração através da embalagem em contato com o alimento, procedeu-se a extração do pentaclorofenol em gelatina e na embalagem de papel. Para ambos, a determinação analítica foi realizada por Cromatografia Gasosa com Detector de Captura de Elétrons (CG Varian Star Modelo 3600 cx) com as seguintes condições operacionais: Temperatura da coluna: 100 °C (2 min), 10 °C min<sup>-1</sup>, 250 °C(0 min); Temperatura do Detector: 300 °C; Temperatura do Injetor: 250°C ; Modo de injeção: splitless; Volume da injeção: 1 µL . Os limites de detecção e quantificação encontrados foram 0,09 mg kg<sup>-1</sup> e 0,3 mg kg<sup>-1</sup> para a gelatina e 0,002 mg kg<sup>-1</sup> e 0,06 mg kg<sup>-1</sup> para as embalagens, respectivamente. Os níveis de recuperação ficaram entre 59,5% para amostras de gelatina e 82% para as embalagens. Os ensaios de migração foram feitos com 5 mL de solução padrão de 0,01 mg L<sup>-1</sup> nas temperaturas 25, 40 e 60 °C e com tempo de exposição de 3, 6, 24 e 48 h . Os resultados demonstraram que das 25 marcas de gelatina comestível (n=125), apenas uma única marca teve a ocorrência da presença de pentaclorofenol abaixo do limite de quantificação no produto e em nenhuma embalagem observou-se a presença do mesmo. Posto isto, pode-se especular que há um processo maior de seleção nos fornecedores de matérias-primas para este tipo de alimento e que no processo de boas práticas de fabricação, as empresas têm se adequando com vistas a qualificar seus produtos.

Palavras-chave: Agrotóxico, Pentaclorofenol, Gelatina, Embalagem, Cromatografia Gasosa.

## ABSTRACT

With the indiscriminate applications of the pesticide and the lack of criteria defined in the election of these, the entire ecosystem if becomes engaged, affecting the health human. The agriculture in our country is still highly dependent on chemicals among them broad spectrum fungicides used to control a variety of fungi. Pentachlorophenol (PCP) represents a great percentage of the produced fungicides on a global scale, and is utilized in the preservation of wood and its derivates and fungicide in processes of tanning of animal hides. Wood and leather being organic materials are attacked by xylophagous organisms. Considering that cellulose is raw material for manufacturing some food paperboard packaging and cardboard and and that the production of the edible gelatin is from the fabric conjunctive (collagen) extracted of skins, leather scraps and ossein of mammals as swines and bovines, food this wide consumed by children and as nutritional complement of the athletes, these may constitute routes of a contamination. In order to evaluate the incidence of pentachlorophenol residue in edible gelatin and the possibility of its migration of the same in contact with the food, it was proceeded extraction from pentachlorophenol in gelatin and the packing of paper .For both matrixes the analytical determination was made by gas chromatography with electron capture detector (GC Varian Star Model 3600 Cx) using the following operational conditions: column temperature : 100 °C (2 min), 10 °C min<sup>-1</sup>, 250 °C (0 min); detector temperature: 300 °C; injector temperature:250 °C; injection mode: splitless ; injection volume: 1 µL . The detection (LOD) and quantitation (LOQ) limits are 0,09 mg kg<sup>-1</sup> and 0,3 mg kg<sup>-1</sup> for gelatin and 0,002 mg kg<sup>-1</sup> and 0,06 mg kg<sup>-1</sup> for the packaging , respectively. Recoveries ranged 59,5% for gelatin and 82% for the packaging. Migration assays in original packaging and products were made with 5 mL standard solution of 0,01mg L<sup>-1</sup> in temperatures 25, 40 and 60 °C with 3, 6, 24 and 48 h of contact. The results showed that primarily packaging in polypropylene are effectiveness as a barrier to migration for this contaminants and so 25 marks (n=125) of edible gelatin only one had presence of PCP bellow LOQ and in none paperboard packaging occurred the presence of PCP. It is cogitated hypothesis of that companies is if adjusting good practical of manufacture and the election of suppliers.

Key words: pesticide, pentachlorophenol, gelatin, packaging, gas chromatography.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>10</b>
1.1 Agrotóxicos .....	10
1.2 Agrotóxicos Organoclorados.....	12
1.3 Pentaclorofenol (PCF) .....	13
1.4 Efeitos na saúde associados à exposição do PCF e seus sais .....	14
1.5 Aspectos de saúde ambiental e sanitária .....	16
1.6 Métodos de Extração e Quantificação de PCF.....	17
1.7 Embalagem de papel e papelão.....	18
1.8 Gelatina Comestível.....	21
1.9 Testes de Migração .....	26
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>28</b>
<b>3 ARTIGOS CIENTÍFICOS.....</b>	<b>29</b>
3.1 Investigation of pentachlorophenol in edible gelatin and its paperboard packaging in Southern Brazil .....	29
3.2 Migration of pentachlorophenol residue from secondary paperboard packaging to edible gelatin matrix.....	50
<b>4 DISCUSSÃO .....</b>	<b>66</b>
4.1 Conclusões .....	70
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>71</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
CG/DCE	Cromatografia Gasosa com detector de captura de elétrons
CG/EM	Cromatografia Gasosa/espectrofotometria de massa
FDA	Food and Drugs Administration
IBAMA	Instituto Brasileiro de Assistência ao Meio Ambiente
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
EPA	Environmental Protection Agency (Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos)
CE	Comunidade Européia
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
LMR	Limite máximo de resíduos
NBR	Norma Brasileira
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCF	Pentaclorofenol
RSD	Estimativa de desvio padrão
SINDAG	Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola

## LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
CV%	Coeficiente de variação
kg	Kilograma
g	Grama
mg	Miligrama
µg	Micrograma
mm	Milímetro
µ	Micra
L	Litro
mL	Mililitro
µL	Microlitros
min	Minutos
N	Nº de pratos teóricos
Rs	Resolução
$r^2$	Coeficiente de correlação
s	Desvio padrão
S/N	Sinal ruído
Tr	Tempo de retenção
R	Recuperação

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 AGROTÓXICOS

Os agrotóxicos surgiram numa tentativa de coexistência do homem com outros seres vivos pela competição do espaço e dos alimentos principalmente na defesa de pragas que atacam as plantações (CAPORAL; COSTABEBER; PAULUS 2006).

Sua utilização teve início na década de 20 e durante a segunda guerra mundial, eles foram utilizados até como arma química. No Brasil, a sua utilização tornou-se evidente em ações de combate a vetores agrícolas na década de 60 (ROCHA, 1998).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária define agrotóxicos e afins como sendo produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas nativas ou plantadas, e de outros ecossistemas e de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como as substâncias e produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento (BRASIL, 2003).

No entanto, tem-se observado ao longo dos anos, que o uso tem levado ao aparecimento de resíduos desses compostos nos diferentes compartimentos do meio ambiente e em produtos alimentícios (TOMITA, BEYRUTH, 2002; BRASIL, ANVISA/PARA, 2006).

O Brasil consumiu no ano de 2005, 365,5 mil toneladas de agrotóxicos, movimentando US\$ 4 bilhões de dólares, ficando em 4º lugar no ranking mundial de consumo (SINDAG, 2007).

A saúde humana pode ser afetada pelos agrotóxicos direta ou indiretamente, sendo que três vias principais são responsáveis por esta contaminação: ocupacional, que se caracteriza pela contaminação dos trabalhadores que manipulam as mistura e/ou diluição dos agrotóxicos, para a pulverização, sendo esta responsável por 80% dos casos de intoxicação; ambiental, caracterizada pela dispersão ou distribuição dos agrotóxicos no meio ambiente como água, atmosfera e solo; alimentar, que ocorre pela ingestão de produtos contaminados, atingindo uma parcela dos consumidores, embora seja menor devido à concentração em ppb e ppm dos resíduos que permanecem nos produtos e o fato de que possa haver a possibilidade de eliminação destes resíduos por processos como o cozimento, fritura, microondas, etc. (MOREIRA, et al., 2002).

A moderna agricultura tem como objetivo a sustentabilidade econômica para que a produção e a qualidade dos alimentos não sejam afetadas com a falta e a elevada dos preços, como consequência, se faz necessária a utilização de medidas no controle de doenças de plantas. A recomendação para este controle recai sobre os fungicidas, considerados importantes na cadeia produtiva de alimentos (ZAMBOLIM; COSTA; VALE, 2000).

A utilização de substâncias químicas com propriedades fungicidas ocorre desde as mais antigas civilizações há mais de duzentos anos. Há relatos do uso de fungicidas pelos gregos e romanos empregando fumigação e tratamento das partes das plantas. O grande avanço no conhecimento de fungicidas deu-se após o século

XVIII, devido a descobertas de novos grupos químicos (ZAMBOLIM; COSTA; VALE, 2000).

## **1.2 AGROTÓXICOS ORGANOCLORADOS**

O grupo químico organoclorado (OC), teve o seu uso restrito nas décadas de 70 e 80 devido aos transtornos como poluentes ambientais e potenciais danos à saúde humana. No Brasil, em 1985 foi proibido em todo território nacional a comercialização, uso e distribuição de OC destinados à agropecuária (BRASIL, 1985). Porém, foi mantida permissão do uso de alguns produtos considerados de menor risco, como o dicofol, lindano, metoxicloro, pentaclorofenol e endossulfan mediante condições específicas (BRASIL, 2006).

Também continuou sendo permitido uso em campanhas de saúde pública, no combate a vetores de agentes etiológicos de moléstias (malária e leishmaniose), bem como em uso emergencial na agricultura, a critério do Ministério da Agricultura (BRASIL, 1990).

Por serem muito lipofílicos e de difícil transformação em metabólitos mais hidrofílicos para serem excretados, possuem alto potencial de biomagnificação (acumulação ao longo da cadeia alimentar) e de acumulação em tecidos graxos, podendo permanecer nos organismos e no solo por mais de duas décadas (ALONZO; CORRÊA, 2003).

Apesar do mecanismo mais clássico de desenvolvimento de toxicidade dos OC estar relacionados ao aumento excessivo na excitabilidade neuronal (excitotoxicidade), atualmente muita ênfase tem sido dada à interação destes toxicantes em receptores endócrinos: estrogênio e androgênio (ALONZO; CORRÊA,

2003). Segundo a Organização Mundial de Saúde, a ingestão contínua de pequeníssimas quantidades de OC presentes nos alimentos, expõe o homem a riscos de diversas naturezas, como carcinogênese, mutagênese, teratogênese, alterações imunológicas e hormonais, irritação, lesão ocular e cutânea, dentre outros (WHO, 1993).

### **1.3 PENTACLOROFENOL (PCF)**

O fungicida pentaclorofenol (PCF) é um produto químico considerado de alta eficiência para a proteção da madeira à maioria dos agentes xilófagos. Este produto é obtido pela cloração direta do fenol, é insolúvel em água e tem caráter ácido. Devido ao seu caráter ácido, o pentaclorofenol pode dar origem aos sais chamados fenatos ou fenóxidos, se submetidos à ação de hidróxidos alcalinos (MORESCHI, 2005). A fórmula molecular do pentaclorofenol é  $C_6Cl_5OH$  e o nome usado de acordo com a IUPAC é 2, 3, 4, 5, 6-Pentachlorophenol. Este produto, na forma comercial, contém cerca de 85% de PCF, 6% de tetraclorofenóis e 6% de outros tipos de fenóis clorados. Quando o PCF é submetido à ação do hidróxido de sódio, dá origem ao pentaclorofenato de sódio (PCF-Na), um produto solúvel em água (MORESCHI, 2005).

É utilizado no Brasil, na forma de seu sal sódico (PCF-Na), como preservante de madeira com ação fungicida e cupinicida para combater possíveis manchas e evitar a deterioração dos substratos ligno-celulósicos (IBAMA, 2005). Além de ser agente de tratamento de madeira, também é agente de impregnação de têxteis industriais, bactericida nas indústrias de curtumes, pasta de papel (branqueamento de papel), moluscida no tratamento de águas residuais (MORESCHI, 2005).

O uso agrícola foi cancelado pela Portaria do Ministério da Agricultura nº 329, de 02 de setembro de 1985 e a sua monografia excluída, conseqüentemente proibidos o uso para campanhas de saúde pública ou domissanearias. A sua total exclusão ocorreu a partir de 30.11.2006 pela Resolução nº 164 de 18.08.2006 / ANVISA.

#### **1.4 EFEITOS NA SAÚDE ASSOCIADOS À EXPOSIÇÃO DO PCF E SEUS SAIS**

O mecanismo de ação do PCF e seus sais afetam a fosforilação oxidativa mitocondrial causando uma aceleração do metabolismo e aumentando a produção de calor, causando perda da resistência elétrica da membrana (BRASIL, 2006).

Este princípio ativo é altamente tóxico, reconhecido como perigoso para animais e humanos em virtude dos seus possíveis efeitos cancerígenos. Devido sua persistência no meio ambiente, está banido ou tem seu uso restrito em 25 países e sua importação proibida em 67 países (US EPA, 2006).

A Environmental Protection Agency, estima que, de 1989 a 1993, ingressaram no ambiente em torno de 52 toneladas de PCF provenientes principalmente da indústria de explosivos (43 %), preservante de madeira (20 %) e o restante de outras indústrias (37 %) (US EPA, 1989). Foram feitas estimativas acerca da distribuição de resíduo de PCF no ambiente e se calcula que está distribuído da seguinte maneira: 48 % no solo, 45 % nos sedimentos, 5,5 % na água e 1,4 % no ar (NCAMP, 1996; HATTEMER-FREY; TRAVIS, 1989). Também pode haver exposição da população em baixas concentrações no ambiente de trabalho, através de casas construídas com madeira tratada (0,5-104 mg/m<sup>3</sup>), pelo ar, dentro e fora de casa, através da água potável (0,02 mg/dia) e dos alimentos (0,1-6 mg/dia) (ASTDR, 1989 apud MORALES, PAZOS, 1998).

Uma preocupação referente ao uso do PCF e seus sais é a presença, nos produtos, de impurezas de grande relevância toxicológica, destacando: éteres policlorodifenílicos, policlorofenoxifenóis, policlorobifenilos, hexaclorobenzeno, pentaclorobenzeno e isômeros de hexaclorociclohexano que são responsáveis pela difusão diária de dioxinas para o ambiente (COMISSÃO DAS COMUNIDADES EUROPÉIAS, 1996).

Durante o processo industrial do PCF e a queima de madeira tratada por este fungicida, há formação de hexaclorobenzeno (HCB), policlorodibenzenodioxinas (PCDD) e os policlorodibenzenofuranos (PCDF) que são contaminantes do PCF concentrado (MORALES; PAZOS, 1998).

Em fábricas de PCF a exposição aguda de trabalhadores tem levado ao aparecimento de cloracne, associada às impurezas contidas no produto. Em estudos que relatam seu uso como fungicida foram identificados nove bebês em enfermaria que apresentaram febre alta, sudorese, respiração ofegante, taquicardia, irritabilidade seguida de letargia, proteinúria, pneumonia ou bronquite. A exposição crônica ao PCF e seus sais está associada ao desencadeamento de alterações endócrinas, nos hormônios tireoidianos e hipotálamo, além da infertilidade (GERHARD et al., 1999).

Os órgãos alvo da ação do PCF e seus sais são: fígado, rins, sistema nervoso, sistema endócrino e imunológico, sendo que pode-se citar efeitos neurológicos, delírio, febre, convulsão e outros pela exposição aguda (ATSDR,2001).

## 1.5 ASPECTOS DE SAÚDE AMBIENTAL E SANITÁRIA

Devido à solubilidade e persistência do pentaclorofenato em água, existem sérios riscos de contaminação do lençol freático com conseqüente contaminação da água para consumo humano. Atualmente, por meio da Portaria nº 518/2004 no Ministério da Saúde, estão regulados os padrões de potabilidade de água, que incluem ações de vigilância e controle onde o PCF é uma das substâncias a serem monitoradas.

Ainda atualmente o passivo ambiental gerado pela Rhodia em Cubatão, por meio de aterros clandestinos contendo PCF, é considerado pela OMS como um dos oito maiores desastres ecológicos mundiais, desastre este ocorrido em fins da década de 70. No Brasil existem casos de acidentes com PCF na área portuária do Rio de Janeiro nos anos 80, que resultaram em mortes. Outros problemas estão associados à contaminação de “camas de aviário” que utilizam serragem ou maravalha que podem contaminar a criação ou as culturas agrícolas aonde estas venham a ser utilizadas como adubo, outro aspecto são as contaminações de alimentos embalados com madeira tratada (BRASIL, 2006).

No Brasil, em 2003, o Instituto de Defesa do Consumidor (IDEC), denunciou a contaminação de adubos, à base de esterco de aves, usadas na agricultura. Esta denúncia foi em decorrência de que a maravalha (ou cepilho, subproduto do beneficiamento de madeiras tratadas com agrotóxico, usado como “cama de aviário” - forração sobre o chão da granja – na produção especialmente de frangos) estaria contaminada por agrotóxicos. A denúncia ponderava que a contaminação da maravalha poderia se estender aos alimentos produzidos com o citado adubo. Além disso, o IDEC cogita que, outros produtos poderiam estar sendo contaminados por resíduos dos conservantes (PCF) pelo uso de caixas de madeira contaminadas,

utilizadas no transporte de frutas e verduras, e de utensílios que entram em contato direto com os alimentos.

Diserens (2001) relatou ter encontrado PCF na madeira dos “pallets”, “container” e caixa de papelão, além disso, cogitou a hipótese de que as frutas poderiam ser contaminadas durante o armazenamento em engradados de madeira tratada.

## 1.6 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE PCF

Entre os vários métodos desenvolvidos para a análise de PCF em diferentes amostras, os métodos por cromatografia gasosa são os mais usados por sua alta sensibilidade e boa resolução, enquanto que por cromatografia líquida há baixa resolução e é freqüentemente afetada pelo efeito matriz (BAGHERI; SAJARI, 2001). A cromatografia a gás ainda é a técnica instrumental muito utilizada para a separação e determinação de inúmeros princípios ativos de agrotóxicos, atribuída a menor tempo de análise, alta seletividade e resolução (CAMPILLO *et al.*, 2007).

Diserens (2001) propõe um método baseado na extração por solventes e quantificação por cromatografia gasosa com espectrofotômetro de massas, para análise de (19) clorofenóis em madeira, papel, frutas e sucos com 93% de recuperação de PCF. Bruns e Currie (1980) propõem a extração de PCF em cenouras e batatas, com o método de extração por soxhlet utilizando acetona, por 44 horas, seguida de “clean up” com florisil e quantificação por cromatografia gasosa com detector de captura de elétrons, com limite de detecção para cenouras ( $9 \text{ ng g}^{-1}$ ) e para batatas ( $147 \text{ ng g}^{-1}$ ) com uma média de recuperação para 10 métodos testados em torno de 80-108% . Ainda na pesquisa de alimentos com e sem gordura(açúcares , frutas , legumes e tecido animal ), foi utilizado por Hopper *et al.*

(1992), um método de multirresíduo com extração por solventes e “clean up” com cromatografia de exclusão – permeação em gel (GPC), seguida de metilação e posterior “clean up” com florisil determinando os níveis por cromatografia gasosa com detector de captura de elétrons. A recuperação para PCF foi de 76-84% com fortificação de  $20 \mu\text{g kg}^{-1}$ .

Para a extração de papel/papelão, Yoon *et al.* (2000) descreve um método por extração com solvente, banho ultra-som e detecção por cromatografia gasosa com detector de captura de elétron e ionização de chama com LD de  $10 \mu\text{g kg}^{-1}$  e LQ igual a  $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ , com uma recuperação de 80 -109% , enquanto Triantafyllou, Akrida – Demertzi e Demertzis (2007) propõem uma extração rápida com etanol, agitação a temperatura ambiente e injeção direta por cromatografia gasosa com detector de ionização de chama. Outros autores, Domeno, Munizza e Nerín (2005), comparam a extração convencional através da derivatização e extração com solventes orgânicos com o método de microextração por fase sólida como proposta do uso de pequenas quantidades de solventes e recuperação em torno de 70 a 84% daqueles obtidos pelo método convencional.

O desenvolvimento da eletroforese capilar (EC) aparece como uma metodologia com alta eficiência nas separações e alta resolução para os clorofenóis com um LD para o PCF de  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$  (JÁUREGUI; MOYANO; GALCERAN, 2000).

## **1.7 EMBALAGEM DE PAPEL E PAPELÃO**

A celulose ou pasta química, é a matéria-prima mais utilizada na fabricação de papéis, representando cerca de 43% do volume de fibras usado pela indústria papelreira. As celuloses branqueadas destinam-se à fabricação de papéis para escritório e para gráficas em geral, enquanto as celuloses não branqueadas,

juntamente com os papéis reciclados, têm como destino mais comum à confecção de papéis para embalagens. As embalagens de papel e papelão representam constante crescimento na indústria de embalagem do gênero alimentício e vem ganhando importância na área de segurança alimentar devido à possibilidade da migração de alguns compostos químicos do material em contato como alimento (MATTOS; VALENÇA, 2000).

Como propriedade de avaliar o uso seguro das embalagens de alimentos oriundos de materiais de papel e papelão reciclados, o Conselho da Comunidade Européia (COUNCIL OF EUROPE'S POLICY STATEMENTS, 2002), aprovou uma proposta ao qual contém uma "Lista de substâncias usadas na fabricação de papel e papelão e outros correlatos que possam entrar em contato com alimentos" e estabeleceu um limite de 0,15 mg/kg de resíduo de pentaclorofenol nestes materiais.

Tanto papéis virgens como os reciclados passam por processos de tratamento, seja para branqueamento, remoção de tintas ou outro contaminante, porém não há eliminação total de contaminantes persistentes como o PCF (DOMENO; MUNIZZA; NERÍN, 2005). Um estudo sobre a migração de poluentes orgânicos das embalagens de material de papelão reciclado em matrizes sólidas de alimentos, demonstrou que a proporção da migração de substâncias para os alimentos depende da natureza da amostra de papel, conteúdo de gordura de alimento e volatilidade do migrante, indicando que o tempo de contato e a temperatura têm um significativo efeito na migração (TRIANAFYLLOU; AKRIDA-DEMERTZI; DEMERTZIS, 2007).

Song, Hong e Komolpraser (2000), validaram um procedimento de análise para cinco contaminantes (benzofenona, PCF, antraceno, dimetilftalato e estearato metílico) em materiais como o papel e papelão virgens e reciclados, utilizados em

embalagens de alimentos para atender ao U.S. Food and Drug Administration, adotando temperatura de 25 °C por 24 horas e tendo como resultado recuperações na ordem de 80 a 109%.

Ozaki *et al.* (2004), analisaram 28 papéis reciclados e virgens, em contato com vários tipos de alimentos ( pizza, sanduíche, chá , café , frango frito, batata frita ) para uma pesquisa genotoxicológica e química, sendo que o PCF foi detectado somente em papéis reciclados com um LD de 0,054 – 0,11  $\mu\text{g g}^{-1}$  .

Choi *et al.* (2002), demonstraram que o polietileno com espessuras entre 0,012 e 0,030 mm, a um gradiente de temperatura entre 10 a 24 °C, por 21 dias, para contaminantes não polares, como o antraceno e o estearato metílico, não apresentou ocorrência de migração significativa na matriz água, porém, com contaminantes polares como o pentaclorofenol, benzofenona e o dimetilftalato após um dia de contato em temperatura de 10 °C , encontraram migração ao nível de fortificação de 5  $\text{mg L}^{-1}$ , detectados por cromatografia gasosa. Portanto, a avaliação destes pesquisadores é que o filme de polietileno não deve ser usado como barreira contra de contaminantes químicos.

Outro estudo avaliou o uso de filmes de polipropileno ( 0,031, 0,071 e 0,127 mm) e polipropileno laminado, como barreira de proteção contra contaminantes da embalagem secundária, testados em solventes simulantes de alimentos ( 95% etanol , isopropanol e 10% etanol )a uma temperatura de 100 °C por duas 2 horas, demonstrando a ineficácia do mesmo perante a contaminação de benzofenona, antraceno, estearato metílico e pentaclorofenol com uma concentração de 1  $\text{mg kg}^{-1}$  , evidenciando que em filmes de menor espessura neste nível de contaminação , a probabilidade de migração é maior (SONG *et al.*, 2003).

## 1.8 GELATINA COMESTÍVEL

A produção de gelatina é obtida a partir de materiais que sejam fonte de colágeno, entre os quais os mais comuns são pele, couro e ossos de animais. No Brasil a fonte primária mais importante é o couro do boi. São cerca de 18 mil toneladas de couro que anualmente se transformam em gelatina. Além do couro bovino também são processadas quatro mil toneladas de couro de suínos (FRANCO, 2005). As substâncias perigosas que podem ser detectadas no couro são: cromo hexavalente, aril-aminas, pentaclorofenol (PCF), formaldeído, produtos contendo tributilestanho (TBT), metais pesados (mercúrio, cádmio e zircônio), alcanos clorados C10-C13, compostos orgânicos voláteis (VOC), fungicidas alergênicos (COMISSÃO DAS COMUNIDADES EUROPEIAS, 2001).

Na indústria alimentícia, onde o uso é mais disseminado, a gelatina é, além de um produto, um ingrediente amplamente utilizado em iogurtes, balas e em produtos dietéticos. Já na indústria farmacêutica, o uso deste ingrediente é comum na fabricação das cápsulas de remédio e de cosméticos como óleos de banho. No segmento fotográfico, o uso mais comum da gelatina é na revelação dos filmes. Há mais de 250 tipos de gelatinas diferentes para todas as principais áreas de aplicação, sendo que 68% estão direcionados para gelatina comestível (A PRODUÇÃO..., 2007). As gelatinas comestíveis disponíveis comercialmente possuem a seguinte composição: 84 – 90% de proteína; 8 – 12% de água; 2 – 4% de sais minerais.

O Brasil é campeão mundial em exportações de gelatina, exportando 25 mil toneladas anuais – o que representa perto de 10% de um mercado que movimenta cerca de US\$ 3 bilhões anuais (PAPEL e celulose..., 2007).

O colágeno natural é uma escleroproteína baseada em uma cadeia de polipeptídeos que compreende aproximadamente 1.050 aminoácidos. Três destas cadeias formam um helicóide triplo. A superposição de vários helicóides triplos produz as fibras de colágeno que são estabilizadas por meio de ligações cruzadas e formam uma estrutura de rede tridimensional. Esta estrutura é a responsável pela insolubilidade do colágeno, que através de uma hidrólise parcial é transformado em colágeno solúvel, resultando ou em gelatina ou em colágeno hidrolisado. Um terço dos aminoácidos do colágeno, e conseqüentemente da gelatina, é formado por glicina, outros 22% de prolina e hidroxiprolina e os restantes 45% são distribuídos em 17 aminoácidos diferentes. Uma característica especial da gelatina é o seu alto teor em aminoácidos básicos e ácidos. Dos aminoácidos ácidos (ácido glutâmico e ácido aspártico), cerca de um terço apresenta-se em forma de amida, como glutamina e asparagina. Dos aminoácidos que contêm enxofre (básicos), a metionina é o único presente, porém em pequena proporção. A cisteína está completamente ausente. Entretanto, não é considerada uma proteína nutricionalmente completa, por não conter triptofano, deficiência nos teores de isoleucina, treonina, metionina e aminoácidos essenciais para síntese de serotonina (ADAM *et al.*, 2004).

Os tecidos animais, geralmente suínos e bovinos, são classificados e cortados em pequenos pedaços e o material é inteiramente pré-lavado e tratado com solução alcalina de cal durante algumas semanas. O material é lavado com água corrente que remove outras substâncias indesejáveis sendo amaciado com solução fraca de ácido sulfúrico. Depois disso, a matéria-prima é tratada por meio de um processo de extração contínua ou múltiplos estágios de lavagem com água quente. As soluções assim obtidas têm uma concentração de aproximadamente 5%, e, através dessa forma de extração, tem um maior poder de gelificação. Numa segunda

etapa, a solução de gelatina passa por um processo de purificação, que consiste em filtragens de alto desempenho, que retêm os resíduos indesejáveis, como gorduras. A solução é então aquecida a cerca de 90 °C para a eliminação de grande parte da água, aumentando a concentração da gelatina, que se torna altamente viscosa, e é novamente filtrada. Essa solução é finalmente esterilizada, em temperaturas de até 140 °C. Posteriormente, a gelatina é solidificada em resfriadores especiais e pressionada através de discos rígidos perfurados, de onde sai em forma de espaguete. É então colocada sobre uma esteira de secagem. Na saída do túnel, é quebrada e moída, sendo depois estocada. Após todos os testes físico-químicos e biológicos, a gelatina é liberada para as aplicações específicas (A PRODUÇÃO..., 2007).

Portanto, processo de fabricação da gelatina tem as seguintes etapas básicas: tratamento do tecido colagênico, extração, purificação, concentração, esterilização, resfriamento, secagem. Na conversão do colágeno à gelatina, ocorre desnaturação da estrutura de hélice tripla e quebra das ligações peptídicas. Alguns dos aminoácidos na estrutura peptídica do colágeno contêm grupos funcionais que são hidrolisados sob condições ácidas ou básicas, levando a mudança no balanço dos grupos carregados das moléculas de gelatina. Considerando-se a forma e o tamanho da molécula de gelatina, tem-se uma outra propriedade importante, que é o ponto isoelétrico, que, por definição, é o pH da solução de proteína em que não há migração para um campo elétrico. As gelatinas são classificadas de acordo com a natureza da matéria-prima e do tipo de hidrólise aplicada a esta (HINTERWALDNER, 1977).

Há dois processos principais empregados na fabricação de gelatina (A PRODUÇÃO..., 2007):

- a) **Processo Ácido – para a fabricação de gelatina do Tipo A:** A matéria-prima (principalmente a pele suína) é submetida a um processo de pré-tratamento de três dias. Este tratamento é realizado com ácido e prepara a matéria-prima para o processo subsequente de extração.
  
- b) **Processo Alcalino – para a fabricação de gelatina do Tipo B:** Este processo estende-se por um período de várias semanas e vai transformando lentamente a estrutura do colágeno. Este processo somente pode ser aplicado quando a matéria-prima for osseína ou raspa bovina. O colágeno produzido desta maneira é solúvel em água quente.

Quando incorporados aos diferentes produtos de confeitaria, cada tipo traz suas próprias vantagens. Por exemplo, gelatina tipo A confere cor mais clara do que a gelatina derivada de ossos, proporcionando boa aparência visual. Gelatina do tipo B tende a ter viscosidade mais elevada do que a do tipo A quando tiver o mesmo valor “bloom” – medida de consistência de um gel (ESTABELECENDO..., 2004). Pode ser encontrada em duas versões: a alimentar e a suplementar. A suplementar, é encontrada em cápsulas ou em pó, e nada mais é do que o colágeno na sua forma mais pura, enquanto que a alimentar, usualmente para sobremesas, pode ser em pó com ou sem sabor, em folhas coloridas ou incolores, mas possuem uma menor quantidade de colágeno, indicada, portanto, como reforço de tratamento.

Por conter proteínas que podem ser alergênicas, assim como, corantes e aromatizantes artificiais, orienta-se o consumo da gelatina colorida somente para o

público infantil maior de um ano, pois nos lactentes, o organismo pode desencadear reações alérgicas.

A dose recomendada para inclusão da gelatina no cardápio é de 10 g diárias na forma de gelatina suplementar em pó, diluída em meio copo de água, ou sucos, leite, sopas, chás, etc. (ADAM *et al.*, 2004).

Para a gelatina alimentar, tem como indicação de consumo duas porções diárias, ou seja, 250 mL, necessárias para manutenção (SGARBIERI, 2004).

Na Alemanha, estudos de investigação dos efeitos da gelatina hidrolisada em atletas e pessoas idosas com problemas nas articulações constataram que a ingestão diária de 10 gramas de colágeno hidrolisado colabora para atenuar as dores e melhorar a mobilidade das articulações. Resultados semelhantes foram obtidos por especialistas em ortopedia, medicina esportiva e fisioterapia em Bonn, onde foram avaliados os resultados do consumo da gelatina e L-cistina, por um período de 3 até 15 meses, em pacientes que sofriam de doenças degenerativas articulares (ADAM *et al.*, 2004).

Embora na literatura internacional tenha – se relatos de pesquisa de PCF em gelatina comestível, Borsetti e Thurston (1980 -1984), somente desenvolveram um método (cromatografia gasosa por captura de elétrons) a ser utilizado pelos laboratórios oficiais reguladores, pois a preocupação na época era em o uso deste contaminantes em peles e couro bovinos.

Em um estudo colaborativo conduzido por Yip (1985), avaliaram-se apenas os resultados de limites de detecção e quantificação do método proposto por Borsetti e Thurston.

Campillo, Peñalver e Hernandez-Córdoba (2007), amostraram 07 tipos de gelatinas (comum e liofilizada) para teste de uma nova metodologia de análise (cromatografia gasosa / microondas de plasma induzido/deteção por emissão atômica) e detectaram  $0,3 \text{ ng g}^{-1}$  em apenas uma amostra de gelatina (liofilizada) para um  $\text{LD} = 6 \text{ ng g}^{-1}$ .

### **1.9 TESTES DE MIGRAÇÃO**

Na ingestão dos alimentos, o consumidor está exposto a diversas substâncias contaminantes, como consequência da migração a partir dos materiais e embalagens que estão em contato direto com os alimentos.

Todos estes materiais podem em determinadas condições, liberar pequenas quantidades de substâncias, que passam para o alimento, durante o período de tempo de contato entre o material e o alimento.

As substâncias capazes de migrar dos materiais para os alimentos são muito diversificadas e dependem do material em causa, podendo ser substâncias usadas no fabrico dos materiais, ou na sua transformação, como tintas de impressão, colas e adesivos e substâncias não intencionais formadas durante o processo, por degradação, ou posteriormente por reação com o próprio alimento, etc. Na grande maioria dos casos, estas substâncias têm baixa toxicidade e migram em concentrações inferiores a  $10 \text{ ng g}^{-1}$  até  $60 \text{ mg g}^{-1}$ , mas, no entanto são consumidas de forma mais ou menos continuada, ao longo de uma vida (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2005).

A determinação da quantidade de substâncias que o material de embalagem cede ao alimento é importante não só por razões de segurança

alimentar, mas muitas vezes por razões ligadas à qualidade do produto, já que as substâncias que migram podem alterar o sabor, o odor ou outras características do produto. Para avaliar a migração, determinam-se dois parâmetros: a migração global e a migração específica. No primeiro caso, faz-se uma avaliação geral, determinando-se a quantidade total de substâncias que migram, sem identificar de que substâncias se tratam, feito através de simulantes dos alimentos. No segundo caso, determina-se especificamente a quantidade que migra de uma determinada substância, e é fixado de acordo com a dose diária aceitável ou dose diária tolerável (BRASIL, 2001).

O grau de migração depende de alguns fatores, como:

- a) Tipo de material da embalagem;
- b) Natureza do alimento que está em contato com o material: se é um produto gordo, ou aquoso, ácido, etc.;
- c) Temperatura, pois podem afetar produtos que possuem uma vida de prateleira de semanas, meses ou anos, antes de serem consumidos, ou aqueles que têm um tempo de vida de apenas alguns dias.

De acordo com a resolução RDC 91 de 11 de maio de 2001, os testes de migração global e de migração específica são feitos nas condições de tempo de contato e temperatura, definidas de acordo com as condições reais.

## 2 OBJETIVOS

O objetivo geral desta pesquisa é o de averiguar a incidência e quantificar resíduos do pentaclorofenol (PCF) na embalagem e no produto de gelatina comestível, pois o PCF é apontado como preservante de madeira e agente fúngico nos processos de branqueamento da polpa de papel e beneficiamento do couro, matérias - prima estas que compõem o processo de fabricação da gelatina comestível (matriz a ser pesquisada).

Desta maneira , o objetivo específico deste trabalho consiste em determinação o status de migração deste contaminante na amostra em função da embalagem que a contém, levando-se em consideração que a embalagem primária (polipropileno) pode ou não ser uma barreira de contenção para a contaminação a ser pesquisada. Por conseguinte, também deverão ser estabelecidos novos limites de detecção e quantificação para este procedimento analítico, para que a metodologia empregada esteja disponível para análises requeridas pela vigilância em saúde.

### **3 ARTIGOS CIENTÍFICOS**

- 3.1** Investigation of pentachlorophenol in edible gelatin and its paperboard packaging in Southern Brazil. Submetida à Revista Food Additives and Contaminants.
  
- 3.2** Migration of pentachlorophenol residue from secondary paperboard packaging to edible gelatin matrix. Submetida à Revista Food Control.

Investigation of pentachlorophenol in edible gelatin and its paperboard packaging in Southern Brazil

R. Fiori<sup>a,b</sup>, T.M. Pizzolato<sup>c</sup> C.P.Z. Noreña<sup>a</sup>, A. Brandelli<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9500, 91501-970 Porto Alegre, Brasil.

<sup>b</sup> Laboratório de Saúde Pública, IPB-LACEN/FEPPS/RS, Av. Ipiranga 5400, Porto Alegre, Brasil.

<sup>c</sup> Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9500, Porto Alegre, Brasil.

**Abstract**

Despite restrictions on the use of pentachlorophenol (PCP) as sanitary products and e campaigns of public health since 1998, this compound has widespread application as fungicide in processes of tanning of animal hides and preservation of wood and its derivates. Residues of this pesticide could contaminate paper intended for food packaging constituting a public health risk. Twenty-five marks of edible gelatin produced at different states of Brazil, namely São Paulo, Santa Catarina, Ceará and Rio Grande do Sul, and commercialized in three regions of Southern Brazil were analyzed for the presence of PCP. The analytical procedure involves direct extraction of PCP from food packaging and edible gelatin samples and determination by gas chromatography with electron capture detection (GC-ECD). The method gave recoveries of 59.5% for gelatin and 82% for food packaging. Had been analyzed 25 gelatin marks (n =125) and only one mark of gelatin sample showed the presence of PCP, however below of the limit of detection. This study demonstrated a concern with the exposition to this contaminant considering that edible gelatin is largely consumed by infantile consumers.

**Keywords:** food packaging; gas chromatography - electron capture detector (GC-ECD); gelatin; paperboard; pentachlorophenol

## Introduction

Chlorophenols have found worldwide application in wood preservation, paper production, leather industry and agriculture. These compounds present a lipophilic character, which contributes to their bioaccumulation in the food chain (Koistunen *et al.* 2007). Pentachlorophenol (PCP) has been related as the most toxic compound among chlorophenols (Yang *et al.* 2005). The relatively high volatility and water solubility of PCP in its ionized form has led to widespread contamination of the environment. Depending on the temperature and type of wood, up to 80% of PCP may evaporate from treated wood within 12 months (World Health Organization 1987). Other impurities which have been found in PCP and their possible metabolic products are also subject of investigation. The exposition via the food chain is the most significant intake route of polychlorinated dibenzodioxin and dibenzofuran for the consumers (Edujje 1999). PCP can not only give rise to acute toxicity but also cause immunological and endocrine disorders and infertility problems in human (Birnbaum 1995, Gerhard *et al.* 1999). WHO classified PCP as a possible carcinogenic agent to humans (World Health Organization 1998).

The use of this chemical has been banned or severity restricted by most countries. European and German regulatory bodies compromised on a limit PCP value of 5 mg kg<sup>-1</sup> dry substance for waste wood to be recycled (Becker *et al.* 2002). The US and European Union legislations regulated the maximum levels of phenols in drinking water as 1 and 0.5 µg L<sup>-1</sup> (Awawdeh and Harmon 2005). In Brazil, PCP was widely used in the form its sodium salt (Na-PCP) as wood preservative to control mould and insects that causes sap stain and deterioration of lignocellulosic substrata. This chemical was also employed as antimicrobial on tanneries and paper production, and molluskacide in treatment of residual waters (Moreschi *et al.* 2005). PCP was prohibited in Brazil from 2006 by Resolution of Brazilian Health Surveillance Agency (Agência Nacional de Vigilância Sanitária 2006). However, the elevated environmental persistence of PCP and the increased demand for utilization of

recyclable paper materials in food packaging give rise to concerns about the presence of this chemical as a potential contaminant from paperboard to food (Choi *et al.* 2002).

Among the various methods developed for PCP analysis in different resources, the majority are focused on its determination in water (Bagheri *et al.* 2005; Bernal *et al.* 1997; Bianchi *et al.* 2002) and food packaging materials (Hagenbarth 2005; Choi *et al.* 2002; Summerfield and Cooper 2001; Diserens 2001; Jickells *et al.* 2005). Some methods for PCP determination in honey (Muiño and Lozano 1991; Sherma and McGinnis 1995; Campillo *et al.* 2006) and gelatin samples (Borsetti and Thurston 1984; Yip 1985; AOAC 1995) have been also described. These analytical methods often involve acidification of the sample to convert PCP to its non-ionized form, extraction with an organic solvent, cleaning into a basic solution, and determination by gas chromatography with electron capture detector (GC-ECD) or other chromatographic method.

Gelatin is broadly consumed by children, athletes and elderly people, and cartonboard boxes are commonly used as secondary packaging for this food. The aim of this work was to evaluate the incidence of PCP in edible gelatin and its packaging material in samples commercially available in Southern Brazil.

## **Materials and methods**

### **Reagents, solvents and standard**

Acetic anhydride, potassium hydroxide, sodium carbonate and sulfuric acid were from Vetec (Rio de Janeiro, Brazil). All reagents were of analytical grade. Acetone, hexane and isopropanol were of pesticide residue grade (Merck, Rio de Janeiro, Brazil). Analytical reference standard of pentachlorophenol was from Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, Germany) with 99% purity. Working solutions were prepared in hexane, making appropriate dilutions to give standard solutions ranging from 0.02 to 100.0 mg L<sup>-1</sup>.

### **Sample Preparation**

Twenty-five marks of edible gelatin produced at different states of Brazil, namely São Paulo, Santa Catarina, Ceará and Rio Grande do Sul, and commercialized in three different regions of Rio Grande do Sul (Fig. 1) were analyzed for the presence of PCP. Samples of five units (85 g each) of the same lot were acquired, representing different flavors of categories Diet and Light in a total of 125 samples. Samples were opened and the contents were homogenized into quarters in large inox trays. After homogenization 2 g of gelatin samples were weighed to test tubes of 100 mL. For the respective paper packaging, pieces were cut (1 x 1 cm) and 0.5 g were weighed into 100 mL test tubes.

### **Principle of analytical procedures**

The methods employed for gelatin and cardboard packagings are procedures originally developed by Borsetti and Thurston (Official Method 985.24, AOAC 1995) and Diserens (2001), respectively.

### **PCP extraction from gelatin sample**

Sample is acid-hydrolyzed with  $\text{H}_2\text{SO}_4$  solution and PCP is extracted with hexane, partitioned into KOH solution, acidified and extracted into hexane without preparation of a derivative.

Gelatin samples (2.0 g) were hydrolyzed with 10 mL of  $6 \text{ mol L}^{-1} \text{H}_2\text{SO}_4$  in tightly cap tubes heated for 60 min at  $100 \text{ }^\circ\text{C}$  in water bath. During this hydrolysis, tubes were periodically removed to mix samples by carefully shaking by hand. After 1 hour, the samples were allowed to cool, 10 mL hexane-isopropanol (4:1, v/v) were added and the mixture was shake for 2 min. The mixture was centrifuged for 2 min at  $1000 \times g$  and the upper hexane layer was transferred to clean tubes. The extraction was repeated twice and all hexane extracts were combined. In these tubes, 5 mL of  $1 \text{ mol L}^{-1} \text{KOH}$  were added; tubes were sealed and shake for 2 min, centrifuged and the upper layer was removed and discarded. Hexane (10 mL) was

added to the extract, and after mixing and centrifuging the hexane phase was removed and discarded. Ten milliliters of the final extracts were transferred to a volumetric flask. A blank reagent was prepared in parallel using this same procedure.

### **PCP extraction from paper packaging sample**

That is based on directly extracted and acetylated in a solution of sodium carbonate in the presence of acetic anhydride and hexane. The hexane layer is analyzed without further purification.

Small strips (0.5 g) of cardboard samples were added to 20 mL of 0.1 mol L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> mixing for 1 min. Then, 5 mL hexane and 2 mL acetic anhydride were added, the tubes were sealed and shake for 30 min. After incubation, tubes were allowed to phase separation, and the hexane layer was transferred to a volumetric flask of 10 mL. A blank reagent was prepared in parallel using this same procedure.

### **Gas chromatography analysis**

A gas chromatography system (Varian Analytical Instruments, USA) equipped with a Ni<sup>63</sup> electron capture detector (Varian Star Model 3600 Cx) and STAR workstation software was used to determine PCP in gelatin and paperboard samples. The separation column was a 12 m x 0.20 mm ID fused silica capillary SPB-5 with a film thickness of 0.33 μm (Supelco). The following GC parameters were kept constant: detector temperature, 300 °C; injector temperature, 250 °C; injection mode, splitless; injection volume, 1 μL. Column temperature program: initial temperature 100 °C, hold 2 min, from 100 °C at a rate of 10 °C min<sup>-1</sup> to final temperature 250 °C, hold 2 min. Carrier gas: ECD grade H<sub>2</sub>, at a flow rate of 1.0 mL min<sup>-1</sup>. Make up gas: ECD grade N<sub>2</sub>, at a flow rate of 1.0 mL min<sup>-1</sup>.

**Preparation of standard for calibration for gelatin sample**

In these analyses, PCP standard was used and working solutions were made by diluting the stock solution with hexane at concentrations of 0.1, 0.2, 0.4, 1.0, 10.0, 100.0 mg L<sup>-1</sup>. Aliquots of 1 µL of these solutions were injected in the GC system.

**Preparation of standard for calibration for paper packaging sample**

PCP at concentrations of 0.02, 0.04, 0.1, 0.2, 0.4, 1.0, 10.0 mg L<sup>-1</sup> in hexane (5 mL) was mixed with 20 mL of 0.1 mol L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> and 2 mL acetic anhydride. Tubes were sealed and shake 30 min on a mechanical shaker and let layers separate. Aliquots of 1 µL of the hexane layer were injected in the GC system.

**Limits of detection and quantitation for gelatin and paper packaging samples**

The limits of detection (LOD) and quantitation (LOQ) were defined as 3 and 10 times the value of noise, respectively. The standard deviation of the estimated concentration values of the lowest calibration point was used as a measure of the noise.

**Recoveries for gelatin sample and paper packaging samples**

Recovery of PCP during development of the method was evaluated by fortifying separate control gelatin samples in triplicate at 0.3 mg kg<sup>-1</sup> (1 LOQ), 1.5 mg kg<sup>-1</sup> (5 LOQ), 3.0 mg kg<sup>-1</sup> (10 LOQ) and control paper packaging samples in triplicate at 0.06 mg kg<sup>-1</sup> (1 LOQ), 0.3 mg kg<sup>-1</sup> (5 LOQ), 0.6 mg kg<sup>-1</sup> (10 LOQ).

## Results and Discussion

Twenty five marks of edible gelatin acquired from three regions of Rio Grande do Sul State, Southern Brazil, were analyzed. A total of 125 gelatin samples and their respective secondary packaging were investigated for presence of PCP. Only one gelatin sample was positive for PCP residues (Fig. 2), at concentration below the limit of quantitation established for the method ( $LOQ = 0,3 \text{ mg kg}^{-1}$ ), however, in none paperboard packaging occurred the presence of PCP. Since PCP presence in food is forbidden, there is not maximum permissible limit for this product.

With the establishment of clean technologies for leather production the utilization of PCP is being replaced. Since PCP was used for treatment of animal hides until 2004-2005, the presence of a positive gelatin sample could be associated with residual PCP from leather, which is a raw material for gelatin production. Considering the persistence of PCP in the environment, contamination from some place where raw material was stored can not be ruled out.

Although in this study PCP residue was not detected in packaging samples, PCP had been a selected fungicide agent of paper pulp, which is raw material of food packaging. Since the prohibition of PCP use for preservation of wood and cellulose pulp recently occurred in Brazil, from November 2006, still can have doubts on the presence of PCP in cardboard destined to foods. In accordance with the Resolution 130/2002, PCP does not have to be detected in levels higher than  $0.10 \text{ mg kg}^{-1}$  in the cartonboard packaging material and has received special attention to ensure the necessary levels of control of any substances that might be transferred to the food in contact with the paperboard (ANVISA 2002). The presence of PCP in packaging is a potential health hazard since migration of PCP from paperboard packaging to foods and water has been demonstrated (Choi *et al.* 2002; Song *et al.* 2003; Triantafyllou *et al.* 2007).

A general evaluation relative to extraction methods employed indicates that specific extraction step would be used for each sample group (gelatin and packaging). The analytical methods used here, involved acidification of the sample to convert PCP to its non-ionized form, followed by extraction into an organic solvent. PCP is a hydrophobic ionizable organic compound and its distribution strongly depends on the pH of the aqueous phase as well as the ionic strength (dependence is only reflecting for pH values in the aqueous phase above 7). Under pH 3 the fraction of neutral species is almost 100%, while above pH 7 the anionic PCP is predominant (Bras *et al.* 2005).

The procedures proposed for gelatin showed a tedious sample treatment. For gelatin samples and calibration standards it was applied underivatized PCP whereas that packaging sample it was followed with acetylation of samples and standards. Some variations in detector response have been noted when underivatized PCP was determined, with variations in reproducibility for PCP response and deviations from linearity (Fig. 2 (A), Fig.3 (A) and Table 1).

Detection limits depend not only on the sensitivity of the systems, analytical interferences may become a problem in PCP analysis for residues particularly at low measurement levels. Derivatization of PCP with appropriate compounds has been proven to be effective to reduce peak tailing. The acetylation allows the chromatographic separation of the acetylated chlorophenols with symmetric peak shapes (Stijve 1981). This method is selected for packaging materials (Diserens 2001), resulting in good linear response for standard calibration curve (Fig.3 (B) and Table 1).

Leaving LOQ and LOD values from original methods for gelatin and packaging, new limits were determined for PCP in gelatin and acetylated PCP in packaging (Table 1). Higher limits were found for gelatin, with LOD  $0.09 \text{ mg kg}^{-1}$  and LOQ  $0.3 \text{ mg kg}^{-1}$ , while Borsetti and Thurston's method (1984) presented a value of LOQ  $0.02 \text{ mg kg}^{-1}$  and LOD  $0.004\text{-}0.006 \text{ mg kg}^{-1}$ . Lower recovery data (59,5%) was also obtained. The interpretation for these results

could be associated with the fact that PCP was not derivatized and the chromatographic column used was a SPB-5 instead the 1%SP-1240 DA used in the original technique. The authors of this method suggest make multiple injections of sample extract or standard solution if inconsistent response are observed, which results an excessive time-consuming methodology.

According to Diserens method (2001), the packaging sample and standard solutions were derivatized resulting LOD below  $0.02 \text{ mg kg}^{-1}$  and our current analyzes was LOD  $0.002 \text{ mg kg}^{-1}$  and LOQ  $0.06 \text{ mg kg}^{-1}$ . For recovery was 82% against 94-115% from Diserens' method. In that case the screening method was analyzed by gas chromatography / mass spectrometry (GC/MS) on the single ion monitoring (SIM) mode in contrast by GC-ECD used in this research. Therefore, the variation coefficient obtained was above 20% for intra-assay accuracy in area function but in retention time function was below 20%, demonstrating the efficiency of derivatization for chromatographic separation with symmetric peak shapes.

Although in international literature it has stories of research of PCP in edible gelatin, Borsetti and Thurston (1980-1984), they had only developed a method (gas chromatography with electron capture detection) to be used by the regulating official laboratories, therefore the concern at the time was in the use of these contaminantes in bovine skins and leather. In a collaborative study lead by Yip (1985), had been evaluated only the results of detection limits and quantitation of the method considered for Borsetti and Thurston.

Campillo, Peñalver and Hernandez-Córdoba (2007), had showed 07 types of gelatins (common and lyophilized) for test of a new methodology of analysis (gas chromatography / microwave induced-plasma atomic emission spectrometry ) and had detected one gelatin (lyophilized) in the level of  $0,3 \text{ ng g}^{-1}$  for  $LD = 6,0 \text{ ng g}^{-1}$ .

**Conclusion**

Available methods must be used as a quality control to detect PCP residues in contaminated packaging and food, more rapid and sensitive using GC-ECD combined with mass spectrometry to confirm the identity of PCP peaks, mainly on official labs that investigated routine food controls to guarantee the public health.

The results presented here are very important towards increasing the enforcement activities of the Brazilian authorities, especially in relation to the investigation of illegal usage of certain pesticides in the food products. In addition, the future prospects are that this investigation will be continued randomly for encouraging that this status it remains in this mode.

**Acknowledgements**

Authors thank the staff of the Central Public Health Laboratory of Rio Grande of Sul (LACEN/RS) that collaborated with this work. A.B. is research awardees of National Research Council (CNPq, Brazil).

## References

- Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2002, Ministry of Health of Brazil, Resolução 130, de 10/05/2002 ANVISA/MS, VISALEGIS. Available at <http://www.anvisa.gov.br> .
- Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2006, Ministry of Health of Brazil, Resolução n. 164, de 18/08/2006 ANVISA/MS, VISALEGIS. Available at <http://www.anvisa.gov.br> .
- Association of Official Analytical Chemists, 1995, Pentachlorophenol in gelatin. Gas Chromatographic Method, First Action, 1985, Pesticide and Industrial Chemical Residues. Official Methods of Analysis, Washington, AOAC.
- Awawdeh, A.M., and Harmon, H.J., 2005, Spectrophotometric detection of pentachlorophenol (PCP) in water using immobilized and water-soluble porphyrins. *Biosensors & Bioelectronics*, **20**, 1595-1601.
- Bagheri, H., Mir, A., and Babanezhad, E., 2005, An electropolymerized aniline-base fiber coating for solid phase microextraction of phenols from water. *Analytica Chimica Acta*, **532**, 89-95.
- Becker R., Buge, H.G., and Win, T., 2002, Determination of pentachlorophenol (PCP) in waste wood - method comparison by a collaborative trial. *Chemosphere*, **472**, 1001-1006.
- Bernal J.L., Nozal, M.J., Toribio, L., Serna, M.L., Borrull, F., Marce, R.M., and Porcurull, E., 1997, Determination of phenolic compounds in water samples by online solid-phase extraction-supercritical-fluid chromatography with diode-array detection. *Chromatographia*, **46**, 295-300.
- Bianchi F., Caseri, M., Mucchino, C., and Musci, M., 2002, Improved determination of chlorophenols in water by solid-phase microextraction followed by benzylation and gas chromatography with electron capture detection. *Chromatographia*, **55**, 595-600.
- Birnbaum, L.S., 1995, Developmental effects of dioxins and related endocrine disrupting chemicals. *Toxicology Letters*, **82-83**, 743-750.

- Borsetti, A.P., and Thurston, L.S., 1984, Gas chromatographic determination of pentachlorophenol in gelatin. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, **67**, 275-277.
- Bras I., Lemos, L., Alves, A., and Pereira, M.F.R., 2005, Photo-Fenton assisted ozonation of *p*-coumaric acid in aqueous solution. *Chemosphere*, **60**, 1095.
- Campillo, N., Peñalver, R., and Hernández-Córdoba, M., 2006, Evaluation of solid-phase microextraction conditions for the determination of chlorophenols in honey samples using gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, **1125**, 31-37.
- Choi, J.O., Jitsunari, F., Asakawa, F., Park, H.J., and Lee, D.S., 2002, Migration of surrogate contaminants in paper and paperboard into water through polyethylene coating layer. *Food Additives and Contaminants*, **19**, 1200-1206.
- Diserens, J.M., 2001, Rapid determination of nineteen chlorophenols in wood, paper, cardboard, and fruit juices by gas chromatography mass spectrometry. *Journal of AOAC International*, **3**, 126-134.
- Eduljee, G., 1999, Secondary exposure to dioxins through exposure to PCP and its derivatives. *Science of the Total Environment*, **232**, 193-214.
- Gerhard I., Frick, A., and Monga, B., 1999, Pentachlorophenol exposure in women with gynecological and endocrine dysfunction. *Environmental Research*, **80**, 383-388.
- Hagenbarth, M.J., 2005, Paper and paperboard industry protocol for sampling and analysis of recycled materials intended for food packaging applications. *Food Additives and Contaminants*, **22**, 1042-1052.
- Jickells S.M., Poulin, J., Mountfort, K.A., and Fernandez-Ocana, M., 2005, Migration of contaminants by gas phase transfer from carton board and corrugated board box secondary packaging into foods. *Food Additives and Contaminants*, **22**, 768-782.
- Koistinen, J., Kukkonen, J.V.K., Sormunen, A., Mannila, E., Herve, S. and Vartiainen, T., 2007, Bioaccumulation, bioavailability and environmental fate of chlorophenol impurities,

- polychlorinated hydroxydiphenylethers and their methoxy analogues. *Chemosphere*, **68**, 1382-1391.
- Moreschi, J.C., 2005, Produtos Preservantes de Madeira. Universidade Federal do Paraná, Curso de Pós Graduação em Engenharia Florestal.
- Muiño, M.A.F., and Lozano, J.S., 1991, Mass spectrometric determination of pentachlorophenol in honey. *Analytica Chimica Acta*, **247**, 121-123.
- Sherma, J., and McGinnis, S.C., 1995, Determination of pentachlorophenol and cymiazole in water and honey by C-18 solid-phase extraction and quantitative HPTLC. *Journal of Liquid Chromatography*, **18**, 755-761.
- Song, Y.S., Begley, T., Paquette, K., and Komolprasert, V., 2003, Effectiveness of polypropylene film as a barrier to migration from recycled paperboard packaging to fatty and high-moisture food. *Food Additives and Contaminants*, **20**, 875-883.
- Stijve, T., 1981, Determinatiuon of pentachrophenol and 2,3,4,6-tetrachlorophenol in edible gelatins. *Deustsch Lebensmittel Rundsch*, **77**, 249-253.
- Summerfield, W., and Cooper, I., 2001, Investigation of migration from paper and board into food-development of methods for rapid testing. *Food Additives and Contaminants*, **18**, 77-88.
- Triantafyllou, V.I., Akrida-Demertzi, K., and Demertzis, P.G., 2007, A study on the migration of organic pollutants from recycled paperboard packaging materials to solid food matrices. *Food Chemistry*, **101**, 1759-1768.
- WHO, 1987, Environmental Health Criteria 71: Pentachlorophenol. World Health Organization, Geneva, pp. 236.
- WHO, Guidelines for drinking-water quality, 2<sup>nd</sup> edition, vol. 2. Health criteria and other supporting information 1996, 940 and Addendum to vol. 2 1998,281. Geneva: World Health Organization.

Yang, S., Han, X., Wei, C., Chen, J., and Yin, D., 2005, The toxic effects of pentachlorophenol on rat Sertoli cells in vitro. *Environmental and Toxicological Pharmacology*, **20**, 182-187.

Yip, G., 1985, Gas chromatographic determination of pentachlorophenol in gelatin: collaborative study. *Journal of Association of Official Analytical Chemists*, **68**, 419-421.

**Table 1.** Determination of PCP in gelatin and paperboard packaging by GC-ECD.

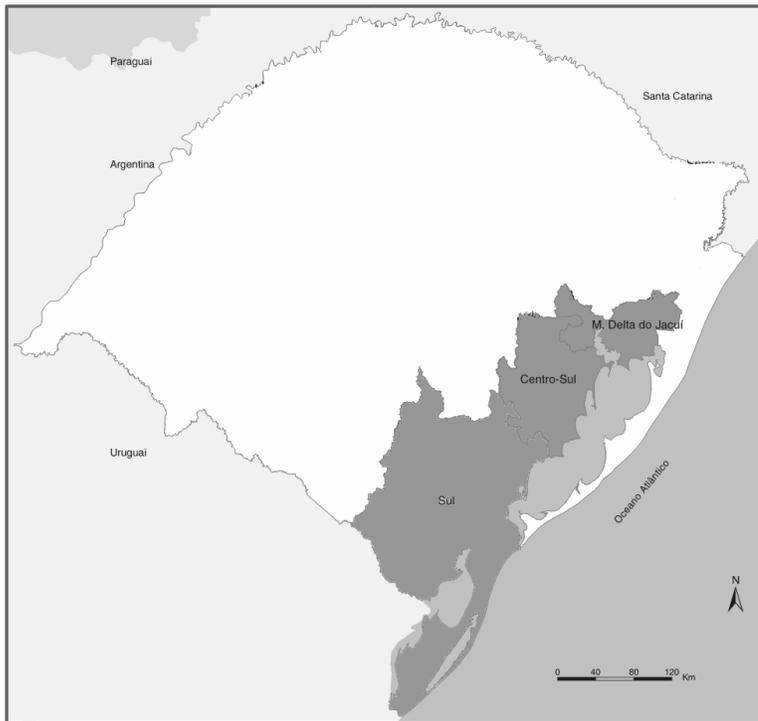
	Gelatin	Packaging
Analyte	PCP	Acetylated PCP
LOD (mg kg <sup>-1</sup> )	0.09	0.002
LOQ (mg kg <sup>-1</sup> )	0.3	0.06
Recovery (%)	59.5 ±2.0	82 ±5.8
Linearity	$y = 32.599x + 2283.8$	$y = 240399x - 28553$
R	0.949	0.998
Slope	32.6	240399
Interception	2284	28553

**Figure legends**

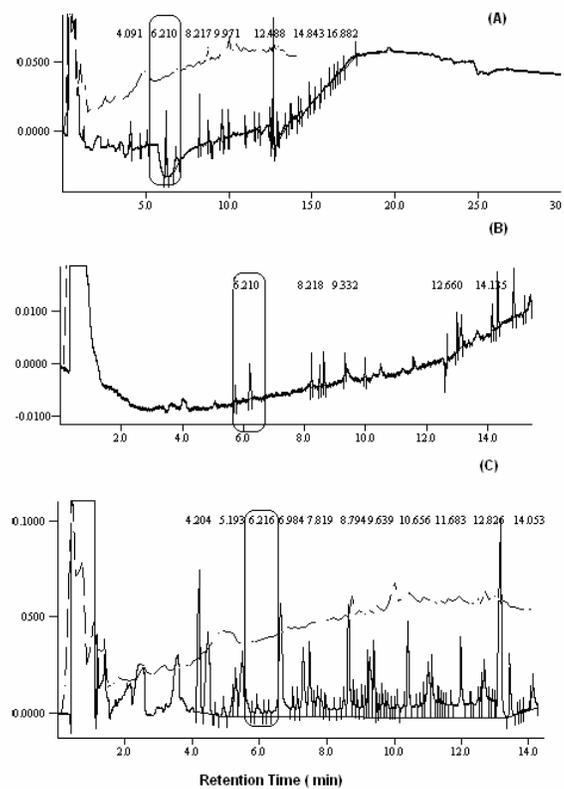
**Fig. 1.** Map showing the locations where edible gelatin samples were obtained. Samples of 25 different marks were obtained from three different regions (marked in gray) as defined by the Health Surveillance Service of Rio Grande do Sul State.

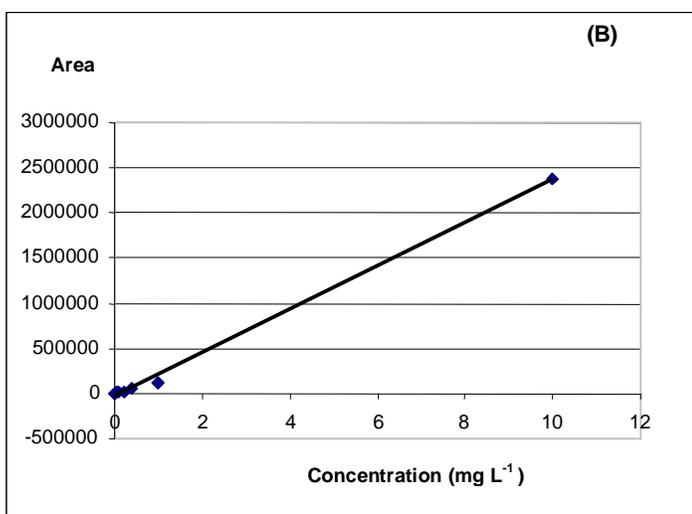
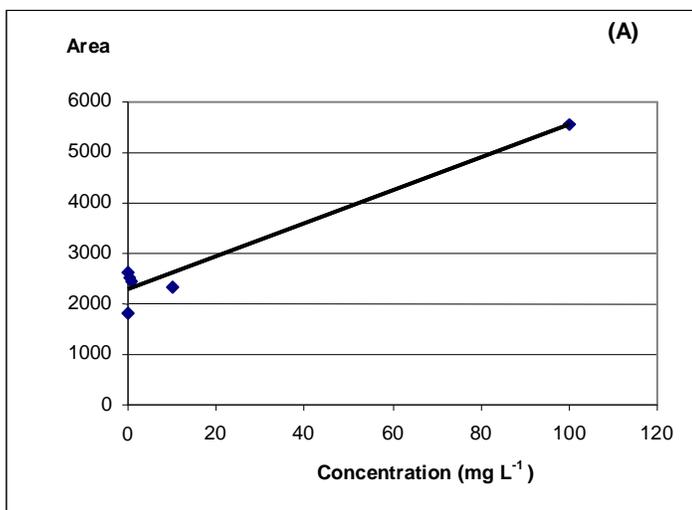
**Fig. 2.** Determination of PCP by GC-ECD. Chromatograms showing (A) underivatized PCP standard solution ( $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ ), (B) fortified gelatin sample with underivatized PCP standard solution ( $3 \text{ mg L}^{-1}$ ) and (C) presence of PCP in gelatin sample ( $0,09 \text{ mg kg}^{-1}$ ).

**Fig. 3.** Calibration curves for (A) PCP standard solution and (B) acetylated PCP standard solution.



Fiori *et al.*, Fig. 1

Fiori *et al.*, Fig. 2

Fiori *et al.*, Fig. 3

Short communication

Migration of pentachlorophenol residue from secondary paperboard packaging to edible gelatin matrix

Raquel Fiori<sup>a,b</sup>, Tânia M.Pizzolato<sup>c</sup>, Caciano P.Z. Noreña<sup>a</sup>, Adriano Brandelli<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 91501-970 Porto Alegre, Brasil

<sup>b</sup>. Laboratório de Saúde Pública-IPB-LACEN/FEPPS/RS, Av. Ipiranga, 5400 – Porto Alegre /RS - Brasil .e-mail : rfsouza@hotmail.com

<sup>c</sup> Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 91501-970 Porto Alegre, Brasil.

\*Corresponding author: Dr. A. Brandelli, ICTA-UFRGS, Av. Bento Gonçalves 9500, (1501-970 Porto Alegre, Brazil; fax: +5551 3308 7048; e-mail: abrand@ufrgs.br

**Abstract**

In the four last decades, international scientific community has come back its attention toward the decurrent toxicology aspects of the cession of certain harmful substances of the packing in direct or indirect contact with foods. A range of paper and board material including cartonboard intended for contact with food could be a risk to consumer, had to the use of pentachlorophenol (PCP) as wood and cellulose pulp preservative. This study analyze the transfer and incorporation of PCP in secondary packaging proving a ineffectiveness as a barrier to migration of polypropylene (PP) film used as primary packaging of food. The results indicated migration on elevated temperature (60 °C) in a short period of time (48 h) when secondary packaging was spiked for PCP derivatized 0.01 mg kg<sup>-1</sup> and placed in contact with dry gelatin conditioned in sachets of PP. A recovery range was 10-28 % to LOD 0.002 mg kg<sup>-1</sup>.

**Keywords:** Pentachlorophenol; migration; secondary packaging; gelatin

## 1. Introduction

The sector of paper and cellulose in Brazil strongly contributes for the economic and social development, producing 10.1 million tons of paper per year. In the global ranking, Brazil is the 7<sup>th</sup> world producer of cellulose and reached the 11<sup>th</sup> place in the production of paper in the year of 2007 (Bracelpa, 2007). According to Brazilian Association of Packagings, the second major utilization for the manufactured paper corresponds to the spending for paperboard packaging.

Paper and paperboard are composites of pulp of vegetal sources as the wood of planted forests (*Pinus* and *Eucalyptus*) normally used as food packaging materials, frequently in forms adapted to direct contact with dry foodstuffs. These materials are frequent seen by the consumer as healthful, but diverse additives are incorporated during the production as agents of resistance, whitening, preservatives, which vary depending on the final purpose. Currently, the negative environmental impact of plastic packaging waste has driven to a gradual push towards use biodegradable materials in food packaging. Paper has attractively seen as a material ease of recycling them (Triantafyllou *et al.*, 2002). However, to avoid attack and development of xylophage microorganisms, some chemicals are used wood preservative and slimicides to a cellulose pulp.

Pentachlorophenol (PCP) had been widely used in wood preservation. This chlorophenol has received special attention in order to measure the levels that can be transferred to foods for direct contact (Triantafyllou, Akrida-Demertzi and Demertzis, 2007; Summerfield and Cooper, 2001; Song *et al.*, 2003; Diserens, 2001; Osaki *et al.*, 2004). This chemical is reported to be a potential carcinogen and genotoxic agent causing chromosomal aberration (National Cancer Institute, 1979) and during the burning of PCP-treated materials, polychlorinated dibenzodioxin and dibenzofuran (PCDD/F) may also be formed (Environmental Health Criteria, 1987). According with the Governmental Decree of Health Ministry of Brazil – Resolution 164/2006 – ANVISA, it had exclusion PCP use from

November 2006. The only resolution that limits levels ( $0.10 \text{ mg kg}^{-1}$ ) in cartonboard packaging materials is RDC 130/2002 –ANVISA.

The term migration usually describes a diffusion process, which may be strongly influenced by an interaction of the packaging material with the food, gained a widespread importance in food safety as normal procedure for checking compliance introduced into legislation. Migration of packaging components can be inferior  $10 \text{ ng g}^{-1}$  till  $60 \text{ mg kg}^{-1}$  that biological reply in the exposed organisms will not be short-term observed, however, after long periods of contaminated food ingestion, subtle toxic manifestations and of difficult detection will be able to occur (Poças, Santos and Xará, 1993).

The industries that put package foods or those who manufacture and sell raw materials do not always know the identities of the potential migrants. Therefore, it is important to analyze the final product as packaging and food for guarantee the quality of products offered a population. This report verified the migration of PCP from spiked paperboard packaging into dry food as edible gelatin in different temperatures and time, which simulate a typical package situation originating indirect contact controlled by a polypropylene film into which the PCP diffused.

## **2. Materials and methods**

### *2.1. Chemicals*

Acetic anhydride, potassium hydroxide, sodium carbonate and sulfuric acid were from Vetec (Rio de Janeiro, Brazil). All reagents were of analytical grade. Acetone, hexane and isopropanol were of pesticide residue grade (Merck, Rio de Janeiro, Brazil). Analytical reference standard of pentachlorophenol was from Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, Germany) with 99% purity .

## 2.2. Gelatin samples

Edible gelatin samples (85 g) in carton box as secondary packaging involving sachets of polypropylene as primary packaging were used. Samples were obtained at a local market at three different regions of Rio Grande of Sul (Brazil).

## 2.3. Preparation of PCP for calibration curve

Standard PCP solutions were prepared in hexane, making appropriate dilutions to give concentrations of 0.02, 0.04, 0.1, 0.2, 0.4, 1.0 and 10.0 mg L<sup>-1</sup>. Five milliliters of these solutions were mixed with 20 mL of 0.1 mol L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> and 2 mL acetic anhydride. Tubes were sealed, shake 30 min on a mechanical shaker and then allowed to phase separation. Aliquots of 1 µL of the hexane layer were injected in the GC system.

## 2.4. Gas chromatography analysis

A gas chromatography system (Varian Analytical Instruments, USA) equipped with a Ni<sup>63</sup> electron capture detector (Varian Star Model 3600 Cx) and STAR workstation software was used to determine PCP in gelatin and paperboard samples. The separation column was a 12 m X 0.20 mm ID fused silica capillary SPB-5 with a film thickness of 0.33 µm (Supelco). The following GC parameters were kept constant: detector temperature, 300 °C; injector temperature, 250 °C; injection mode, splitless; injection volume, 1 µL. Column temperature program: initial temperature 100 °C, hold 2 min, from 100 °C at a rate of 10 °C min<sup>-1</sup> to final temperature 250 °C, hold 2 min. Carrier gas: ECD grade H<sub>2</sub>, at a flow rate of 1.0 mL min<sup>-1</sup>. Make up gas: ECD grade N<sub>2</sub>, at a flow rate of 1.0 mL min<sup>-1</sup>.

## 2.5. Accelerated migration test

Five milliliters of a standard solution of acetylated PCP (0.01 mg L<sup>-1</sup>) were sprayed into empty gelatin cardboard packaging, which was allowed to dry. The dry gelatin samples

involved in closed sachets of polypropylene were replaced into spiked packaging, closed and stored at 25, 40 or 60 °C for 3, 6, 24 and 48 h. After exposure, it was proceeded the extraction conform analytical method adopted.

### *2.6. Analytical procedure*

The method employed for PCP in gelatin (AOAC, 1985 : 985.24,) consists in acid hydrolysis of gelatin with H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> solution, originating a homogeneous hydrolysate to facilitate the PCP extraction with hexane. Partition with KOH solution executes the function of clean up to separate acid compounds and PCP.

Gelatin samples were removed from secondary cardboard packaging and opened the sachets. Gelatin samples (2.0 g) were hydrolyzed with 10 mL of 6 mol L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in tightly cap tubes heated for 60 min at 100 °C in water bath. During this hydrolysis, tubes were periodically removed to mix samples by carefully shaking by hand. After 1 hour, the samples were allowed to cool, 10 mL hexane-isopropanol (4:1, v/v) were added and the mixture was shake for 2 min. The mixture was centrifuged for 2 min at 1000 x g and the upper hexane layer was transferred to clean tubes. The extraction was repeated twice and all hexane extracts were combined. In these tubes, 5 mL of 1 mol L<sup>-1</sup> KOH were added; tubes were sealed and shake for 2 min, centrifuged and the upper layer was removed and discarded. Hexane (10 mL) was added to the extract, and after mixing and centrifuging the hexane phase was removed and discarded. Ten milliliters of the final extracts were transferred to a volumetric flask. A blank reagent was prepared in parallel using this same procedure.

## **3. Results**

Typical GC-ECD chromatograms are shown in Fig. 1. The clear peaks were obtained at the same retention time as those of standards in hexane. The quality criteria applied were: (1) retention time match for sample to be within 9.61 min of the mean for standards analyzed; (2)

a signal-to-noise ratio of 3 for the limit of detection (LOD); (3) LOD was calculate from calibration standards. The linearity of calibration curve obtained the correlation coefficient  $r^2 = 0.9978$  and according Rieder *et al.* (2000), is considered strongest correlation with minor dispersion on set of points located in the curve. LOD was in the range  $0.002 \text{ mg kg}^{-1}$  and repeatability was calculated using the Relative Standard Deviation (RSD) obtained range 1%. Finally, the calculated recovery value was in the range 10-28%.

Gelatin samples were exposed to secondary packaging artificially contaminated with PCP and investigated for presence of PCP. Among the conditions of time and temperature tested, PCP was detected in samples exposed at  $40 \text{ }^\circ\text{C}$  for 48 h and at  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  for 6, 24, 48 h (Table 1). In these conditions, samples were positive for PCP residues at concentrations above the limit of detection (LOD) established for the method.

The results of the time dependent migration of PCP from secondary cardboard packaging at  $40 \text{ }^\circ\text{C}$  and  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  into gelatin and at  $40 \text{ }^\circ\text{C}$  important migration occurred only at 48 h, but at  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  PCP migration was observed at 6 h (Fig. 2).

It was observed how rapid migration from paper box packaging occurs to dry gelatin in elevated temperature and short period of time, even through polypropylene film that is generally used as barrier to migration.

#### **4. Discussion**

PCP showed ability to migrate from a secondary packaging to a dry food matrix, in this case, edible gelatin. The migration kinetics often dependents on the temperature, nature and properties of the paper (like thickness), and nature of the contaminant (chemical structure and physical properties). PCP hold relatively high molecular mass ( $266 \text{ g mol}^{-1}$ ) getting itself relative low migration rates (Choi *et al.*, 2002). Papers are relatively open and porous structures allowing the contaminants can be transferred to dry and fatty foods in short

exposure times. Efficient and rapid migration of chemical pollutants, including chlorophenols, from paperboard to selected dry foods has been reported (Anderson and Castle, 2003; Triantafyllou, Akrida-Demertzi and Demertzis, 2007). However, primary polypropylene packaging was not capable to hinder PCP migration.

Some researchers have investigated the effectiveness of polypropylene and polyethylene films in contact to food : Choi *et al.* (2002), had demonstrated that polyethylene with thicknesses between 0,012 and 0,030 mm to 24- 10 °C, per 21 days, for apolar contaminants, as the anthracene and the methyl stearate, did not demonstrate occurrence of significant migration in the first water, however, with polar contaminants as PCP, benzophenone and the dimethyl phthalate after one day of contact in 10 °C , presented migration to the level of 5 mg L<sup>-1</sup>, detected by gas chromatography. Another study, it evaluated the use of polypropylene films (0.031, 0.071 and 0,127 mm) tested in solvent simulantes of foods (95% ethanol, isopropanol and 10% ethanol) to a 100 °C for 2 hours, demonstrating the inefficacy of the same for the contamination of benzophenone, anthracene, methyl stearate and PCP with a concentration of 1 mg kg<sup>-1</sup>, evidencing that in films of lesser thickness in this level of contamination, the migration probability is bigger. (SONG *et al.*, 2003). They found that such films were not effective as barriers to some chemical contaminants.

It is alarming the fact of food products, being the packing contaminated in the origin, can become tainted by even low concentrations of undesirable compounds like PCP. This situation is even truer if the products are stored under inadequate conditions. Particularly, gelatin is greatly consumed by children and athletes. Gelatin is normally consumed by children in the school diets at least a time per week (Adam *et al.*, 2004) and for athletes it is an indicated dessert before a competition (Sansone, 2007). Thus could represent a risk of sub-acute contamination.

Therefore, similar studies must be developed with other contaminants simulating the real situation in the proper sample and not only determined in solvents simulation. These experimental data are relevant to monitor the situation of food packaging materials for the presence of toxic compounds that can effectively be transferred to food products. Such results may help the health surveillance agencies to check the resources utilized for food packaging are in agreement the legislation.

### **Acknowledgements**

Authors thank the staff of the Central Public Health Laboratory of Rio Grande of Sul State (LACEN/RS) that collaborated with this work.

## References

Adam, M., Kasper, H., Seeligmüller, K. and Beuker, F. Collagen Hydrolysate and its Relationship to joint health. A science compendium (2004), 1<sup>a</sup> Ed.

Anderson W.A.C. and Castle L., Benzophenona in cartonboard packaging materials and the factors that influence its migration into food. Food Additives and Contaminants **20** (2003) 607-618.

AOAC - Official Methods of Analysis of the Association of Analytical Chemists. Pentachlorophenol in gelatin. Gas Chromatographic Method, First Action, 1985, Pesticide and Industrial Chemical Residues, Chapter 10, Supplement March, 1 - pp. 58.

BRACELPA NEWS, Ano XIII – n. 666 (2007), Available at <http://www.bracelpa.org.br> .

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Resolução RDC n. 130, de 10/05/2002 ANVISA/MS, VISALEGIS. Available at <http://www.anvisa.gov.br> .

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Resolução RDC n. 164, de 18/08/2006 ANVISA/MS, VISALEGIS. Available at <http://www.anvisa.gov.br> .

Choi J.O., Jitsunari F., Asakawa F., Park H.J. and Lee D.S, Migration of surrogate contaminants in paper and paperboard into water through polyethylene coating layer. Food Additives and Contaminants **19** (2002) 1200-1206.

Diserens J. M., Rapid determination of Nineteen Chlorophenols in Wood Paper, Cardboard, and Fruit Juices by Gas Chromatography Mass Spectrometry. Journal of AOAC International **3** (2001) 126-134.

Environmental Health Criteria 71: Pentachlorophenol. World Health Organization, Geneva, 1987, pp.236.

National Cancer Institute, NCI Public Inquiries Office, 6116 Executive Boulevard, Available at <http://www.cancer.gov/help> .

Ozaki A., Yamaguchi Y., Fujita T., Kuroda K. and Endo G, Chemical analysis and genotoxicological safety assessment of paper and paperboard used for food packaging. *Food and Chemical Toxicology* **42** (2004) 1323-1337.

Poças, M.F., Santos, M.C. and Xará, S. *Interacção Embalagem / Alimento*, Porto , CEPA/ESB (1993).

Rieder A., Dores E. F. G. de C, Higa N. and Moraes M. P. L., Alterações no teor de matéria orgânica de solos e provável efeito no poder de proteção ambiental nas bordas do pantanal diante da poluição por pesticidas, *Pesticidas: R. Ecotox. e Meio Ambiente*, Curitiba, **10** (2000), jan./dez 87-112.

Sansone, F. *Orientação nutricional para atletas em dias de competições*, CPN News – On line. (2007). Available at <http://www.cpnacademia.com.br> .

Song Y.S., Begley T., Paquette K. and Komolprasert V., Effectiveness of polypropylene film as a barrier to migration from recycled paperboard packaging to fatty and high-moisture food. *Food Additive Contaminants* **20** (2003) 875-883.

Summerfield W. and Cooper I. Investigation of migration from paper and board into food-development of methods for rapid testing. *Food Additives and Contaminants*, **18** (2001) 77-88.

Triantafyllou V.I., Karamani A.G., Akrida-Demertzi K and Demertzis P.G., Studies on the usability of recycled PET for food packaging applications. *European Food Research and Technology* **215** (2002) 243-248.

Triantafyllou V.I., Akrida-Demertzi K. and Demertzis P.G, A study on the migration of organic pollutants from recycled paperboard packaging material to solid food matrices. *Food Chemistry* **101** (2007) 1759-1768.

**Table 1.** Migration of PCP from cardboard packaging to gelatin\*

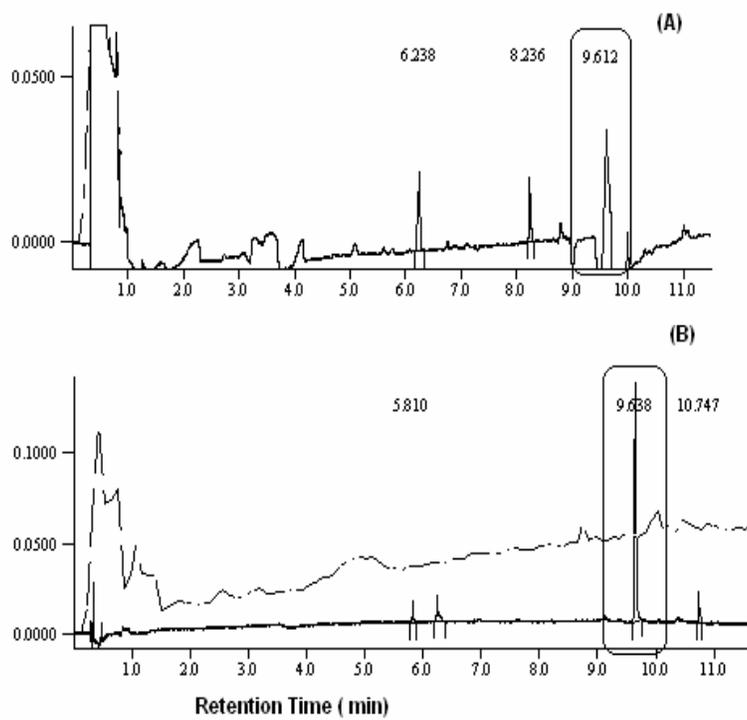
Temperature (°C)	Time of exposition (h)			
	3	6	24	48
25	<0.002	<0.002	<0.002	<0.002
40	<0.002	<0.002	<0.002	0.002
60	<0.002	0.01	0.01	0.06

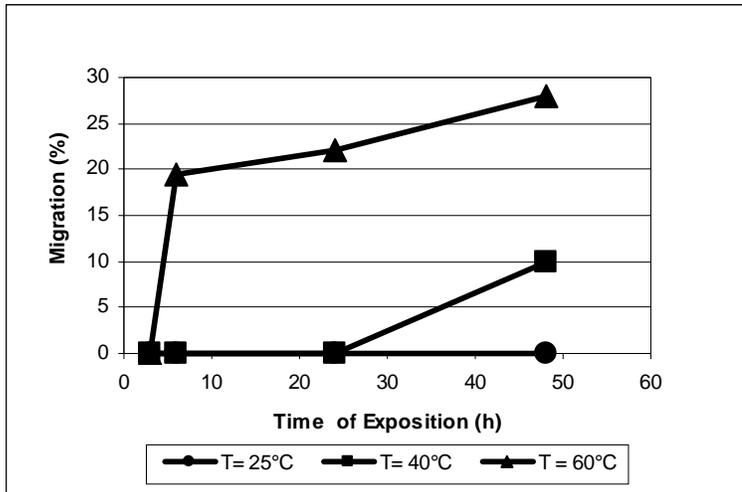
\* Values for PCP are expressed as mg kg<sup>-1</sup>. LOD = 0.002 mg kg<sup>-1</sup>.

**Figure legends**

**Fig. 1.** Determination of PCP by GC-ECD. Chromatograms showing (A) presence of PCP in gelatin sample after migration at 60 °C for 48h, (B) Acetylated PCP standard solution (0,2 mg L<sup>-1</sup>).

**Fig. 2.** Migration of PCP from secondary cardboard packaging to gelatin matrix.

Fiori *et al.*, Fig. 1



Fiori *et al.*, Fig. 2

## 4 DISCUSSÃO

Para o objetivo de averiguar a situação de possível incidência de contaminação por pentaclorofenol (PCF) em amostras de gelatina comestível, assim como, de sua embalagem de papel, o presente trabalho apresentou resultados satisfatórios. Das 25 marcas correspondentes a 125 amostras (as embalagens de diferentes tipos de marcas eram idênticas) encontradas no comércio local das seguintes regiões do Estado do RS: Sul, Centro Sul e Metropolitano Delta do Jacuí, apenas uma marca apresentou presença deste contaminante em valores abaixo do limite de quantificação, sendo que nas análises ensaiadas nas embalagens de papel da matriz gelatina, nenhum resíduo foi detectado.

Foram estabelecidos limites de quantificação (LQ) e detecção (LD) diversos do que foi apresentado na metodologia original, em virtude das modificações feitas para adequar o método com a realidade operacional do laboratório. A análise instrumental adotada foi à cromatografia a gás com detector de captura de elétrons, constituindo-se ainda, no mais adequado para clorofenóis. O limite de quantificação e de detecção estabelecido pelo método de Borsetti & Thurston (1984) foi de 0,02 mg kg<sup>-1</sup> e 0,004-0,006 mg kg<sup>-1</sup>, respectivamente, usando uma coluna cromatográfica de 1% SP1240 DA. O LD encontrado foi de 0,09 mg kg<sup>-1</sup> e LQ foi 0,3 mg kg<sup>-1</sup> com recuperação das amostras fortificadas em 59,5%.

Apesar deste método ser simples, o mesmo demonstrou-se de execução muito extensa, assim como, propiciou perdas de amostras (remoção das fases orgânica ou aquosa) pela partição líquido – líquido . O uso de padrão e amostra sem derivatizar dificultou em uma boa resolução dos picos de PCF. Trata-se de um método Oficial, adotado desde 1984 para extração de PCF em leite e sangue de gado leiteiro e foi adaptada para extração em gelatina comestível. A técnica original

não utiliza a derivatização pelo fato de estar substituindo a mesma pelo uso de uma coluna cromatográfica de vidro contendo como fase líquida 1% SP-1240 DA indicada para determinação como fenol livre.

Em um estudo colaborativo, 11 laboratórios integrantes, utilizaram as mais diversas colunas cromatográficas com o mesmo procedimento analítico, e o que foi observado pelo coordenador Yip, (1985), é que houve variação na altura dos picos e nos tempos de retenção (1,25 a 10,25 min), alargamento de picos e recuperações que variaram de 46 a 114% .

O único método descrito para este tipo de matriz, deve ser revisado em sua extração, para se evitar perdas, e como análise instrumental, seguindo o uso de cromatografia gasosa com ECD, sem o auxílio de espectrometria de massas, a derivatização ainda é a mais adequadas para melhorar o desempenho dos picos sem mudar o uso de colunas cromatográficas comuns em laboratórios de análises de resíduos como as conhecidas 5% fenil metil silicone.

Quanto à análise das embalagens de papel, através do método de Diserens (2001), a mesma mostrou – se de rápida operação com derivatização da embalagem e padrão. O LD ficou com  $0,002 \text{ mg kg}^{-1}$  e LQ  $0,006 \text{ mg kg}^{-1}$  e as fortificações apresentaram 82% de recuperação. Diserens utilizou cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas tendo um LD menor de  $0,02 \text{ mg kg}^{-1}$ , desenvolvendo um método rápido de triagem de PCF em frutas, madeiras e papel/papelão.

A etapa de acetilação permitiu a separação cromatográfica do clorofenol acetilado (PCF) com formato de picos simétricos, em contraste com clorofenóis

livres, que usualmente produzem picos com caudas pronunciadas e pouca linearidade.

Os inúmeros métodos analíticos para a análise deste contaminante requerem procedimentos de extração exaustivos, tais como soxhlet, extração em fase sólida, líquido – líquido, destilação a vapor e nas mais diversas alternativas analíticas como cromatografia líquida, cromatografia em fluido supercrítico e eletroforese capilar, porém a capacidade operacional do laboratório é que deve decidir qual o melhor método e adaptá-lo quando necessário .

Para o teste de migração, que é a segunda proposta deste trabalho, evidenciou-se que em alta temperatura e em curto espaço de tempo de exposição é possível uma incorporação e transferência do resíduo PCF da embalagem para a matriz gelatina (40 °C no tempo de 48 h e 60 °C para os tempos maiores que 6 h ) perspassando a barreira de polipropileno (saches com gelatinas).

Embora os valores encontrados para a recuperação e concentração foram baixos, isto é possível ocorrer devido à volatilidade do contaminante pesquisado, pois pode depender do tempo de exposição, da natureza da embalagem primária e da concentração do PCP na embalagem secundária (JICKELLS *et al.*, 2005).

De acordo com Song *et al.* (2003), há um decréscimo da concentração de contaminantes, tais como o antraceno, benzofenona, estearato metílico e PCP, quando se aumenta a espessura do filme do polímero da embalagem de 0,071 mm para 0,127 mm .

Jickells *et al.* (2005), menciona que a transferência de alguns contaminantes pesquisados (diheptilftalato, diisopropilnaftaleno, benzofenona e tricloroanisole) foi mais rápida em embalagem primária de papel com cereais de

0 – 10 dias comparados com 10 - 30 dias na embalagem primária de polipropileno com cereais.

Simoneau (2003) refere-se à pressão de vapor de substâncias polares como medida que possa facilitar a entrada da fase gasosa no material da embalagem. A espessura da natureza da embalagem primária também pode influenciar no processo de transferência.

A termodinâmica da natureza cinética no processo de dissolução e difusão de cada composto pode determinar efeito relativo nos níveis de migração, o que necessita de maior estudo.

Alguns autores como Choi *et al.* (2002), Triantafyllou *et al.* (2007) e Song *et al.* (2003), apresentaram pesquisa a respeito da avaliação destas migrações, sendo que os testes foram feitos em sua grande maioria com solventes simulantes conforme determina a Resolução RDC 91/2001 da ANVISA, o que, por outro lado, seria mais interessante o uso em amostras reais. A condução destas pesquisas em embalagens x alimentos, colabora para um maior tempo de vida de prateleira na expectativa de alimentos que não fornecem um ingrediente a mais não desejado.

Segundo os dados da Organização das Nações Unidas (SAÚDE, 2005), em 2025 teremos a necessidade de alimentar 7,9 bilhões de pessoas, e é de informação pública que para isto se faz necessária uma série de uso de substâncias, tais como, agrotóxicos nas produções agrícolas e outros aditivos em alimentos.

No Brasil informações sobre doenças e mortes causadas por alimentos são esparsas, apesar do reconhecimento de que o controle de qualidade de alimentos é muito pobre, mesmo quando existe algum controle. O melhor sistema de proteção à saúde pública deve partir da responsabilidade da indústria em preparar alimentos

que não sejam prejudiciais à saúde das pessoas, acondicionados em embalagem isentas destes contaminantes, assim como, deve haver programas de monitoramento por agências reguladoras para assegurar que a indústria está realmente realizando o seu trabalho, produzindo alimentos isentos de contaminação.

### **5.1 CONCLUSÕES**

- Amostras de gelatina comestível comercializadas nas Regiões Sul, Centro Sul e Metropolitano Delta do Jacuí do Estado do RS apresentaram baixa presença de PCF (1 em 125), e nenhuma embalagem apresentou resíduos deste pesticida.

- Os métodos empregados para gelatina e papel podem ser adaptados para uso em laboratórios que analisam resíduos de alimentos, diminuindo o tempo de extração e de detecção instrumental.

- O PCF é capaz de migrar de embalagem secundária de papel para a gelatina, atravessando a embalagem primária de polipropileno.

- A velocidade de migração do PCP é dependente da temperatura, tempo e natureza da embalagem a que o sistema é exposto, no caso, ocorreram a presença do contaminante em 40°C / 48h seguidas dos tempos de 6,24 e 48 h para uma temperatura de 60°C.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

A PRODUÇÃO de gelatina. Eberbach: Gelita Group, [2007]. Disponível em: <<http://www.gelita.com>> Acesso em: 27 nov. 2007.

ADAM, M. et al. **Collagen hydrolyzed and its relationship to joint health: a science compendium**. Eberbach, Germany: GELITA Health Initiative, 2004. 120 p.

AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTER (ATSDR). **Toxicological profile of pentachlorophenol**. Atlanta, 2001. Disponível em: <<http://www.atsdr.cdc.gov/tfacts51.html>>. Acesso em: 15 jul. 2006.

ALONZO, H.G.; CORRÊA, C.L. Praguicidas. In: OLGA, A. (ed.). **Fundamentos de Toxicologia**. São Paulo: Atheneu, 2003, 446 p.

BAGHERI, M.; SAJARI, J. New polymeric sorbent for the solid-phase extraction of chlorophenols from water samples followed by gas chromatography-electron-capture detection. **Journal Chromatography A**, Amsterdam, v. 910, n.1, p.87-93, 2001.

BORSETTI, A.P.; THURSTON, L.S. Gas chromatographic determination of pentachlorophenol in gelatin. **Journal of Association of Official Analytical Chemists**, Arlington, v. 67, n. 2, p. 275-277, 1984.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Agrotóxicos e Toxicologia, **Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA)**. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/toxicologia/residuos/index.htm>>. Acesso em: 12 dez. 2006.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Glossário de Vigilância Sanitária**. Brasília, 2003. Disponível em: <<http://e-glossario.bvs.br>>. Acesso em: 12 jul. 2007.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Nota técnica sobre a reavaliação toxicológica do ingrediente ativo pentaclorofenol e seus sais**. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 20 dez. 2006.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução n. 164, de 18/08/2006. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 10 jun. 2007.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº. 91, de 11 de maio de 2001. Disponível em <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 10 jun. 2007.

BRASIL. Decreto nº. 98816, de 11 de janeiro de 1990. Regulamenta a Lei no 7.802, de 11 de julho de 1989. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>> Acesso em: 17 jan. 2007.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Portaria n.º 329, de 02 de setembro de 1985. Proíbe a comercialização, o uso e a distribuição dos produtos agrotóxicos organoclorados. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 3 set. 1985. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 10 jun. 2006.

BRASIL. Portaria nº 518, de 25 de março de 2004. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>> Acesso em: 17 jan. 2007.

BRUNS, G.W.; CURRIE, R.A. Extraction of pentachlorophenol and tetrachlorophenol residues from field-contaminated carrots and potatoes: comparison of several methods. **Journal of Association of Official Analytical Chemists**, Arlington v. 63, n. 1, p. 56-60, 1980.

CAMPILLO, N., PEÑALVER, R., AND HERNÁNDEZ-CÓRDOBA, M. Evaluation of solid-phase microextraction conditions for the determination of chlorophenols in honey samples using gas chromatography. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v.1125, p.31-37, 2006.

CAPORAL, F. R.; COSTABEBER, J. A.; PAULUS, G. Agroecologia: matriz disciplinar ou novo paradigma para o desenvolvimento rural sustentável. In: CURSO DE APERFEIÇOAMENTO EM AGROECOLOGIA À DISTÂNCIA, 2., Brasília, 2007. [Trabalhos.] Brasília, s.n., 2007.

CHOI, J.O. et al. Migration of surrogate contaminants in paper and paperboard into water through polyethylene coating layer. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 19, n. 12, p. 1200-6, 2002.

COMISSÃO DAS COMUNIDADES EUROPÉIAS. **Decisão 1996/211/CE da Comissão de 26 de Fevereiro de 1996**. Luxemburg, 1996. Disponível em: <<http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do>> Acesso em: 20 out. 2007.

COMISSÃO DAS COMUNIDADES EUROPÉIAS. **Decisão 2001/852/CE da Comissão de 19 de Novembro de 2001**. Luxemburg, 2001. Disponível em: <<http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do>> Acesso em: 20 out. 2007.

COUNCIL OF EUROPE'S POLICY STATEMENTS. Paper and board material and articles intend to come into contact with foodstuffs. Resolution RESAP, Strasbourg: 2002. 88 p. Disponível em : <<http://fca.cefic.org/Files/Stories/P&B%20%20Policy%20Statement%20Paper%20130405.pdf>> Acesso em : 10 dez. de 2006 .

DISERENS, J. M. Rapid determination of nineteen chlorophenols in wood paper, cardboard, and fruit juices by gas chromatography mass spectrometry. **Journal of AOAC International**, Arlington, v. 3, p. 126-134, 2001.

DOMENO, C.; MUNIZZA, C.; 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 of Chromatography A**, Amsterdam, p. 8-15, 2005.

ESTABELECENDO novos padrões para gelatina. **Brasil Alimentos**, São Paulo, Ano V, n. 27, p. 30-31, set./out., 2004.

FRANCO, L. A outra face do couro. Demanda pelo produto deve crescer como matéria-prima para gelatina. **Globo Rural**, São Paulo, v. 20, n. 233, p. 22-23, 2005. Disponível em: <<http://revistagloborural.globo.com,6993,EGS1155-1482,00.html>> Acesso em: 12 mar. 2007.

GERHARD, I.; FRICK, A.; MONGA, B. Pentachlorophenol exposure in women with gynecological and endocrine dysfunction. **Environmental Research**, SanDiego, v. 80, Section A, p. 383-388, 1999.

HATTEMER-FREY, H.A.; TRAVIS, C.C.. Pentachlorophenol: environmental partitioning and human exposure. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v.18, p. 482-489, 1989.

HINTERWALDNER, R. Raw materials. In: WARD, A.G.; COURTS, A. (ed.). **The science and technology of gelatin**. London: Academic Press, 1977. p. 295-314.

HOPPER, M.L. et al. Analysis of fatty and nonfatty foods for chlorophenoxy alkyl acids and pentachlorophenol. **Journal of AOAC International**, Arlington, v. 75, n. 4, p. 707-713, 1992.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz: métodos físicos - químicos para análise de alimentos**. 4. ed. São Paulo, 2005. Cap. 14.

INSTITUTO BRASILEIRO DE DEFESA DO CONSUMIDOR (IDEC). Os riscos de conservantes de madeira. **Revista do IDEC on line**, São Paulo, out./nov. 2003. Disponível em: <<http://www.idec.org.br>>. Acesso em: 12 jul. 2006.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS (IBAMA). **Setor de preservativo de madeiras**. Brasília, 2005. Disponível em: <<http://www.ibama.gov.br/qualidadeambiental/madeira>>. Acesso em: 28 jul. 2006.

JAÚREGUI, O.; MOYANO, E.; GALCERAN, M.T. Capillary electrophoresis ion-trap mass spectrometry for the separation of chlorophenols. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 896, p. 125-133, 2000.

JICKELLS S.M. et al. Migration of contaminants by gas phase transfer from carton board and corrugated board box secondary packaging into foods. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 22, p. 768-782, 2005.

MATTOS, R.L.G.; VALENÇA, A.C.V. Celulose no mercado: novo ciclo de expansão. **BNDES Setorial**, Rio de Janeiro, n.12, p.93-104, 2000.

MORALES, I.C ; PAZOS, C.B. Pentaclorofenol: toxicología y riesgos para el ambiente. **Madera y Bosques**, México, v. 4, n. 2, p. 21-37, 1998.

MOREIRA, J.C. et al. Integrated evaluation of the health impact of pesticide use in a community at Nova Friburgo. **Ciência & Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v.7, n. 2. p.299-311, 2002.

MORESCHI, J.C. **Produtos preservantes de madeira**. Curitiba, 2005. Universidade Federal do Paraná. Curso de Pós Graduação em Engenharia Florestal, BR-PR, 2005.

NATIONAL COALITION AGAINST THE MISUSE OF PESTICIDES (NCAMP). **A report about their toxic trail and safer alternative**. Washington, 1996. Appendix A: Chemicals at a Glance Penta.

OZAKI, A. et al. Chemical analysis and genotoxicological safety assessment of paper and paperboard used for food packaging. **Food and Chemical Toxicology**, Elmsford, v. 42, p. 1323-1337, 2004.

PAPEL e celulose. Porto Alegre: Global 21 – Comércio Exterior e Marketing Internacional, 2007. Disponível em: <<http://www.global21.com.br/artigos/>>. Acesso em: 05 jan. 2007.

ROCHA, J.C.S. Direito ambiental, meio ambiente do trabalho rural e agrotóxicos. **Revista de Direito Ambiental**, São Paulo, ano 3, n. 10, p. 106-122, 1998.

SAÚDE, Conselho Nacional de (Ed.). Consumo de Agrotóxicos cresce no Brasil: CNS aprovou posição contrária à liberação da importação de agroquímicos. **Jornal do CNS**, Brasília, set. 2005. ano1 ,n.5, p. 2-8.

SGARBIERI, V. **Estudo de propriedades nutritivas, tecnológicas e funcionais (Fisiológicas) de proteínas de soro de leite bovino, gelatina, e seus hidrolisados**. Campinas: UNICAMP. Faculdade de Engenharia de Alimentos. Departamento de Alimentos e Nutrição, 2004. Projetos de Pesquisa

SIMONEAU, I. C. Migration research on dry food. In: PLASTICS AND POLYMERS IN CONTACT WITH FOODSTUFFS CONFERENCE, 20., 2003, Glasgow, UK. **Proceedings...** Glasgow: Leatherhead, 2003.

SINDICATO NACIONAL DA INDÚSTRIA DE PRODUTOS PARA A DEFESA AGRÍCOLA (SINDAG). **Dados de mercado**. São Paulo, 2007. Disponível em: <<http://www.sindag.com.br>>. Acesso em: 10 out. 2007.

SONG, Y.S. et al. Effectiveness of polypropylene film as a barrier to migration from recycled paperboard packaging to fatty and high-moisture food. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 9, n. 20, p. 875-883, 2003.

SONG, Y.S.; HONG, J.P.; KOMOLPRASER, V. Analytical procedure for quantifying five compounds suspected as possible contaminants in recycled paper/paperboard for food. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 48, p. 5856-5859, 2000.

TOMITA R.Y.; BEYRUTH Z. Toxicologia de agrotóxicos em ambiente aquático. **O Biológico**, São Paulo, v. 64, n. 2, p. 135-142, 2002.

TRIANAFYLLOU, V.I.; AKRIDA-DEMERTZI, K.; DEMERTZIS, P.G. A study on the migration of organic pollutants from recycled paperboard packaging material to solid food matrices. **Food Chemistry**, London, v. 101, p.1759-1768, 2007.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (US EPA ). **Pesticides**. Washington, 2006. Disponível em: <<http://www.epa.gov/pesticides/>> Acesso em: 22 jul. 2006.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (US EPA ). **Risk Assessment Guidance for Superfund (RAGS) - Human Health Evaluation Manual**, Part A.v.1, Washington, 1989. Disponível em: <<http://www.epa.gov/oswer/riskassessment/ragsa/>> Acesso em: 12 jul. 2006.

WHO. **Polychlorinated biphenyls and terphenyls**. 2nd.ed. Geneva: 1993.

YIP, G. Gas chromatographic determination of pentachlorophenol in gelatin: collaborative study. **Journal of Association of Official Analytical Chemists**, Arlington, v.68, p.419-421, 1985.

YOON, S.S.; HONG, J.P.; KOMOLPRASER, V. Analytical Procedure for quantifying five compounds suspected as possible contaminants in recycled paper/paperboard for food packaging. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 48, p. 5856-5859, 2000.

ZAMBOLIM, L.; COSTA, H.; VALE, F.X. Utilização de fungicidas no manejo integrado de doenças em hortaliças. In: ZAMBOLIM, L. (ed.). ENCONTRO SOBRE MANEJO INTEGRADO DE DOENÇAS, PRAGAS E ERVAS DANINHAS, 2., Viçosa, 2000. **[Trabalhos apresentados]**. Viçosa: UFV, 2000.