UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Determinação de éteres de difenilas polibromadas (PBDEs) em alimentos comercializados no Brasil empregando microextração em sorvente empacotado (MEPS) e estimativa da ingestão diária

Marília Cristina Oliveira Souza

Ribeirão Preto

2019

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Determinação de éteres de difenilas polibromadas (PBDEs) em alimentos comercializados no Brasil empregando microextração em sorvente empacotado (MEPS) e estimativa da ingestão diária

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Toxicologia
Orientada: Marília Cristina Oliveira Souza
Orientador: Prof. Dr. Fernando Barbosa Júnior
Coorientador: Dr. Bruno Alves Rocha

Ribeirão Preto

2019

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Souza, Marília Cristina Oliveira

Determinação de éteres de difenilas polibromados (PBDEs) em alimentos comercializados no Brasil empregando microextração em sorvente empacotado (MEPS) e estimativa da ingestão diária. Ribeirão Preto, 2019.

109 p.: il.; 30 cm.

Tese de doutorado apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/ USP - Área de Concentração: Toxicologia.
Orientador: Professor Dr. Fernando Barbosa Júnior
Coorientador: Dr. Bruno Alves Rocha

1. Éteres de difenilas polibromadas, 2. Microextração em sorvente empacotado, 3. Alimentos, 4. Estimativa da ingestão diária, 5. Poluentes orgâncios persistentes.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Marília Cristina Oliveira Souza

Determinação de éteres de difenilas polibromados (PBDEs) em alimentos comercializados no Brasil empregando microextração em sorvente empacotado (MEPS) e estimativa da ingestão diária.

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Toxicologia

Orientador: Prof. Dr. Fernando Barbosa Junior

Coorientador: Dr. Bruno Alves Rocha

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr._____

Instituição:_____Assinatura:_____

Prof. Dr._____

Instituição:_____Assinatura:_____

Prof. Dr._____

Instituição:_____Assinatura:_____

Prof. Dr._____

Instituição:_____Assinatura:_____

Prof. Dr._____

Instituição:_____Assinatura:_____

A Deus por me permitir crescer com meus próprios passos,

Mas sempre me carregando no colo durante a longa caminhada.

"Das sementes que fui lançando na vida Tu fizeste crescer um

lindo jardim de bênçãos e felicidade"!

Obrigada, meu Pai!

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por me conceder sabedoria, me iluminar e abençoar em cada passo dessa jornada. Seus planos para minha vida são maiores e melhores que qualquer sonho que eu possa ter.

Aos meus pais, **Ciro e Dulce**, pelo amor simples e imensurável, por serem minha fortaleza e meu eterno porto seguro. Por sempre acreditar em mim e não medir esforços para me fazer feliz. Obrigada por serem as melhores pessoas que eu já conheci!

À minha amada irmã e melhor amiga **Juliana**, pela amizade sincera, pela lealdade, pelo amor e carinho incondicional. Estar ao seu lado em parte dessa jornada foi fundamental para meu crescimento pessoal e profissional. Você foi a melhor parte de Ribeirão. Obrigada por ser meu maior e melhor exemplo de inteligência e dedicação.

Ao meu marido, **Muryllo**, meu eterno amor e companheiro, por todos os momentos que permaneceu ao meu lado, por compartilhar cada sonho e dificuldade, pela força e paciência nos dias difíceis, pela compreensão e amor ilimitado. Amor, obrigada por estar ao meu lado durante meu estágio nos Estados Unidos, e não medir esforços para eu viver meus sonhos. Com você que eu vivo os melhores dias da minha vida! Obrigada por ser minha melhor metade!

À **Fernanda** e ao **Eduardo**, por se tornarem minha família e serem tão presentes em nossas vidas, sempre ajudando no que é possível. À **Vó Izolina**, por ser pelo doce carinho e por se tornar minha "vózinha postiça".

As minhas amigas especiais, **Carla, Lara, Gabriela, Fernanda e Letícia**, pela amizade sincera e por serem pessoas indispensáveis.

Ao meu orientador **Prof. Dr. Fernando Barbosa Júnior** pela dedicação, confiança e pela grande oportunidade de trabalhar em seu grupo de pesquisa.

À **Carol**, por se fazer presente e auxiliar sempre no que é possível. Obrigada pelo carinho com nosso laboratório.

Ao **Bruno**, pelo apoio e auxílio incondicional no laboratório, por me coorientar e por sua amizade.

Aos amigos e companheiros do laboratório de Toxicologia Analítica e de Sistemas (ASTox), pela troca diária de experiências, conhecimentos, pela amizade e prontidão em ajudar durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao **Dr. Kurunthachalam Kannan**, pela oportunidade de fazer parte do seu grupo de pesquisa durante meus seis meses de estágio BEPE e me proporcionar grande crescimento pessoal e profissional. E a todos os colegas do Wadsworth Center (Albany, NY) pelo auxílio

nos estudos desenvolvidos, em especial ao Honda, Sunmi, Raj, Sonali e Kim pela amizade.

À **Dra. Vanessa Cristina Oliveira Souza**, funcionária do Laboratório de Toxicologia Analítica e de Sistemas da FCFRP- USP, por seu auxílio técnico e apoio constante. À **Maria Aparecida Buzeto**, pelo cafezinho e ajuda diária.

Às funcionárias da Seção de Pós-graduação **Rosemary Ioshimine Gerolineto e Rosana Florencio** por toda dedicação.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo** (FAPESP) pela bolsa de estudos concedida (2015/19665-8 e 2016/23372-9) e também pelos auxílios financeiros do mesmo e das agências de fomento, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico Tecnológico (CNPQ) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

E a todos que não estão presentes nestas linhas, mas que, direta ou indiretamente, participaram da minha caminhada desde a graduação até a defesa desta tese de doutorado.

A todos vocês meus sinceros agradecimentos!

"Seja você quem for, seja qual for a posição social que você tenha na vida, a mais alta ou a mais baixa, tenha sempre como meta muita força, muita determinação e sempre faça tudo com muito amor e com muita fé em Deus, que um dia você chega lá. De alguma maneira você chega lá."

Ayrton Senna

RESUMO

Souza, M. C. O. **Determinação de éteres de difenilas polibromados (PBDEs) em alimentos comercializados no Brasil empregando microextração em sorvente empacotado (MEPS) e estimativa da ingestão diária**, 2019. 109 f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

Éteres de difenilas polibromadas (PBDEs) são compostos classificados com retardantes de chama e são poluentes orgânicos persistentes. Estes compostos são utilizados em diversos produtos para aumentar a resistência ao fogo e a altas temperaturas. Os potenciais efeitos à saúde humana, após exposição aos PBDEs têm se tornado uma grande preocupação devido ao aumento das concentrações de PBDE no ambiente. A dieta é considerada a mais importante fonte de exposição aos PBDEs, e as amostras de alimentos devem ser monitoradas para verificar os níveis de contaminação. No entanto, a determinação rotineira desses contaminantes em amostras complexas, como os alimentos, requer um método simples, rápido e com sensibilidade compatível com as baixas concentrações encontradas. Diante do exposto, este estudo propõem um novo método combinando microextração em sorvente empacotado (MEPS) e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas para determinação de 7 congêneres de PBDEs (BDE-28, BDE-47, BDE-99, BDE-100, BDE-153, BDE-154, e BDE-183) em amostras de alimentos de origem animal e com alto teor lipídico, incluindo ovo, peixe, frutos do mar, e leite. O método proposto apresenta as eguintes vantagens: (i)- Reduz a quantidade de amostra requerida nas análises (50 e 100 mg de amostra liofilizada); (ii)- Reduz o consumo de solvente; (iii)- Melhora os limites de deteção (0,42 ng/g de lipídio para ovo, 0,27 ng/g de peixe fresco, e 0,26 ng/g de leite fresco), e IV- Apresenta excelente reprodutibilidade e repetibilidade, altos valores de recuperação sem de efeito matriz. Após a etapa de validação analítica, o método foi aplicado em 123 amostras das diversas matrizes em estudo. O BDE-47 foi o congênere que apresentou maior porcentagem de detecção entre todos os PBDEs analisados. O somatório das médias das concentrações ($\sum_{PBDEs}$) de todos os congêneres analisados foi de 18,1 ng/g de lipídio para as amostras de ovos, 26,4 ng/g de peixe fresco, 25,6 ng/g de frutos do mar fresco, e 39,9 ng/g de leite fresco. As concentrações encontradas neste estudo foram maiores que os encontrados em países Europeus e Estados Unidos. Baseado nisto, este estudo sugere que as altas concentrações encontradas podem ser justificadas pela ausência de legislação no Brasil quanto ao uso de PBDEs e quantidade máxima permitida em alimentos e amostras ambientais. A partir dos resultados obtidos das concentrações de PBDEs nas amostras e do consumo médio do alimento no país, estimou-se a ingestão diária (IDE) de PBDEs da população brasileira, e o IDE total foi de 31,9 ng/Kg de peso corpóreo – dia, e com base nos valores de dose de referência (BDE-47, BDE-99 e BDE-153) estimou-se o *hazard index* (HI), com valor de 0,356. A IDE apresentou altos valores em relação a outros estudos descritos na literatura, e HI com valor menor que 1. Os resultados sugerem que o risco cumulativo de exposição aos PBDEs pode estar subestimado, uma vez que apenas três congêneres de PBDEs e apenas quatro tipos de alimentos foram incluídos no cálculo, necessitando de uma avaliação de risco mais detalhada para estimar o potencial risco à saúde dos brasileiros.

Palavras-chave: éteres de difenilas polibromadas, microextração em sorvente empacotado, alimentos, estimativa da ingestão diária, poluentes orgânicos persistentes.

ABSTRACT

Souza, M. C. O., **Determination of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in foods commercialized in Brazil employing microextraction by packed sorbent (MEPS) and daily intake estimated**, 2019. 109 f. Thesis (Doctoral) Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) are compounds classified as flame retardants and are persistent organic pollutants. These compounds are used in several products to increase fire and high temperatures resistance. The occurrence of potential human health effects after exposure has become a great concern due to the increase of PBDE concentration in the environment. Diet is considered the most important source of exposure to PBDEs, and food samples should be monitored to evaluate the contamination. However, the routine determination of these contaminants in a complex matrix, such as food samples, requires a simple, rapid and sensitive method compatible with the low concentrations found. In this sense, the present study proposes a new method combining the microextraction by packed sorbent (MEPS) and the gas chromatography coupled to mass spectrometry to determine 7 PBDEs (BDE-28, BDE-47, BDE-99, BDE- BDE-153, BDE-154, and BDE-183) in food samples of animal origin and with high lipid content, including egg, fish, seafood, and milk. So, the proposed method presents the following advantages: (i) -reduces the amount of sample required in the analyzes (50 and 100 mg of lyophilized sample); (ii) reduces solvent consumption; (iii) improves the detection limits (9 ng/g lipid in egg, 2 ng/g in fresh fish, and 1.5 ng/g in fresh milk), and ensures a great reproducibility and repeatability, high recovery values and absence of matrix effect. After the analytical validation step, the method was applied to the analysis of 123 different samples. The BDE-47 was the congener that presented the highest percentage of detection among all PBDEs analyzed. The sum of the mean concentrations (ΣPBDEs) of all the analyzed congeners was 18.1 ng/g lipid in egg samples, 26.4 ng/g in fresh fish, 25.6 ng/g in fresh seafood, and 39.9 ng/g in fresh milk. The concentrations determined in the samples of this study were higher than those found in samples from European countries and from the United States. Based on these results, this study suggests that the high concentrations found can be justified by the absence of legislation in Brazil regarding the use of PBDEs and the maximum amount allowed in food and environmental samples. Considering the results obtained for PBDE concentrations in the samples and the average food consumption in Brazil, the PBDEs estimate daily intake (EDI) for Brazilian population was calculated, and the total EDI was 31.9 ng/kg body weight – day. Indeed, the value of 0.356 for hazard index (HI) was estimated based on the reference dose values (BDE-47, BDE-99, and BDE-153). The EDI presented high values in relation to other studies described in the literature and the HI value was less than 1. The results suggest that the cumulative risk of exposure to PBDEs may be underestimated since only three PBDEs and four different types of food were included in the calculation. Therefore, a more detailed risk assessment to estimate the potential Brazilian health damage is of great importance.

Keywords: polybrominated diphenyl ethers, microextraction by packed sorbent, foods, daily intake estimated, persistent organic pollutants.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Alguns métodos descritos na literatura para determinação de PBDEs em alimentos..... 28

Tabela 2 – Razão massa/carga (m/z) dos íons monitorados..... 37

Tabela 3 – Variáveis da MEPS testadas durante a otimização das condições de extração..... 59

Tabela 4 – Efeito matriz para os congêneres de PBDEs em 4 diferentes lotes de ovos brancos..... 64

Tabela 5 – Limite inferior de quantificação do método para determinação dos congêneres de PBDEs em amostras de ovos liofilizados (n=10)..... 65

Tabela 6a – Precisão intercorridas e intra-corridas do método de determinação dos congêneres de PBDEs em amostras de ovos liofilizados (n=6 para cada controle de qualidade)..... 66

Tabela 6b – Exatidão intercorridas e intra-corridas do método de determinação dos congêneres de PBDEs em amostras de ovos liofilizados (n=6 para cada controle de qualidade)..... 66

Tabela 7 – Comparação das características analíticas do método validado para quantificação de PBDEs em amostras de ovos com outros estudos descritos na literatura..... 67

Tabela 8 – Concentração determinada para cada congênere de PBDE em amostras comerciais de ovos incluindo ovos convencionais e caipiras. Os valores são expressos em µg/g lipídio..... 68

Tabela 9 – Concentração média determinada para o BDE-47 e para a somatória de todos os congêneres de PBDEs em amostras de ovos em cada estudo, incluindo os dados deste estudo, paises europeus e Estados Unidos, ambos com valores expressos em ng/g lipídio..... 71

Tabela 10 – Efeito matriz para os congêneres de PBDEs em 4 diferentes lotes de peixe..... 76

Tabela 11 – Limite inferior de quantificação do método para a determinação dos congêneres de PBDEs em amostras de peixes liofilizados (n=10)..... 78

Tabela 12a – Precisão intercorridas e intra-corridas do método para a deterrminação dos congêneres de PBDEs em amostras de peixes liofilizados (n=6 para cada controle de qualidade)..... 78

Tabela 12b – Exatidão intercorridas e intra-corridas do método para a determinação dos congêneres de PBDEs em amostras de peixes liofilizados (n=6 para cada controle de qualidade)..... 79

Tabela 13 – Comparação dos parâmetros analíticos de destaque do método validado para quantificação de PBDEs em amostras de peixes com outros estudos descritos na literatura..... 80

Tabela 14 – Concentração quantificada para cada congênere de PBDE em amostras comerciais de peixes e frutos do mar. Os valores são expressos em µg/g amostra fresca..... 82

Tabela 15: Concentração média determinada para o BDE-47 e para a somatória de todos os congêneres de PBDEs em amostras de peixes e frutos em diferentes estudos da literatura, ambos com valores expressos em ng/g amostra fresca..... 83

Tabela 16 – Efeito matriz para os congêneres de PBDEs em 4 diferentes lotes do leite orgânico integral Timbaúba – amostra branco..... 89

Tabela 17 – Limite inferior de quantificação do método de análise dos congêneres de PBDEs em amostras de leite liofilizados (n=10)..... 90

Tabela 18a – Precisão intercorridas e intra-corridas do método para a determinação dos congêneres de PBDEs em amostras de leite liofilizado (n=6 para cada controle de qualidade)..... 90

Tabela 18b – Exatidão intercorridas e intra-corridas do método para a determinação dos congêneres de PBDEs em amostras de leite liofilizado (n=6 para cada controle de qualidade)..... 91

Tabela 19a – Concentração quantificada para cada congênere de PBDE (BDE-28, -47, -99 e -100) em amostras de leite comerciais de leite do produtor. Os valores são expressos em µg/g amostra fresca. 92

Tabela 19b - Concentração quantificada para cada congênere de PBDE (BDE-153, -154, -183 e $\sum_{PBDEs}$) em amostras de leite comerciais de leite do produtor. Os valores são expressos em µg/g amostra fresca..... 93

Tabela 20 - A concentração média determinada para BDE-47 e para a soma de todos os congêneres de PBDEs ($\sum_{PBDE}$) em amostras de leite em cada estudo, incluindo dados deste estudo, países europeus, Estados Unidos e China. Os valores são expressos como ng/g de amostra fresca..... 95

Tabela 21 – Valores de Ingestão diária estimada total, para cada alimento selecionado no estudo e considerando a diferença entre homens e mulheres. Os valores estão expressos em ng/Kg de peso corpóreo – dia..... 97

Tabela 22 – A ingestão diária estimada (IDE) de PBDEs em alimentos brasileiros e em outros países. Os valores do IDE consideraram a soma de todos os congêneres do PBDEs analisados nos estudos. Os valores estão expressos em ng/Kg de peso corpóreo – dia..... 98

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura química geral dos éteres de difenilas polibromadas (US. EPA, 2009)..... 22

Figura 2: Estrutura química dos congêneres de PBDEs empregados no estudo..... 35

Figura 3: Estrutura química do 4,4'-dibromodifenil, empregado como padrão interno neste estudo..... 36

Figura 4: Espectro de massas do 2,4,4'- éter tribromodifenil (BDE-28)..... 54

Figura 5: Espectro de massas do 2,2',4,4'- éter tetrabromodifenil (BDE-47)..... 54

Figura 6: Espectro de massas do 2,2',4,4',6- éter pentabromodifenil (BDE-100)..... 55

Figura 7: Espectro de massas do 2,2',4,4',5- éter pentabromodifenil (BDE-99)..... 55

Figura 8: Espectro de massas do 2,2',4,4',5,6'- éter hexabromodifenil (BDE-154)..... 55

Figura 9: Espectro de massas do 2,2',4, 4',5,5'- éter hexabromodifenil (BDE-153)..... 56

Figura 10: Espectro de massas do padrão interno (4,4'-dibromodifenil)..... 56

Figura 11: Cromatograma obtido a partir da análise de amostra de ovo fortificada com padrões na concentração de 10 µg de cada PBDE/g lipídeo e padrão interno na concentração de 7,0 µg/g lipídeo. Condições instrumentais descritas no item 3.2..... 56

Figura 12: Figura demonstrativa das etapas da microextração em sorvente empacotado..... 59

Figura 13: Curvas analíticas CCAS, CCMBF e CCEMBF para os seis congêneres de PBDEs na faixa de concentração de 0,75 a 10 µg de cada PBDE/g lipídio..... 62

Figura 14: Cromatograma obtido a partir da análise de amostra branco de ovo e amostras branco com padrão interno (amostra zero) na concentração de 7,0 µg/g lipídio..... 63

Figura 15: Possíveis vias de debrominação redutiva de congêneres de PBDEs durante o processo de metabolismo das galinhas (adaptado de Pirard e Pauw, 2007)..... 69

Figura 16: Curvas analíticas CCAS, CCMBF e CCEMBF para seis congêneres de PBDEs na faixa de concentração de 0,15 a 2,25 µg de cada PBDE/g de amostra fresca..... 74

Figura 17: Cromatograma obtido a partir da análise de amostra branco de peixe e amostras branco com padrão interno (amostra zero) na concentração de 1,50 µg/g amostra fresca..... 75

Figura 18: Cromatograma obtido a partir da análise de amostra de leite fortificada com padrões na concentração de 0,80 µg de cada PBDE/g de amostra fresca e padrão interno na concentração de 0,40 µg/g de amostra fresca..... 84

Figura 19: Curvas analíticas CCAS, CCMBF e CCEMBF para seis congêneres de PBDEs na faixa de concentração de 0,02 a 0,8 µg de cada PBDE/g de amostra fresca..... 87

Figura 20: Cromatograma obtido a partir da análise de amostra branco de leite e amostras branco com padrão interno (amostra zero) na concentração de 0,40 µg/g de amostra fresca..... 88

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AT: Tempo médio

ATSDR: Agência para registro de substâncias tóxicas e doenças

BDE-28: 2,4,4'- éter tribromodifenil

BDE-47: 2,2',4,4'- éter tetrabromodifenil

BDE-99: 2,2',4,4',5- éter pentabromodifenil

BDE-100: 2,2',4,4',6- éter pentabromodifenil

BDE-153: 2,2',4,4',5,5'- éter hexabromodifenil

BDE-154: 2,2',4,4',5,6'- éter hexabromodifenil

BDE-183: 2,2',3,4,4',5,6'- éter heptabromodifenil

BW: Peso corpóreo

C: Concentração média

CCAS: Curva de calibração do analito em solução

CCMBF: Curva de calibração da matriz branca fortificada

CCEMBF: Curva de calibração do extrato da matriz branca fortificada

CQA: Controle de Qualidade de Alta Concentração

CQB: Controle de Qualidade de Baixa Concentração

CQM: Controle de Qualidade de Média Concentração

CV: Coeficiente de Variação

ED: Duração da exposição

EF: Frequência de exposição

EFSA: *European Food Safety Authority* - Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar

ELL: Extração líquido-líquido

EPA: *Environmental Protection Agency* - Agência de proteção ambiental

EPR: Erro Padrão Relativo

FMN: Fator de Matriz Normalizado

FCFRP: Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto

FS: Fator de incerteza

GC: Cromatografia gasosa

GC-MS: Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

HI: Hazard índex – Índice de perigo

HPLC: Cromatografia líquida de alta eficiência

IDE: Ingestão diária estimada

IE: Impacto de elétrons

INMETRO: Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia

LD: Limite de detecção

LMR: Limite máximo de resíduo

LOAEL: Menor dose onde há efeito adverso

LQ: Limite de quantificação

MAPA: Ministério da Agricultura Pecuária e Abastatecimento

MEPS: Microextração em sorvente empacotado

MS: Espectrometria de massas

m/z: Razão massa/carga

NMR: Nível de mínimo risco

NOAEL: Dose que não se observa efeito adverso

PBDEs: Éteres de difenilas polibromadas

PI: Padrão interno

PLE: Extração líquida pressurizada

POPs: Poluentes orgânicos persistentes

PPB: Parte por bilhão

PPM: Parte por milhão

QuEChERS: *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe*

r: coeficiente de correlação

RfD: Dose de referência

RPM: rotações por minuto

SIM: Monitoramento de íon selecionado

SPE: Extração em fase sólida

sPLE: Extração líquida pressurizada seletiva

USGS: Serviço geológico dos Estados Unidos

v/v: volume/volume

WHO: *World Health Organization*

LISTA DE SÍMBOLOS

∑: Somatório

®: Marca registrada

SUMARIO

RESUMO ix

ABSTRACT x

LISTA DE TABELAS xi

LISTA DE FIGURAS xiii

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS xiv

LISTA DE SÍMBOLOS xvi

1. Introdução 21

1.1 Contaminantes emergentes e poluentes orgânicos persistentes 21

1.2 Éteres de difenilas polibromadas (PBDEs) 22

1.3 Exposição humana aos PBDEs e toxicidade 23

1.4 Técnicas analíticas para determinação de PBDEs em alimentos 26

1.5 Métodos de preparo de amostras para determinação de PBDEs em alimentos 27

1.6 Microextração em sorvente empacotado (MEPS) 28

2. Objetivos 32

2.1 Objetivo Geral: 32

2.2 Objetivos específicos: 32

3. Materiais e Métodos 34

3.1 Soluções padrão e reagentes 34

3.2 Instrumentação analítica 36

3.3 Amostras 37

3.3.1 Amostras comerciais 37

3.3.2 Amostras “branco” 38

3.4 Preparo das amostras 39

3.4.1 Estudo I – Avaliação da presença de PBDEs em amostras de ovos 40

3.4.1.1 Determinação da porcentagem lipídica nas amostras de ovos 41

3.4.2 Estudo II – Avaliação da presença de PBDEs em amostras de peixes e frutos do mar 42

3.4.3 Estudo III – Avaliação da presença de PBDEs em amostras de leite 43

3.5 Validação analítica 43

3.5.1 Linearidade 44

3.5.2 Seletividade 45

3.5.3 Efeito Matriz 45

3.5.4 Limites de detecção e quantificação 47

3.5.5 Precisão e exatidão 48

3.5.6 Recuperação 49

3.6 Estudo IV – Ingestão diária estimada de PBDEs e avaliação de risco da exposição humana a esses contaminantes ambientais 49

4. Resultados e discussão 52

4.1 Otimização das condições experimentais 52

4.2 Estudo I: Avaliação da presença de PBDEs em amostras de ovos 57

4.2.1 Desenvolvimento e otimização das condições do método de preparo de amostra empregando microextração em sorvente empacotado 57

4.2.2 Determinação da porcentagem lipídica nas amostras de ovos 61

4.2.3 Validação analítica 61

4.2.4 Aplicação do método analítico em amostras comerciais 68

4.3 Estudo II: Avaliação da presença de PBDEs em amostras de peixes e frutos do mar 72

4.3.1 Desenvolvimento e otimização das condições do método de preparo de amostra empregando microextração em sorvente empacotado 72

4.3.2 Validação analítica 74

4.3.3 Aplicação do método analítico em amostras comerciais 81

4.4 Estudo III: Avaliação da presença de PBDEs em amostras de leite 84

4.4.1 Desenvolvimento e otimização das condições do método de preparo de amostra empregando microextração em sorvente empacotado 84

4.4.2 Validação analítica 86

4.4.3 Aplicação do método analítico em amostras comerciais 92

4.5 Estudo IV: Ingestão diária estimada de PBDEs e avaliação de risco da exposição humana a esses contaminantes ambientais 96

5. Considerações finais 101

Referências bibligráficas 103

Introdução

1. Introdução

1.1 Contaminantes emergentes e poluentes orgânicos persistentes

O rápido crescimento e desenvolvimento industrial e a intensa atividade humana promoveram um aumento na produção de diversos produtos e bens de consumo, expondo o meio ambiente e a população em geral a uma nova categoria de contaminantes, denominados contaminantes emergentes. Esses compostos pertencem a diversas classes químicas, são tipicamente detectados em baixas concentrações, e muitos dos efeitos, tanto em humanos quanto no ambiente, ainda são pouco conhecidos. Dentre os contaminantes emergentes se destacam, retardantes de chama, produtos farmacêuticos, nanopartículas, plastificantes, tensoativos, praguicidas, produtos de cuidado pessoal, e alguns compostos químicos de origem industrial que não eram monitorados e/ou detectados (Matamoros et al., 2012; US. EPA, 2014; Bai et al., 2018)

A *United States Geological Survey* (USGS) define um contaminante emergente como qualquer substância química sintética ou naturail, ou ainda microrganismos, que não são comumente monitorados no ambiente, mas que possuem a capacidade de contaminá-lo e causar riscos à saúde humana e ao ecossistema (USGS, 2014).

Alguns dos contaminantes emergentes apresentam propriedades específicas como alta estabilidade, transporte de longo alcance e distribuição em todos os compartimentos ambientais, alta solubilidade em lipídeos, podendo bioacumular em animais, principalmente em espécies pertencentes ao topo da cadeia alimentar. Esse grupo de compostos químicos é classificado como poluentes orgânicos persistentes (POPs) (Mortimer, 2013; Xu et al., 2013; Omar et al., 2018; Wit et al., 2019).

1.2 Éteres de difenilas polibromadas (PBDEs)

Os compostos classificados como retardantes de chama são utilizados como uma medida de segurança na prevenção de incêndios, inibindo o processo de combustão e reduzindo os riscos e danos provocados por estes. Sua aplicação ocorre principalmente nas indústrias de eletroeletrônicos, têxtil, automobilística e construção civil, em materiais como madeira, plásticos, papéis, utensílios de cozinha, carpetes e roupas (Angioni et al, 2013; Cruz et al., 2017; Annunciação et al., 2018; Fromme, 2018).

Atualmente, existem mais de 175 substâncias químicas classificadas como retardantes de chama. Dentre eles, os compostos halogenados bromados são utilizados em numerosos produtos durante décadas, e representam um consumo de aproximadamente 20% do uso do total de retardantes de chama. Os éteres de difenilas polibromadas (PBDEs) é um grande grupo pertencente aos retardantes de chama bromados, e sua ampla utilização é devido ao baixo custo e alta eficiência contra a propagação da chama (Król et al., 2012; Frol, 2013; Fromme, 2018).

Os PBDEs são uma classe de substâncias químicas com 209 possibilidades de congêneres teóricos, que diferem de acordo com o número de átomos de bromo (2 a 10 átomos) e de seus padrões de substituição em dois anéis aromáticos ligados por um átomo de oxigênio, no entanto apenas alguns congêneres são estáveis e comercialmente relevantes. São 10 grupos homólogos de PBDEs contendo um ou mais congêneres em cada grupo, baseado no número de substituinte bromo (Figura 1) (EFSA, 2011; Cruz et al., 2017; Annunciação et al., 2018; Fromme, 2018).

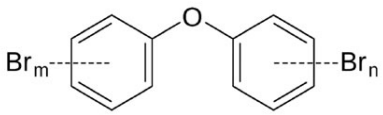


Figura 1: Estrutura química geral dos éteres de bifenilas polibromadas (US. EPA, 2009).

De acordo com a estrutura química e com suas propriedades físico-químicas, os PBDEs apresentam baixa pressão de vapor, são compostos hidrofóbicos, e persistentes no ambiente, devido, principalmente, ao elevado coeficiente de partição octanol/água (valores de $\log K_{ow}$ entre 5,9 a 10), e classificados como poluentes orgânicos persistentes. Os congêneres de baixo peso molecular, tri a hexa-BDE, são os mais importantes do ponto de vista toxicológico (Yan et al., 2010; Król et al., 2012; Cruz et al., 2017; Pietron e Malagocki, 2017; Annunciação et al., 2018; Fromme, 2018; Giulivo et al., 2018).

Os PBDEs são comercialmente produzidos como misturas em três diferentes formulações. A formulação comercial éter de difenila penta-bromada (penta-BDE), na maioria das vezes contém os congêneres penta e tetra-BDE, e a formulação éter de difenila octa-bromada (octa-BDE) contém os congêneres hepta e octa-BDE. Já a éter de difenila deca-bromada (deca-BDE) é formada pelos congêneres deca-BDE e alguns congêneres nona-BDE e octa-BDE. . Nas últimas décadas, os PBDEs vêm atraindo cada vez mais atenção das comunidades científicas e agências reguladoras de diversos países. Os Estados Unidos e países da União Européia proibiram a produção, comercialização e importação de formulações penta-BDE e octa-BDE, desde 2004. A mistura comercial de deca-BDE é ainda produzida e utilizada nos Estados Unidos, e nos países europeus apresenta apenas aplicação restrita (UNEP, 2009; US. EPA, 2011).

1.3 Exposição humana aos PBDEs e toxicidade

A avaliação da concentração de PBDEs em matrizes ambientais e nos alimentos é utilizada para diagnosticar potenciais fontes de exposição a estas substâncias e o biomonitoramento humano, através da análise de marcadores de dose interna, como

leite materno, sangue e cabelo, traz informações dos níveis de exposição das populações em geral (Ni et al., 2013; Annunciação et al., 2018).

A exposição aos PBDEs pode ocorrer no ambiente de trabalho tais como em indústrias de produtos plásticos, papéis, madeira e utensílios domésticos, através da exposição por meio da dieta, ingestão e inalação da poeira interna e do ar interior, absorção dérmica, e também por meio de efluentes contaminados pelo descarte inadequado. Entre estes, as rotas dietéticas desempenham um papel considerável na exposição humana em geral, especialmente através de alimentos de origem animal ricos em lipídeos, como peixes, frutos do mar, carnes, ovos, leite e seus derivados. (Ni et al., 2013; Covaci e Marlavannan, 2015; Cruz et al., 2017; Pietron e Malagocki, 2017; Annunciação et al., 2018; Giulivo et al., 2018).

Não há relatos na literatura de valores de Limite Máximo de Resíduo (LMR) para PBDEs e seus metabólitos em alimentos. De acordo com dados publicados pela *European Food Safety Authority* (EFSA), em 2011, observou-se NOAEL equivalente a 0,45 mg/Kg de peso corpóreo/dia, e LOAEL equivalente a 0,8 mg/Kg de peso corpóreo/dia baseado em estudos com ratos expostos de forma neonatal ao Penta-BDE, durante 30 dias, considerando absorção de 90% e com base nos efeitos no desenvolvimento neurológico.

Em 2004 a Agência para Registro de Substâncias Tóxicas e Doenças (ATSDR) emitiu, para o Penta-BDE, um Nível de Mínimo Risco (NMR) de 0,03 mg/Kg de peso corpóreo/dia, para exposição oral aguda (1 a 14 dias); e 0,007 mg/Kg de peso corpóreo/dia, para exposição oral de duração intermediária (>14 a 364 dias). Considerando um indivíduo de 70 kg, o NMR para exposição oral aguda e de duração intermediária é de 2,1 mg/dia e 0,49 mg/dia, respectivamente. O NMR é calculado pela

razão entre o NOAEL e o fator de incerteza/segurança (FS) da substância de interesse (EFSA, 2011).

De acordo com a *European Food Safety Authority* (EFSA), a ingestão diária estimada (IDE) de PBDEs através da dieta é de 1,2 ng/Kg de peso corpóreo por dia na Alemanha, 1,1 ng/Kg – dia na Espanha, e 0,2 ng/Kg – dia na França (EFSA, 2011). Na população dos Estados Unidos o IDE é 0.6 ng/Kg de peso corpóreo - dia, de acordo com a *Environmental Protection Agency* (EPA) (Pietrón e Malagocki, 2017).

O consumo de alimentos ricos em lipídeos e aqueles provenientes de fontes contaminadas representam uma forma importante de exposição aos PBDEs. As comparações entre diferentes localidades devem ser feitas com cautela devido à variação entre os congêneres usados para calcular $\sum_{PBDEs}$ e os diferentes produtos alimentícios usados no consumo alimentar da população em estudo (US. EPA, 2009; Johnson-Restrepo e Kannan, 2009; EFSA, 2011; Domingo, 2012; Ni et al., 2013; Covaci e Marlavannan, 2015; Pietrón e Malagocki, 2017).

No Brasil, os dados sobre exposição aos PBDEs ainda são escassos ou ausentes. A exposição humana aos PBDEs tem sido motivo de grande preocupação, já que há evidências recentes de que esses compostos causam potenciais efeitos adversos à saúde, principalmente hepatotoxicidade, neurotoxicidade, embriotoxicidade, e desregulações endócrinas e imunológicas. A exposição aos PBDEs pode afetar as células cerebrais fetais humanas, os padrões comportamentais em crianças e causar diminuições significativas da fecundidade em mulheres (Rahman et al., 2001; Costa et al., 2008; Pestana, 2008; US. EPA, 2011; He et al., 2008; Shao et al., 2008; Hu et al., 2010).

Os PBDEs são potenciais desreguladores endócrinos atuando como antagonistas e agonistas dos receptores de andrógeno, progesterona e estrógeno. A diminuição dos níveis séricos de tiroxina (hormônio T4) foi observada em animais expostos a 3 mg/Kg

de peso corpóreo por dia de penta-BDE. Os efeitos dos PBDEs sobre os hormônios tireoidianos são atribuídos às alterações no transporte, indução de enzimas responsáveis pela metabolização e por ação direta nos receptores. Os metabólitos hidroxilados dos PBDEs apresentam maior afinidade às proteínas transportadoras e aos receptores destes hormônios, devido ao fato de que PBDEs, com quatro a seis átomos de bromo, podem formar metabólitos similares à tiroxina (Pestana et al., 2008).

1.4 Técnicas analíticas para determinação de PBDEs em alimentos

Os PBDEs são contaminantes ambientais que se distribuem em diferentes compartimentos e são encontrados em concentrações em níveis traço. Dessa forma, a determinação desses compostos exige técnicas analíticas capazes de identificar e quantificar os analitos com elevada sensibilidade, seletividade, precisão e exatidão. A técnica analítica mais empregada para a determinação dos congêneres dos PBDEs em alimentos é a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) (WHO, 2006; Covaci and Marlavannan, 2015; Annunciação et al., 2018).

A cromatografia gasosa baseia-se na separação pela diferença de distribuição das substâncias da amostra entre a fase estacionária (sólida ou líquida) e fase móvel (gasosa). Esta técnica apresenta alto poder de resolução, alta sensibilidade, e a amostra e/ou seus componentes devem ser voláteis e termicamente estáveis. A espectrometria de massas consiste em uma fonte de ionização o qual permite a formação de íons por retirada ou captura de um elétron, um analisador de massas que realiza monitorização de um íon seletivo de acordo com sua razão massa/carga ou por meio de varredura espectral, e um detector que detecta e amplifica o sinal da corrente de íons que vem do analisador e transfere o sinal para o sistema de processamento de dados (Skoog et al., 2009; Chiaradia et al., 2008; Collins et al., 2006).

1.5 Métodos de preparo de amostras para determinação de PBDEs em alimentos

Antecedendo a análise instrumental, a etapa de preparo das amostras é a mais crítica e laboriosa durante o desenvolvimento de um procedimento analítico, sendo de extrema importância o controle, a otimização das condições e a validação do método de análise. Essa etapa tem como principais objetivos extrair, isolar e pré-concentrar os analitos presentes em uma matriz complexa, e remover os interferentes (*clean up*), tornando assim a amostra compatível com a instrumentação analítica utilizada (Covaci et al., 2010; Reiner et al., 2014; Annunciação et al., 2018).

O aumento na seletividade e sensibilidade e a diminuição da interferência causada pela matriz são as principais vantagens de um método de preparo de amostras ideal. É importante destacar que a escolha da técnica de preparo de amostra baseia-se nas propriedades físico-químicas dos analitos de interesse, dos constituintes da matriz, e, também, dos interferentes (Reiner et al., 2014; Borges et al., 2015).

Na literatura científica, são descritos vários métodos de preparo de amostras para determinação de PBDEs em amostras de alimentos (Tabela 1), no entanto requerem grande consumo de solvente e de amostra, e longo tempo para extração dos analitos. Como as amostras de alimentos são sólidas, a maioria das técnicas de extração baseia-se na partição sólido-líquido. As principais técnicas utilizadas envolvem extração por Soxhlet, extração líquida pressurizada (PLE), extração assistida por micro-ondas, sistemas de ultrassom, extração em fase sólida (SPE), e QuEChERS (extração em fase sólida dispersiva). A técnica de preparo de amostras de alimentos utilizando Soxhlet é a mais comum, com tempo de extração variando de 8 a 48 horas, e mistura de solventes polares e apolares em diferentes proporções, com volume de aproximadamente 200 mL da mistura de solventes, além de grande quantidade de amostra (> 200 g) requerida nas

análises. Como consequência, geram-se quantidade excessiva de resíduos de solventes tóxicos (Covaci et al., 2009; Annunciação et al., 2018).

Tabela 1 – Alguns métodos descritos na literatura para determinação de PBDEs em alimentos.

Literatura	**Hu e Hu, 2014**	**Kalachova et al., 2013**	**Dirtu et al. 2013**	**Cascaes, 2009**
Tipo de amostra	2,5g de Ovo	10g Peixe	2g Ovo	5g Peixe
Solvente	25mL 1:1 v/v hexano:acetona	15mL 1:2 v/v H2O:Ac etila	1:1 v/v DCM:hexano	80mL 1:1 v/v hexano:DCM 50%
Método de preparo de amostra	[1]ELL + *clean-up* com H_2SO_4	[2]QuEChERS	[3]PLE	[4]Soxhlet
Etapa adicional (*clean up*)	coluna de sílica	coluna de sílica	-	coluna de sílica e alumina
Detecção	GC-MS	GC-MS/MS	GC-MS	GC-MS

[1] ELL, Extração líquido-líquido
[2] QuEChERS, Extração em fase sólida dispersiva - *QUick Easy CHeap Effective Rugged and Safe*
[3] PLE, Extração Líquido Pressurizada
[4] Soxhlet, Extração contínua utilizando solvente quente

Diante do exposto, o desenvolvimento de novos métodos, que requerem procedimentos de preparo de amostras de alimentos que sejam mais simples e rápidos, e que consumam menor quantidade de amostras e de reagentes é necessário.

1.6 Microextração em sorvente empacotado (MEPS)

A microextração em sorvente empacotado (MEPS) é uma técnica de preparo de amostra introduzida por Mohamed Abdel-Rehim e colaboradores (2003), e consiste basicamente na miniaturização do sistema de extração em fase sólida (SPE)

convencional, proporcionando a extração, pré-concentração dos analitos, e remoção dos interferentes em uma única etapa. O aumento na sensibilidade do método, a redução do volume da amostra e do eluente (mililitros para microlitros), redução no tempo de análise e utilização de tecnologias ambientalmente corretas são as principais vantagens da técnica analítica descrita (Abdel-Rehim, 2010; Martínez-Moral e Tena, 2014; Queiroz, 2015; Martínez-Moral, 2015).

A MEPS é constituída por uma microcoluna recheada com 1- 4 mg de material sólido (fases seletivas) conectada à agulha de uma microseringa. Os analitos adsorvidos na microcoluna são eluídos na fase extratora e injetados no sistema analítico (Queiroz, 2015). As etapas desta técnica incluem o condicionamento da fase extratora, ciclos de aspiração/dispensação da amostra, eliminação de interferentes e a eluição dos analitos em solvente compatível com o sistema analítico. A etapa de limpeza do cartucho, após a eluição dos compostos de interesse, é importante para diminuir os efeitos de *carryover* e, desta forma, favorecer a reutilização da coluna (Queiroz, 2015; Martínez-Moral, 2015; Yang et al., 2017).

Martínez-Moral e Tena (2014) descreveram o desenvolvimento e validação de um método de extração líquido pressurizado seletiva (sPLE) seguida por MEPS e quantificação por GC-MS, para a determinação de congêneres PBDE em lodo de esgoto. O emprego da MEPS proporcionou aumento de sensibilidade, resultando em diminuição dos limites de detecção e quantificação, valores menores do que os previamente relatados para a determinação de PBDEs nessas amostras. Além disso, a MEPS forneceu um *clean up* adicional na matriz, melhorando a detecção e protegendo o CG-MS de possíveis interferentes, e bons valores de recuperação, variando entre 92% e 102%.

Sendo uma técnica miniaturizada, os métodos analíticos baseados em MEPS são mais rápidos, simples, robustos, possibilitam acoplamento *on-line* com instrumentação analítica e, consomem quantidade de amostra e volumes de solvente inferiores às técnicas clássicas de preparo de amostras, como a SPE, Soxhlet, e a extração líquido-líquido (ELL) (Gjelstad e Pedersen-Bjergaard, 2014; Yang et al., 2017). Até o momento ainda não há descrito na literatura científica métodos de preparo de amostras empregando MEPS para determinação de PBDEs em amostras de alimentos.

Objetivos

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral:

Desenvolver, otimizar e validar métodos analíticoss para a determinação dos principais congêneres de éteres de difenilas polibromadas em alimentos, e estimar a exposição humana a esses contaminantes

2.2 Objetivos específicos:

- Desenvolver e validar métodos análiticos para determinação dos congêneres de PBDEs: 2,4,4'- éter tribromodifenil (BDE-28), 2,2',4,4'- éter tetrabromodifenil (BDE-47), 2,2',4,4',5- éter pentabromodifenil (BDE-99), 2,2',4,4',6- éter pentabromodifenil (BDE-100), 2,2',4,4',5,5'- éter hexabromodifenil (BDE-153), 2,2',4,4',5,6'- éter hexabromodifenil (BDE-154) e 2,2',3,4,4',5,6'- éter heptabromodifenil - BDE-183, em amostras de alimentos, incluindo ovo, peixe, frutos do mar e leite, empregando a microextração em sorvente empacotado (MEPS) e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS);

- Avaliar as concentrações de PBDEs nas amostras de alimentos obtidas do mercado nacional e comparar com os valores encontrados em outros países;

- Estimar a ingestão diária (IDE) a PBDEs pela população brasileira pelo consumo dos alimentos analisados e estabelecer uma avaliação de risco da exposição a esses contaminantes através do *Hazard Index*.

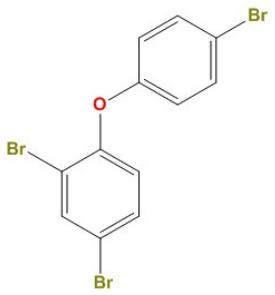
Materiais e Métodos

3. Materiais e Métodos

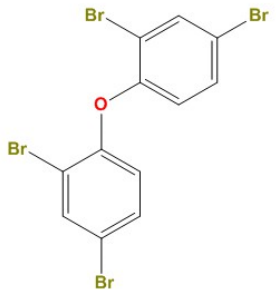
3.1 Soluções padrão e reagentes

Os congêneres dos éteres de difenilas polibromadas - PBDEs (Accustandart®, New Haven, CT, USA) selecionados no estudo foram os 2,4,4'- éter tribromodifenil - BDE-28, 2,2',4,4'- éter tetrabromodifenil - BDE-47, 2,2',4,4',5- éter pentabromodifenil - BDE-99, 2,2',4,4',6- éter pentabromodifenil - BDE-100, 2,2',4,4',5,5'- éter hexabromodifenil - BDE-153, 2,2',4,4',5,6'- éter hexabromodifenil - BDE-154, e 2,2',3,4,4',5,6'- éter heptabromodifenil - BDE-183, e suas estruturas estão demonstradas na figura 2. O 4,4'-dibromodifenil foi utilizado como padrão interno – PI (figura 3) (99,9%; Supelco – Sigma Aldrich Company®, Bellefonte, PA, USA). As soluções estoque dos padrões analíticos foram estocadas em tubos de vidro adequadamente fechados, a -20ºC, ao abrigo da luz, até o momento das análises.

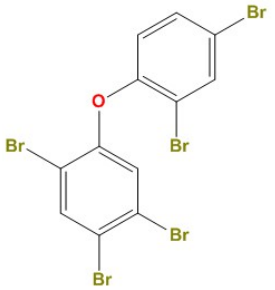
Os seguintes solventes (grau HPLC) foram utilizados durante os experimentos: hexano, acetona, acetonitrila, diclorometano e isooctano (2,2,4-trimetilpentano), adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Água deionizada de alta pureza (resistividade 18.2 mΩ cm) foi obtida utilizando-se sistema de purificação Milli-Q (Millipore RiOs-DITM, Bedford, MA, EUA). O ácido sulfúrico foi obtido da Synth® (Diadema, São Paulo, Brasil).



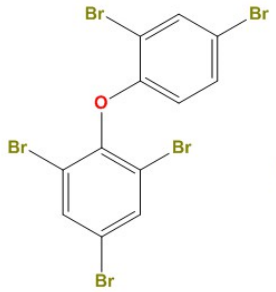
2,4,4'- éter tribromodifenil - BDE-28



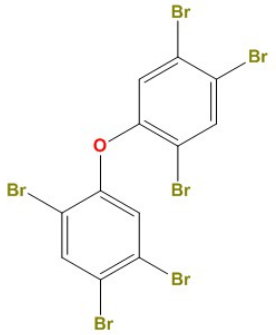
2,2',4,4'- éter tetrabromodifenil - BDE-47



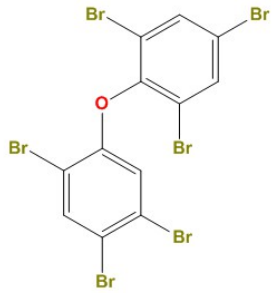
2,2',4,4',5- éter pentabromodifenil - BDE-99



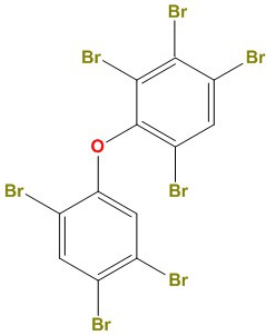
2,2',4,4',6- éter pentabromodifenil - BDE-100



2,2',4,4',5,5'- éter hexabromodifenil - BDE-153



2,2',4,4',5,6'- éter hexabromodifenil - BDE-154



2,2',3,4,4',5,6'- éter heptabromodifenil - BDE-183

Figura 2: Estrutura química dos congêneres de PBDEs empregados no estudo.

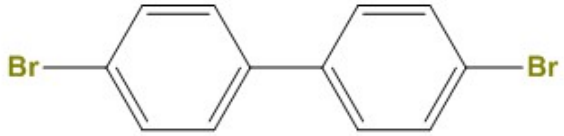


Figura 3: Estrutura química do 4,4'-dibromodifenil, empregado como padrão interno neste estudo.

3.2 Instrumentação analítica

As análises foram realizadas utilizando um sistema de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS), da Thermo Fisher Scientific®. A separação dos congêneres de PBDEs foi obtida em uma coluna analítica TG-SQC (15 m x 0,25 mm x 0,25 µm; 5% fenilmetilsiloxano, 95% polidifenilsiloxano), Thermo Fisher Scientific®. A temperatura inicial do forno, que contém a coluna cromatográfica, foi de 100 °C, mantida por 2 minutos, seguida por uma rampa de aquecimento a 8 °C/min até 200 °C, com posterior aumento de 10 °C/min até 300 °C, mantendo por 1 minuto, totalizando 25,5 minutos de tempo de corrida. Hélio foi utilizado como gás de arraste, na vazão de 1 mL/min. A temperatura do injetor foi 230 °C, o volume de injeção foi 2 µL, realizada em modo *splitless*, e com abertura da válvula após 1 minuto.

O BDE-183 foi incluído no método para quantificação de PBDEs em amostras de leite, dessa forma, as condições cromatográficas foram ajustadas para um melhor desempenho analítico. Na rampa de aquecimento do forno da coluna, a temperatura iniciou-se com 100 °C e mantendo-se por 2 minutos, seguida por uma rampa de aquecimento a 8 °C/min até 200 °C, com posterior aumento de 10 °C/min até 290 °C, mantendo por 3 minuto, e finalmente, um aquecimento de 10 °C/min até 300 °C totalizando 27,5 minutos de tempo de corrida.

O sistema de detecção utilizado foi um espectrômetro de massas do tipo quadrupolo (modelo ISQ single quadrupole, Thermo Fisher Scientific®), equipado com fonte de ionização por impacto de elétrons. As temperaturas da fonte de ionização e da linha de transferência para o espectrômetro de massas (*transfer line*) foram mantidas em 250 °C e 280 °C, respectivamente. As determinações foram executadas no modo *Full Scan*, monitorando a faixa de razão massa/carga (m/z) de 220 a 800, e em modo de monitoramento de íon selecionado (*SIM*). As m/z selecionadas no modo *SIM* estão descritas na Tabela 2. A aquisição e a quantificação dos dados foram realizadas utilizando o programa Thermo Xcalibur ™ versão 2.2 (Thermo Fisher Scientific®).

Tabela 2 – Razão massa/carga (m/z) dos íons monitorados

Analitos	Íon precursor (m/z)
BDE-28	248 – 246 – 406
BDE-47	326 – 486 – 484
BDE-99 e -100	404 – 406 – 564
BDE-153 e -154	484 – 482 – 486
BDE-183	562 – 564 – 722
*PI – 4,4’-dibromodifenil	152 – 312 – 310

*PI, padrão interno

3.3 Amostras

3.3.1 Amostras comerciais

As amostras de alimentos de ovo, peixe, frutos do mar e leite foramadquiridass em diferentes estabelecimentos comercias de Ribeirão Preto e região, São Paulo, Brasil, para determinação das concentrações totais dos congêneres BDE-28, BDE-47, BDE-99, BDE-100, BDE-153 e BDE-154. No método desenvolvido para quantificação de

PBDEs em amostras de leite foi incluído um congênere hepta, o BDE-183. Foram selecionados no estudos 40 amostras de ovos, 40 de peixe/frutos do mar e 43 amostras de leite (total de 123 amostras), as quais foram classificadas por um código numérico e caracterizadas pelo subtipo de amostra de cada grupo. As amostras foram armazenadas em freezer – 80ºC até o momento das análises, em tubos de polipropileno.

3.3.2 Amostras "branco"

Para o desenvolvimento e validação do método de extração de PBDEs em ovos, foram utilizadas amostras de ovo orgânico da marca "Label Rouge", Porto Feliz, São Paulo, Brasil. As aves da marca "Label Rouge" (amostras branco) são submetidas a um sistema de criação ecologicamente correto e recebem ração orgânica. São produtos certificados pela IBD Certificações, uma instituição acreditada pelo Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO) e credenciada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Estas amostras foram utilizadas como matriz branca, ou seja, matriz com ausência dos analitos de interesse. Os teores dos PBDEs foram previamente avaliados nestas amostras após análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS). Utilizou-se as condições de preparo de amostra descritas por Martínez-Moral e Tena (2014), a qual utiliza a técnica de microextração em sorvente empacotado (MEPS) como etapa de *clean up* para determinação de PBDEs em lodo de esgoto, e as condições descritas por Hu e Hu (2014), que determinou os níveis de PBDEs em ovos por extração líquido-líquido (ELL) e *clean up* com ácido sulfúrico, com modificações e adaptações necessárias.

As amostras utilizadas para o desenvolvimento e validação do método de preparo de amostras para quantificação de PBDEs em peixe e frutos do mar foram obtidas de criadouro de peixe localizado na Represa de Furnas, na cidade de Alfenas,

Minas Gerais, Brasil. A amostra foi considerada uma matriz branca após análise prévia da matriz, utilizando as condições de preparo de amostra desenvolvida nesse estudo para quantificação de PBDEs em ovos. Os valores encontrados para todos os analitos em estudo foram sempre inferiores à metade do limite de detecção do estudo.

Para o desenvolvimento e validação do método analítico para determinação dos principais congêneres de PBDEs em amostras de leite utilizou-se como matriz branca o leite orgânico integral "Timbaúmba", com 3% de gorduras totais (Lote: L2T542 - Indústrias de laticínios Murici Ltda – Alagoas – Fazenda Timbaúba Alimentos Orgânicos Ltda). As amostras foram previamente analisadas e os teores de PBDEs foram avaliados após análise por GC-MS, utilizando as condições de preparo de amostras já desenvolvidas para as amostras anteriores.

3.4 Preparo das amostras

As etapas de otimização, desenvolvimento e validação dão método analítico de preparo de amostra para os alimentos selecionados no estudo foram realizadas separadamente para cada alimento de escolha, em vista da diferença de complexidade entre as matrizes, dos interferentes presentes e da concentração dos PBDEs em cada amostra. Diante do exposto, o projeto foi divido em estudos I, II e III, correspondendo ao desenvolvimento e validação do método analítico para as amostras de ovo, peixe e frutos do mar, e leite, respectivamente. Ademais, nos estudos encontram-se as aplicações em amostras comerciais, à comparação com estudos já descritos na literatura relativos tanto a metodologia quanto as concentrações quantificadas nas amostras brasileiras e em outros países. O estudo IV inclui os cálculos da ingestão diária estimada de PBDEs em relação ao consumo, por parte dos brasileiros, de ovos, peixes, alimentos

de origem marinha e leite, e a comparação com os cálculos de ingestão diária já estabelecida em países Europeus e nos EUA.

Antecedendo a etapa de preparo das amostras, as mesmas foram homogeneizadas, de acordo com suas características físicas, acondicionadas em tubos de polipropileno de 50 mL, congeladas em freezer à -80 °C e, posteriormente, liofilizadas (Liofilizador modelo L101 Liobrás®, São Carlos, São Paulo). Após a liofilização, as amostras foram tamisadas (Tamisador modelo AS200 Retch®, Haan, Alemanha), utilizando tamises de 4 mm, 2 mm, 1 mm, 500 µm, 250 µm, 125 µm, 63 µm e, por fim, 45 µm. Ademais, para as amostras de peixe e alimentos de origem marinha houve necessidade da utilização de um moinho analítico em processo anterior à tamisação. As partículas obtidas no tamis de diâmetro de 125 µm foram as de escolha para os processos de preparo de amostras, devido a uma maior recuperação dos analitos após análise.

3.4.1 Estudo I – Avaliação da presença de PBDEs em amostras de ovos

50 mg de ovos liofilizados e tamisados foram pesados em tubos de polipropileno de 15 mL, (FA2104N, Bioprecisa, Curitiba, PR, Brasil) e alíquotas 20 µL da solução de uso do PI (2 µg/mL) foram adicionadas. Previamente ao preparo da amostra foram adicionados 4,0 mL de hexano, os tubos foram então agitados em vórtex (10 segundos) (QL-910, Biomixer) e sonificados por 15 minutos (frequência ultrassônica 40 kHz, potência ultrassônica 135 W, frequência 50/60 Hz – modelo USC-1400, Unique®, Indaiatuba, SP, Brasil). Após a agitação, os sobrenadantes foram transferidos para novos tubos de polipropileno (15 mL), e então adicionou 2,0 mL de ácido sulfúrico concentrado, para promover a remoção lipídica ácida. Os tubos foram novamente agitados em ultrassom e centrifugados a 2500 g (Centrífuga 80-2B-15 mL, Centribio).

As fases orgânicas foram separadas, transferidas para novos tubos de polipropileno e evaporadas em concentrador a vácuo de amostras (Christ RCV 2-25 CO plus e Christ CT 04-50 SR). Os resíduos foram reconstituídos em 500 µL de acetonitrila.

Após a remoção lipídica ácida, a microextração em sorvente empacotado (MEPS) foi empregada para extração, pré-concentração dos PBDEs presentes no resíduo reconstituído em acetonitrila, e um *clean up* adicional da matriz. Para o MEPS utilizou-se o dispositivo eVolt® XR – Enabled by Xchange®, uma seringa de volume fixo de 100 µL e coluna de fase reversa C18 para extração com MEPS, ambos da SGE - Analytical Science. Esse dispositivo acopla à seringa, a qual contém a coluna, e permite alterar a velocidade de aspiração e dispensação dos solventes, amostras e eluentes, com faixa de velocidade de 10 a 100 µL/segundo. A acetonitrila foi utilizada como solvente para condicionar a coluna de C18. O solvente condicionante percorreu por três vezes a coluna a uma velocidade de 30 µL/s (controlada no próprio dispositivo eVolt). As amostras foram aspiradas e dispensadas por 4 vezes (400 µL) a 20 µL/s. Utilizou-se o isooctano como solvente de eluição, percorrendo por dois ciclos a coluna de C18 (200 µL) e também a 20 µL/s. O volume de 2 µL do eluato foram utilizados para análise instrumental no GC-MS. Para a lavagem do cartucho, utilizou-se isooctano em duplicata (300 µL) a 30 µL/s.

3.4.1.1 Determinação da porcentagem lipídica nas amostras de ovos

A determinação da porcentagem lipídica das amostras de ovos foi realizada em colaboração com o Laboratório de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação da Apis Flora Industrial e Comercial Ltda, com as adaptações necessárias do *AOAC Offical Method 923.07 Lipid and Lipid Phosphorus in Eggs.*

As amostras de ovo foram pesadas, em tubo de polipropileno de 15 mL, 10 mL da mistura clorofórmio e etanol absoluto (1:1 v/v) foi adicionado. O extrato foi agitado em vórtex por aproximadamente 1 minuto e deixado em repouso até completa sedimentação, obtendo uma solução límpida. Uma alíquota de 5 mL do sobrenadante da solução (seco e tarado - P1) foi transferida para um vidro de relógio, e esta foi seca em chapa de aquecimento. Após a secagem, levou-se à estufa (100-105°C) por 2h, e o vidro de relógio foi pesado até obter peso constante (P2). O resultado foi expresso em porcentagem (%).

3.4.2 Estudo II – Avaliação da presença de PBDEs em amostras de peixes e frutos do mar

Cerca de 100 mg de peixe liofilizado foram pesados em tubos de polipropileno de 15 mL. Nestes, 10 µL da solução de uso do PI de concentração 2 µg/mL, e 2 mL de hexano foram adicionados. Os tubos foram agitados em vórtex e ultrassom. Após a agitação, adicionou-se 1 mL de ácido sulfúrico concentrado, para remoção lipídica. Os tubos foram novamente ultrassonicados por 15 minutos e centrifugados a 2500 g por 10 minutos. A fase orgânica foi separada e evaporada em concentrador a vácuo de amostras. Os resíduos foram reconstituídos com 500 µL de diclorometano.

O resíduo reconstituído foi submetido ao método de extração empregando a MEPS. Anteriormente ao início das extrações, a coluna C18 da MEPS foi condicionada com acetonitrila e diclorometano. Cada solvente condicionante percorreu por três ciclos a coluna a 30 µL/s. As amostras foram aspiradas e dispensadas por 4 vezes (400 µL) a 20 µL/s. Utilizou-se o hexano como solvente de eluição, por dois ciclos (200 µL), e, também, a 20 µL/s. O volume de injeção foi de 2 µL do eluato. Para a lavagem do cartucho, utilizou-se hexano em duplicata (200 µL) a 30 µL/s.

3.4.3 Estudo III – Avaliação da presença de PBDEs em amostras de leite

Uma massa de aproximadamente 100 mg de leite orgânico liofilizado foi adicionada em tubos de polipropileno de 15 mL, com fortificação de 20 µL da solução estoque de padrão interno (concentração 2 µg/mL), e adição de 2 mL de hexano, em extração dupla. Os tubos foram agitados e a fase orgânica separada após a etapa de centrifugação. Acrescentou-se 2 mL de ácido sulfúrico concentrado, para uma remoção lipídica ácida, constituindo a primeira etapa de *clean up* da técnica. Os tubos foram novamente agitados e a fase orgânica separada e evaporada em concentrador a vácuo de amostras. Os resíduos foram reconstituídos com 200 µL de acetonitrila.

O resíduo reconstituído foi submetido à técnica de extração empregando MEPS, utilizando uma fase sólida constituída de C18 acoplada a uma seringa de volume fixo de 50 µL. A coluna C18 da MEPS foi condicionada com acetonitrila, por três ciclos a 30 µL/s. A segunda etapa da MEPS inclui o carreamento da amostra, as quais foram aspiradas e dispensadas até o esgotamento do volume total, a 20 µL/s. Utilizou-se o isooctano como solvente de eluição, por dois ciclos (100 µL), e, também, a 20 µL/s. 2 µL do eluato foram utilizados para análise por GC-MS. Para a lavagem do cartucho, utilizou-se isooctano e hexano. Empregando estas condições descritas, não foram observados efeitos de memória (*carryover).*

3.5 Validação analítica

A validação de um método analítico é um estudo experimental e documentado que objetiva demonstrar que o procedimento utilizado é adequado à finalidade proposta, de forma a assegurar a confiabilidade dos resultados obtidos (MAPA, 2011). Os métodos analíticos desenvolvidos para quantificação dos PBDEs em diferentes tipos de amostras de alimentos foram validados de acordo com as diretrizes estabelecidas pelo

Manual de Garantia da Qualidade Analítica (International Standard Book Number – ISBN 978-85-7991055-5) instituídas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) por meio da Instrução Normativa nº 16 de 17 de maio de 2013.

A validação dos métodos foi conduzida observando os seguintes parâmetros analíticos: linearidade, seletividade, efeito matriz, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ), precisão e exatidão (repetibilidade intra- e inter dia intralaboratorial) e recuperação.

3.5.1 Linearidade

Linearidade é a capacidade de o método produzir resultados diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado. De uma forma mais geral, a linearidade mede a capacidade de um método analítico em gerar resultados proporcionais às concentrações da espécie em análise, dentro de uma faixa de concentração específica (MAPA/ACS, 2011).

A linearidade foi avaliada construindo três diferentes curvas de analíticas: curva de calibração do analito em solução (CCAS), a partir dos padrões de calibração dos analitos puros solubilizados em solvente; curva de calibração da matriz branca fortificada (CCMBF), a partir de matriz branca fortificada com os padrões de calibração dos analitos puros; e curva de calibração do extrato da matriz branca fortificada (CCEMBF), construída a partir do extrato da matriz branca submetida à extração e posterior a esta, fortificada com os padrões de calibração do analito puro.

As curvas analíticas apresentaram faixa linear de 1,4 a 150 ng/g de lipídio para as amostras de ovo, de 0,92 a 100 ng/g de amostra fresca de peixe, e de 0,88 a 200 ng/g de amostra fresca de leite. Utilizou-se a concentração de 70 ng/g para o padrão interno, para ambos os métodos analíticos desenvolvidos.

Para a CCAS foi utilizado como solvente isooctano no método para amostras de ovo e leite, e hexano para amostras de peixe, enquanto para CCEMBF foi utilizado extrato de ovo, peixe e leite liofilizados. As CCMBF foram construídas a partir da fortificação de amostras branco de ovo, peixe e leite liofilizados com padrão interno e soluções padrão correspondentes a cada ponto da curva de calibração. Após a fortificação, todos os pontos passaram pelo mesmo processo de extração. Cada um dos seis pontos dos três tipos de curvas foi preparado em triplicata. A análise de regressão utilizada foi a dos mínimos quadrados, em que a variável independente refere-se à concentração teórica de cada congênere de PBDE. A regressão foi representada graficamente pela equação da reta e a correlação pelo coeficiente de correlação (*r*).

3.5.2 Seletividade

A seletividade é a capacidade do procedimento analítico de discriminar entre os analitos de interesse e substâncias análogas, como isômeros, metabólitos, produtos de degradação, substâncias endógenas, componentes da matriz, isóbaros e componentes que possam gerar interferência poliatômica, entre outras (MAPA/ACS, 2011). A seletividade do método foi avaliada por meio da análise de amostras branco e amostras zero e do efeito matriz, a partir da comparação entre a resposta instrumental advinda do processamento da matriz, do extrato da matriz fortificada e do analito puro em solvente. Amostra zero é aquela que contém o padrão interno na mesma concentração utilizada no método, mas não apresenta os analitos de interesse.

3.5.3 Efeito Matriz

Efeito matriz é um estudo de seletividade que objetiva verificar possíveis interferências causadas pelas diversas substâncias que compõem a matriz amostral,

gerando, basicamente, fenômenos de diminuição ou ampliação do sinal instrumental ou da resposta instrumental (MAPA/ACS, 2011). O efeito matriz foi avaliado por meio da construção de dois tipos de curvas, CCAS e CCEMBF, e comparando os interceptos e inclinações das curvas.

De acordo com as diretrizes do MAPA, o estudo de efeito matriz não necessita ser realizado no caso de se utilizar CCMBF ou CCEMBF. No entanto, é importante levar em consideração as perdas de recuperação provenientes da extração, mesmo que ocorram em menores proporções. Assim, devido a essas diferenças de recuperação por razões práticas, foi utilizada CCMBF para quantificação de todos os padrões de PBDEs.

No entanto, para um estudo adicional de efeito matriz, uma vez que as amostras de alimentos são matrizes muito complexas e com grande quantidade de interferentes, e os PBDEs são encontrados em níveis traços, utilizou-se o guia de validação da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA – Resolução RDC nº 27, de 17 de maio de 2012) para métodos bioanalíticos.

O efeito matriz foi avaliado utilizando-se quatro diferentes amostras de ovos, peixes e leite liofilizados. O padrão interno e os padrões de PBDEs foram adicionados após o processamento, nas mesmas concentrações das amostras de controle de qualidade de baixa concentração – CQB e controle de qualidade de alta concentração - CQA. Os valores de CQB utilizados foram 4,0 ng/g de ovo fresco, 3,0 ng/g de amostra fresca para as amostras de peixe e leite. Os valores de CQA foram de 180 ng/g de lipídio para a amostra de ovo, 120 ng/g de leite fresco e 80 ng/g de peixe fresco. Para cada amostra foi calculado o fator de matriz normalizado pelo padrão interno (FMN), conforme a fórmula a seguir:

$$FMN = \frac{Resposta\ do\ analito\ em\ matriz / Resposta\ do\ PI\ em\ matriz}{Resposta\ do\ analito\ em\ solução / Resposta\ do\ PI\ em\ solução}$$

Como critério de aceitação, o coeficiente de variação (CV) dos FMNs relativos às amostras CQB e CQA deve ser inferior a 15%.

3.5.4 Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram calculados diretamente usando a CCMBF. Para o cálculo foram utilizados os valores de *slope* (inclinação da curva) e do desvio padrão (DP) do intercepto das médias de 3 curvas. Os valores de 3,3 e 10 para LD e LQ, nessa ordem, foram multiplicados pelo quociente entre o desvio padrão do intercepto e a média do *slope*, como demonstrado nas equações seguintes:

$$LD = 3{,}3\ x\ \frac{Desvio\ padrão\ do\ intercepto}{média\ da\ inclinação\ da\ curva}$$

$$LQ = 10\ x\ \frac{Desvio\ padrão\ do\ intercepto}{média\ da\ inclinação\ da\ curva}$$

Os valores determinados para o LD foram de 0,42 ng/g de lipídio (lpd) nas amostras de ovo, 0,27 ng/g de peixe e 0,26 ng/g de leite. Após os cálculos, foram avaliadas 10 amostras enriquecidas com padrões de PBDEs nas concentrações correspondentes aos limites de quantificação para cada método proposto (1,40 ng/g lpd em ovo, 0,92 ng/g de peixe e 0,88 ng/g de leite). Essas análises objetivaram certificar

que o LQ calculado era a menor concentração quantificada de cada PBDE com precisão e exatidão, obtendo coeficiente de variação (CV) até 20% e porcentagem de inexatidão (erro padrão relativo) de ± 20%.

3.5.5 Precisão e exatidão

A precisão e a exatidão do método foram avaliadas através de estudos intra e intercorridas. Os estudos foram realizados nas concentrações relativas ao controle de qualidade de baixa concentração - CQB, controle de qualidade de média concentração - CQM, e controle de qualidade de alta concentração - CQA. Para a avaliação da precisão e da exatidão intra-corrida foram analisadas seis alíquotas destas concentrações extraídas através de uma única curva de calibração. Para o estudo destes parâmetros intercorridas foram analisadas seis alíquotas de cada uma das extrações de PBDEs durante três diferentes dias. Os valores correspondentes ao CQM foram de 90 ng/g de lipídio para ovos, 40 ng/g de peixe fresco, e 60 ng/g de leite fresco.

A avaliação da precisão intra e intercorridas foram realizadas através do cálculo do coeficiente de variação (CV) dos resultados obtidos. Assim, para que o método possa ser referido como preciso, o CV deve ser igual ou inferior a 15%. A exatidão é expressa pelo Erro Padrão Relativo (EPR), não admitindo valores fora da faixa de 15% do valor nominal, segundo a equação a seguir:

$$EPR = \frac{(concentração\ média\ experimental - concentração\ nominal)}{valor\ nominal}\ x\ 100$$

3.5.6 Recuperação

A recuperação pode ser definida como a fração da quantidade total do analito presente na amostra, a qual é obtida após a finalização do processo de extração. Tem como objetivo a correlação dos erros sistemáticos oriundos das etapas do método analítico. O cálculo da recuperação é realizado de acordo com a equação:

$$Recuperação\ (\%) = \frac{concentração\ medida\ após\ o\ processo\ de\ extração}{concetração\ teórica}\ x\ 100$$

A recuperação foi determinada por meio da análise de seis replicatas das respectivas amostras, fortificadas com padrões em três diferentes concentrações, correspondentes ao CQB, CQM e CQA, e padrão interno. Os valores utilizados foram equivalentes àqueles utilizados para o teste de precisão e exatidão.

3.6 Estudo IV – Ingestão diária estimada de PBDEs e avaliação de risco da exposição humana a esses contaminantes ambientais

A ingestão diária estimada (IDE) de PBDEs pela população brasileira, do estado de São Paulo, foi calculada baseada no estudo de Staskal e colaboradores (2008). O cálculo foi realizado considerando um adulto com peso corporal de 70 Kg (BW), uma frequência de exposição de 365 dias/ano (EF), uma duração da exposição de 30 anos (ED), a média da taxa de ingestão de alimento diária para cada amostra analisada (IR), o tempo médio de 10950 dias (AT), e a média do somatório da concentração de todos os congêneres de PBDEs para todas as amostras analisadas (C). A fórmula usada para calcular a IDE é:

$$IDE = \frac{C.IR.EF.ED}{BW.AT}$$

A avaliação de risco humana da exposição aos PBDEs via alimentação, foi avaliada a partir do cálculo do *hazard index* ou índice de perigo. O *hazard index* foi calculado baseado na razão entre a somatória da ingestão diária calculada neste estudo e a dose de referência (RfD) para os congêneres de PBDEs separadamente (Staskal et al., 2008). De acordo com a *European Food Safety Autority* (EFSA, 2011), os valores reportados de RfD para os congêneres de PBDEs foi de 0,1 µg/Kg peso corpóreo – dia para o BDE-47 e BDE-99, e 0,2 µg/Kg peso corpóreo – dia para o BDE-153.

Resultados e discussão

4. Resultados e discussão

4.1 Otimização das condições experimentais

As condições cromatográficas foram otimizadas com objetivo de avaliar a eficiência de separação eficiência. Foram testados diferentes parâmetros instrumentais, como o comprimento das colunas analíticas (30 e 15 metros), rampas de temperatura do forno de temperatura, diferentes vazões do gás de arraste, temperatura do injetor e volume de injeção.

Inicialmente, testou se uma coluna de 30 metros FS-CAP SLB-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm; 5% fenilmetilsiloxano, 95% polidifenilsiloxano), Sigma-Aldrich® e os resultados não foram satisfatórios. Com uma coluna analítica menor (15 metros), TG-SQC (15 m x 0,25 mm x 0,25 µm; 5% fenilmetilsiloxano, 95% polidifenilsiloxano), Thermo Fisher Scientific®, os picos cromatográficos dos congêneres de PBDEs apresentaram melhor resolução e o tempo de corrida cromatográfica foi menor.

Os congêneres de PBDEs com elevada quantidade de bromo na estrutura apresentam problemas em relação à estabilidade térmica. Esses PBDEs de alto peso molecular apresentam tempos de retenção consideravelmente elevados, podendo ocasionar degradação térmica das moléculas quando analisadas em colunas cromatográficas maiores (30 metros). O maior tempo de permanência na coluna associado ao aumento gradativo da temperatura durante a separação promove diminuição do sinal analítico para os congêneres mais bromados, e em temperaturas próximas a 300 °C, os congêneres que ainda não chegaram ao detector podem ser degradados termicamente (Annunciação et al., 2018). Ademais, de acordo com o *Método 1614A da US. EPA* a utilização de colunas curtas são mais indicadas para a

determinação de retardantes de chama, devido a menor permanência dos compostos na coluna cromatográfica.

A temperatura inicial do forno foi de 100 °C, mantida durante 2 minutos, seguida de uma primeira rampa de aquecimento a 8 °C/min, até 200 °C, com posterior aumento à 10 °C/min, até 300 °C, mantendo nessa temperatura por 1 minuto. O tempo total de corrida foi de 25,5 minutos, para separação de todos analitos e padrão interno, com temperatura máxima da coluna de 350 °C. Hélio foi utilizado como gás de arraste, na vazão de 1 mL/min. A temperatura do injetor foi fixada em 230 °C. O cálculo do volume de injeção foi realizado no software Thermo Xcalibur™, versão 2.2 (Thermo Fisher Scientific®), na opção *Vapor Volume Calculator*, a partir do tipo do *liner* do injetor (SSL 5 mm ID splitless) e do solvente utilizado na análise (isooctano e hexano), sendo fixado em 2 µL. Foi selecionado o modo de injeção Splitless, com abertura da válvula após 1 minuto da injeção dos analitos no sistema cromatográfico. O modo de injeção Splitless ou sem divisor é necessário para análises de traços, já que, nesse caso, uma maior quantidade de amostra é injetada na coluna. A válvula do divisor permanece fechada durante a injeção, possibilitando a total transferência da amostra para a coluna. Após um determinado tempo, no caso desse estudo, 1 minuto, a válvula é aberta para purgar traços remanescentes da amostra volatilizada, principalmente o solvente.

As análises iniciais no espectrômetro de massas foram executadas no modo *Full Scan*, monitorando a faixa de razão massa/carga (m/z) de 200 a 800. Posteriormente, foram selecionados os íons fragmentos mais intensos para cada congênere e padrão interno, no modo *SIM* (monitoramento de íon selecionado), descritos no item 3.2. Os tempos de retenção para cada composto foram determinados por comparação com soluções padrão dos PBDEs e do padrão interno e

seus respectivos espectros de massas. As figuras de 4 a 9 mostram os espectros de massa obtidos no modo *Full Scan* para cada congênere de PBDE em estudo, e a figura 10 o espectro de massa obtido no modo *Full Scan* para o padrão interno, 4,4'-dibromodifenil. A Figura 11 apresenta os cromatogramas referentes aos tempos de retenção dos congêneres de PBDEs e padrão interno, indicando que os analitos são eluídos na sequência, padrão interno, BDE-28, BDE-47, BDE-100, BDE-99, BDE-154 e BDE-153.

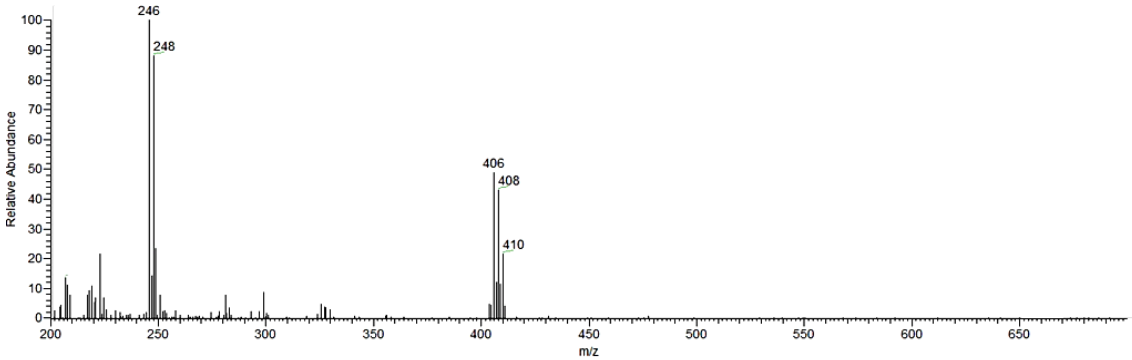


Figura 4: Espectro de massas do 2,4,4'- éter tribromodifenil (BDE-28).

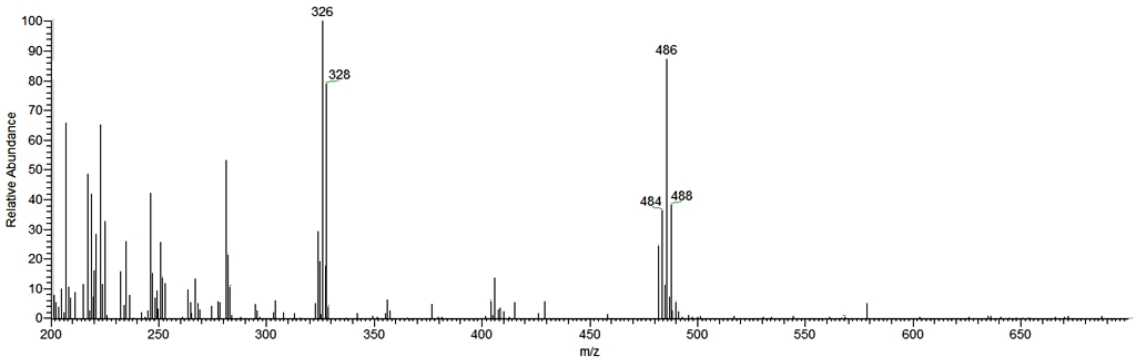


Figura 5: Espectro de massas do 2,2',4,4'- éter tetrabromodifenil (BDE-47).

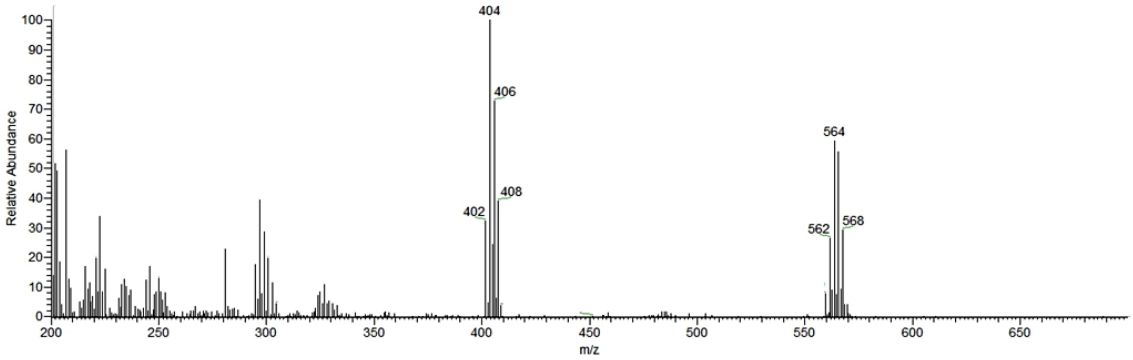


Figura 6: Espectro de massas do 2,2’,4,4’,6- éter pentabromodifenil (BDE-100).

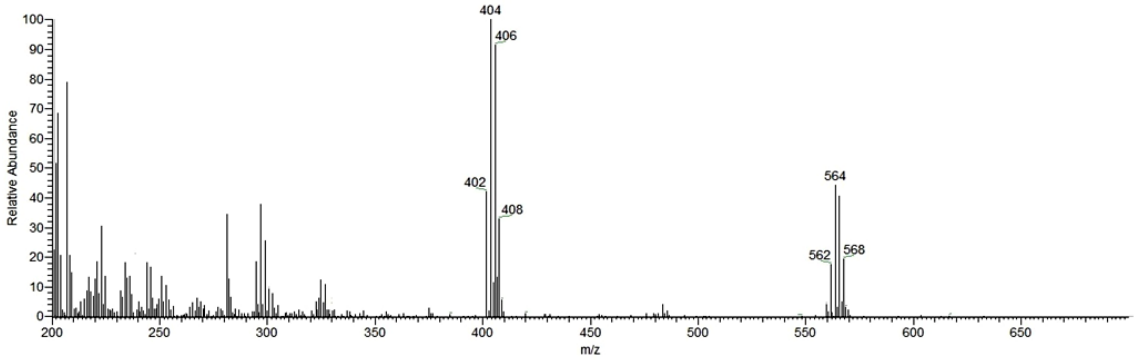


Figura 7: Espectro de massas do 2,2’,4,4’,5- éter pentabromodifenil (BDE-99).

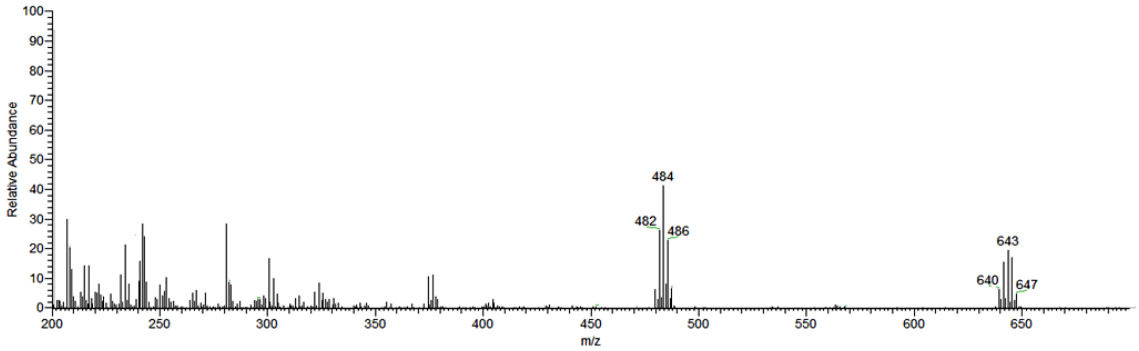


Figura 8: Espectro de massas do 2,2’,4,4’,5,6’- éter hexabromodifenil (BDE-154)

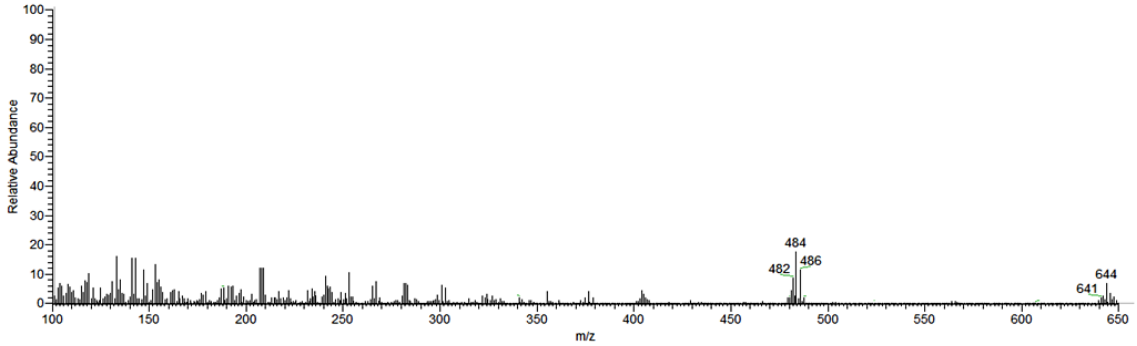


Figura 9: Espectro de massas do 2,2’,4, 4’,5,5’- éter hexabromodifenil (BDE-153).

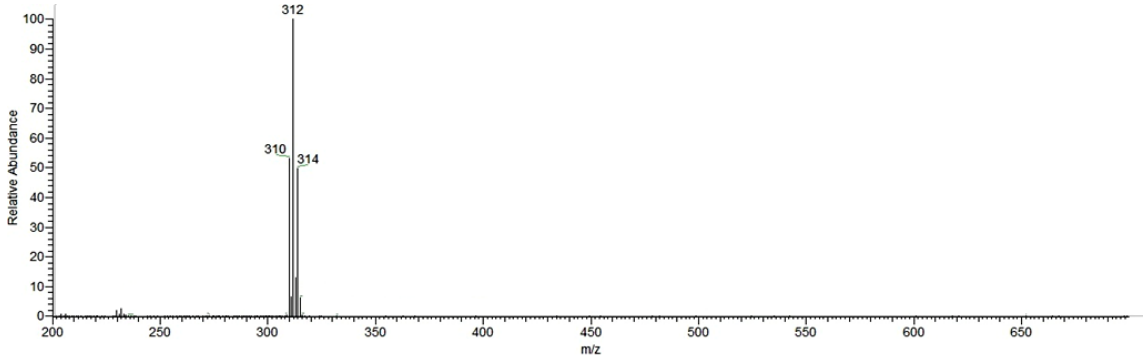


Figura 10: Espectro de massas do padrão interno (4,4’-dibromodifenil).

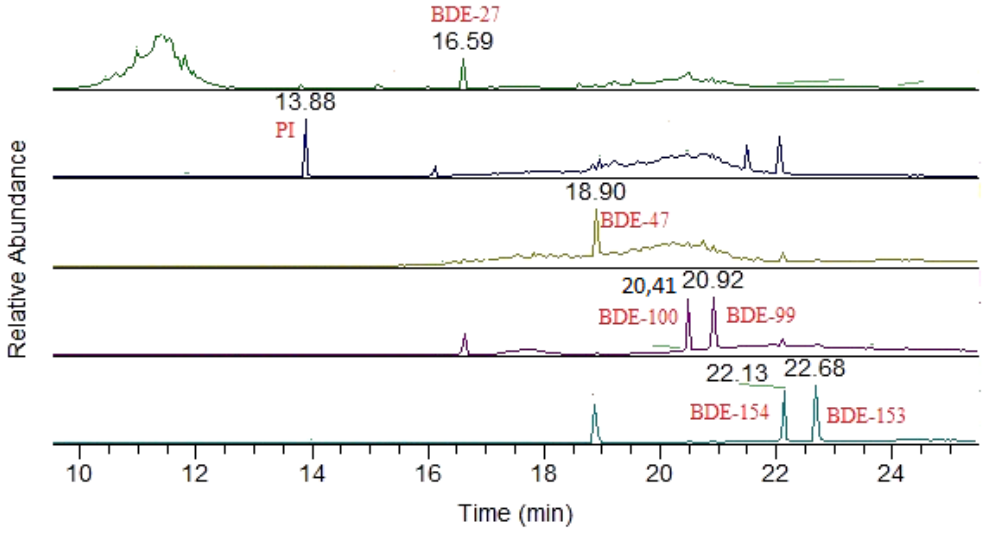


Figura 11: Cromatograma obtido a partir da análise de amostra de ovo fortificada com padrões na concentração de 75 ng de cada PBDE/g lipídio e padrão interno na concentração de 70 ng/g lipídeo. Condições instrumentais descritas no item 3.2.

4.2 Estudo I: Avaliação da presença de PBDEs em amostras de ovos

4.2.1 Desenvolvimento e otimização das condições do método de preparo de amostra empregando microextração em sorvente empacotado

Para serem consideradas amostras “branco” e utilizadas nas etapas de desenvolvimento e validação do método de extração, esses ovos foram previamente analisados, utilizando o método descrito no item 3.4. Durante as análises não foram detectados nenhum congênere de PBDE e padrão interno nas amostras branco utilizadas.

Devido à perda de água durante o processo de liofilização, uma massa de 250 mg de amostra liofilizada corresponde a 1000 mg (1 g) de amostra fresca, indicando um teor de 75% de água. Dessa forma, 50 mg de amostra, utilizadas no processo de extração, correspondem a 200 mg de amostra fresca.

Testaram-se diferentes solventes como eluente na etapa de MEPS, tais como o clorofórmio, diclorometano, hexano e isooctano. O isooctano (trimetil-pentano) foi o solvente de escolha no método desenvolvido para amostras de ovos devido ao melhor perfil da linha de base obtido durantes as análises no GC-MS. Os outros solventes testados apresentaram maior quantidade de ruído e maior instabilidade da linha de base. Inicialmente, foram utilizadas as unidades das concentrações em ng/g de amostra fresca. Os dados de massas da amostra liofilizada e fresca foram considerados para os cálculos de conversão de unidades para posterior expressão dos resultados finais do estudo em ng de PBDEs/g de lipídios, após a determinação da porcentagem lipídica de todas as amostras, incluindo a branca. A escolha da unidade foi de acordo com outros estudos da literatura que também quantificaram PBDEs em amostras de ovos.

Durante a etapa de otimização do método de extração, as condições iniciais utilizadas foram baseadas no estudo descrito por Salami e Queiroz (2011), que

quantificaram sulfonaminas em amostras de ovo empregando MEPS como método de extração, e nas condições descritas por Hu e Hu (2014), que determinaram as concentrações de PBDEs em amostras de ovos por ELL e *clean up* com ácido sulfúrico concentrado.

Inicialmente utilizou-se apenas a acetonitrila e hexano, em testes separados, como solventes extratores. No entanto, as amostras de ovos apresentam grande conteúdo lipídico, levando a interferência da matriz na análise por GC-MS. Em teste subsequente, o hexano foi utilizado como solvente extrator e uma etapa adicional de *clean up* com ácido sulfúrico concentrado foi adicionada. O ácido promove a remoção do conteúdo lipídico da amostra, facilitando a análise e quantificação dos analitos de interesse devido à redução do efeito matriz (Hu e Hu, 2014).

A MEPS foi empregada ao resíduo reconstituído em acetonitrila, visando à extração e pré-concentração dos analitos, e um *clean up* adicional da matriz. As etapas do MEPS (figura 12) incluem condicionamento da fase extratora, aspiração e dispensação da amostra, eluição dos analitos com solvente compatível com o sistema analítico de detecção e limpeza dos cartuchos, para diminuir os efeitos de *carryover*, também denominado de efeito memória, e favorecer a reutilização da coluna.

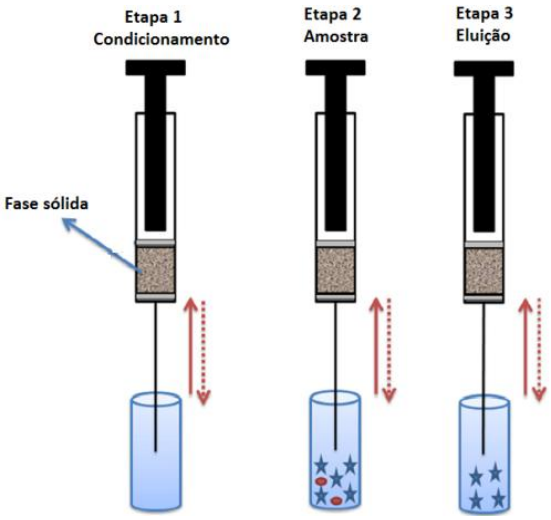


Figura 12: Figura demonstrativa das etapas da microextração em sorvente empacotado (MEPS).

As extrações utilizando microtécnicas são baseadas em equilíbrio, dessa forma a MEPS possui diversas variáveis que devem ser consideradas durante o estudo. O tipo de solvente para reconstituição do resíduo, os ciclos de aspiração e dispensação da amostra, as velocidades utilizadas durante cada etapa, tipo e volume do eluente são alguns parâmetros que devem ser considerados no desenvolvimento do método. Durante a otimização das condições da MEPS, foram testados os parâmetros descritos na Tabela 3, juntamente com suas variáveis.

Tabela 3 – Variáveis da MEPS testadas durante a otimização das condições de extração

Variáveis MEPS	
Solvente para reconstituição do resíduo	Metanol Acetonitrila
Ciclos de aspiração/dispensação da amostra	3 ciclos (300 µL) 4 ciclos (400 µL) 5 ciclos (500 µL)
Velocidade de aspiração	30 µL/segundo 20 µL/segundo
Solvente de eluição	Clorofórmio Diclorometano Hexano Isooctano
Volume do eluente	1 ciclo (100 µL) 2 ciclos (200 µL) 3 ciclos (300 µL)

Para obter a melhor condição para etapa da MEPS avaliou-se os resultados de acordo com a recuperação obtida durante as análises por GC-MS, comparando os sinais analíticos gerados pela matriz extraída com os sinais obtidos com análise de padrões em solvente. Diante do exposto, a melhor condição observada foi utilizando:

• Acetonitrila como solvente para reconstituição do resíduo (etapa de pré-preparo das amostras). A acetonitrila foi suficiente para remoção de quantidade significativa do resíduo de PBDE e padrão interno retidos no tubo de polipropileno.

• 4 ciclos de aspiração e dispensação da amostra, utilizando 400 µL dos 500 µL contidos no tubo. 300 µL não foram suficientes e a aspiração do volume total criava

bolhas de ar na seringa de MEPS, dificultando a interação do analito com a fase estacionária (C18).

• A velocidade de 20 µL/segundo foi utilizada devido a melhor interação dos PBDEs com a fase de C18, em comparação com a velocidade de 30 µL/segundo.

• Isooctano como eluente, devido ao melhor perfil da linha de base durante a análise por GC-MS.

• Eluição por 2 ciclos, utilizando o total de 200 µL de isooctano. Com a utilização de 1 ciclo de eluição (100 µL) observou-se a ocorrência de *carryover*, após a análise, em GC-MS, dos 100 µL subsequentes.

4.2.2 Determinação da porcentagem lipídica nas amostras de ovos

A porcentagem lipídica foi determinada para cada amostra analisada, e a média foi de 54,2 % ± 8,6, baseada método *AOAC Offical Method 923.07 Lipid and Lipid Phosphorus in Eggs,* com modificações necessárias.

4.2.3 Validação analítica

É importante salientar que para os PBDEs ainda não há descrito na literatura valores de limite máximo de resíduo (LMR) em alimentos para ser considerado dentro dos parâmetros analíticos da validação recomendados pelo MAPA. Dessa forma, optou-se por não determinar os parâmetros de limite de decisão (CCα) e capacidade de detecção (CCβ), os quais dependem do valor de LMR para serem calculados.

A partir da análise estatística da regressão linear dos mínimos quadrados foi possível afirmar que os métodos desenvolvidos possuem excelente correlação entre concentração e resposta, visto que os valores obtidos para coeficiente de correlação (*r*) foram maiores que 0,98. O MAPA não especifica qual valor de *r* é aceitável para estudo

de linearidade, sendo assim foi tomado como base o valor 0,98 definido pela ANVISA por meio da Resolução nº 27, de 17 de maio de 2012, guia de validação para métodos bioanalíticos. As curvas analíticas para os seis congêneres de PBDEs estão mostradas na figura 13, e cada ponto de cada curva foi obtido em triplicada.

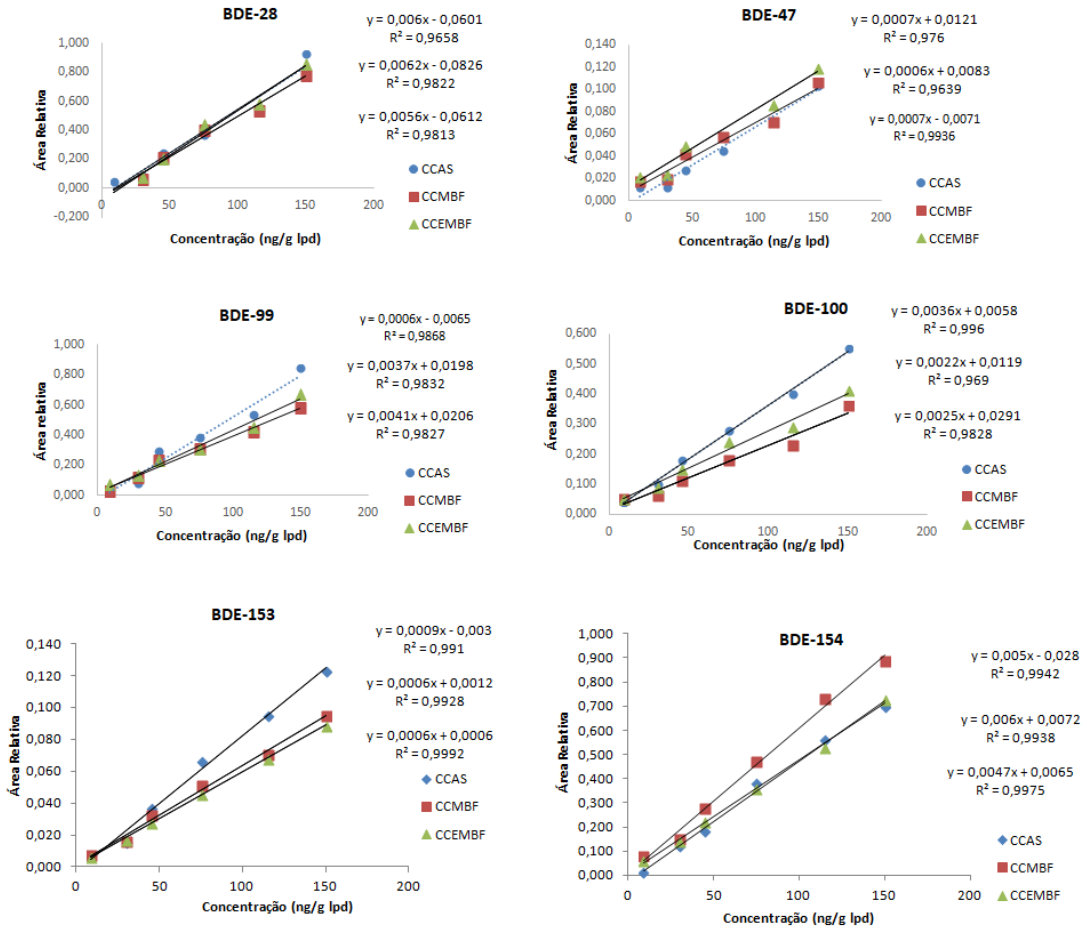


Figura 13: Curvas analíticas CCAS, CCMBF e CCEMBF para os seis congêneres de PBDEs na faixa de concentração de 1,40 a 150 ng de cada PBDE/g lipídio.

A seletividade foi avaliada pela análise de seis amostras branco (ovo orgânico), matriz com ausência dos analitos de interesse, e pela análise de seis amostras zero, que consiste em matriz ausente de PBDE, mas com adição de padrão interno, e também por

meio de comparação entre as inclinações das curvas CCAS e CCEMBF, no teste de efeito matriz. Os cromatogramas da amostra branco e da amostra zero estão indicados na figura 14.

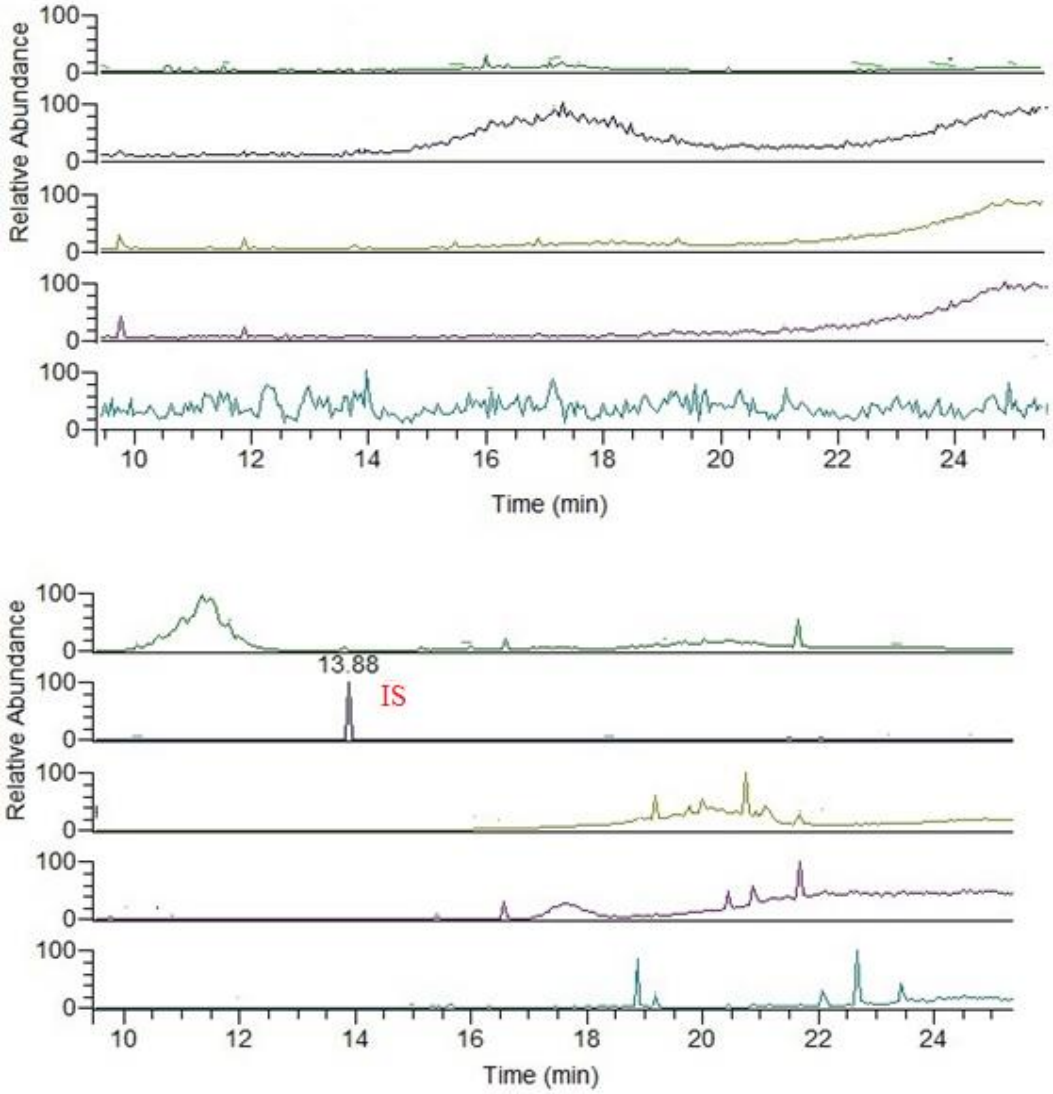


Figura 14: Cromatograma obtido a partir da análise de amostra branco de ovo e amostras branco com padrão interno (amostra zero) na concentração de 70 ng/g lipídio.

Por meio da comparação entre as inclinações das curvas CCAS e da CCEMBF dos congêneres BDE-28, BDE-47, BDE-100 e BDE-99, pode-se observar ausência de

efeito matriz devido à proximidade entre elas, o que demonstra pouca perda nos processos de extração. Há uma pequena diferença entre as curvas dos congêneres BDE-154 e BDE-153, observando uma pequena interferência da matriz na quantificação desses analitos.

Os coeficientes de variação (CV) dos fatores de matriz normalizados (FMNs) relativos a todas as amostras analisadas foram inferiores a 15 % (Tabela 4), indicando ausência de efeito matriz no método proposto.

Tabela 4 – Efeito matriz para os congêneres de PBDEs em 4 diferentes lotes de ovos brancos.

Efeito Matriz - CV (%)	
BDE-28	13,2
BDE-47	3,98
BDE-99	7,41
BDE-100	8,38
BDE-153	14,7
BDE-154	9,29

CV (%) = Desvio padrão/média * 100

A recuperação tem por objetivo corrigir o resultado da análise dos erros sistemáticos oriundos dos processos de extração e das perdas advindas de todas as etapas da marcha analítica, realizadas até a leitura da resposta instrumental, tais como *clean up*, diluições ou pré-concentrações, secagens (MAPA/ACS, 2011). Para concentração igual ou maior a 10 ng/g de amostra (ou µg/Kg de amostra), a faixa de recuperação aceita pelo MAPA para valores acima e abaixo de 100% é de -20% a +10%. O método apresentou uma recuperação média de 105,7%, com maior valor para o BDE-153 (109,9 %) e menor valor para o BDE-100 (87,2 %), indicando baixas perdas durante o processo de extração e evaporação, e boa pré-concentração dos analitos na

etapa de MEPS. De acordo com os resultados encontrados, todos os congêneres apresentaram recuperação dentro da faixa estipulada pelo MAPA.

O limite de detecção do método (LD) corresponde à menor concentração do analito que pode ser detectada considerando as condições experimentais estabelecidas. O valor de LD calculado para o método proposto foi de 0,42 ng de cada PBDE/g lipídio. Por outro lado, o limite inferior de quantificação é a menor concentração do analito que pode ser determinada com níveis aceitáveis de precisão e exatidão. Para certificar que o limite de quantificação calculado era a menor concentração quantificada de cada PBDE com CV de até 20% e porcentagem de inexatidão de ± 20%, foram avaliadas 10 amostras branco enriquecidas com padrões de PBDEs na concentração de 1,40 ng de cada PBDE/g lipídio. Valores estão indicados na Tabela 5.

Tabela 5 – Limite inferior de quantificação do método para determinação dos congêneres de PBDEs em amostras de ovos liofilizados (n=10).

LQ (1,40 ng/g lpd)	Precisão - CV (%)	Exatidão - EPR (%)
BDE-28	13,4	-1,42
BDE-47	12,4	0,12
BDE-99	14,7	9,70
BDE-100	2,57	15,7
BDE-153	5,88	8,61
BDE-154	11,5	7,49

CV= coeficiente de variação (desvio padrão/concentração média experimental)*100
EPR= erro padrão relativo (concentração média experimental - valor nominal)/valor nominal * 100

Os coeficientes de variação obtidos nos estudos de precisão e os erros padrão relativos obtidos nos estudos de exatidão intra e inter-corridas, em sextuplicata para cada valor de concentração, (Tabela 6a e 6b) foram inferiores a 15%, assegurando a

reprodutibilidade e repetibilidade dos resultados. Desta forma, este trabalho pode ser utilizado como referência para outros estudos que envolvam a determinação de PBDEs em amostras de ovos.

Tabela 6a – Precisão intercorridas e intra-corridas do método de determinação dos congêneres de PBDEs em amostras de ovos liofilizados (n=6 para cada controle de qualidade).

Precisão - CV (%)	BDE-28	BDE-47	BDE-99	BDE-100	BDE-153	BDE-154
Intra CQB	8,77	7,25	13,8	8,80	13,1	12,5
CQM	8,04	8,89	14,1	13,9	9,52	10,2
CQA	5,35	9,38	10,7	13,7	7,09	8,90
Inter CQB	8,66	5,07	12,6	4,44	13,9	11,3
CQM	2,78	5,67	7,63	9,35	6,14	4,16
CQA	5,33	5,58	5,68	5,91	4,14	4,41

Tabela 6b – Exatidão intercorridas e intra-corridas do método de determinação dos congêneres de PBDEs em amostras de ovos liofilizados (n=6 para cada controle de qualidade).

Exatidão - EPR (%)	BDE-28	BDE-47	BDE-99	BDE-100	BDE-153	BDE-154
Intra CQB	14,9	3,80	10,4	9,43	7,95	9,57
CQM	5,78	-1,19	11,2	6,20	9,76	6,79
CQA	4,15	-2,06	4,41	6,46	3,62	2,63
Inter CQB	11,8	3,46	3,56	2,21	-1,03	3,10
CQM	-2,10	-6,15	4,79	-1,83	13,0	10,4
CQA	3,95	-0,04	9,45	12,1	-0,35	-1,53

O método desenvolvido e validado para determinação sequencial dos congêneres de PBDEs em amostras de ovos está de acordo com as diretrizes estabelecidas pelo MAPA (Instrução Normativa nº 16 de 17 de maio de 2013).

O método analítico empregando MEPS mostrou-se mais rápido, simples e consumiu menor quantidade de solvente que as técnicas de preparo de amostras clássicas descritas na literatura, tais como extração em fase sólida (SPE), extração líquido-líquido (ELL), Soxhlet, e extração líquido pressurizada (PLE), como demonstrado na tabela 7. Ademais, como outras vantagens, a técnicas de MEPS pode ser empregada tanto para extração dos analitos, quanto para pré-concentração e eficiente *clean up* adicional da matriz.

Tabela 7 – Comparação das características analíticas do método validado para quantificação de PBDEs em amostras de ovos com outros estudos descritos na literatura.

Características analíticas	LD	Amostra	Preparo de amostra	Volume de solvente	*Clean up*	Tempo de análise
Presente estudo	0,42 ng/g lpd[1]	0,05 g	MEPS	4 mL hexano	Ácido sulfúrico + MEPS	5 min (MEPS)
Dirtu (2013)	nd[2]	2,0 g	PLE[3]	Diclorometano: hexano	Nd	40 min
Hu e Hu (2014)	0,8 µg/Kg mf[5]	2,5 g	ELL[4]	25 mL hexano:acetona	Ácido sulfúrico + coluna sílica	1 hour
Covaci (2015)	7,77 ng/g lpd	3,5 g	Soxhlet	100 mL hexano: acetona (3:1)	Sílica acidificada	2 hours
Zeng (2016)	1,8 ng/g lpd	1,0 g	Soxhlet	200 mL hex:acetona	coluna de Florisil silica gel	24 hours

[1] lpd – lipídio; [2] nd – não disponível; [3] PLE – extração liquida pressurizada; [4] ELL – extração líquido-líquido; [5] mf – massa fresca

4.2.4 Aplicação do método analítico em amostras comerciais

O método analítico validado, descrito acima, foi aplicado em 40 amostras comerciais de ovos adquiridos na cidade de Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil. As amostras incluíram 20 ovos convencionais (também denominados de ovos de granja) e 20 ovos caipiras. A concentração do BDE-28 em todas as amostras analisadas foi abaixo do limite de detecção. O BDE-47 apresentou a mais alta porcentagem de detecção e quantificação, correspondendo a 30% do total de amostras analisadas. O BDE-100 e o BDE-153 foram quantificados em 5 amostras. O BDE-99 e o BDE-154 foram mensurados em 2 e 1 amostras, respectivamente. Os resultados estão apresentados na tabela 8, e as concentrações abaixo do LD foram substituídas pelo valor referente ao LD dividido por 2 (0,21 ng/g lipídio).

Tabela 8 – Concentração determinada para cada congênere de PBDE em amostras comerciais de ovos incluindo ovos convencionais e caipiras. Os valores são expressos em ng/g lipídio.

Amostras	BDE-28	BDE-47	BDE-99	BDE-100	BDE-153	BDE-154	$\sum_{PBDE}$
Convencional (média)	0,21*	2,95	1,67	0,21	0,21	8,85	13,67
(Min – Max)	-	0,21 – 9,79	0,21 – 5,73	-	-	0,21 – 22,4	3,13 – 23,8
(Detecção - %)	0	10	2,5	0	0	7,5	-
(Percentil 25 -75)	-	0,21 – 5,22	-	-	-	0,21 – 16,3	6,88 – 21,2
Caipira (média)	0,21	7,48	1,79	5,27	2,65	3,16	20,56
(Min – Max)	0	0,21 – 12,62	0,21 – 6,20	0,21 – 55,86	0,21 – 32,7	0,21 – 15,5	4,43 – 68,4
(Detecção - %)	-	25	2,5	7,5	2,5	5	-
(Percentil 25 -75)		5,18 – 10,8	0,21 – 5,11	4,5 – 4,5	4,5 – 4,7	4,5 – 5,9	9,4 – 19,57

*Valor equivalente ao Limite de Detecção/2

É importante enfatizar que a alta prevalência do BDE-47 nas amostras analisadas pode ser devido ao padrão de substituição dos congêneres, ou seja, o BDE-47 pode resultar da redução da debrominação do BDE-99 e BDE-100, desde que não ocorram rearranjos durante o processo de metabolismo das galinhas. Similarmente, BDE-154 pode gerar o BDE-99 e o BDE-100, e o BDE-153 pode formar o BDE-99, como demonstrado na figura 15 (Pirard and Pauw, 2007).

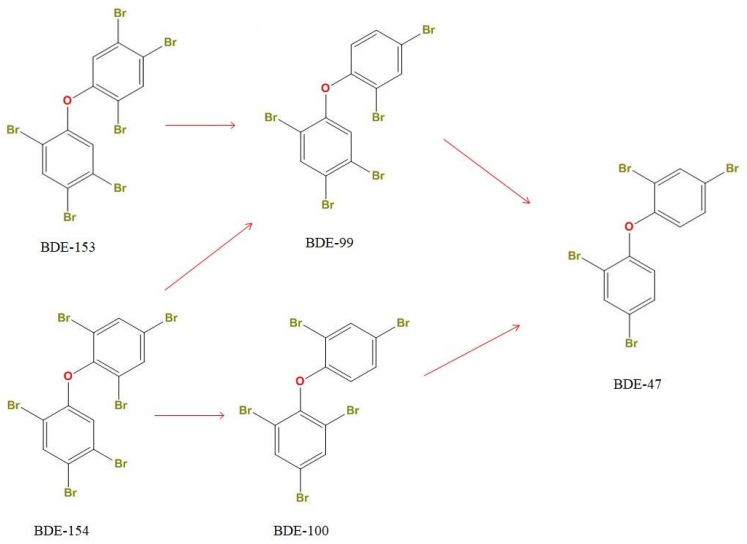


Figura 15: Possíveis vias de debrominação redutiva de congêneres de PBDEs durante o processo de metabolismo das galinhas (adaptado de Pirard e Pauw, 2007).

Alimentos de produção doméstica geralmente não são submetidos a nenhum controle de conformidade, embora sejam consumidos em grande quantidade pelos seus produtores. Portanto, decidiu-se investigar a contaminação de PBDEs em ovos caipiras e comparar a concentração medida com ovos comerciais convencionais. Das 40

amostras analisadas, 17 amostras foram quantificadas com precisão e exatidão, sendo 11 amostras de ovos caipiras (67,7%) e 6 amostras de ovos convencionais (35,3%).

Os ovos apresentam elevada porcentagem de gordura e, portanto, tendem a acumular poluentes orgânicos persistentes, como os PBDEs (Pirard and Pauw, 2007). A determinação da porcentagem lipídica foi maior para os ovos caipiras, com média de 57,5 %, em comparação aos ovos convencionais, com valores médios de 48,09 %. Quanto maior a porcentagem lipídica do alimento, maior a probabilidade de acúmulo de POPs.

Retardantes de chama bromados, como os PBDEs, podem atingir o meio ambiente através de lixiviação durante os processos de produção e aplicação, através da volatilização e perdas de particulados durante o uso e descarte. Desta forma, o solo pode ser considerado uma fonte importante de PBDEs para ovos de produção doméstica, com destaque ao BDE-47 por ser altamente bioacumulativo e persistente (Covaci et al., 2009). Ovos caipira são potencialmente mais contaminados que outros tipos de ovos devido ao intenso contato das galinhas com o ambiente. As pessoas que consomem principalmente alimentos/ovos de produção doméstica podem pertencer a um grupo sensível da população em termos de exposição a contaminantes ambientais, e as investigações para a sua exposição a esses contaminantes são muito limitadas (Van Orvermeire et al., 2009).

Este estudo mostrou maiores valores tanto para valor individual do BDE-47 quanto para a somatória de todos os congêneres avaliados, em comparação com outros estudos da literatura em outros paises. Os ovos convencionais mostraram uma concentração média para o BDE-47 de 2,95 ng/g lpd e a somátoria de todos os PBDEs ($\sum_{PBDEs}$) (28, 47, 99, 100, 153, 154) foi de 13,67 ng/g lpd. Os ovos caipiras mostraram valores de 7,48 ng/g lpd e 20,56 ng/g lpd para o BDE-47 e $\sum_{PBDEs}$, respectivamente. As

concentrações quantificadas de PBDEs nas amostras de ovos convencionais e caipiras não apresentaram diferença estatisticamente significativa, com $p>0,05$ (*RStudio®* *software*).

Na tabela 9 encontram-se os valores para a média da concentração do BDE-47 e para a somátoria de todos os congêneres de PBDEs analisados em cada estudo, incluindo paises europeus e Estados Unidos, ambos com valores na faixa de concentração em ng/g de lipídio.

Tabela 9 – Concentração média determinada para o BDE-47 e para a somatória de todos os congêneres de PBDEs em amostras de ovos em cada estudo, incluindo os dados deste estudo, paises europeus e Estados Unidos, ambos com valores expressos em ng/g lipídio.

País	BDE-47	$\sum_{PBDEs}$	Congêneres	Referência
Presente estudo	5,88 [a]	18,13 [b]	28, 47, 99, 100, 153, 154	-
Bélgica	0,27	1,41	28, 47, 66, 85, 99, 100, 153, 154, 183	Covaci et al., 2009
Espanha	n.d.[c]	0,53	47, 99, 153, 154, 183	Bocio et al., 2003
Suécia	0,14	0,41	47, 99, 100, 153, 154	Darnerud et al., 2006
Alemanha	0,6	2,3	47, 99, 100, 153, 154, 183	Tritscher et al., 2003
Estados Unidos	0,2	0,62	47, 99, 100, 153, 154, 183	Schecter et al., 2008

[a] Média de todas amostras analizadas, incluindo ovos convencionais e caipiras.
[b] Média da somatória de todas amostras analisadas, incluindo ovos convencionais e caipiras.
[c] não disponível

As altas concentrações observadas nas amostras de ovos deste estudo, provenientes de Ribeirão Preto, podem ser devido à ausência de legislação e especificações de uso de PBDEs e outros retardantes de chama bromados no país. O uso indiscriminado e abusivo de contaminantes emergentes, em geral, pode contribuir para alta contaminação ambiental, de alimentos e subsequente contaminação humana. As

menores concentrações encontradas em países da Europa e nos Estados Unidos justifica-se pela proibição da comercialização das formulações penta-BDE e octa-BDE pela União Européia em 2004, e em julho de 2003 a maioria dos estados dos EUA baniram a comercialização dos produtos contendo penta e octa-BDE (Pestana et al., 2008).

4.3 Estudo II: Avaliação da presença de PBDEs em amostras de peixes e frutos do mar

4.3.1 Desenvolvimento e otimização das condições do método de preparo de amostra empregando microextração em sorvente empacotado

Após a liofilização de 1000 mg de peixe fresco (amostra branco) foram obtidos 230 mg de amostra liofilizada, correspondendo a uma perda de, aproximadamente, 77 % de água. No entanto, o valor correspondente à porcentagem de água no peixe é um pouco menor, uma vez que ocorrem perdas de amostras tanto na trituração no processador de alimentos, quanto no processo de liofilização, levando a um resultado de porcentagem maior. Para uma determinação mais exata da porcentagem de água, seria necessária a utilização de liofilizadores mais potentes capazes de liofilizarem pedaços inteiros de amostra, sem prévia trituração.

Os PBDEs por serem compostos altamente lipofílicos e apolares não apresentam uma distribuição no tecido do peixe de forma uniforme. Sendo assim, os processos de pré-preparo das amostras, como a liofilização e a moagem, garantem a homogeneidade necessária para uma representatividade da amostra, permitindo que a quantidade de massa a ser analisada não represente um falso positivo ou falso negativo.

De acordo com o Banco Nacional de Dados de Nutrientes de Referência Padrão (*National Nutrient Database for Standard Reference*) elaborado pelo Serviço de

Pesquisa Agrícola do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (*Agricultural Research Service of United State Department of Agriculture* – USDA) (USDA, 2001), aproximadamente 70% da carne fresca de peixe é composta por água. Assim, para este trabalho foi adotada a porcentagem de água estabelecida pelo USDA, para determinação da proporção de massa fresca e massa liofilizada a serem utilizadas em estudos comparativos. Dessa forma, 100 mg de amostra, utilizadas no processo de extração, correspondem a aproximadamente 333 mg de amostra fresca.

Visando à redução ainda maior do volume de solvente extrator (hexano), utilizou-se menor volume nessa etapa inicial. As amostras de peixe apresentaram menor interferência da matriz na análise por GC-MS, em comparação com as amostras de ovos, possibilitando o uso de 100 mg para as análises.

Os parâmetros e variáveis testadas para essa metodologia foram semelhantes aos testados para as amostras de ovos. O diclorometano e a acetonitrila foram testados como solventes para reconstituição do resíduo seco, e o diclorometano foi o solvente de escolha devido a maior afinidade com os analitos em estudo. Quatro ciclos de aspiração e dispensação da amostra, utilizando 400 µL, do total de 500 µL contidos no tubo, foram suficientes para retenção adequada dos analitos no cartucho de C18, assim como a velocidade de 20 µL/segundo no dispositivo eVolt® XR. O hexano foi o solvente de escolha para eluição dos PBDEs e PI, devido ao melhor perfil da linha de base durante a análise por GC-MS. Eluiu-se por 2 ciclos, utilizando o total de 200 µL de hexano, não observando a ocorrência de *carryover* durante as análises.

A possibilidade de reutilização do cartucho de C18 por cerca de 80 extrações é uma potencial vantagem observada na técnica de MEPS em relação aos métodos convencionais de extração, como a SPE. Observou-se que após aproximadamente 80 experimentos utilizando o mesmo cartucho, a recuperação dos analitos e a qualidade da

extração diminuíram em relação à eliminação de interferentes e ao perfil da linha de base na análise instrumental, sendo, portanto, necessário trocar cartucho para a realização das próximas extrações.

4.3.2 Validação analítica

O coeficiente de correlação (*r*) foi calculado a partir da CCAS, CCMBF e da CCEMBF, na faixa de concentração de 0,92 - 2 - 7 – 14 – 35 – 50 – 70 - 100 ng de cada PBDE/g amostra de peixe fresco. A partir da análise estatística da regressão linear dos mínimos quadrados foi possível afirmar que os métodos desenvolvidos possuem excelente correlação entre concentração e resposta, visto que os valores obtidos para coeficiente de correlação (*r*) foram maiores que 0,98. As curvas analíticas para os seis congêneres de PBDEs estão demonstradas na figura 16, e cada ponto de cada curva foi obtido em triplicada.

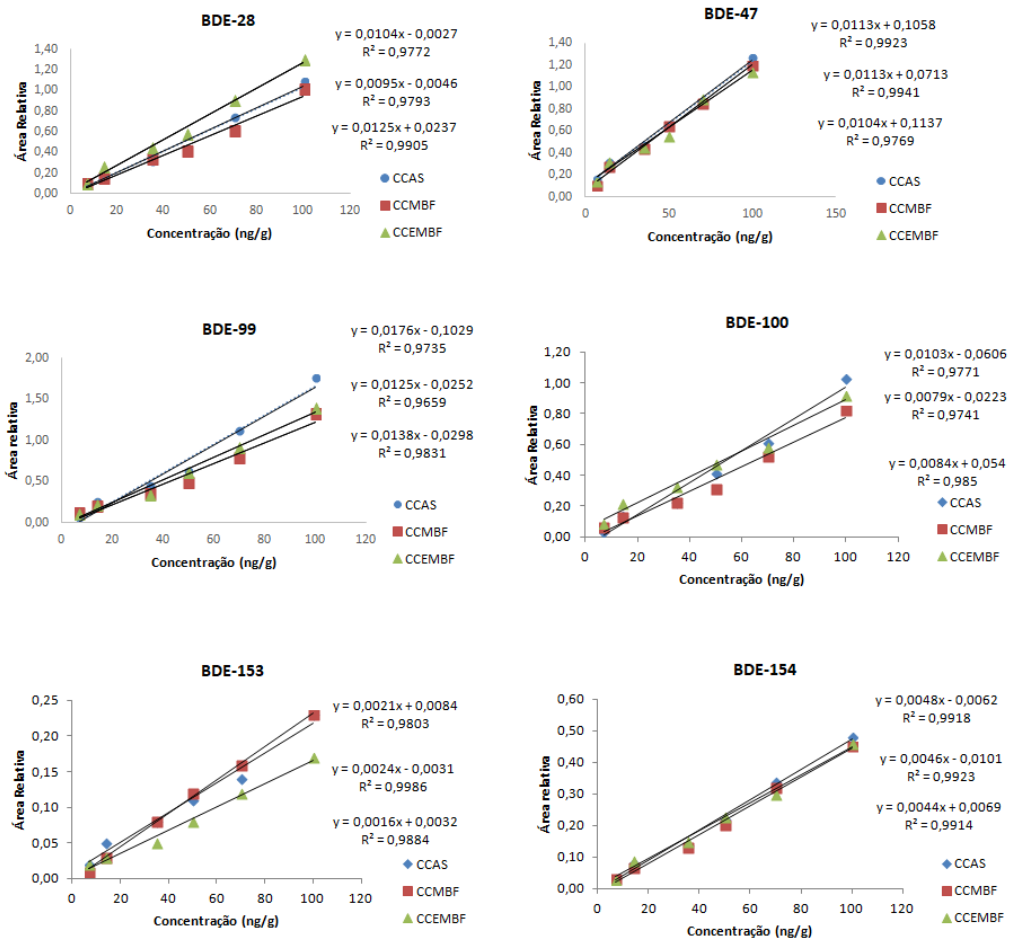


Figura 16: Curvas analíticas CCAS, CCMBF e CCEMBF para seis congêneres de PBDEs na faixa de concentração de 0,92 a 100 ng de cada PBDE/g de amostra fresca.

Para o teste de seletividade, os cromatogramas da amostra branco e da amostra zero estão indicados na figura 17.

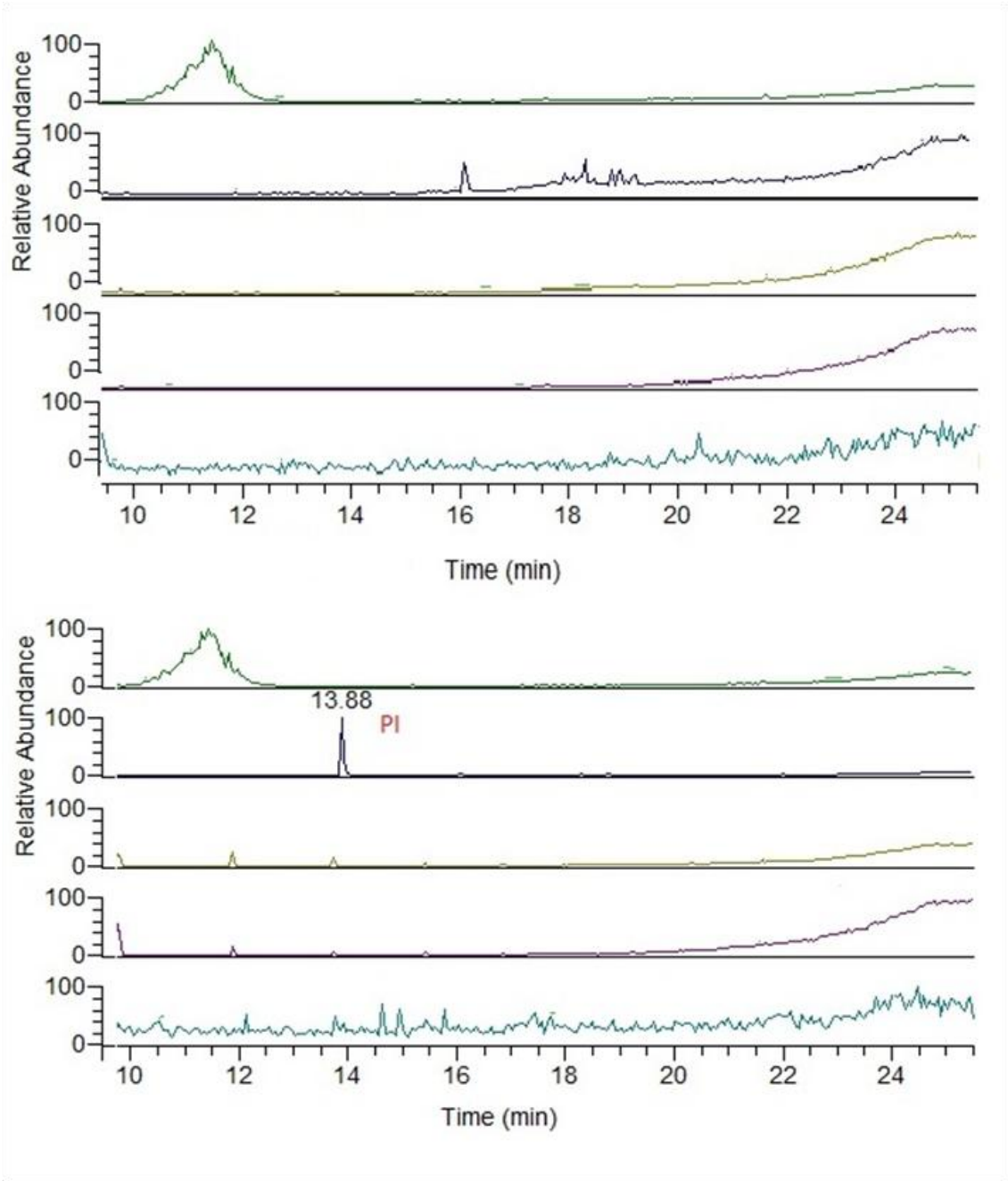


Figura 17: Cromatograma obtido a partir da análise de amostra branco de peixe e amostras branco com padrão interno (amostra zero) na concentração de 70 ng/g amostra fresca.

Por meio da comparação entre as inclinações das curvas CCAS e da CCEMBF de todos congêneres de PBDEs não se observa efeito matriz devido à proximidade entre elas, o que demonstra pouca perda nos processos de extração. Os CVs dos FMNs

relativos a todas as amostras analisadas foram inferiores a 15 % (Tabela 10), indicando ausência de efeito matriz no método proposto.

Tabela 10 – Efeito matriz para os congêneres de PBDEs em 4 diferentes lotes de peixe.

Efeito Matriz - CV (%)	
BDE-28	11,08
BDE-47	7,83
BDE-99	8,45
BDE-100	7,35
BDE-153	12,78
BDE-154	9,36

O método apresentou uma recuperação média de 101,8%, com maior valor para o BDE-28 (106,7 %) e menor valor para o BDE-99 (87,3 %), indicando baixas perdas durante o processo de extração e evaporação, e boa pré-concentração dos analitos na etapa de MEPS. De acordo com os resultados encontrados, todos os congêneres apresentaram recuperação dentro da faixa estipulada pelo MAPA.

O valor de LD calculado para o método proposto foi de 0,27 ng de cada PBDE/g de amostra fresca. A avaliação das 10 amostras enriquecidas com padrões de PBDEs na concentração de 0,92 ng de cada PBDE/g de amostra fresca está indicada na Tabela 11.

Tabela 11 – Limite inferior de quantificação do método para a determinação dos congêneres de PBDEs em amostras de peixes liofilizados (n=10).

LQ (0,92 ng/g de amostra)	**Precisão -** CV (%)	**Exatidão -** EPR (%)
BDE-28	13,8	1,50
BDE-47	11,5	-5,71
BDE-99	10,9	7,45
BDE-100	13,7	5,00
BDE-153	12,5	-3,42
BDE-154	13,8	8,34

Os coeficientes de variação obtidos nos estudos de precisão e os erros padrão relativos obtidos nos estudos de exatidão intra e inter-corridas (Tabela 12a e 12b) foram inferiores a 15%, assegurando a reprodutibilidade e repetibilidade dos resultados, podendo assim, ser utilizado como um trabalho de referência para outros estudos que envolvam a análise de PBDEs em amostras de peixes.

Tabela 12a – Precisão intercorridas e intra-corridas do método para a derminação dos congêneres de PBDEs em amostras de peixes liofilizados (n=6 para cada controle de qualidade).

Precisão - CV (%)	**BDE-28**	**BDE-47**	**BDE-100**	**BDE-99**	**BDE-154**	**BDE-153**
Intra CQB	4,98	2,19	0,28	0,18	3,42	1,24
CQM	0,22	3,00	1,36	1,37	3,82	1,70
CQA	5,99	3,63	0,59	0,15	0,74	2,36
Inter CQB	10,5	10,4	3,92	6,98	7,78	5,70
CQM	12,7	11,3	5,16	8,29	6,04	6,89
CQA	13,4	7,38	4,93	4,06	5,62	2,63

Tabela 12b – Exatidão intercorridas e intra-corridas do método para a determinação dos congêneres de PBDEs em amostras de peixes liofilizados (n=6 para cada controle de qualidade).

Exatidão - EPR (%)	**BDE-28**	**BDE-47**	**BDE-100**	**BDE-99**	**BDE-153**	**BDE-154**
Intra CQB	-6,60	6,12	1,66	-1,21	-3,67	-2,09
CQM	-7,64	-7,75	-0,02	-2,53	1,03	0,61
CQA	-8,66	8,75	6,75	5,62	-2,83	0,57
Inter CQB	-3,27	-4,11	-1,34	11,4	-2,87	-1,61
CQM	-4,94	7,5	1,89	2,00	0,41	2,73
CQA	7,42	11,9	6,73	8,29	1,77	1,84

O método desenvolvido e validado para determinação dos congêneres de PBDEs em amostras de peixes está de acordo com as diretrizes estabelecidas pelo MAPA (Instrução Normativa nº 16 de 17 de maio de 2013). O método analítico empregando MEPS mostrou-se fácil, rápido, eficiente, e com menor consumo de solvente comparado às técnicas de preparo de amostras convencionais descritas na literatura para extração de PBDEs em amostras de peixe, principalmente o Soxhlet e a extração líquido pressurizada (PLE), como demonstrado na tabela 13. Além da extração dos analitos, similarmente a extração em fase sólida, é importante destacar as etapas de pré-concentração e *clean up* da matriz da microextração em sorvente empacotado.

Tabela 13 – Comparação dos parâmetros analíticos de destaque do método validado para quantificação de PBDEs em amostras de peixes com outros estudos descritos na literatura.

Características analíticas	LD	Amostra	Preparo de amostra	Volume de solvente	*Clean up*	Tempo de análise
Presente estudo	0,27 ng/g	0,1 g	MEPS	Hexano 2 mL	Ácido sulfúrico + MEPS	15 min
Peng (2007)	0,08 ng/g	20 a 50 g	Soxlet	Diclorometano: hexano 40mL	Sílica gel acidificada + $NaSO_4$ anidro	24 h
Szlinder-Richert (2010)	nd[1]	Nd	Soxlet	hexano:acetona (3:1)	Sílica, albumina e carbono ativado	6 h
Lavandier (2013)	2 ng/mL	1,0 g	ELL[2]	20 mL hexano	Saponificação + ácido sulfúrico	2 h
Zhou (2016)	Nd	2,0 g	Soxhlet	hexano: acetona	Ácido súlfurico + Sílica gel ativada	24 h
Gandhi (2017)	Nd	3,0 g	PLE[3]	Diclorometano: hexano	Coluna de albumina	3 h

[1]nd – não disponível
[2]PLE – extração liquida pressurizada
[3]ELL – extração líquido-líquido

Os princípios da química verde e a manutenção da qualidade ambiental para o desenvolvimento de metodologias têm ganhado atenção na química analítica nos últimos anos. Abordagens para menor consumo de solvente e extração acelerada, como as metodologias de preparo de amostras miniaturizadas e as estratégias propostas para redução do consumo de solventes orgânicos, podem reduzir riscos para saúde humana e ambiental (Berton et al., 2016).

Diante do contexto, o desenvolvimento de metodologia empregando microextração em sorvente empacotado permite a quantificação de poluentes orgânicos persistentes em amostras biológicas, incluindo alimentos, ambientais e humanas, e

enquadrando-se dentro dos parâmetros e critérios de aceitação da química verde. Ademais, proporcionam uma pré-concentração ideal dos analitos e um *clean up* adequado da matriz, tornando-a compatível com a instrumentação analítica.

4.3.3 Aplicação do método analítico em amostras comerciais

Pouco é conhecido a cerca das concentrações de retardantes de chamas bromados no hemisfério Sul do planeta, e os dados dos níveis PBDEs nas amostras brasileiras ainda são escassos. Esses compostos são facilmente transportados pela atmosfera, são capazes de bioacumular em tecidos gordurosos, biomagnificar na cadeia alimentar aquática, e são resistentes à degradação. Diante do contexto, os peixes e frutos do mar são importantes fontes de exposição de PBDEs para o homem, e quanto maior o teor lipídico da espécie maior a probabilidade de acúmulo desses poluentes lipofílicos (Lavandier et al., 2013).

O método analítico validado, descrito acima, foi aplicado em 40 amostras comerciais de peixes e frutos do mar, obtidos do mercado nacional, de acordo com a disponibilidade. As amostras selecionadas foram 22 amostras de diferentes espécies de peixes, incluindo cambucu (espécie de pescada), salmão, corvina, meca, pintado, sardinha nones, sardinha nacional, tambaqui, truta, cação, atum e tilápia. E também 18 amostras de frutos do mar, incluindo polvo, camarão de diferentes tamanhos, marisco, lula e lagosta.

Todas as amostras de peixes analisadas no estudo apresentaram pelo menos um congênere de PBDE quantificado com precisão e exatidão, ou seja, com valores de concentração acima do limite de quantificação. Os congêneres de PBDEs foram quantificados em 10 amostras de frutos do mar, com valores acima do limite de detecção.

A média da somatória de PBDEs das 40 amostras analisadas foi de 25,9 ng/g amostra fresca, indicando grande prevalência desse poluente orgânico persistente em peixes e frutos do mar. O BDE-28 apresentou 45% de detecção, correspondendo a 18 amostras com valores acima do limite de detecção. O BDE-47 apresentou alta porcentagem de quantificação, correspondendo a 58% das amostras e o BDE-100 foi determinado em 55% delas. A concentração do BDE-99 em todas as amostras analisadas foi abaixo do limite de detecção. O BDE-153 também mostrou significativa porcentagem de detecção e quantificação, correspondendo a 48% do total de amostras analisadas. E o BDE-154 foi mensurado em 33% das amostras analisadas. Os resultados estão descritos na tabela 14, e as concentrações abaixo do LD foram substituídas por valor igual ao LD dividido por 2 (0,13 ng/g amostra fresca).

Tabela 14 – Concentração quantificada para cada congênere de PBDE em amostras comerciais de peixes e frutos do mar. Os valores são expressos em ng/g amostra fresca.

Amostras	BDE-28	BDE-47	BDE-99	BDE-100	BDE-153	BDE-154	$\sum_{PBDE}$
Peixe (média)	7,60	1,94	0,13*	1,68	9,88	5,18	26,43
(Min – Max)	0,13 – 17,44	1,02 – 6,85	-	0,13 – 4,62	1,21 – 17,84	0,13 – 14,36	13,2 – 40,8
(Detecção - %)	60	78	0	78	55	37	-
(Percentil 25 -75)	1,26 – 8,31	1,02 – 3,43	-	1,20 – 2,60	7,72 – 14,43	0,13 – 10,43	21,9 – 33,8
Frutos do mar (média)	4,48	1,08	0,13	1,26	12,03	7,11	25,61
(Min – Max)	0,13 – 24,96	1,32 – 2,37	-	0,13 – 2,77	1,53 – 39,77	0,13 – 17,30	2,06 – 57,7
(Detecção - %)	28	34	0	28	34	39	-
(Percentil 25 -75)	1 – 2,27	1,32 – 1,88	-	0,13 – 1,25	1,53 – 12,16	0,13 – 10,17	17,2 – 35,1

*Valor equivalente ao Limite de Detecção/2

Outros estudos realizados na costa brasileira encontrados na literatura científica descrevem uma maior prevalência da quantificação dos BDEs-47, -85, -99, -100, e -154, sugerindo o possível predomínio no uso de formulações penta. Não existe legislação no país que proíbe o uso de materiais contendo PBDEs. Existe um projeto, que ainda está em análise pelo governo brasileiro, que cita que produtos contendo PBDEs (importados ou produzidos no país) deveriam ter concentrações menores que 0,1% m/m. Esses produtos incluiriam apenas computadores e seus acessórios e componentes. Ademais, o uso contínuo desses compostos, disposição errônea de equipamentos eletroeletrônicos e as perdas por volatilização em produtos contendo esses compostos, proporcionam o aumento dos níveis de PBDEs no ambiente (Lavandier et al., 2013). Dessa forma, os valores determinados nas amostras brasileiras foram maiores que aqueles encontrados em outros países, como descrito na tabela 15.

Tabela 15: Concentração média determinada para o BDE-47 e para a somatória de todos os congêneres de PBDEs em amostras de peixes e frutos em diferentes estudos da literatura, ambos com valores expressos em ng/g amostra fresca.

País	**Amostra**	**BDE-47**	**∑PBDE**	**Congeneres**	**Referência**
Presente estudo	Peixe	1,94	26,43	28, 47, 99, 100, 153, 154	-
	Frutos do mar	1,08	25,61		
Estados Unidos	Peixe	n.d	3,4	43 BDE congeners	Staskal et al., 2008
Reino Unido	Peixe	n.d	0,09 – 8,9	17 BDE congeners	Zhihua et al., 2018
Hong Kong – China	Peixe	n.d	1,9 - 16	22 BDE congeners	Wang et al., 2011
Grandes Lagos – Canadá	Peixe	<1-300	1-390	14 BDE congeners	Gandhi et al., 2017
Mar Báltico	Peixe/Salmão	1,6	2,5	28, 47, 99, 100, 153, 154, 183	Szlinder-Richert et al., 2010
Itália	Peixe	0,18	0,52	22 BDE congeners	Martellini et al., 2016
	Molusco	0,04	0,49		

4.4 Estudo III: Avaliação da presença de PBDEs em amostras de leite

4.4.1 Desenvolvimento e otimização das condições do método de preparo de amostra empregando microextração em sorvente empacotado

No método analítico desenvolvido para determinação de PBDEs em amostras de leite, o congênere 2,2',3,4,4',5,6' hepta-dibromodifenil éter (BDE-183), representante da formulação octa-BDE, foi adicionado em vista da alta prevalência nas amostras. Diante disso, alguns parâmetros instrumentais foram alterados para melhor performance analítica, como a rampa de aquecimento do forno da coluna cromatográfica, e o canal do BDE-183 para monitorização do íon selecionado (SIM) para a aquisição dos dados no espectrômetro de massas. Na figura 18 está o cromatograma após a adição do BDE-183 na metodologia, indicando o tempo de retenção de 24,57 minutos.

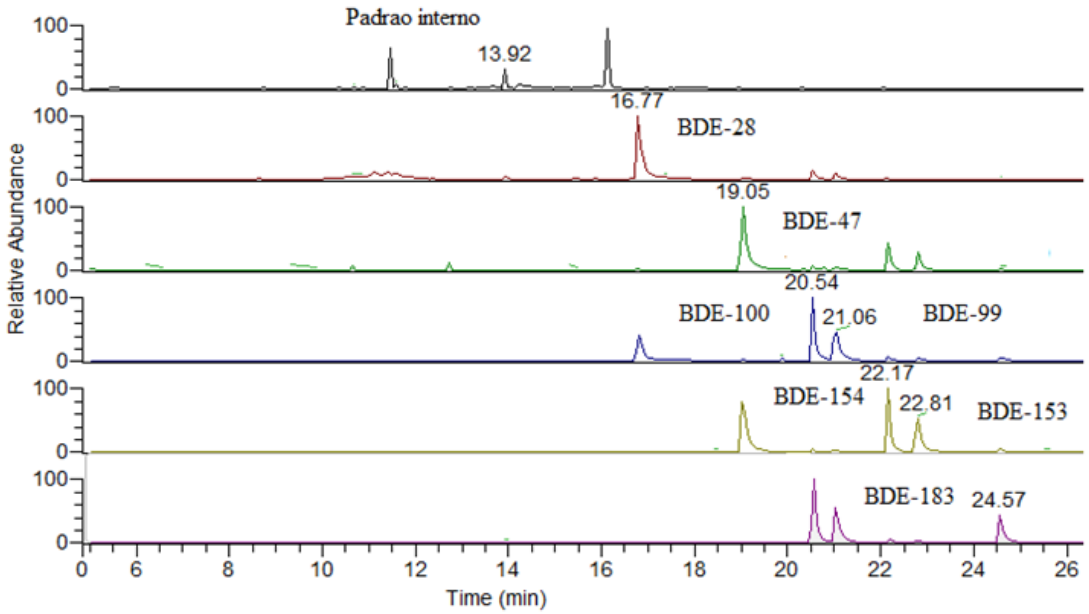


Figura 18: Cromatograma obtido a partir da análise de amostra de leite fortificada com padrões na concentração de 50 ng de cada PBDE/g de amostra fresca e padrão interno na concentração de 70 ng/g de amostra fresca.

Aproximadamente 30 mL das amostras de leite orgânico foram acondicionadas em tubos de polipropileno de 50 mL, pesadas (massa média de 31,37 g), congeladas em freezer -80 ºC e, em seguida liofilizadas até completa remoção de água. Após o processo de liofilização, obteve-se uma massa média de 3,05 g de extrato seco total, correspondendo a uma perda de, aproximadamente, 90,28 % de água.

A gordura do leite está presente na forma de pequenos glóbulos suspensos na fase aquosa. Cada glóbulo é envolvido por uma camada formada por um componente da gordura denominado fosfolipídio. Essa camada forma uma membrana que impede a união de todos os glóbulos (USDA, 2001). Desse modo, a gordura do leite é mantida na forma de suspensão. Os PBDEs por serem compostos altamente lipofílicos e apolares não apresentam uma distribuição uniforme no leite, sendo necessária a remoção de todo conteúdo aquoso da matriz para auxiliar no processo de preparo de amostra.

O método de extração desenvolvido para determinação e quantificação de PBDEs em amostras de leite foi realizado após a finalização dos experimentos realizados para o método de preparo de amostras de ovos e peixe, e suas respectivas aplicações. Os valores de concentração estão expressos em ng/g de amostra fresca.

Os parâmetros e variáveis testadas para essa metodologia foram semelhantes aos testados para as amostras anteriores, facilitando o desenvolvimento da metodologia proposta. A acetonitrila foi o solvente de escolha na reconstituição do resíduo após a secagem da fase orgânica, com intuito de manter a coluna de C18 do MEPS em boas condições e utilizá-la em mais extrações. Utilizou-se na microextração uma seringa de volume fixo de 50 µL, para maior pré-concentração dos analitos e possível redução dos limites de detecção e quantificação. A amostra foi carreada em seu volume total, visando uma recuperação total dos analitos, com velocidade de 20 µL/segundo no dispositivo eVolt® XR. O isooctano foi o solvente de escolha para eluição dos PBDEs e

PI, devido a maior afinidade dos PBDEs nesse solvente. Eluiu-se por 2 ciclos, utilizando o total de 100 µL de isooctano, não observando a ocorrência de *carryover* durante as análises posteriores. O cartucho foi lavado com isooctano e hexano, para ser reutilizado na próxima extração.

4.4.2 Validação analítica

Os coeficientes de correlação (*r*) calculados a partir da CCAS, CCMBF e da CCEMBF, na faixa de concentração de 0,88 – 1,5 - 5 – 10 – 30 – 50 – 100 – 150 ng de cada PBDE/g amostra fresca para cada congênere, foram maiores que 0,98. As curvas analíticas para os seis congêneres de PBDEs estão demonstradas na figura 19, e cada ponto foi obtido em triplicata.

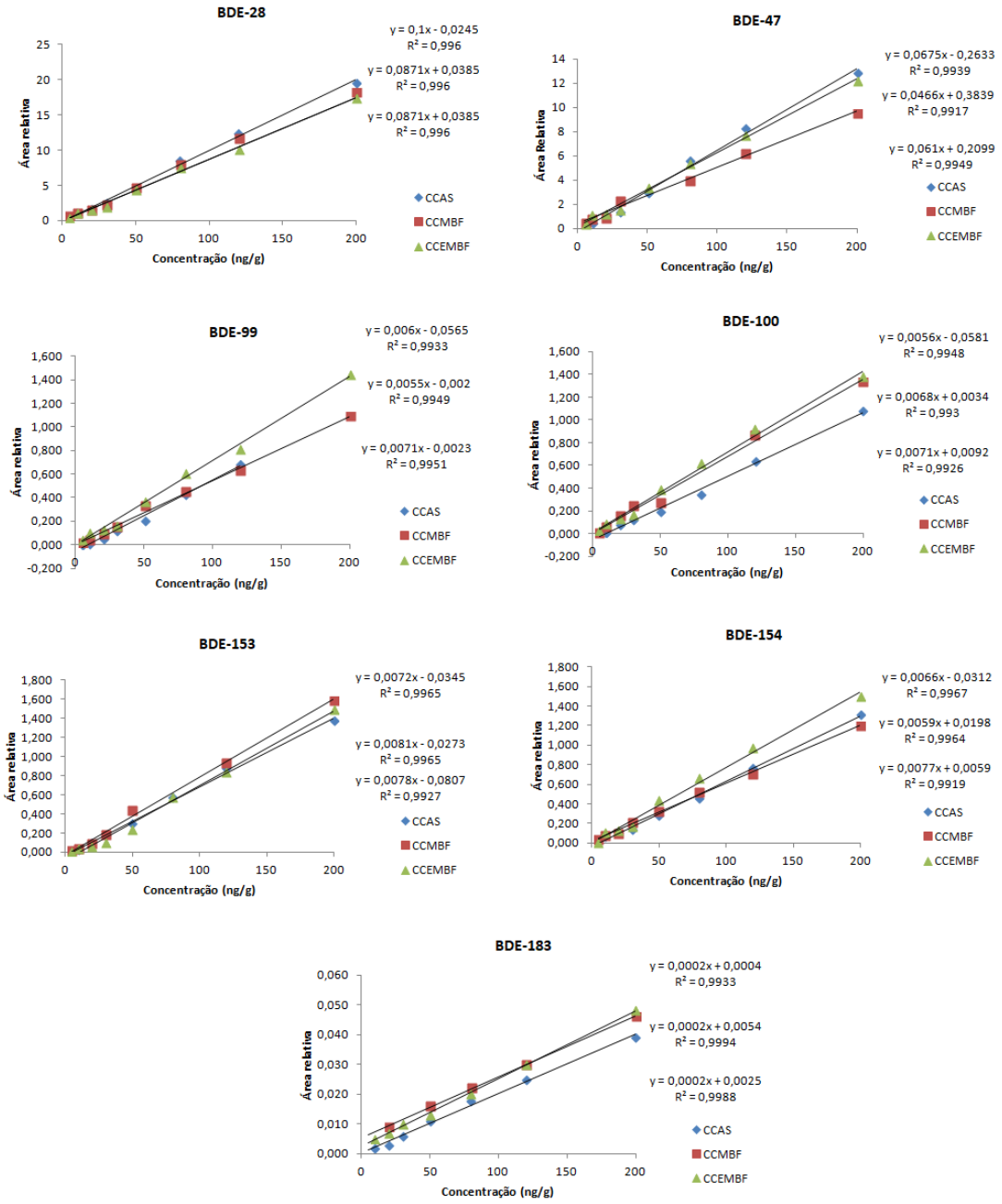


Figura 19: Curvas analíticas CCAS, CCMBF e CCEMBF para seis congêneres de PBDEs na faixa de concentração de 0,88 a 200 ng de cada PBDE/g de amostra fresca.

A seletividade demonstrada a partir dos cromatogramas da amostra branco e da amostra zero está demonstrada na figura 20.

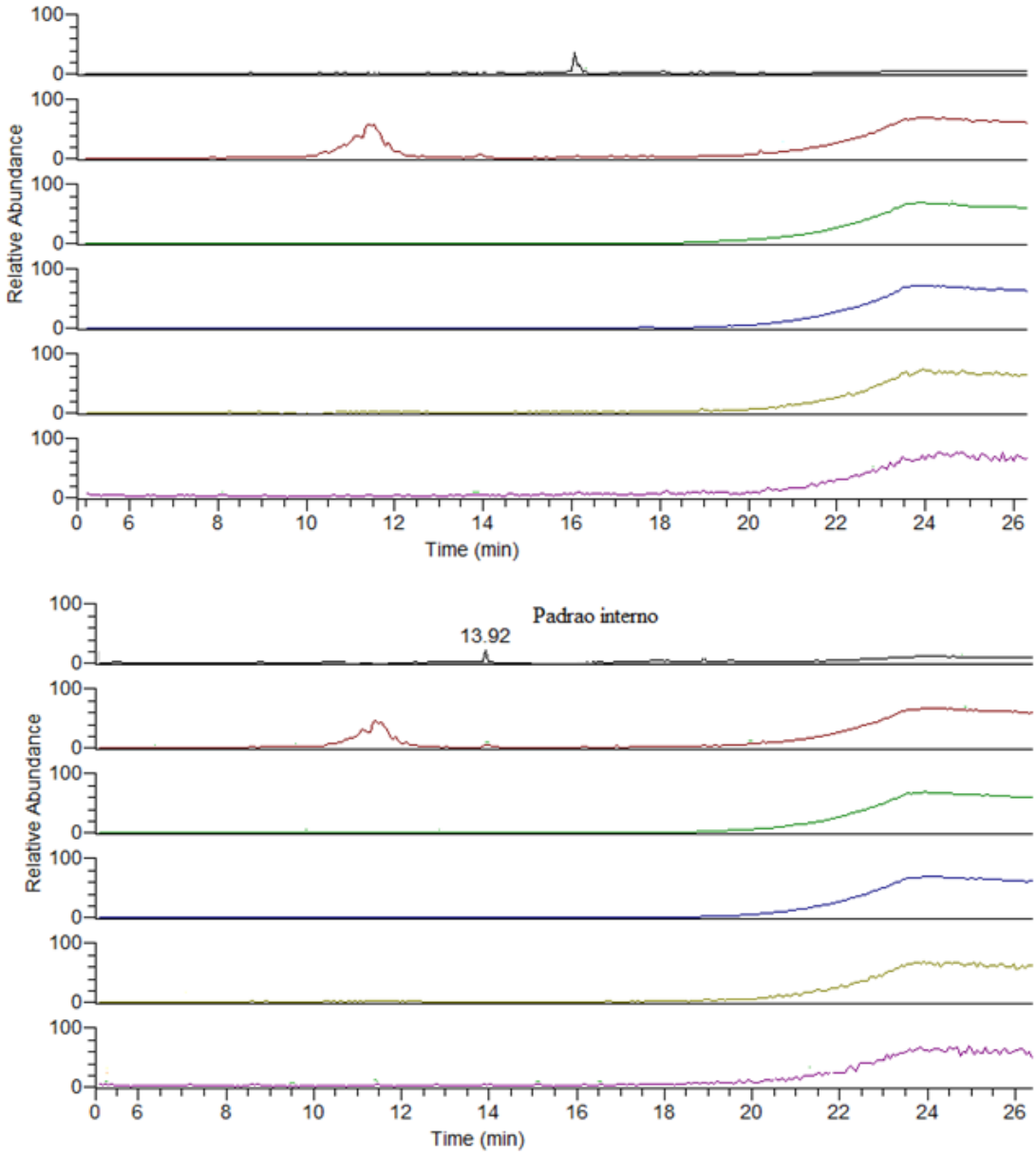


Figura 20: Cromatograma obtido a partir da análise de amostra branco de leite e amostras branco com padrão interno (amostra zero) na concentração de 70 ng/g de amostra fresca.

Por meio da comparação entre as inclinações das curvas CCAS e da CCEMBF de todos congêneres de PBDEs, o efeito matriz não é observado devido à proximidade entre elas, o que demonstra pouca perda nos processos de extração. Os CVs dos FMNs

relativos a todas as amostras analisadas foram inferiores a 15 % (Tabela 16), indicando ausência de efeito matriz no método proposto.

Tabela 16 – Efeito matriz para os congêneres de PBDEs em 4 diferentes lotes do leite orgânico integral Timbaúba – amostra branco.

Efeito Matriz - CV (%)	
BDE-28	9,78
BDE-47	7,53
BDE-99	13,23
BDE-100	13,89
BDE-153	9,19
BDE-154	7,56
BDE-183	9,98

O método apresentou uma recuperação média de 103,5%, com maior valor para o BDE-183 (107,8 %) e menor valor para o BDE-28 (97,2 %), indicando baixas perdas durante o processo de extração e evaporação, e boa pré-concentração dos analitos na etapa de MEPS. De acordo com os resultados encontrados, todos os congêneres apresentaram recuperação dentro da faixa estipulada pelo MAPA.

O limite de detecção calculado foi de 0,26 ng de cada PBDE/g de amostra fresca. O limite de quantificação calculado foi 0,88 ng de cada PBDE/g amostra fresca (Tabela 17).

Tabela 17 – Limite inferior de quantificação do método de análise dos congêneres de PBDEs em amostras de leite liofilizados (n=10).

LQ (0,88 ng/g amostra fresca)	**Precisão -** CV (%)	**Exatidão -** EPR (%)
BDE-28	7,82	2,56
BDE-47	8,75	5,63
BDE-99	10,2	-4,85
BDE-100	13,8	8,56
BDE-153	10,5	-3,75
BDE-154	12,8	8,74
BDE-183	8,23	4,56

Os coeficientes de variação obtidos nos estudos de precisão e os erros padrão relativos obtidos nos estudos de exatidão intra e intercorridas (Tabela 18a e 18b) foram inferiores a 15%, assegurando a reprodutibilidade e repetibilidade dos resultados. Desta forma, este estudo pode ser utilizado como um trabalho de referência para outros centros de pesquisa que envolva a determinação de PBDEs em amostras de leites.

Tabela 18a – Precisão intercorridas e intra-corridas do método para a determinação dos congêneres de PBDEs em amostras de leite liofilizado (n=6 para cada controle de qualidade).

Precisão - CV (%)	**BDE-28**	**BDE-47**	**BDE-100**	**BDE-99**	**BDE-154**	**BDE-153**	**BDE-183**
Intra CQB	4,88	3,92	0,24	2,01	0,72	0,93	0,24
CQM	0,80	0,47	2,11	1,26	9,22	1,26	0,84
CQA	9,39	9,39	0,01	0,30	3,49	7,35	4,03
Inter CQB	10,45	6,01	6,23	3,95	10,83	12,77	9,33
CQM	13,77	4,05	3,91	4,02	10,93	6,63	3,31
CQA	9,52	5,89	1,46	0,91	4,22	11,60	6,69

Tabela 18b – Exatidão intercorridas e intra-corridas do método para a determinação dos congêneres de PBDEs em amostras de leite liofilizado (n=6 para cada controle de qualidade).

Exatidão - EPR (%)	**BDE-28**	**BDE-47**	**BDE-100**	**BDE-99**	**BDE-154**	**BDE-153**	**BDE-183**
Intra CQB	-2,81	7,28	7,93	1,35	-2,55	-6,42	4,43
CQM	-11,45	0,39	6,81	0,18	10,27	4,66	9,18
CQA	-10,60	-4,33	1,11	-0,01	0,33	-0,06	8,52
Inter CQB	2,91	7,44	11,1	1,42	5,31	5,17	4,54
CQM	13,77	4,05	6,93	2,25	12,84	10,64	11,16
CQA	-11,61	0,51	2,37	-0,52	2,63	-6,09	4,88

Poucos são os métodos descritos na literatura para determinação de PBDEs em amostras de leite ou derivados. O método proposto no estudo está de acordo com as diretrizes estabelecidas pelo MAPA, por meio da Instrução Normativa nº 16 de 17 de maio de 2013. Para quantificação de PBDEs em amostras de leite utilizou-se na MEPS uma seringa de volume fixo de 50 µL, possibilitando uma pré-concentração dos analitos duas vezes maior e, consequentemente, uma redução dos limites de detecção e quantificação, em relação aos métodos desenvolvidos para as amostras de ovo e peixe deste estudo.

Com os resultados acima descritos e nos demais métodos propostos no estudo, podemos observar que a técnica baseada em MEPS apresenta como principal vantagem a pré-concentração dos analitos, e como consequência o aumento do sinal analítico instrumental e a redução dos limites de detecção e quantificação. Na metodologia para quantificação de PBDEs em amostras de leite, partiu-se de um volume de 4 mL de hexano, na etapa de pré-preparo das amostras, e finalizou-se com apenas 100 µL de eluente (isooctano) no MEPS, dos quais 2 µL foram utilizados para análise no GC-MS. Dessa forma, a MEPS pode ser considerada uma técnica ideal para análise traços.

4.4.3 Aplicação do método analítico em amostras comerciais

Após o desenvolvimento e validação do método analítico para quantificação de PBDEs em amostras de leite, o mesmo foi aplicado em 43 amostras, incluindo 15 amostras obtidas diretamente do produtor (produção doméstica) e 28 amostras comerciais. Dentre as amostras comerciais analisou-se leite do tipo integral, semi desnatado, desnatado, zero lactose, pasteurizado, leite em pó, e formulações infantil. Os resultados estão descritos nas tabelas 19a e 19b, e os dados estão divididos em amostras do tipo comercial e leite do produtor, com os valores de média (mínimo – máximo), porcentagem de detecção e percentil 25-75.

Tabela 19a – Concentração quantificada para cada congênere de PBDE (BDE-28, -47, -99 e -100) em amostras de leite comerciais de leite do produtor. Os valores são expressos em ng/g amostra fresca.

Amostras	BDE-28	BDE-47	BDE-99	BDE-100
Comercial (média)	5,96	29,02	2,62	1,02
(Min – Max)	0,13 – 35	0,13 - 85	0,13 – 1,75	0,13 – 1,75
(Detecção - %)	43	72	47	7
(Percentil 25 -75)	0,13 - 10	0,13 - 50	0,13 - 5	0,13 - 0,75
Produtor (média)	5,42	18,06	2,06	0,99
(Min – Max)	0,13 – 32,5	0,13 – 62,5	0,13 – 7,5	0,13 – 2,5
(Detecção - %)	34	54	47	20
(Percentil 25 -75)	0,13 – 6,25	0,13 – 30	0,13 – 2,5	0,13 – 1,05

Tabela 19b - Concentração quantificada para cada congênere de PBDE (BDE-153, -154, -183 e $\sum_{PBDEs}$) em amostras de leite comerciais de leite do produtor. Os valores são expressos em ng/g amostra fresca.

Amostras	BDE-153	BDE-154	BDE-183	$\sum_{PBDEs}$
Comercial (média)	1,46	2,24	3,45	44,46
(Min – Max)	0,13 – 15	0,13 – 12,5	0,13 – 42,5	7 – 111,5
(Detecção - %)	11	29	36	-
(Percentil 25 -75)	0,13 – 0,75	0,13 – 5	0,13 – 5	28,12 – 65,87
Produtor (média)	1,25	3,57	1,68	31,60
(Min – Max)	0,13 – 2,5	0,13 - 15	0,13 – 7,5	7 – 69,75
(Detecção - %)	7	47	40	-
(Percentil 25 -75)	0,13 – 1,75	0,13 – 6,25	0,13 – 2,5	12,87 – 50,5

Em todas as amostras de leite analisadas, incluindo amostras comerciais e de produção doméstica, foi quantificado pelo menos um congênere de PBDE com valor de concentração acima do limite de detecção. Nas amostras comerciais, a média de concentração para a somatória de todos os congêneres de PBDEs analisados ($\sum_{PBDEs}$) foi de 44,5 ng/g de amostra fresca e para o BDE-47 foi de 29 ng/g de amostra fresca. Nas amostras de leite de produção doméstica, a média de concentração para $\sum_{PBDEs}$ foi de 31,6 ng/g e para o BDE-47 foi de 18 ng/g de amostra fresca.

A quantidade de lipídeos das amostras provenientes diretamente do produtor são maiores que das amostras comerciais, dessa forma a probabilidade de acúmulo de PBDEs é maior em vista da alta lipofilicidade desses contaminantes. O solo é considerado uma potencial fonte de exposição aos PBDEs para as vacas, por serem compostos persistentes e bioacumulativos. O leite apresenta elevado teor lipídico (3,5 a 6%) e é ideal para análise de carga corportal total do animal de poluentes lipofílicos,

como os PBDEs, uma vez que ocorre transferência desses compostos bioacumulados para o leite (Bocio et al., 2003).

No entanto, com base nos dados obtidos no estudo, os resultados tanto para a concentração média da $\sum_{PBDEs}$ analisados quanto para o BDE-47 foram maiores para as amostras de leite comercial. Deve-se ressaltar que no presente estudo, analisaram-se também amostras de leite desnatado com porcentagem zero de gordura, e leite semi desnatado com 1% de gordura, e pelo menos um congênere de PBDE foi quantificado. Diante do exposto, e de acordo com o estudo de Schecter e colaboradores (2011), supõem-se que as concentrações de PBDEs quantificadas nas amostras sejam provenientes dos processamentos industriais e das embalagens dos alimentos, embora uma fonte exata de contaminação não esteja determinada. O somatório das concentrações de PBDEs quantificadas nas amostras de leite, comercial e do produtor, não apresentaram diferença estatisticamente significativa, $p > 0.05$ (*RStudio® software*).

Os níveis de PBDEs no ambiente têm aumentado consideravelmente nas últimas décadas, favorecendo o biacúmulo desses compostos em animais e a possível exposição humana. Os valores encontrados nas amostras analisadas apresentaram concentrações próximas ao limite de quantificação para cada congênere de PBDE detectado. Mas é importante salientar que a avaliação de risco e o perigo associado a uma exposição leva-se em conta o somatório de contaminantes expostos e não um isoladamente. Diante do exposto, o somatório das concentrações de PBDEs determinadas em todas as amostras de leite analisadas ($\sum_{PBDEs}$) foi de 39,9 ng/g de amostra. E o congênere de maior prevalência, assim como em outras amostras analisadas no estudo, foi o BDE-47, com concentração média de 25,2 ng/g de amostra. Congêneres pertencentes à formulação penta-BDE apresentam alto potencial de bioacumulação no ambiente e nos organismos, com prevalência do BDE-47. Ademais, congêneres de PBDEs com maior

quantidade de bromo na estrutura, como o BDE-183 e BDE-209, podem sofrer debrominação no ambiente e durante o metabolismo no organismo dos animais que o bioacumularam, formando os congêneres menos bromados (BDE-47), e consequentemente um enriquecimento trófico (Domínguez et al., 2010).

Os valores encontrados nas amostras analisadas foram comparados com outros estudos descritos na literatura, e os dados estão descritos na tabela 20. As concentrações quantificadas no estudo foram consideravelmente maiores que as encontradas em países europeus e na China, por exemplo. A ausência de legislação brasileira que preconiza o uso de PBDE no país e a ausência de limites estabelecidos para quantidade máxima permitida em alimentos e amostras ambientais, aumenta consideravelmente a exposição humana a esses poluentes persistentes, podendo causar potenciais efeitos adversos à saúde da população brasileira.

Tabela 20- A concentração média determinada para BDE-47 e para a soma de todos os congêneres de PBDEs ($\sum_{\mathbf{PBDE}}$) em amostras de leite em cada estudo, incluindo dados deste estudo, países europeus, Estados Unidos e China. Os valores são expressos como ng/g de amostra fresca.

País	BDE-47	$\sum_{PBDE}$	Congêneres analisados	Referência
Presente estudo	25,2	39,9	28, 47, 99, 100, 153, 154, 183	-
Itália	0,09	3,7	22 BDE congeners	Martellini et al., 2016
China	0,01	0,08	28, 47, 99, 100, 153, 154, 183	Gong et al., 2015
EFSA	0,022	0,28	28, 47, 99, 100, 153, 154, 183, 209	EFSA, 2011

4.5 Estudo IV: Ingestão diária estimada de PBDEs e avaliação de risco da exposição humana a esses contaminantes ambientais

A ingestão diária estimada (IDE) associada com o consumo de alimentos brasileiros foi calculada no estudo. A IDE determinada para as amostras de ovos foi de 3,02 ng/Kg de peso corpóreo – dia, considerando um consumo médio de ovos na população brasileira (IR) de 11,7 g/dia, de acordo com a Pesquisa de Orçamento Familiar (IBGE, 2013), e a concentração média (C) de 18,1 ng/g de amostra fresca para a somatória de sete congêneres de PBDEs de todas as amostras analisadas.

O IR para as amostras de peixes é de 23,4 g/dia (IBGE, 2013), e a C determinada foi de 26,4 ng/g de amostra fresca. Dessa forma, o IDE calculada para o consumo de peixe foi de 8,8 ng/Kg de peso corpóreo – dia. Em relação às amostras de frutos do mar, o IDE foi de 0,26 ng/Kg de peso corpóreo – dia, considerando IR de 0,7 g/dia (IBGE, 2013) e C de 25,6 ng/g de amostra fresca.

Nas amostras de leite, o IDE calculado foi de 19,8 ng/Kg de peso corpóreo – dia, com ingestão diária média de leite pela população brasileira de 34,7 g/dia (IBGE, 2013) e concentração média da somatória de todos os congêneres de PBDEs de 39,9 ng/g de amostra fresca. A ingestão diária estimada total para todas as amostras analisadas no estudo foi de 31,9 ng/Kg de peso corpóreo – dia.

Os cálculos do IDE também consideraram a diferença entre homens (peso médio de 73 kg) e mulheres (peso médio de 63 kg) para cada alimento selecionado no estudo. A taxa média diária de ingestão de alimentos (IR) para mulheres e homens está de acordo com a Pesquisa de Orçamento Familiar (IBGE, 2013) e os valores obtidos estão descritos na Tabela 21. Os dados sugerem maior contribuição para a exposição aos PBDEs através da ingestão de leite (19,8 ng/Kg de peso corpóreo - dia, 22,5 ng/Kg - dia

para mulheres e 18,5 ng/Kg - dia para homens) em comparação aos demais alimentos estudados.

Tabela 21 – Valores de Ingestão diária estimada total, para cada alimento selecionado no estudo e considerando a diferença entre homens e mulheres. Os valores estão expressos em ng/Kg de peso corpóreo – dia.

Alimento	**Ingestão diária estimada**
Total ($\sum_{EDI}$)	31,9
Ovo (Masculino – Feminino)	3,02 (3,45 – 2,76)
Peixe (Masculino – Feminino)	8,8 (9,52 – 8,7)
Frutos do mar (Masculino – Feminino)	0,26 (0,25 – 0,24)
Leite (Masculino – Feminino)	19,8 (18,5 – 22,5)

O valor de IDE total do estudo foi comparado com outros valores de ingestão diária de PBDEs da literatura (tabela 22), considerando a somatória de todos os congêneres de PBDEs analisados no estudo e os principais alimentos que constituem fontes de exposição aos PBDEs. Os dados foram obtidos das agências reguladoras *European Food Safety Autority* (EFSA) and *United States Environmental Protection Agency* (US. EPA) (EFSA, 2011; U.S. EPA, 2010).

Tabela 22 – A ingestão diária estimada (IDE) de PBDEs em alimentos brasileiros e em outros países. Os valores do IDE consideraram a soma de todos os congêneres do PBDEs analisados nos estudos. Os valores estão expressos em ng/Kg de peso corpóreo – dia.

País	Ingestão diária estimada
Presente estudo (Brasil)	31,9
Bélgica	0,80
Alemanha	2,50
Espanha	1,40
Finlândia	0,58
França	0,22
Irlanda	0,95
Holanda	0,79
Suécia	0,88
Estados Unidos	1,50

Os PBDEs apresentam alta lipofilicidade podendo acumular-se na cadeia alimentar e nos alimentos (Pietrón and Malagocki, 2017). Nossos resultados mostraram que as concentrações de PBDEs podem variar com o tipo de alimento, e alimentos ricos em lipídeos, como ovos, peixes, frutos do mar e leite contribuem significativamente para exposição humana aos PBDEs.

Para determinar o risco cumulativo da exposição a três congêneres de PBDE (BDE-47, BDE-99, e BDE-153), o *hazard index* (HI) ou índice de perigo foi calculado para cada alimento selecionado no estudo, através da soma do valor para cada analito individual. Também foi relatado o somatório de todas as amostras de alimentos analisadas.

A dose de referência (RfD) estabelecida pela *European Food Safety Autority* é baseada no efeito sobre o comportamento motor espontâneo, na toxicidade do

desenvolvimento neurocomportamental e nas alterações neurocomportamentais observadas em camundongos (Viberg et al., 2007, EFSA 2011).

O *hazard index* (HI) para amostras de ovos, considerando no cálculo os congêneres BDE-47, BDE-99, e BDE153 foi de 0,047. Para as amostras de peixe o HI foi de 0,094, e para as amostras de frutos do mar o HI foi de 0,003. Nas amostras de leite, o HI calculado foi de 0,212. Considerando uma exposição total aos alimentos analisados, o *hazard index* determinado foi de 0,356, um valor alto comparado com os dados da literatura. No entanto, o valor determinado no estudo foi menor que 1, considerando valores maiores que 1 para substâncias com poteciais riscos para saúde humana. Sugere-se avaliar outras fontes alimentares que possam contribuir para ingestão de PBDEs para uma avaliação de risco mais completa para esse contaminante.

É importante mencionar que o risco cumulativo de exposição ao PBDE pode estar subestimado no estudo, uma vez que apenas três congêneres de PBDEs e apenas quatro tipos de alimentos foram incluídos no cálculo. A exposição humana inclui outros congêneres, além de mais vias de exposição, como outros alimentos e também a ingestão de poeira doméstica, e inalação de ar e material particulado (Pietrón and Malagocki, 2017).

O uso continuo e indiscriminado de PBDEs, a ausência de legislação brasileira, a disposição errônea de equipamentos eletrônicos e as perdas por volatilização de produtos contendo esses compostos, aumentam os níveis de PBDEs no meio ambiente, e dessa forma podem representar um risco para a saúde humana em vista do aumento da exposição a esses compostos persistentes (Lavandier, et al., 2013).

Considerações finais

5. Considerações finais

Os métodos analíticos desenvolvidos e validados neste estudo para quantificação dos PBDE em diferentes tipos de amostras de alimentos empregando MEPS e CG-MS apresentaram diversas vantagens, tais como rapidez, simplicidade e menor consumo de solvente orgânico que as técnicas de preparo de amostras clássicas, como a SPE, ELL, Soxhlet, e a PLE. A técnica de MEPS pode ser empregada tanto para extração dos analitos, quanto para pré-concentração e eficiente *clean up* da matriz. Ademais, os métodos mostraram-se eficazes para aplicação na análise de alimentos, e em vista da facilidade no uso do MEPS e no curto tempo no preparo de amostras ele pode ser utilizado na análise de rotina, auxiliando as agências regulamentadoras a estipular os limites máximos permitidos em alimentos e no meio ambiente.

Os resultados do estudo também descrevem pela primeira vez importantes fontes de exposição humana aos PBDEs, a ingestão através da alimentação. A avaliação da presença dos principais congêneres de PBDEs em amostras de alimentos, como ovos, peixes, frutos do mar e leites, obtidos no mercado brasileiro, é de extrema importância devido às informações limitadas em relação aos níveis encontrados no país, e ao alto conteúdo lipídico, o que favorece o bioacúmulo desses contaminantes.

Esse foi o primeiro estudo a reportar as concentrações de PBDEs em amostras de alimentos comercializados no Brasil. Os dados obtidos indicam maiores níveis de PBDE nas amostras brasileiras de alimentos, em comparação com outros estudos da literatura. A ausência de legislação e especificações de uso para PBDEs no Brasil é uma possível causa para as altas concentrações desses compostos nos alimentos brasileiros. Destaca-se também que os valores encontrados de estimativa de ingestão diários mais elevados podem oferecer maior risco para a saúde da população brasileira.

Referências bibliográficas

Referências bibliográficas

Abdel-Rehim, M. Recent advances in microextraction by packed sorbent for bioanalysis Journal of Chromatography A, v.1217, p.2569-2580, 2010.

Angioni, S.A.; Scortichini, G.; Diletti, G.; Perletta, F.; Ceci, R.; Ferri, N. Study of the toxic effects of flame retardant PBDE-47 on the clam Chamelea gallina (Linnaeus, 1758). Veterinaria Italiana, v.49, n.1, p.69-77, 2013.

Annunciação, D. L. R.; Almeida, F. V.; Hara, E. L. Y.; Grassi, M. T.; Sodré, F. F. Éteres difenílicos polibromados (PBDEs) como contaminantes persistentes: ocorrência, comportamento no ambiente e estratégias analíticas. Química Nova, v.41, p. 782-795, 2018.

Bai, X.; Lutz, A.; Carroll, R.; Keteles, K.; Dahlin, K.; Murphy, M.; Nguyen, D. Occurrence, distribution, and seasonality of emerging contaminants in urban watersheds. Chemosphere, v.200, p.133-143, 2018.

Bocio, A.; Llobet, M.; doming, J. L.; Corbella, J.; Teixido, A.; Casas, A. Polybrominated Diphenyl Ethers (PBDEs) in Foodstuffs: Human Exposure through the Diet. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 51, 3191−3195, 2003.

Borges, K. B.; Pereira, A. C.; Mano, C. Introdução ao preparo de amostras. Keyller Bastos Borges, Eduardo Costa de Figueiredo, Maria Eugênia Costa Queiroz. Preparo de Amostras para Análise de Compostos Orgânicos. Rio de Janeiro. LTC, p.2-8, 2015.

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Secretaria de Defesa Agropecuária: Manual de garantia da qualidade analítica. Brasília, DF, MAPA, 2011, p.277.

Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Brasília, DF, Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003.

Cascaes, M. J. Ocorrência de PCBs, PBDEs e pesticidas organoclorados em Prionace glauca da costa sul brasileira. 2009. Dissertação de Mestrado. Instituto Oceanográfico. Universidade de São Paulo.

Chiaradia, M. C.; Collins, C. H.; Jardim, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. Química Nova, v.31, n.3, p.623-636, 2008.

Collins, C. H., Braga, G. L., Bonato, P. S. Fundamentos de cromatografia. Editora da Unicamp – SP, 2006.

Costa, L. G., Giordano, G.; Tagliaferri, S.; Caclieri, A.; Mutti, A. Polybrominated diphenyl ether (PBDEs) flame retardants: environmental contamination, human body burden and potential adverse health effects. Acta Biomedica, v.79, p.172-183, 2008.

Covaci, A.; Roosens, L.; Dirtu, A. C.; Waegeneers, N.; Overmeire, I. V.; Neels, H.; Goeyens, L. Brominated flame retardants in Belgian home-produced eggs: Levels and contamination sources. Science of the Total Environment, 407, 4387-4396, 2009.

Covaci, A.; Malarvannan, G. Brominated Flame Retardants. The Handbook of Environmental Chemistry, DOI 10.1007/698_2015_339, 2015.

Cruz, R.; Marques, A.; Cunha, S. C.; Casal, S. Polybrominated diphenyl ethers and metabolites – An analytical review on seafood occurrence. Trends in Analytical Chemistry, v.87, p.129-144, 2017.

Darnerud P.O.; Atuma, S.; Aume, M.; Bjerselius, R.; Glynn, A.; Petersson Grawé, K.; Becker, W. Dietary intake estimations of organohalogen contaminants (dioxins, PCB, PBDE, and chlorinated pesticides, e.g. DDT) based on Swedish maked basket data. Food and Chemical Toxicology, 44, 1597-1606, 2006.

Dirtu, A. C.; Abdallah, M.; Covaci, A. Advances in the sample preparation of brominated flame retardants and other brominated compounds. Trends in Analytical Chemistry, v.43, p.189-203, 2013.

Domínguez, A. A.; Law, R. J.; Herzke, D.; Boer, J. Bioaccumulation of Brominated Flame Retardants. The Handbook of Environmental Chemistry (2011) - DOI 10.1007/698_2010_95.

Domingo J. L. Polybrominated diphenyl ether in food and human dietary exposure: A review of the recent scientific literature. Food and Chemical Toxicology, 50, 238-249, 2012.

European Food Safety Authority (EFSA), Scientific Opinion on Polybrominated Diphenyl Ethers (PBDEs) in Food. EFSA Journal, v.9, n.5, 274 p., 2011, Parma, Italy.

Flame Retardants Online - FROL. Disponível em: http://www.flameretardants-online.com/web/en/106/7ae3d32234954e28e661e506e284da7f.htm. Acesso em: fevereiro/2017.

Fromme, H. Occurrence of polybrominated diphenyl ethers and hexabromocyclododecane (2018). Encyclopedia of environmental health, 2nd Edition. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409548-9.11242-4.

Gandhi, N.; Gewurtz, S. B.; Drouillard, k. G.; Kolic, T.; MacPherson, K.; Reiner, E. J.; Bhavsar, S. P. Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in Great Lakes fish: Levels, patterns, trends, and implications for human exposure. Science of the Total Environmental, 576, 907-916, 2017.

Gjelstad, A.; Pedersen-Bjergaard, S. Challenges and new directions in analytical sample preparation. Analytical and Bioanalytical Chemistry, v.406, p.375–376, 2014.

Gong, Y.; Wen, S.; Zheng, C.; Peng X.; Li, Y.; Hu, D.; Peng, L. Potential risk assessment of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) by consuming animal-derived foods colleted from interior areas of China. Environmental Science and Pollution Research, 22, 8349-8258, 2015.

Guilivo, M.; Suciu, N. A.; Eljarrat, E.; Gatti, M.; Capri, E.; Barcelo, D. Ecological and human exposure assessment to PBDEs in Adige River. Environmental Research, v.164,p.229-240, 2018

He, Y.; Murphy, M. B.; Yu, R. M. K.; Lama, M. H. W.; Hecker, M.; Giesy, J. P.; Wu, R. S. S.; Lama, P. K. S. Effects of 20 PBDE metabolites on steroidogenesis in the H295R cell line. Toxicology Letters, v.176, n.3, p.230–238, 2008.

Hu, G. C.; Dai, J. Y.; Xu, Z. C.; Luo, X. J.; Cao, H.; Wang, J. S.; Mai, B. X.; Xu, M. Q. Bioaccumulation behavior of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in the freshwater food chain of Baiyangdian Lake, North China. Environmental International. New York. v.38, n.4, p.309-315, 2010.

Hu, X.; Hu, D. Levels of methoxylated polybrominated diphenyl ethers and polybrominated diphenyl ethers in hen eggs from China. Analytical Chemistry Research, v.2, p.1-14, 2014.

Instituto Brasileiro De Geografia E Estatística - IBGE. Pesquisa de Orçamento Familiar (POF), Aquisição alimentar domiciliar per capita anual, por grandes regiões, segundo os produtos, período 2008-2009, 2013.

Kalachova, K. Pulkrabova, J.; Cajka, T.; Hajslova, J. Determination of Brominated Flame Retardants (BFRs) in fish tissue using an optimized extraction/clean up procedure and the Agilent 7000 triple quadrupole GC/MS System. Agilent technologies, 2013.

Król, S.; Zabiegala, B.; Namiésnik, J. PBDEs in environmental samples: Sampling and analysis. Talanta, v.93, p.1-17, 2012.

Johnson-Restrepo, B.; Kannan, K. Na assessment of source and pathways of human exposure to polybrominated diphenyl ether in the United State. Chemosphere, 79, 542-548, 2009.

Lavandier, R.; Quinete, N.; Hauser-Davis, R. A.; Dias, P. S.; Taniguchi, S.; Montone, R.; Moreira, I. Polybrominated biphenyls (PCBs) and Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in three fish species from na estuary in the southestern coast of Brazil. Chemosphere, 90, 2435-2443, 2013.

Martellini, T.; Diletti, G.; Scortichini, G.; Lolini, M.; Lanciotti, E.; Katsoyiannis, A.; Cincinelli, A. Occurence of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in foodstuffs in Italy and implication for human exposure. Food and Chemical Toxicology, 89, 32-38, 2016.

Martínez-Moral, M. P. Métodos analíticos para la determinación de compuestos disruptores endocrinos. 2015. Tese de Doutorado. Universidad de la Rioja.

Martínez-Moral, M. P.; Tena, M. T. Use of microextraction by packed sorbents following selective pressurized liquid extraction for the dertermination of brominated diphenyl ether in sewage sludge by chromatography-mass spectrometry. Journal of Chromatography A, v.1364, n.2014, p.28-35, 2014.

Matamoros, V.; Sala, L.; Salvadó, V. Evaluation of a biologically-based filtration water reclamation plant for removing emerging contaminants: a pilot plant study. Bioresource Technology, v.104, p.243-249, 2012.

Mortimer, D. N. Persistent organic pollutants in foods: science, policy and regulation. Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition, p.3-19, 2013.

Ni, K.; Lu, Y.; Wang, T.; Kannan, K.; Gosens, J.; Xu, L.; Li, Q.; Wang, L..; Liu, S. A review of human exposure to polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in China. International Journal of Hygiene and Environmental Health, v. 216, n.2013, p.607–623, 2013.

Omar, M. L.; Alharbi, A. A. B.; Rafat, A.; Khattab, I. A. Health and environmental effects of persistent organic pollutants. Journal of Molecular Liquids, v.263, p.442-453, 2018.

Official Methods Of Analysis – OMA - AOAC INTERNATIONAL. Lipids and Lipid Phosphorus (P2O5) in Eggs. http://www.eoma.aoac.org/methods/info.asp?ID=19341. Accessed in March 2018.

Peng, J-H.; Huang, C-W.; Weng, Y-M.; Yak, H-K. Determination of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in fish samples from rivers and estuaries in Taiwan. Chemosphere, v.66, p.1990–1997, 2007.

Pestana, C. R.; Borges, K. B.; Fonseca, P.; Oliveira, D. P. Risco ambiental da aplicação de éteres de difenilas polibromadas como retardantes de chama. Revista Brasileira de Toxicologia, v.21, n.2, p.41-48, 2008.

Pirard, C.; Pauw, E. Absorption, disposition and excretion of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in chicken. Chemosphere, 66, 320-325, 2007.

Pietrón, W. J.; Matagocki, P. Quantification of polybrominated diphenyl ether (PBDE) in food. A review. Talanta, 167, 411-427, 2017.

Queiroz, M. E. C. Microextração em Sorvente Empacotado (MEPS). Keyller Bastos Borges, Eduardo Costa de Figueiredo, Maria Eugênia Costa Queiroz. Preparo de Amostras para Análise de Compostos Orgânicos. Rio de Janeiro. LTC, 2015, p.164-170.

Rahman, F.; Langford, K. H.; Scrimshaw, M. D.; Lester, J. N. Polybrominated diphenyl ether (PBDEs) flame retardants (Review). Science of the Total Environment, v. 275, p. 117, 2001.

Reiner, E. J., Jobst, K. J.; Megson, D.; Dorman, F. L.; Focant, J.-F. Analytical Methodology of POPs. Environmental Forensis for Persistent Organic Pollutants, Chapter 3, 2014.

Salami, F. H.; Queiroz, M. E. C. Microextraction in packed sorbent for determination of sulfonamides in egg samples by liquid chromatography and spectrophotometric detection. Jounal of the Brazilian Chemical Society, v.22, n.9, p.1656-1661, 2011.

Schecter, A., Harris, T.R., Shah, N., Musumba, A., Papke, O. Brominated flameretardants in US food. Molecular Nutrition & Food Research, v.52, p.266–272, 2008.

Schecter, A.; Smith, S.; Colacino, J.; Malik, N.; Opel, M.; Paepke, O.; Birnbaum, L. Contamination of U.S. Butter with Polybrominated Diphenyl Ethers from Wrapping Paper. Environmental Health Perspectives, v.119, n.2, p.151-119, 2011.

Shao, J.; Echert M. L.; Lee, L. E.; Gallagher, E. P. Comparative oxygen radical formation, and toxicity of BDE 47 in rainbow trout cell lines. Marine Environmental Research, v.66, p.7–8, 2008.

Skoog, D. A.; Holler; Crouch, S. R. Princípios da Análise Instrumental. 6 ed. Porto Alegre: Bookman, 2009.

Staskal, D. F.; Scott, L. L.; Haws, L. C.; Luksemburg, W. L.; Birnbaum, L. S.; Urban, J. D.; Willians, E. S.; Paustenbach, D. J.; Harris, M. A. Assessment of Polybrominated diphenyl ether exposure and health risk associated with consumption of southern Mississippi catfish. Environmental Science Technology, 42, 6755-6761, 2008.

Szlinder-Richert, J.; Barska, I.; Usydus, Z.; Grabic, R. Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in selected fish species from the southern Baltic Sea. Chemosphere, 78, 695-700, 2010.

Tritscher A., Stadler R., Scanlan F., Collingro C., Päpke O. Determination of PBDEs in samples of raw cow's milk, fish and eggs. Organohalogen Compounds, 61, 131-134, 2003.

United Nations Environment Programme - UNEP, 2009. The 9 new POPs under the Stockholm Convention. Disponível em: http://chm.pops.int/ Acesso em: fevereiro 2016.

United States Department Of Agriculture - USDA. Agricultural Research Service: National Nutrient Database for Standard Reference. Release 26, Disponível em: http://ndb.nal.usda.gov/ndb/search/list. Acesso em: dezembro de 2016.

United States Environmental Protection Agency - US. EPA. Furniture flame retardancy partnership: Environmental profiles of chemical flame-retardant alternatives for low-density polyurethane foam. Rep. n.742-R-05-002A, USEPA, Washington, D.C., 2009.

United States Environmental Protection Agency - US. EPA, 2014. Disponível em: http://www2.epa.gov/columbiariver/chemicals-emerging-concern. Acesso em: abril/2015.

United States Geological Survey - USGS, 2014. Disponível em: http://toxics.usgs.gov/regional/emc/. Acesso em: abril/2015.

Van Orvermeire, I.; Pussemier, L.; Waegeneers, N.; Hanot, V.; Windal, V.; Boxis, L.; Covaci, A.; Eppe, G.; Scippo, M. L.; Sioen, I.; Bilau, M.; Gellynck, X.; De Steur, H.; Tangni, E. K.; Goeyens, L. Assessment of the chemical contamination in home-produced eggs in Belgium: General overview of the CONTEGG study. Science of the total Environment, 407, 4403-441, 2009.

Viberg, H.; Fredriksson, A.; Eriksson, P. Changes in spontaneous behaviour na altered response to nicotine in adult rat, after neonatal exposure to the brominted flame retardant, decabrominated diphenyl ether (PBDE 209). NeuroToxicology, 28, 136-142, 2007.

Xu, W.; Wang, X.; Cai, Z. Analytical of the persistent organic pollutants identified in the Stockholm Convention: A review. Analytical Chimica Acta, 790, 1-13, 2013.

Wang, H-S.; Du, J.; Ho, K-L., Leung, H-M.; Lam, M. H-W.; Giesy, J. P.; Wong C. K-C.; Wong, M-H. Exposure of Hong Kong residents to PBDEs and theirs strutural analogues through market fish consumption. Journal of Hazardous Materials, 192, 374-380, 2011.

Wit, C. A,. Balmer, J.; Muir, D. C. G.; Vorkamp, K.; Wilson, S. Chemicals of emerging Arctic Concern: Preface. Emerging Contaminants, v.5, p1-3, 2019.

Yang, L.; Said, R.; Abdel-Rehim, M. Sorbent, Device, Matrix and Application in Microextraction by Packed Sorbent (MEPS): A Review. Journal of Chromatography B, v.1043, p.33-43, 2017.

Yan, S.; Subramanian, B.; Tyagi, R. D.; Surampalli, R. Y.; Zhang, T. C. Emerging Contaminants of Environmental Concern: Source, Transport, Fate and Treatment. Practice Periodical of Hazardous, Toxic and Radioactive Waste Management, v.14, p.2-20, 2010.

World Health Organization - WHO. EVALUATION OF CERTAIN FOOD CONTAMINANTS. Sixty-fourth meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, 2006.

Zeng, Y-H.; Luo, X-J.; Tang, B.; Mai, B-X. Habitat- and species-dependent accumulation of organohalogen pollutants in home-Produced eggs from an electronic waste recycling site in South China: Levels, profiles, and human dietary exposure. Environmental Pollution, 216, 64-70, 2016.

Zhihua, L.; Panton, S.; Marshall, L.; Fernandes, A.; Rose, M.; Smith, F.; Holmes, M. Spatial analysis of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) and polybrominated biphenyls (PBBs) in fish collected from UK and proximate marine waters. Chemosphere, 195, 727-734, 2018.

Zhou, Y.; Chen, Q.; Du, X.; Yin, G.; Qiu, Y.; Ye, L.; Zhu, Z.; Zhao, J. Occurrence and trophic magnification of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) and their methoxylated derivatives in freshwater fish from Dianshan Lake, Shanghai, China. Environmental Pollution, v.219, p.938-938, 2016.