

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA**

GRACIELLE RODRIGUES PEREIRA

**VALIDAÇÃO E APLICAÇÃO DO BIOENSAIO DR
CALUX[®] PARA TRIAGEM DE CONTAMINAÇÃO POR
DIOXINAS, FURANOS E BIFENILAS POLICLORADAS
EM GORDURA DE AVES**

Belo Horizonte, MG

2019

GRACIELLE RODRIGUES PEREIRA

**VALIDAÇÃO E APLICAÇÃO DO BIOENSAIO DR
CALUX[®] PARA TRIAGEM DE CONTAMINAÇÃO POR
DIOXINAS, FURANOS E BIFENILAS POLICLORADAS
EM GORDURA DE AVES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção de grau de Mestra em Ciência de Alimentos.

Orientadora: Profa. Dra.Scheilla Vitorino
Carvalho de Souza Ferreira
Área de concentração: Ciência de
Alimentos

Belo Horizonte, MG

2019

R696v Rodrigues, Gracielle Pereira.
Validação e aplicação do bioensaio DR CALUX® para triagem de contaminação por dioxinas, furanos e bifenilas policloradas em gordura de aves / Gracielle Rodrigues Pereira. – 2019.
106 f. : il.

Orientadora: Scheilla Vitorino Carvalho de Souza Ferreira.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos.

1. Aves – Gordura – Teses. 2. Dioxinas – Teses. 3. Furanos – Teses. 4. Bifenilas policloradas – Teses. 5. Alimentos – Qualidade – Teses. 6. Validação de método – Teses. I. Souza, Scheilla Vitorino Carvalho de. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. III. Título.

CDD:641.365

Elaborado por Darlene Teresinha Schuler – CRB-6/1759



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS

PPCCA

FOLHA DE APROVAÇÃO

VALIDAÇÃO E APLICAÇÃO DO BIOENSAIO DR CALUX® PARA A TRIAGEM DE DIOXINAS, FURANOS e BIFENILAS POLICLORADAS EM GORDURA DE AVES

GRACIELLE RODRIGUES PEREIRA

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA DE ALIMENTOS, como requisito para obtenção do grau de Mestre em CIÊNCIA DE ALIMENTOS, área de concentração CIÊNCIA DE ALIMENTOS.

Aprovada em 11 de março de 2019, pela banca constituída pelos membros:

Profa. Dra. Scheilla Vitorino C. S. Ferreira (Orientadora e Presidente da Comissão)
Faculdade de Farmácia - UFMG

Profa. Dra. Andréa Melo Garcia de Oliveira
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA)

Profa. Dra. Silvana da Motta
Faculdade de Farmácia - UFMG

Dra. Carolina Sheng Whei Miaw Botelho
Labfar Pesquisa e Serviços Ltda.

Belo Horizonte, 11 de março de 2019.

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos (PPGCA) da Faculdade de Farmácia (FAFAR) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

Ao Laboratório Nacional Agropecuário de Minas Gerais (LANAGRO/MG) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), pela infraestrutura e treinamentos recebidos.

Ao Laboratório de Dioxinas e PCBs (LDP) do LANAGRO/MG, pelo apoio dos colaboradores e disponibilização da infraestrutura.

À Biblioteca da FAFAR e Secretaria do PPGCA, pela assistência nas pesquisas bibliográficas e resolução de questões administrativas.

AGRADECIMENTOS PESSOAIS

Aos meus pais pelo apoio e amor de sempre. Aos meus irmãos e demais familiares pela torcida.

Ao Rafael Mota, por toda a colaboração e amizade ao longo do desenvolvimento deste trabalho.

Ao Rafael Pissinati, pela confiança depositada, oportunidade de aprendizagem e colaboração em todas as etapas de planejamento e realização deste projeto.

Aos demais colegas do LDP, pelas colaborações prestadas.

À Professora Scheilla, pela confiança, apoio e conhecimento compartilhado nesta orientação.

Aos demais membros do grupo de Bromatologia que colaboraram com a realização deste trabalho, especialmente ao Professor Roberto G. Junqueira.

Aos professores do PPCGA da FAFAR/UFMG, pelo conhecimento compartilhado.

Aos membros da Comissão Examinadora Dra. Andrea Melo Garcia de Oliveira, Dra. Carolina S. W. Miaw e Dra. Silvana da Motta pelas considerações que muito contribuíram para a qualidade deste trabalho.

A todo o pessoal do Laboratório de Cultivo Celular do LANAGRO/MG, em especial à Jaque, Raimunda e Anapolino, por toda colaboração, ensinamentos e amizade.

Aos meus amigos Dani, Ivy, Bruno, amigos do Bonde, Deise e Miriane, pela torcida, apoio e amizade.

Aos demais colegas e todos os colaboradores do LANAGRO/MG que tornam a rotina mais leve e agradável.

Às amigas Anna Lydia, Isabela, Isadora e Joyce pelos momentos de descontração e apoio.

RESUMO

O método DR CALUX® foi validado para a análise de dioxinas, furanos e bifenilas policloradas *dioxin-like* em amostras de gordura de aves, com o propósito de aplicação na triagem de amostras do programa nacional do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Amostras naturalmente contaminadas, em três níveis de concentração, além do branco, sendo 20 replicatas por nível, foram analisadas em quatro bateladas analíticas, sob condições de repetibilidade e precisão intermediária. A faixa de concentração validada cobriu os níveis críticos para a triagem, ou seja, próximos aos limites máximos regulamentados e ao limite de corte. A taxa de seletividade foi 90% enquanto as taxas de sensibilidade variaram entre 95 e 100%. As taxas de falsos resultados foram baixas, correspondendo a 10% de falso-positivos e 0% a 5% de falso-negativos. A região de perda de confiabilidade (RPC) foi estimada entre -0,20 (portanto não diferindo de zero) e 0,94 pg TEQ-OMS/g de gordura, considerando-se porcentagens de resultados positivos de 5% e 95%, respectivamente, sendo o limite de detecção definido como o extremo superior desta faixa. Precisão foi demonstrada, com valores de acordância e concordância iguais a 1,00 fora da RPC. Os resultados do método de triagem foram comparados com aqueles obtidos pelo método confirmatório para 36 amostras de rotina. Os resultados encontrados, aliados a uma avaliação do histórico de amostras analisadas para este escopo, no âmbito do programa nacional, indicaram a aplicabilidade do método DR CALUX® como estratégia de triagem, simplificando e trazendo agilidade ao processo de monitoramento dos contaminantes mencionados no contexto da cadeia produtiva de alimentos brasileira.

Palavras-chave: Dioxinas. Furanos. Bifenilas Policloradas. Método de Ensaio Qualitativo. Triagem. Validação Intralaboratorial. Gordura de Aves.

ABSTRACT

The DR CALUX[®] method was validated for the analysis of dioxins, furans and dioxin-like polychlorinated biphenyls in poultry fat aiming its application in the samples screening of the national program of the Ministry of Agriculture, Livestock and Food Supply (MAPA). 20 replicates of naturally contaminated samples, at three concentration levels, and the blank sample were analyzed in four different runs, under repeatability and intermediate precision conditions. The validate range covered the critical levels for the screening, e.g., the maximum limit and the cut-off limit. The selectivity rate was 90% meanwhile the sensitivity rate were between 95 and 100%. The false results rates were low, as the value obtained for false-positives was 10% and for false-negatives were between 0% and 5%. The unreliability region (UR) was estimated between -0,20 (so, not different from zero) and 0,94 pg TEQ-WHO/g of fat, based on 5 and 95% of positive results, respectively, being the detection limit defined as the upper limit of this region (0,94). Method precision was demonstrated with accordance and concordance values of 1,00 out of the UR. 36 routine samples were analyzed and the results were compared with those obtained by the confirmatory method. These results, associated with an evaluation of the historical of samples analyzed for this scope, by the national program, indicated the DR CALUX[®] applicability as a screening strategy, simplifying and promoting a higher sample throughput to the monitoring process of the referred contaminants in the Brazilian food chain.

Keywords: Dioxins. Furans. Polychlorinated Biphenyls. Qualitative Method. Screening. Intralaboratory Validation. Poultry Fat.

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| Lista de Figuras..... | 12 |
| Lista de Tabelas..... | 15 |
| Lista de Abreviações..... | 17 |
| 1. Introdução..... | 18 |
| 2. Objetivos..... | 23 |
| 2.1. Objetivo geral | 23 |
| 2.2. Objetivos específicos..... | 23 |
| 3. Revisão de Literatura..... | 24 |
| 3.1. Dioxinas, Furanos e PCBs..... | 24 |
| 3.1.1. Histórico | 24 |
| 3.1.2. Formação e Características Químicas | 29 |
| 3.1.3. Toxicidade | 33 |
| 3.1.4. Contaminação de Alimentos | 38 |
| 3.2. Controle de Dioxinas em Alimentos..... | 40 |
| 3.2.1. Regulamentações e Programas de Monitoramento | 40 |
| Fonte: Adaptado de BRASIL, 2018a. | 44 |
| 3.2.2. Métodos de Análise..... | 44 |
| 3.2.4. Validação de Métodos Qualitativos | 52 |
| 4. Material e Métodos | 56 |
| 4.1 Equipamentos | 56 |
| 4.2 Material..... | 57 |
| 4.3 Reagentes | 58 |

| | | |
|-------|--|----|
| 4.4 | Kit, Soluções e Misturas..... | 59 |
| 4.5 | Amostras..... | 60 |
| 4.5.1 | Validação do Método..... | 60 |
| 4.5.2 | Aplicação do Método e Comparação com CG-EMAR..... | 64 |
| 4.6 | Metodologia de Análise DR CALUX®..... | 64 |
| 4.6.1 | Cultivo Celular..... | 65 |
| 4.6.2 | Preparo de amostras..... | 68 |
| 4.6.3 | Análise da atividade do receptor Ah mediada por luciferase em células DR CALUX®..... | 70 |
| 4.6.4 | Leitura de resultados..... | 71 |
| 4.7 | Delineamento Experimental..... | 72 |
| 4.7.1 | Validação do Método..... | 72 |
| 4.7.2 | Aplicação do Método e Comparação com CG-EMAR..... | 75 |
| 5 | Resultados e Discussão..... | 76 |
| 5.1 | Validação do Método..... | 76 |
| 5.1.1 | Taxas de falso-positivos (TFP), falso-negativos (TFN), seletividade (TST), sensibilidade (TSB) e confiabilidade (TCF)..... | 76 |
| 5.1.2 | Região de perda de confiabilidade e limite de detecção..... | 78 |
| 5.1.3 | Acordância e Concordância..... | 85 |
| 5.2 | Aplicação do método..... | 88 |
| 5.3 | Análise da aplicabilidade do método considerando o histórico de amostras recebidas no LANAGRO/MG..... | 93 |
| 6 | Conclusão..... | 94 |
| 7 | Referências Bibliográficas..... | 95 |

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1- Estrutura química geral dos dibenzofuranos (PCDFs) à esquerda e das dibenzo-p-dioxinas (PCDDs) à direita..... 31
- Figura 2- Estrutura química do 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina (2,3,7,8-TCDD)..... 31
- Figura 3- Estrutura geral das bifenilas policloradas (PCBs)..... 32
- Figura 4- Ação das dioxinas, representadas pelo 2,3,7,8-TCDF: 2,3,7,8-tetraclorodibenzofurano (2,3,7,8-TCDD) via interação com o receptor de aril hidrocarbonetos (AhR). Arnt: translocador nuclear de AhR; DNA: ácido desoxirribonucleico; XRE: elementos de resposta a xenobióticos. 35
- Figura 5- Atividade das células DR CALUX[®]. AhR: receptor de aril hidrocarbonetos; Arnt: translocador nuclear de AhR; DNA: ácido desoxirribonucleico; XRE: elemento de resposta a xenobióticos. 52
- Figura 6. Representação esquemática da placa de microtitulação após adição da suspensão de células (representada por C) e de tampão PBS (P). 67
- Figura 7- Representação esquemática da placa de microtitulação após exposição, C representa as amostras da curva de calibração, D o dimetilsulfóxido (DMSO), R a amostra padrão BRM 07, utilizada para controle de crescimento celular e S as amostras..... 71
- Figura 8- Representação esquemática da faixa de concentração validada e sua relação com os níveis regulamentados e de decisão para a triagem de dibenzo-p-dioxinas (PCDDs), dibenzofuranos (PCDFs) e bifenilas policloradas (PCBs). LB: *lowerbound*; UB: *upperbound*; LM: limite máximo; A1: amostra 1; A2: amostra 2; A3; amostra 3..... 73
- Figura 9- Representação esquemática de uma bateria analítica do processo de validação. Concentrações expressas em pg TEQ-OMS/g de gordura. R: replicata por nível estudado. 74

Figura 10- Resultados experimentais (○), curva de desempenho (—) e equação obtidos pelo modelo não linear Probit para o método DR CALUX[®] na detecção de dioxinas, furanos e bifenilas policloradas em gordura de frango. 79

Figura 11- Gráfico exploratório dos resíduos (e_i) e coeficiente de determinação (R^2) obtidos para o modelo não linear Probit para o método DR CALUX[®] na detecção de dioxinas, furanos e bifenilas policloradas em gordura de frango. 80

Figura 12- Resultados experimentais (□), curva de desempenho (—) e equação obtidos pelo modelo não linear Sig. 1 para o método DR CALUX[®] na detecção de dioxinas, furanos e bifenilas policloradas em gordura de frango. 81

Figura 13- Gráfico exploratório dos resíduos (e_i) e coeficiente de determinação (R^2) obtidos para o modelo não linear Sig. 1 para o método DR CALUX[®] na detecção de dioxinas, furanos e bifenilas policloradas em gordura de frango. 82

Figura 14- Resultados experimentais (△), curva de desempenho (—) e equação obtidos pelo modelo não linear Sig. 2 para o método DR CALUX[®] na detecção de dioxinas, furanos e bifenilas policloradas em gordura de frango. 83

Figura 15- Gráfico exploratório dos resíduos (e_i) e coeficiente de determinação (R^2) obtidos para o modelo não linear Sig. 2 para o método DR CALUX[®] na detecção de dioxinas, furanos e bifenilas policloradas em gordura de frango. 84

Figura 16- Valores de acordância e concordância em função das concentrações estudadas de dioxinas, furanos e bifenilas policloradas, expressas em equivalência tóxica total (TEQ) segundo Organização Mundial da Saúde (OMS), com destaque para os níveis externos à região de perda de confiabilidade - área sombreada. 87

Figura 17- Comparação dos resultados obtidos pelo método DR CALUX[®] e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas de alta resolução (CG-EMAR) pelo teste de Bland-Altman. Mean: diferença média entre as respostas dos dois métodos, SD: desvio padrão. 89

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1- Valores de TEFs (Fatores de Equivalência Tóxica) estabelecidos pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em 2005 para dibenzo-p-dioxinas (PCDDs), dibenzofuranos (PCDFs) e bifenilas policloradas (PCBs)..... | 36 |
| Tabela 2- Limites de referência adotados para as matrizes analisadas pelo PNCRC quanto à contaminação por dibenzo-p-dioxinas (PCDDs), dibenzofuranos (PCDFs) e bifenilas policloradas (PCBs). | 44 |
| Tabela 3- Trabalhos de avaliação de desempenho ou aplicação do método DR-CALUX [®] em matrizes alimentares. | 47 |
| Tabela 4- Valores de REP (potencial relativo) para dibenzo-p-dioxinas (PCDDs), dibenzofuranos (PCDFs) e bifenilas policloradas (PCBs). | 49 |
| Tabela 5- Comparação entre os parâmetros avaliados nas validações de métodos qualitativos e quantitativos..... | 53 |
| Tabela 6- Limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) do método confirmatório cromatográfico para os diferentes congêneres de dibenzo-p-dioxinas (PCDDs), dibenzofuranos (PCDFs) e bifenilas policloradas (PCBs).. | 60 |
| Tabela 7- Níveis de contaminação das amostras empregadas na validação, por congêneres e equivalência tóxica total (TEQ) da Organização Mundial de Saúde (OMS), determinados pelo método confirmatório cromatográfico..... | 63 |
| Tabela 8- Condições cromatográficas para purificação do extrato de amostra | 69 |
| Tabela 9- Taxas de falso-positivos (TFP), falso-negativos (TFN), seletividade (TST), sensibilidade (TSB) e confiabilidade (TCF) obtidas para a detecção de dioxinas em amostras de gordura de ave pelo método DR CALUX [®] | 77 |

Tabela 10- Valores de acordância (ACO) e condordância (CON) obtidos na detecção de dioxinas em amostras de gordura de ave pelo método DR CALUX® 86

Tabela 11- Resultados das análises de 36 amostras expressos em pg TEQ-OMS/g de gordura (*upperbound*) para o método confirmatório por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas de alta resolução (CG-EMAR) e expressos em BEQ para o método de triagem DR CALUX® 91

LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

| | |
|---------------------|---|
| 1,2,3,4,6,7,8-HpCDD | 1,2,3,4,6,7,8-Heptaclorodibenzo-p-dioxina |
| 1,2,3,4,6,7,8-HpCDF | 1,2,3,4,6,7,8-Heptaclorodibenzofurano |
| 1,2,3,4,7,8,9-HpCDF | 1,2,3,4,7,8,9-Heptaclorodibenzofurano |
| 1,2,3,4,7,8-HxCDD | 1,2,3,4,7,8-Hexaclorodibenzo-p-dioxina |
| 1,2,3,4,7,8-HxCDF | 1,2,3,4,7,8-Hexaclorodibenzofurano |
| 1,2,3,4-TCDD | 1,2,3,4-Tetraclorodibenzo-p-dioxina |
| 1,2,3,6,7,8-HxCDD | 1,2,3,6,7,8-Hexaclorodibenzo-p-dioxina |
| 1,2,3,6,7,8-HxCDF | 1,2,3,6,7,8-Hexaclorodibenzofurano |
| 1,2,3,7,8,9-HxCDD | 1,2,3,7,8,9-Hexaclorodibenzo-p-dioxina |
| 1,2,3,7,8,9-HxCDF | 1,2,3,7,8,9-Hexaclorodibenzofurano |
| 1,2,3,7,8-PeCDD | 1,2,3,7,8-Pentaclorodibenzo-p-dioxina |
| 1,2,3,7,8-PeCDF | 1,2,3,7,8-Pentaclorodibenzofurano |
| 2,3,4,6,7,8-HxCDF | 2,3,4,6,7,8-Hexaclorodibenzofurano |
| 2,3,4,7,8-PeCDF | 2,3,4,7,8-Pentaclorodibenzofurano |
| 2,3,7,8-TCDD | 2,3,7,8-Tetraclorodibenzo-p-dioxina |
| 2,3,7,8-TCDF | 2,3,7,8-Tetraclorodibenzofurano |
| ACO | Acordância |
| AhR | <i>Arylhydrocarbon receptor</i> |
| Arnt | Translocador nuclear de AhR |
| BEQs | Equivalentes Bioanalíticos |
| BDS | BioDetection System |
| CDTA | cido trans-1,2,diaminociclohexano,N,N,N',N'-tetraacético monohidratado |
| CE | Comissão Europeia |
| CFIA | <i>Canadian Food and Inspection Agency</i> |
| CG | Cromatografia gasosa |

| | |
|------------------|--|
| CG-EM | Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas |
| CG-EMAR | Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas de alta resolução |
| CLAE | Cromatografia líquida de alta eficiência |
| CON | Concordância |
| DL-PCBs | <i>Dioxin-like</i> PCBs |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| DR CALUX® | <i>Dioxin Responsive Chemical-Activated Luciferase gene eXpression</i> |
| DDT | Diclorodifeniltricloroetano |
| DTT | Ditiotreitol |
| EDTA | Ácido etilenodiaminotetraacético |
| EFSA | <i>European Food Safety Authority</i> |
| FAO | <i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i> |
| FDA | <i>Food and Drug Administration</i> |
| GEMS/Food | <i>Global Environment Monitoring System's Food Contamination Monitoring and Assessment Programme</i> |
| HAHs | Hidrocarbonetos aromáticos halogenados |
| IARC | <i>International Agency for Research on Cancer</i> |
| INMETRO | Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia |
| LANAGRO/MG | Laboratório Nacional Agropecuário em Minas Gerais |
| LD | Limite de detecção |
| LD ₅₀ | Dose letal média |
| LMs | Limites máximos |
| MAPA | Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento |
| MERCOSUL | Mercado Comum do Sul |
| MS | Ministério da Saúde |
| NDL-PCBs | <i>Non-dioxin-like</i> PCBs |
| OCDD | Octaclorodibenzo-p-dioxina |
| OCDF | Octaclorodibenzofurano |

| | |
|---------------|--|
| OMS | Organização Mundial de Saúde |
| p.a. | Para análise |
| p.a.r. | Para análise de resíduos |
| PBS | Solução salina fosfatada tamponada |
| PCBs | Bifenilas policloradas |
| PCDDs | Dibenzo-p-dioxinas policloradas |
| PCDFs | Dibenzo-furanos policlorados |
| PNCRC | Programa Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em Produtos de Origem Animal |
| REDE LANAGROS | Rede Nacional de Laboratórios Agropecuários |
| REP | <i>Relative potency</i> ou potencial relativo |
| RPC | Região de perda de confiabilidade |
| SFB | Soro fetal bovino |
| SIF | Serviço de Inspeção Federal |
| TCF | Taxa de confiabilidade |
| TEFs | <i>Toxic equivalency factors</i> ou fatores de equivalência tóxica |
| TEQ | <i>Total toxic equivalence</i> ou equivalência tóxica total |
| TFN | Taxa de falso-negativos |
| TFP | Taxa de falso-positivos |
| TSB | Taxa de sensibilidade |
| TST | Taxa de seletividade |
| UE | União Europeia |
| USDA | <i>United States Department of Agriculture</i> |
| USEPA | <i>United States Environmental Protection Agency</i> |
| XRE | Elementos de resposta a xenobióticos |
| WHO | <i>World Health Organization</i> |

1. Introdução

As dibenzo-p-dioxinas policloradas (PCDDs) ou dioxinas, os dibenzofuranos policlorados (PCDFs) ou furanos e as bifenilas policloradas (PCBs) constituem um grupo de hidrocarbonetos aromáticos halogenados (HAHs) (REINER *et al.*, 2006), constituídos por dois anéis benzênicos e átomos de cloro, os quais estão ligados diretamente aos anéis (CHOBTANG *et al.*, 2011; HITES, 2011). Com as diversas possibilidades para as posições dos átomos de cloro, várias estruturas são possíveis para as dioxinas, sendo que cada uma delas determina um congênere (SCHECTER, 2012).

A produção das dioxinas e dos furanos se dá, de maneira não intencional, em processos industriais diversos, bem como em incêndios florestais e outras atividades em que há queima de matéria orgânica e presença de cloro (ASSUNÇÃO & PESQUERO, 1999). As PCBs são produzidas industrialmente e, devido às suas características de grande estabilidade térmica e química e também às suas propriedades bacteriostáticas, formulações à base de PCBs foram largamente aplicadas para finalidades de isolamento elétrico, como também em produtos de limpeza e diluentes de agrotóxicos (MMA, 2019).

Tais compostos se acumulam no meio ambiente e nas diversas cadeias alimentares, pois apresentam alta estabilidade química, sendo resistentes à degradação metabólica e a tratamentos químicos (CHOBTANG *et al.*, 2011; ROSE *et al.*, 2017). Desta forma, a contaminação de alimentos por dioxinas, furanos e PCBs constitui um tópico de grande preocupação para as autoridades em segurança alimentar, devido à alta toxicidade ao organismo humano (CHOBTANG *et al.*, 2011).

A acumulação das dioxinas, furanos e PCBs após ingestão, devido ao longo período de meia-vida no organismo humano (aproximadamente sete anos para indivíduos adultos), bem como suas interações com o organismo

corroboram para a sua toxicidade (HITES, 2011). Diversos efeitos da exposição a esses compostos já foram observados, entre eles desordens no sistema reprodutor, imunossupressão, perturbações endócrinas, anormalidades cutâneas e desenvolvimento de câncer (CHOBTANG *et al.*, 2011; REINER *et al.*, 2006).

Produtos de origem animal, como carnes, ovos e produtos lácteos são as principais fontes dos contaminantes em questão para a população humana (HOOGENBOOM *et al.*, 2015). As dioxinas, furanos e PCBs se acumulam nas plantas, solo e água próximos aos locais onde são geradas. Pelo contato ou ingestão desses recursos, os animais promovem sua bioacumulação. Os referidos contaminantes irão se depositar nos tecidos adiposos desses animais, fazendo com que os produtos derivados deles, ricos em conteúdo de gordura, constituam importantes vias de inserção de tais substâncias no organismo humano (RYSVY *et al.*, 2012).

A estratégia das autoridades brasileiras em segurança alimentar para a garantia da inocuidade de grande parcela dos alimentos ofertada ao consumo, quanto à presença de resíduos decorrentes do emprego de drogas veterinárias, agroquímicos e contaminantes ambientais é o Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em Produtos de Origem Animal (PNCRC Animal), do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (BRASIL, 1999, 2010). O PNCRC Animal visa, entre outros, monitorar o frango produzido no Brasil quanto à contaminação por dioxinas, furanos e PCBs, por meio da análise da gordura dos animais destinados ao consumo humano (BRASIL, 2017a).

A técnica de referência para análise destes contaminantes é a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas de alta resolução (CG/EMAR). Apesar de ser capaz de identificar e quantificar cada congênera (EUROPEAN COMMISSION- EC, 2017), trata-se de uma técnica laboriosa, cara e que requer especialistas treinados para sua execução (CHOBTANG *et al.*, 2011).

Existe uma tendência dos laboratórios de análise de alimentos em adotar métodos mais modernos que as técnicas analíticas tradicionais. Esses novos métodos constituem alternativas mais limpas (oferecem menores danos ao meio ambiente), de simples operação e oferecem um bom custo-benefício, além de atenderem às demandas de segurança, qualidade e rastreabilidade alimentar (CHOBTANG *et al.*, 2011; CIFUENTES, 2012).

Usualmente, na análise de dioxinas, furanos e PCBs, são adotados dois diferentes tipos de métodos, os confirmatórios e os de triagem. Na triagem, o resultado obtido para as amostras são comparados com um valor de corte e, aquelas amostras tidas como suspeitas (teores de dioxinas acima do valor de corte estabelecido), são submetidas à análise pelo método confirmatório, que emprega a técnica de referência CG/EMAR. (MALISCH & KOTZ, 2014).

Técnicas que envolvem ensaios biológicos vêm sendo utilizadas para a triagem de amostras destinadas à análise de dioxinas e furanos. Elas apresentam baixo custo e resposta rápida quando comparadas aos métodos tradicionais, além de permitirem uma redução significativa no número de amostras destinadas aos métodos confirmatórios de referência (CHOBTANG *et al.*, 2011; REINER *et al.*, 2006).

O método DR CALUX[®] (*Dioxin Responsive Chemical-Activated LUCiferase gene eXpression*), patenteado pela empresa BioDetection System (BDS), é uma opção de método de triagem para a detecção de dioxinas e furanos. Trata-se de um bioensaio que utiliza células modificadas geneticamente que respondem às dioxinas e compostos relacionados quando em contato com algum deles (VROMMAN *et al.*, 2012). Uma vez no meio intracelular, as dioxinas interagem com o receptor AhR (*arylhydrocarbon receptor*), levando à formação de um complexo que age como modulador da expressão gênica (SORG, 2014).

O complexo formado pela interação de dioxinas com o receptor AhR nas células DR CALUX[®] é capaz de modular a expressão de um gene codificante

da enzima luciferase. Quando estas células entram em contato com os compostos em questão, elas irão produzir a enzima luciferase, de forma dose-dependente. Sendo assim, é possível estimar o teor de dioxinas e furanos de uma amostra por meio da análise da atividade da luciferase de células DR CALUX[®] que foram expostas a esta amostra. A atividade da enzima é medida por leitura espectrofotométrica do produto da reação da luciferase com seu substrato, e o resultado é comparado com os valores encontrados para uma curva padrão de 2,3,7,8-TCDD (2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina), o congênera mais tóxico das dioxinas (WINDAL *et al.*, 2005).

Para se garantir a qualidade metrológica dos resultados analíticos obtidos por um método, é necessário que o mesmo seja validado. A partir da validação, é possível mostrar que o método analítico apresenta rastreabilidade, comparabilidade e confiabilidade nos seus resultados (BRASIL, 2011; GONDIM *et al.*, 2011). Este processo se faz necessário em análises quantitativas bem como em análises por métodos de triagem qualitativos (GONDIM *et al.*, 2011). Gondim *et al.* (2014) propuseram e demonstraram a aplicabilidade de um procedimento de validação para métodos qualitativos, o qual permite a avaliação de parâmetros de desempenho específicos para métodos dessa natureza.

Trabalhos da literatura reportaram estudos de desempenho do método DR CALUX[®] para algumas matrizes alimentares, incluindo leites de cabra e bovino (FOCHI *et al.*, 2008); ração e óleo de peixe (GIZZI *et al.*, 2005); óleo de peixe e peixe (HOOGENBOOM *et al.*, 2006); carne bovina, frango, ovo, leite, peixe e ração (HUSAIN *et al.*, 2014); carne bovina e ração (JEONG *et al.*, 2005); óleos vegetal e de peixe e leite (VANLOCO *et al.*, 2004); ração, óleo vegetal, óleo de peixe e gordura animal (PISKORSKA *et al.*, 2017); peixe (TSUTSUMI *et al.*, 2003); ração, peixe, leite, ovo e gordura animal (VANDERPERREN *et al.*, 2010); produtos lácteos, ovo, peixe, gordura animal e óleo vegetal (VROMMAM *et al.*, 2012). Em sua maioria, esses trabalhos utilizaram amostras fortificadas, e não naturalmente contaminadas, além disso

nenhum deles apresentou uma abordagem completa de validação qualitativa para a matriz gordura de frango.

Considerando, assim, as vantagens do emprego de métodos de triagem associados aos métodos confirmatórios, bem como o fato de que tais estratégias ainda não são empregadas no programa nacional de monitoramento de contaminantes em alimentos, o presente estudo objetivou validar e aplicar o método DR CALUX[®] para detecção de dioxinas, furanos e PCBs em amostras de gordura de aves.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Validar e aplicar o método DR CALUX® para detecção de dioxinas, furanos e PCBs na matriz gordura de aves, visando sua implantação no programa de monitoramento nacional.

2.2. Objetivos específicos

Analisar amostras de gordura de aves não contaminadas e naturalmente contaminadas, em níveis de concentração próximos ao limite máximo regulamentado, previamente confirmadas por CG/EMAR, para avaliar o desempenho do método DR CALUX®, por meio do estudo dos parâmetros de validação de métodos qualitativos: taxas de falso-positivos (TFP), de falso-negativos (TFN), de sensibilidade (TSB), de seletividade (TST), de confiabilidade (TCF), acordância (ACO), concordância (CON), limite de detecção (LD) e região de perda de confiabilidade (RPC).

Aplicar o método DR CALUX® validado na triagem de amostras do programa de monitoramento nacional da contaminação de gordura de aves por dioxinas, furanos e PCBs, com posterior confirmação por CG/EMAR para todas as amostras, visando à comparação dos resultados frente a um método de referência.

Avaliar a aplicabilidade de método DR CALUX® como estratégia de triagem no monitoramento de contaminação de gordura de frango por dioxinas, furanos e PCBs, tendo como base os dados históricos do programa nacional do MAPA.

3. Revisão de Literatura

3.1. Dioxinas, Furanos e PCBs

3.1.1. Histórico

As dioxinas, os furanos e as PCBs constituem um grupo de contaminantes alimentares que ganhou notoriedade a partir da década de 1950 (HOOGENBOOM *et al.*, 2015).

Apesar da preexistência dessas substâncias na atmosfera, a exposição humana às PCDDs e PCDFs se deu, principalmente, com o advento da Revolução Industrial (século XVIII). Posteriormente, na década de 1940, esta exposição aumentou abruptamente, devido à produção e o uso de herbicidas policlorados (SCHRENK & CHOPRA, 2012). Em meados da década de 1950, surgiram os primeiros estudos que avaliaram os efeitos tóxicos das dioxinas (HUFF & WASSOM, 1973) e o primeiro evento que destacou a importância desses compostos como contaminantes na cadeia alimentar, a ocorrência da “doença de edema” em frangos nos Estados Unidos (HOOGENBOOM *et al.*, 2015).

A primeira exposição humana a altos níveis de dioxinas sobre a qual se tem dados ocorreu em 1949, devido a um acidente numa fábrica de herbicidas nos Estados Unidos (BRETTHAUER *et al.*, 1991; INSTITUTE OF MEDICINE, 1994). Naquele tempo, a alta toxicidade desses compostos ainda não era conhecida e também não era sabido que eles eram formados como subprodutos na produção do herbicida triclorofenol (ZOBER *et al.*, 1994). Dezenas de pessoas foram afetadas, muitas apresentaram cloroacne e outras morreram devido ao desenvolvimento de câncer após a exposição a tais contaminantes (BRETTHAUER *et al.*, 1991).

Em 1953, pelo menos 70 pessoas foram expostas a um acidente durante a fabricação do mesmo herbicida (triclorofenol) na Alemanha. Estudos relataram que estes indivíduos apresentaram diversas manifestações de toxicidade, como desenvolvimento de câncer, cloroacne e danos hepáticos (BRETTHAUER *et al.*, 1991). Apenas em 1957, quando a 2,3,7,8-TCDD foi identificada como subproduto da fabricação de triclorofenol, os efeitos tóxicos notados após este evento foram atribuídos às dioxinas (ZOBER *et al.*, 1994).

Ainda na década de 1950, no ano de 1957, o motivo da morte de milhares de frangos nos Estados Unidos foi justificado pela presença de substâncias lipofílicas tóxicas presentes nesses animais e nas rações que eram destinadas a eles. Essas substâncias, que ainda não haviam sido identificadas, causavam efeitos conhecidos como “doença de edema”, e foram denominadas de “fator edema” (FIRESTONE, 1973). Dez anos mais tarde, quando outro incidente envolvendo a contaminação de frangos pelo “fator edema” já havia ocorrido, as dioxinas foram identificadas como o fator em questão. Em ambos os incidentes, as aves tiveram contato com pesticidas que continham clorofenóis (HOOGENBOOM *et al.*, 2015).

Seguindo os eventos supramencionados, o episódio do “Agente Laranja” ganhou notoriedade a partir de 1961. Naquele ano, o governo dos Estados Unidos iniciou o uso extensivo de herbicidas clorados como agentes desfolhantes na guerra no Vietnã (SCHECTER *et al.*, 2012). Apesar da preocupação, advertências e solicitações por parte de cientistas para que o governo interrompesse o uso desses agentes químicos, eles continuaram sendo utilizados por mais dez anos (INSTITUTE OF MEDICINE, 1994).

O problema seria menor não fosse à contaminação por 2,3,7,8-TCDD de dois terços dos herbicidas utilizados. Milhares de hectares de terras receberam os herbicidas e milhões de pessoas foram atingidas pelos seus efeitos. Ao voltarem para seu país de origem, os militares americanos logo começaram a questionar a relação entre seus problemas de saúde eminentes e a exposição aos herbicidas durante a guerra (INSTITUTE OF MEDICINE, 1994;

SCHECTER *et al.*, 2012). Segundo SCHRENK & CHOPRA (2012), os herbicidas também estavam contaminados por PCBs.

Diante da vasta exposição dos militares americanos, da população local e do meio ambiente às dioxinas durante a guerra no Vietnã, na década de 1970 o governo dos Estados Unidos promoveu estudos para avaliar os efeitos fisiológicos e ecológicos do emprego dos herbicidas naquele período (INSTITUTE OF MEDICINE, 1994). Nessa década, houve um aumento considerável de publicações que tiveram como alvo as dioxinas e, desde então, diversos trabalhos trataram deste assunto (HUFF & WASSOM, 1973).

Nos anos seguintes, outros eventos envolvendo dioxinas se destacaram. Em 1976, entre um e três quilogramas de 2,3,7,8-TCDD, em meio a outros químicos, foram liberados para o meio ambiente após um acidente ocorrido durante a fabricação de 2,4,5-triclorofenol na cidade de Seveso. A fumaça de compostos tóxicos emitidos atingiu uma área habitada por aproximadamente 37 mil pessoas e levou à morte de milhares de animais nas proximidades da fábrica nos dias que seguiram o episódio. Estudos sobre a população afetada ainda foram conduzidos mais de trinta anos após o ocorrido, no intuito de avaliar os efeitos das dioxinas na saúde humana (SCHRENK & CHOPRA, 2012; WHO, 2016).

Em 2004, um caso de envenenamento por dioxinas ganhou destaque na mídia mundial. Viktor Yushchenko, candidato a presidência da Ucrânia, apresentou fortes dores de cabeça e náuseas horas após um jantar com grupos relacionados à eleição ao qual ele era candidato. Dias depois, surgiram sintomas mais severos, que foram atribuídos às substâncias químicas que normalmente se encontram ausentes nos alimentos. A aparência do candidato mudou completamente, de um homem jovem e saudável para aquela de um indivíduo com nítidas alterações na pele e com saúde debilitada. Alguns meses mais tarde, descobriu-se que as referidas substâncias eram dioxinas. Apesar do caso não ter sido totalmente resolvido, acredita-se que tenha ocorrido um envenenamento (SCHECTER *et al.*, 2012).

Para a análise dos compostos tóxicos que acometeram Viktor Yushchenko, a técnica de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) e o bioensaio DR-CALUX[®] foram utilizados (SCHECTER *et al.*, 2012). A CG-EM foi utilizada na análise de dioxinas pela primeira vez na década de 1970, e se tornou o “padrão ouro” para esta análise na década seguinte (REINER *et al.*, 2006; SCHECTER *et al.*, 2006). Ainda na atualidade, a CG-EM é considerada a melhor técnica para a identificação e quantificação de dioxinas em diversas matrizes, com o emprego de detectores de alta resolução (HOOGENBOOM *et al.*, 2015).

A síntese das PCBs teve início na Alemanha, por volta de 1800, mas sua produção em escala industrial iniciou na década de 1920 (PENTEADO & VAZ, 2001). Nessa época, equipamentos elétricos começavam a ser utilizados no mundo todo; sendo que os transformadores elétricos utilizados eram isolados por material de característica combustível (MMA, 2019).

A ocorrência de alguns acidentes envolvendo a combustão desses materiais isolantes levou à sua substituição por outros líquidos, não inflamáveis. Neste contexto, as PCBs começaram a ser largamente utilizadas, pois atendiam aos requisitos de serem bons isolantes e não promoviam a propagação do fogo, em caso de acidentes (MMA, 2019).

Alguns anos mais tarde, já na década de 1960, após uma série de estudos sobre poluentes perigosos, realizados pela Organização das Nações Unidas (ONU), foram detectadas as PCBs em meio às análises do herbicida diclorodifeniltricloroetano (DDT), de forma que estes compostos foram incluídos na relação dos poluentes em questão (MMA, 2019).

Ainda na década de 60, um acidente numa indústria alimentícia na cidade de Yusho, no Japão, levou à contaminação de óleo de arroz pelas PCBs que eram componentes de equipamentos envolvidos na produção. Devido à falta de cor, cheiro e textura notáveis das PCBs, os consumidores não perceberam qualquer alteração no produto e o consumiram normalmente, o

que levou a uma série de sintomas na população daquela região nos dias que se seguiram à contaminação. Alterações na pele, mucosas, cloroacne, perda de peso, disfunção endócrina, entre outros, acometeram diversas crianças e adultos (SCHRENK & CHOPRA, 2012).

Outro acidente envolvendo exposição da população às PCBs, também por meio da ingestão de óleo de arroz contaminado, ocorreu em Taiwan, em 1979, e ficou conhecido como desastre de Yu-Cheng. Os mesmos sintomas das vítimas de Yusho acometeram as vítimas de Taiwan, além de anemia, dores nos ossos, e os mesmos efeitos a longo prazo do acidente anterior (por exemplo: aumento no número de ocorrências de abortos e disfunção na glândula tireoide) (PENTEADO & VAZ, 2001; SCHRENK & CHOPRA, 2012).

Atualmente, a produção e o uso das PCBs é regulamentado em muitos países, sendo sua fabricação e comercialização proibidas em todo o território Brasileiro (MMA, 2019).

Análises de diferentes matrizes, como solo, ar, vegetação e leite de origem animal mostram que a contaminação mundial por dioxinas e furanos diminuiu a partir dos anos 1990 (REINER *et al.*, 2006). Na Europa, os resultados de programas de monitoramento desses compostos pela Autoridade em Segurança Alimentar Europeia, *European Food Safety Authority* (EFSA), mostraram que, de maneira geral, houve um declínio nos níveis presentes nos alimentos estudados, entre meados da década de 1990 e o ano de 2010 (EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY- EFSA, 2012). Segundo o *United States Department of Agriculture* (USDA) (2015), a ingestão diária desses compostos pela população humana diminuiu a partir da década de 1970.

Apesar dessa tendência de diminuição dos níveis de dioxinas e furanos, toda a população humana está exposta, mesmo que a um nível de concentração mínimo, ou de *background*, portanto, as dioxinas podem ser encontradas em qualquer indivíduo, com níveis maiores naqueles que vivem em países mais industrializados (SCHECTER *et al.*, 2006; WHO, 2016).

3.1.2. Formação e Características Químicas

As dioxinas e os furanos podem ser produzidos de maneira não intencional em processos de incineração (industrial ou queima de lixo doméstico), incêndios florestais, queimas vulcânicas, branqueamento de polpa celulósica com utilização de compostos clorados, fabricação de alguns pesticidas, herbicidas e fungicidas, entre outros. As ações antropológicas são as maiores responsáveis pela produção desses contaminantes, sendo apenas uma pequena quantidade das dioxinas originada dos processos naturais supramencionados (REINER *et al.*, 2006; SCHECTER *et al.*, 2006).

Quimicamente, o grupo das dioxinas inclui as PCDDs e os PCDFs (SCHRENK & CHOPRA, 2012). Esses compostos não possuem aplicações comerciais, eles são produzidos de forma não intencional, por exemplo, como subprodutos na produção de herbicidas organoclorados e em processos de combustão em que haja presença de cloro (SCHRENK & CHOPRA, 2012; HUANG & BUEKENS, 1995). As PCBs são utilizadas desde o início do século XX, entre outros, como isolantes em transformadores e capacitores elétricos na indústria. Treze dos 209 diferentes tipos de PCBs possuem estruturas e toxicidade semelhantes àsquelas das dioxinas, sendo nesses casos denominados DL-PCBs (do inglês *dioxin-like* PCBs) (SCHECTER *et al.*, 2006; STOCKHOLM CONVENTION, 2012).

Acredita-se que a formação das dioxinas e furanos possa ocorrer por dois diferentes mecanismos. O primeiro ocorre na faixa de temperatura de 500 °C a 800 °C e é conhecido como processo homogêneo. Nele, as principais reações são aquelas de rearranjo de precursores clorados, como clorofenol e clorobenzenos (ZHOU *et al.*, 2015).

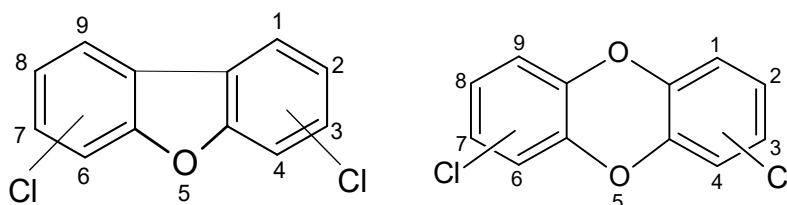
O segundo processo é conhecido como formação heterogênea e pode ocorrer via dois mecanismos distintos. Um deles é a síntese “de novo”, onde ocorre a transferência de cloro da fase gasosa para átomos de carbono,

através do efeito catalítico da superfície das cinzas metálicas presentes. O outro mecanismo constitui a teoria precursora, onde subprodutos da combustão, incluindo clorofenol e clorobenzenos, reagem na superfície catalítica das cinzas por meio de reações de condensação. Os mecanismos heterogêneos ocorrem entre 200 °C e 400 °C (GULLETT *et al.*, 2000; ZHOU *et al.*, 2015).

As dioxinas e furanos possuem estruturas planares e, quando puras, são sólidos cristalinos incolores, que possuem baixas pressões de vapor (SCHRENK & CHOPRA, 2012). As PCBs apresentam-se como líquidos, de alta densidade e viscosidade, de forma que são misturadas ao triclorobenzeno para obtenção da viscosidade adequada às suas diversas aplicações (MMA, 2019).

Os três grupos de compostos mencionados apresentam estruturas parecidas, pois são HAHs (REINER *et al.*, 2006), com a presença de dois anéis benzênicos e átomos de cloro ligados a esses anéis (CHOBTANG *et al.*, 2011; SCHECTER *et al.*, 2006). Não só a quantidade, mas também as posições dos átomos de cloro variam nas dioxinas, nos furanos e nas PCBs, sendo que cada configuração determina um congênere. Para as dioxinas e furanos, constituídas de uma estrutura planar tricíclica, composta por dois anéis aromáticos conectados por dois átomos de oxigênio e quatro a oito átomos de cloro ligados aos átomos de carbono, são possíveis 210 congêneres. Desses, 75 são PCDDs e são 135 PCDFs (SCHECTER *et al.*, 2006, 2012). A estrutura química geral desses compostos pode ser visualizada na **Figura 1**.

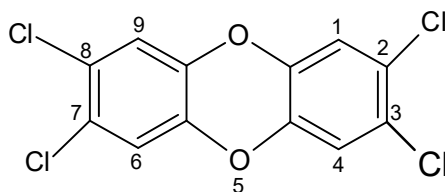
Figura 1- Estrutura química geral dos dibenzofuranos (PCDFs) à esquerda e das dibenzo-p-dioxinas (PCDDs) à direita.



Fonte: Adaptado de SCHECTER *et al.*, 2012.

Os congêneres que possuem átomos de cloro nas posições 2, 3, 7 e 8 possuem maior destaque por serem relativamente resistentes à degradação metabólica. Como resultado dessa resistência, eles se acumulam no corpo humano, principalmente nas gorduras subcutâneas e viscerais e no fígado (HOOGENBOOM *et al.*, 2015). No total, existem 17 PCDDs e PCDFs com átomos de cloro nessas posições (SCHRENK & CHOPRA, 2012). A estrutura do congêneres mais tóxico, o 2,3,7,8-TCDD, cuja meia vida em humanos é de aproximadamente sete anos (HOOGENBOOM *et al.*, 2015), é mostrada na **Figura 2**.

Figura 2- Estrutura química do 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina (2,3,7,8-TCDD).

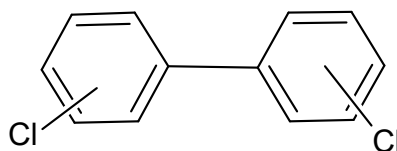


Fonte: Adaptado de RYSAVY *et al.*, 2012.

As PCBs (**Figura 3**) podem ser de dois tipos: coplanares e não coplanares; sendo que os congêneres coplanares apresentam os dois anéis

benzênicos no mesmo plano. As PCBs consideradas DL-PCBs possuem no mínimo quatro átomos de cloro em sua estrutura e são do primeiro tipo. A coplanaridade só é possível nesses compostos (DL-PCBs) quando as posições orto não são substituídas (PCBs não-orto) ou são substituídas em apenas uma posição (PCBs mono-orto). As PCBs que não se incluem no grupo das DL-PCBs são chamadas de NDL-PCBs (*non-dioxin-like* PCBs) (HOOGENBOOM *et al.*, 2015; SCHECTER *et al.*, 2012).

Figura 3- Estrutura geral das bifenilas policloradas (PCBs).



Fonte: Adaptado de SCHECTER *et al.*, 2012.

As PCDDs, os PCDFs e as PCBs possuem estabilidade química e térmica, são altamente lipofílicas, apresentando alta solubilidade em gorduras e solventes orgânicos e praticamente nenhuma solubilidade em água. Devido a essas características, elas estão essencialmente associadas a particulados e matéria orgânica em amostras de meio ambiente e se acumulam na cadeia alimentar (SCHRENK & CHOPRA, 2012; WHO, 2002).

Em virtude de sua persistência, esses compostos podem ser transportados pelo mundo todo, ligados a partículas de aerossol e acometer as áreas expostas a eles, mesmo anos após a sua chegada. Por exemplo, regiões do Vietnã onde os herbicidas eram estocados, espalhados ou onde eram feitos os carregamentos dos aviões durante a guerra na década de 1960, apresentavam, ainda no início do século seguinte, altos níveis de dioxinas no ambiente, na população humana e nos alimentos (SCHRENK & CHOPRA, 2012; SCHECTER *et al.*, 2012).

A destruição de material contaminado por dioxinas e furanos deve ser feita pela incineração a temperaturas maiores que 800 °C (WHO, 2016). Para as PCBs há outras alternativas, a depender na natureza do material, sendo a incineração aplicável a sólidos e líquidos (MMA, 2019).

3.1.3. Toxicidade

A ingestão de alimentos contaminados constitui a principal rota de exposição de animais e humanos às dioxinas (CHOBTANG *et al.*, 2011; WHO, 2016). Depois de serem absorvidos pelo trato gastrointestinal, alguns congêneres são metabolizados em compostos não tóxicos, os quais serão excretados; outros congêneres, em particular as dioxinas e furanos 2,3,7,8-substituídas e as PCBs, as quais contêm de sete a oito átomos de cloro, são mais resistentes à degradação, permanecem estocados nos tecidos e órgãos, sendo dificilmente eliminados do organismo (CHOBTANG *et al.*, 2011).

Diversos efeitos da exposição a esses compostos já foram observados, entre eles desordens no sistema reprodutor, imunossupressão, perturbações endócrinas, anormalidades cutâneas e desenvolvimento de câncer. Em especial, o contato com poucos microgramas de 2,3,7,8-TCDD por quilo de massa corporal levou a perda de peso, necrose hepática e teratogênese em espécies de laboratório. Como a principal “marca” da contaminação por 2,3,7,8-TCDD, tem-se a cloroacne, uma grave desordem cutânea caracterizada pela presença de cravos, cistos e pústulas nas bochechas, axilas e em outras regiões do corpo (CHOBTANG *et al.*, 2011; SCHRENK & CHOPRA; 2012, REINER *et al.*, 2006).

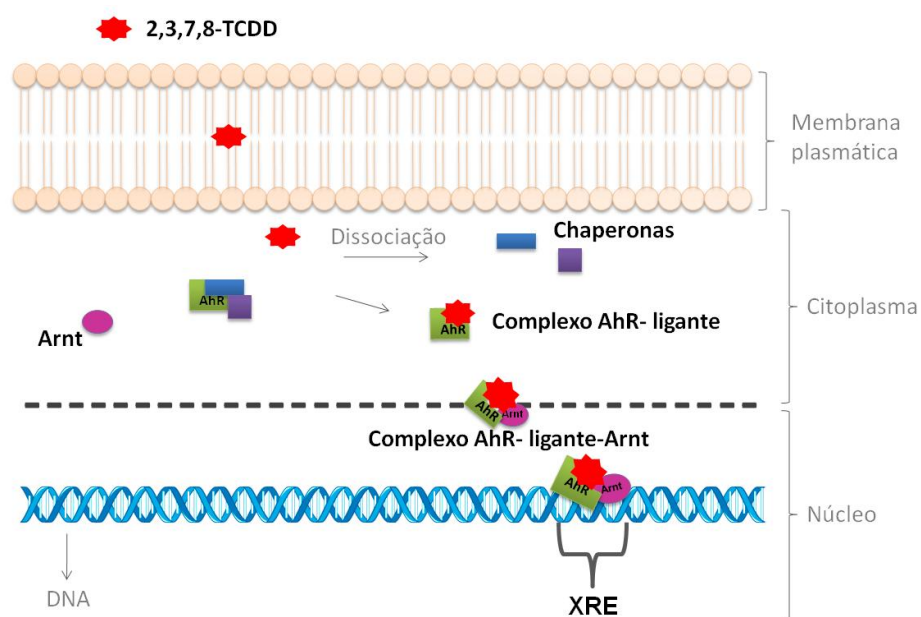
A *International Agency for Research on Cancer* (IARC) da Organização Mundial de Saúde (OMS) classificou o 2,3,7,8-TCDD como carcinogênico humano, sendo que as PCDDs e PCDFs são capazes de causar câncer em diversas espécies e em diversos órgãos. A dose letal média (LD₅₀) do 2,3,7,8-TCDD para humanos é estimada entre 4 a 6 mg/ kg de massa corporal

(SCHRENK & CHOPRA, 2012; WHO, 2016) e sua meia vida em homens adultos é de aproximadamente oito anos (WHO, 2002).

O principal modo de ação das dioxinas, furanos e PCBs é mediado pela sua interação com uma proteína receptora intracelular, o receptor AhR. Este receptor está presente na maioria dos tecidos dos vertebrados, e está localizado no citosol, associado a proteínas chaperonas (SCHRENK & CHOPRA, 2012). Ele pertence a uma família de fatores de transcrição que estão envolvidos na regulação de vários processos fisiológicos, sendo encontrado, entre outros, nos pulmões, fígado e placenta humana (SORG, 2014).

Quando um ligante do receptor AhR, como as dioxinas, entra na célula, ele se liga ao receptor e ocorre a dissociação das proteínas chaperonas e formação do complexo AhR-ligante. Esse complexo se liga a um fator de transcrição, uma proteína chamada de translocador nuclear de AhR, o Arnt. O novo complexo formado, AhR-ligante-Arnt, se liga a sequências específicas do DNA, chamadas de elementos de resposta a xenobióticos (XRE), que são encontradas na região promotora de vários genes. A ligação do complexo a essas regiões modula a expressão dos genes a jusante (*downstream*). Esta atividade do AhR é conhecida como via canônica (SORG, 2014). A ação das dioxinas (a exemplo, do 2,3,7,8-TCDD), pela via canônica é ilustrada na **Figura 4**.

Figura 4- Ação das dioxinas, representadas pelo 2,3,7,8-TCDF: 2,3,7,8-tetraclorodibenzofurano (2,3,7,8-TCDD) via interação com o receptor de aril hidrocarbonetos (AhR). Arnt: translocador nuclear de AhR; DNA: ácido desoxirribonucleico; XRE: elementos de resposta a xenobióticos.



Fonte: Adaptado de SORG, 2014.

Apesar dessa classe alvo comum do AhR (a classe dos XREs), diversos outros genes, com funcionalidades não relacionadas, podem ser regulados por este receptor. Tais genes variam de acordo com o tipo celular e o organismo em questão. O receptor AhR pode interagir também com outras vias de sinalização intracelular e extracelular, por exemplo, com vias relacionadas ao controle do ciclo celular, homeostase do cálcio e proteínas quinase. Tudo isto torna a ação tóxica das dioxinas mais complexa do que seria caso o receptor AhR tivesse apenas uma via de ação (SCHRENK & CHOPRA, 2012; SORG, 2014).

O modo de ação via receptor AhR auxilia na avaliação da toxicidade das dioxinas, pois as legislações acerca dos limites permitidos em alimentos e os níveis de tolerância humana levam em consideração 17 PCDD e PCDFs, além

de 12 DL-PCBs. Entretanto, na maioria das vezes, esses contaminantes não são encontrados individualmente no ambiente ou no alimento, mas sim como misturas dessas substâncias, sendo que cada uma possui um potencial tóxico e um comportamento cinético distinto (SCHRENK & CHOPRA, 2012; HOOGENBOOM *et al.*, 2015).

Para avaliar melhor o risco que uma amostra contendo dioxinas, furanos e PCBs oferece a quem a ingere, a OMS estabeleceu os fatores de equivalência tóxica (TEFs - *toxic equivalency factors*) para cada congêneres (Tabela 1) (WHO, 2002). Os TEFs são baseados no potencial tóxico relativo de cada congêneres em comparação com o congêneres mais tóxico, o 2,3,7,8-TCDD (cujo TEF é igual a um) e determinados experimentalmente pela análise da ativação do receptor AhR por cada um dos congêneres (SORG, 2014).

Tabela 1- Valores de TEFs (Fatores de Equivalência Tóxica) estabelecidos pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em 2005 para dibenzo-p-dioxinas (PCDDs), dibenzofuranos (PCDFs) e bifenilas policloradas (PCBs).

| Composto | TEF |
|---------------------|--------|
| PCDDs | |
| 2,3,7,8-TCDD | 1 |
| 1,2,3,7,8-PeCDD | 1 |
| 1,2,3,4,7,8-HxCDD | 0,1 |
| 1,2,3,6,7,8-HxCDD | 0,1 |
| 1,2,3,7,8,9-HxCDD | 0,1 |
| 1,2,3,4,6,7,8-HpCDD | 0,01 |
| OCDD | 0,0003 |
| PCDFs | |
| 2,3,7,8-TCDF | 0,1 |
| 1,2,3,7,8-PeCDF | 0,03 |
| 2,3,4,7,8-PeCDF | 0,3 |
| 1,2,3,4,7,8-HxCDF | 0,1 |

| | |
|-----------------------|---------|
| 1,2,3,6,7,8-HxCDF | 0,1 |
| 1,2,3,7,8,9-HxCDF | 0,1 |
| 2,3,4,6,7,8-HxCDF | 0,1 |
| 1,2,3,4,6,7,8-HpCDF | 0,01 |
| 1,2,3,4,7,8,9-HpCDF | 0,01 |
| OCDF | 0,0003 |
| PCBs não-orto | |
| PCB-77 | 0,0001 |
| PCB-81 | 0,0003 |
| PCB-126 | 0,1 |
| PCB-169 | 0,03 |
| PCBs mono-orto | |
| PCB-105 | 0,00003 |
| PCB-114 | 0,00003 |
| PCB-118 | 0,00003 |
| PCB-123 | 0,00003 |
| PCB-156 | 0,00003 |
| PCB-157 | 0,00003 |
| PCB-167 | 0,00003 |
| PCB-189 | 0,00003 |

2,3,7,8-TCDF: 2,3,7,8-tetraclorodibenzofurano; 2,3,7,8-TCDD: 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina; 1,2,3,7,8-PeCDF: 1,2,3,7,8-pentaclorodibenzofurano; 2,3,4,7,8-PeCDF: 2,3,4,7,8-pentaclorodibenzofurano; 1,2,3,7,8-PeCDD: 1,2,3,7,8-pentaclorodibenzo-p-dioxina; 1,2,3,4,7,8-HxCDF: 1,2,3,4,7,8-hexaclorodibenzofurano; 1,2,3,6,7,8-HxCDF: 1,2,3,6,7,8-hexaclorodibenzofurano; 2,3,4,6,7,8-HxCDF: 2,3,4,6,7,8-hexaclorodibenzofurano; 1,2,3,4,7,8-HxCDD: 1,2,3,4,7,8-hexaclorodibenzo-p-dioxina; 1,2,3,6,7,8-HxCDD: 1,2,3,6,7,8-hexaclorodibenzo-p-dioxina; 1,2,3,7,8,9-HxCDD: 1,2,3,7,8,9-hexaclorodibenzo-p-dioxina; 1,2,3,7,8,9-HxCDF: 1,2,3,7,8,9-hexaclorodibenzofurano; 1,2,3,4,6,7,8-HpCDF: 1,2,3,4,6,7,8-heptaclorodibenzofurano; 1,2,3,4,6,7,8-HpCDD: 1,2,3,4,6,7,8-heptaclorodibenzo-p-dioxina; 1,2,3,4,7,8,9-HpCDF: 1,2,3,4,7,8,9-heptaclorodibenzofurano; OCDD: octaclorodibenzo-p-dioxina; OCDF: octaclorodibenzofurano, PCB: bifenila policlorada.

Fonte: Adaptado de WHO, 2006.

Além de se ligar ao AhR, para um valor de TEF ser atribuído a uma substância, ela deve apresentar similaridade estrutural ao 2,3,7,8-TCDD, efeitos tóxicos e bioquímicos mediados por AhR, similares àqueles do TCDD, e

persistência e acúmulo no ambiente e na cadeia alimentar (SCHRENK & CHOPRA, 2012).

Quando se analisa uma mistura de dioxinas, furanos e PCBs, os níveis de cada congêneres são determinados e multiplicados pelos seus respectivos valores de TEFs, os resultados são somados, a fim de se obter o valor de TEQ (*total toxic equivalence*), a equivalência tóxica total da mistura (HOOGENBOOM *et al.*, 2015; SCHECTER, 2012). O referido cálculo é feito como apresentado na **Equação 1**, na qual “n” é número de congêneres presentes na mistura.

$$TEQ = \sum_{i=1}^n (\text{concentração do congêneres})_i \times TEF_i$$

(Eq. 1)

Há um valor estabelecido de tolerância de ingestão de dioxinas, por kg de massa corporal por mês. Este nível representa a quantidade de dioxinas que pode ser ingerida ao longo da vida de um ser humano sem efeitos detectáveis à saúde. Este limite havia sido estimado como 70 pgTEQ por kg de massa corporal, por mês, em 2001. Entretanto, novos estudos epidemiológicos e experimentais concluíram que este limite é, na verdade, cerca de sete vezes menor (EFSA, 2018; MALISCH & KOTZ, 2014; WHO, 2016).

Os aspectos toxicológicos descritos ressaltam a importância do monitoramento e controle da contaminação de alimentos por dioxinas.

3.1.4. Contaminação de Alimentos

Alguns eventos envolvendo a inserção das dioxinas na produção animal e consequente aumento da exposição humana ganharam notoriedade

internacional e fizeram com que fossem desenvolvidas legislações acerca da presença desses contaminantes nos alimentos. Entre esses eventos, destacaram-se a contaminação de frangos ocorrida na Bélgica e a contaminação de leite e seus derivados na Alemanha, ambos no final da década de 1990 (LUPTON *et al.*, 2017; MALISCH & KOTZ, 2014).

No Brasil, dois episódios de contaminação de produtos da cadeia de produção alimentar por dioxinas se destacam. Em 1997, foi observado um aumento gradual de dioxinas em alguns produtos de origem animal da Alemanha. As investigações concluíram que a origem da contaminação era a polpa cítrica importada do Brasil, a qual era importada por alguns países da Europa para ser utilizada na alimentação de ruminantes. Em resposta ao ocorrido, a União Europeia estabeleceu um limite máximo aceitável desses compostos na polpa cítrica de 500 pg TEQ-OMS/kg (United States Department of Agriculture- USDA, 2015).

Mais recentemente, no ano de 2015, foram encontradas cargas de carne de frango exportadas para a China contaminadas por dioxinas. O país suspendeu a importação de frango do Brasil e o caso foi tratado como pontual pelo produtor e pelas autoridades brasileiras (MENDES & ZAIA, 2015; MARTINS, 2015).

Desde 2012, o Brasil analisa, por meio do PNCRC Animal, amostras quanto à contaminação por dioxinas, furanos e PCBs. Como mostram os relatórios disponíveis no site do MAPA, a quantidade de amostras recebidas para esta análise aumentou a partir de 2015, ano em que houve a exportação de frangos contaminados, como mencionado anteriormente (BRASIL, 2013; 2014; 2015a, b; 2016; 2017a, b, 2018a).

Entre as matrizes contempladas pelo Plano, destaca-se a gordura de aves, que além de representar a matriz com maior número de amostras coletadas, quando comparada às demais matrizes, também foi aquela que resultou em maior número de amostras não conformes (três das 291 amostras

no ano de 2015 e uma das 305 amostras de 2016). No ano de 2016 também houve uma amostra não conforme de gordura de suíno (de um total de 305 amostras) e uma amostra de ovo (de um total de 53) (BRASIL 2013; 2014; 2015b, 2016).

A carne de frango foi a mais consumida, em kg, no ano de 2016 no Brasil; totalizando 41 kg/habitante (EMBRAPA, 2017). O frango de origem brasileira, além de servir ao mercado interno, possui parte considerável, quase um terço do que é produzido, destinada à exportação, o que coloca o país em uma importante posição entre os produtores de frango mundiais (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL- ABAPA, 2017). Estes dados, aliados ao fato de que as dioxinas entram em contato com a população humana, principalmente via alimentação, mostram a necessidade de se monitorar os teores de dioxinas no frango produzido no Brasil.

3.2. Controle de Dioxinas em Alimentos

3.2.1. Regulamentações e Programas de Monitoramento

A OMS considera a redução da exposição humana às PCDDs, PCDFs e PCBs uma importante meta de saúde pública. A Organização estabeleceu, com a colaboração da FAO (do inglês *Food and Agriculture Organization of the United Nations*), um documento que orienta autoridades nacionais e regionais quanto à tomada de medidas preventivas e de redução da contaminação das cadeias de produção alimentar por tais substâncias, o *Code of practice for the prevention and reduction of dioxin and dioxin-like PCB contamination in foods and feeds*. A OMS também é responsável pelo GEMS/Food (do inglês *Global Environment Monitoring System's Food Contamination Monitoring and Assessment Programme*), que fornece informações sobre os níveis e tendências de contaminantes (incluindo as dioxinas) em alimentos de vários

países. A organização recomenda que os países empreguem sistemas de monitoramento internos para verificar se os níveis de tolerância não estão sendo excedidos nos alimentos produzidos (WHO, 2016).

As quantidades toleráveis de ingestão de dioxinas, furanos e PCBs como aquela estabelecida pela OMS levam em consideração a exposição crônica a baixos níveis dessas substâncias. Esses valores não informam sobre os níveis de segurança dos alimentos, ou seja, a partir deles não é possível avaliar se a quantidade de dioxinas presente em um alimento oferece risco de toxicidade ao organismo humano mediante uma única exposição (EFSA, 2018; HOOGENBOOM *et al.*, 2015).

A UE estabeleceu limites máximos (LMs) de dioxinas, furanos e PCBs em alguns produtos de origem animal e também nas rações e suplementos destinados à alimentação animal. Esses valores precisavam ser “estritos, porém possíveis”, de maneira que fornecessem segurança aos consumidores e não mais do que 5% das amostras de certo gênero alimentício fosse descartado. Desta forma, foi preconizado que alimentos que excedessem os LMs deveriam ser descartados. Níveis de ação também foram estabelecidos, representando valores abaixo dos LMs, porém acima dos níveis desejados. Assim, alimentos com teores de dioxinas acima dos níveis de ação poderiam ser vendidos, mas a origem da contaminação deveria ser identificada e eliminada (HOOGENBOOM *et al.*, 2015; MALISCH & KOTZ, 2014).

A UE adota o monitoramento dos teores de dioxinas, furanos e PCBs em alguns produtos de origem animal, mediante requisitos preconizados nos Regulamentos da Comissão Europeia (CE): i) CE n°1881 de 2006, que “define os teores máximos para PCBs não semelhantes a dioxinas, dioxinas e furanos e para a soma de dioxinas, furanos e PCBs sob a forma de dioxina em determinados gêneros alimentícios”; ii) CE n°644 de 2017, que “estabelece métodos de amostragem e análise para o controle dos teores de dioxinas, PCBs sob a forma de dioxina e PCBs não semelhantes a dioxinas em

determinados gêneros alimentícios”; e iii) CE nº711 de 2013, que trata dos níveis de ação, mencionados anteriormente (EC, 2017).

Nos Estados Unidos, o monitoramento dos alimentos quanto aos teores de dioxinas, furanos e PCBs é feito por órgãos federais como FDA (do inglês *Food and Drug Administration*) e USDA, por meio da coleta anual de amostras representativas da dieta da população americana em geral, o que inclui produtos importados. Diante dos resultados encontrados, busca-se tratar as origens das contaminações, a fim de minimizar a exposição humana aos contaminantes. O país não definiu valores máximos permitidos, mas utiliza aqueles dos países de destino quando se trata da exportação de algum produto (LUPTON, 2017; INSTITUTE OF MEDICINE, 2003; USDA, 2015).

Como não há uma legislação internacional a ser seguida, cada país define como regulamentar e monitorar os teores de dioxinas, furanos e PCBs aos quais sua população está sendo exposta. O Canadá, por exemplo, monitora os teores de tais contaminantes em alguns produtos destinados à alimentação animal, mas não nos alimentos destinados ao consumo humano. No Japão, não existem programas de monitoramento, porém estudos que avaliam os níveis na população, nos alimentos e no ambiente vêm sendo feitos (CFIA, 2017; SCHRENK & CHOPRA, 2012; INSTITUTE OF MEDICINE, 2003).

Estudos promovidos pelo Governo Australiano, de 2001 a 2004, concluíram que a população não estava exposta a altos teores de dioxinas (teores que pudessem oferecer risco à saúde). Diante disso, o país decidiu não estabelecer níveis máximos permitidos ou programas de monitoramento nos alimentos, e novas pesquisas seriam realizadas após dez anos, para avaliar se a exposição humana permanecia baixa. Entretanto, não foram identificadas publicações do Governo Australiano após este prazo (AUSTRALIAN GOVERNMENT, 2005; 2019).

No Brasil, o MAPA, por meio do PNCRC Animal, analisa, desde 2012, amostras de origem animal quanto à presença e teores de dioxinas, furanos e

PCBs. Atualmente, as matrizes gorduras de ave, bovina e suína, leite, pescado e ovos compõem o escopo do referido Plano (BRASIL, 2018a, b), visto que os alimentos que tendem a ter teores mais altos são aqueles de origem animal, como os laticínios, carne vermelha, frango, ovos, peixe e gorduras de origem animal (HOOGENBOOM *et al.*, 2015; USDA, 2015).

Todos os anos o MAPA divulga um plano de amostragem que determina quantas amostras de cada matriz devem ser coletadas pelo Serviço de Inspeção Federal (SIF) e enviadas à Rede Nacional de Laboratórios Agropecuários (REDE LANAGROS) para monitoramento dos contaminantes abordados no Plano. A coleta pelo SIF permite a rastreabilidade da origem das amostras. Em casos de violação, as propriedades cujos produtos excederam os limites permitidos são investigadas, visando encontrar as causas da violação e as devidas sanções administrativas e medidas de controle do risco de novas violações são aplicadas (BRASIL, 2018b).

Para análise da conformidade das amostras, o Brasil adota limites de referência, que são os valores máximos permitidos para os compostos em cada tipo de alimento (BRASIL, 2018b). Segundo a IN 42 de 1999 do MAPA, caso esses limites não tenham sido estabelecidos pelo Ministério da Saúde (MS), adota-se aqueles internalizados no Mercado Comum do Sul (MERCOSUL), os recomendados pelo *Codex Alimentarius*, os constantes nas diretivas da União Europeia e aqueles utilizados pelo FDA/USA. Os limites de referência adotados atualmente no Brasil são mostrados na **Tabela 2**.

Tabela 2- Limites de referência adotados para as matrizes analisadas pelo PNCRC quanto à contaminação por dibenzo-p-dioxinas (PCDDs), dibenzofuranos (PCDFs) e bifenilas policloradas (PCBs).

| Matriz | Limites de Referência | | |
|--------------------|---|---|------------------|
| | Somatório de dioxinas e furanos (PCDD/PCDF TEQ-OMS) | Somatório dioxinas, furanos e PCBs (PCDD/PCDF/PCBs TEQ-OMS) | Somatório PCBs* |
| Gordura de Bovinos | 2,5 pg/g | 4,0 pg/g | 200 µg/ kg |
| Gordura de Suínos | 1,0 pg/g | 1,25 pg/g | 200 µg/kg |
| Gordura de Aves | 1,75 pg/g | 3,0 pg/g | 200 µg/kg |
| Ovos | 2,5 pg/g gordura | 5,0 pg/g gordura | 40 µg/kg gordura |
| Leite | 2,5 pg/g gordura | 5,5 pg/g gordura | - |
| Pescado** | 3,5 pg/g | 6,5 pg/g | - |

TEQ: equivalência tóxica total; OMS: Organização Mundial de Saúde;*Somatório de PCB-101, PCB-118, PCB-138, PCB-153 e PCB-180; **Pescado de captura e pescado de cultivo.

Fonte: Adaptado de BRASIL, 2018a.

3.2.2. Métodos de Análise

Os baixos limites regulatórios estabelecidos para dioxinas, furanos e PCBs em alimentos (da ordem de pg/g de amostra) aliados à complexidade das matrizes e à necessidade de se analisar 29 diferentes congêneres tornam a detecção e quantificação dessas substâncias grandes desafios (CHOBTANG *et al.*, 2011).

A CG-EMAR é considerada o “padrão-ouro” para análise de dioxinas, furanos e PCBs. Esta técnica é capaz de detectar, quantificar e identificar os congêneres presentes nas amostras mesmo em níveis muito baixos (HOOGENBOOM *et al.*, 2015).

Apesar de proporcionar bons resultados, a técnica de CG-EMAR é laboriosa, demanda tempo e possui alto custo. Para sua execução são necessários especialistas bem treinados e etapas de *clean-up* da amostra previamente à análise, que são feitas com a utilização de adsorventes como sílica e carvão, no intuito de separar os compostos de interesse de interferentes muito possivelmente presentes na matriz. Além disso, a instrumentação possui alto custo de aquisição e manutenção, bem como os solventes, reagentes e padrões utilizados (CHOBTANG *et al.*, 2011; REINER *et al.*, 2006).

Os órgãos regulamentadores em segurança alimentar muitas vezes precisam de respostas rápidas nas análises de grande número de amostras, a fim de se evitar perdas econômicas e incidentes indesejados, como casos de exposição a altos níveis de dioxinas (FOCANT, 2012.). Em diversos setores da produção alimentar, métodos qualitativos são utilizados numa etapa de triagem das análises laboratoriais, pois produzem resultados rápidos por meio da utilização de técnicas mais simples e econômicas que as tradicionais (GONDIM *et al.*, 2014).

Nas análises de dioxinas, furanos e PCBs, bioensaios vêm sendo utilizados como alternativas à análise por CG-EMAR, sendo aplicados para triagem das amostras e tendo como propósito fornecer alto desempenho e menores custos de análise (FOCANT, 2012; WHO, 2006).

A União Europeia, um dos principais importadores de carne do Brasil (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS EXPORTADORAS DE CARNE- ABIEC, 2016) e uma importante referência quando se trata de análise de dioxinas, adota a estratégia de análise de dioxinas, furanos e PCBs por métodos de triagem e métodos confirmatórios. Os métodos de triagem comparam o resultado encontrado para uma amostra com um valor de corte estabelecido, obtendo-se o resultado “conforme”, caso o valor encontrado não exceda o valor de corte ou “não conforme” caso o valor obtido seja maior que o valor de corte. Segundo a UE, pode ser usado como valor de corte o valor que

corresponda a dois terços do LM estabelecido pela legislação (MALISCH & KOTZ, 2014; EC, 2017).

As amostras tidas como “não conformes” no método de triagem devem ser analisadas pelo método confirmatório. No caso de se utilizar bioensaios na triagem, os resultados são expressos como Equivalentes Bioanalíticos (BEQs) e são capazes de indicar a faixa de concentração de contaminantes nas amostras, que será determinada de forma mais detalhada por CG-EMAR no caso das amostras suspeitas (MALISCH & KOTZ, 2014).

Entre os bioensaios desenvolvidos para detecção de dioxinas, furanos e PCBs em diversas matrizes, o método DR-CALUX[®] tem sido utilizado para análise de matrizes alimentares nos últimos anos e tem se mostrado adequado (CHOBTANG *et al.*, 2011; WHO, 2002). Alguns autores já demonstraram sua aplicação na manutenção da segurança alimentar, conforme representado na **Tabela 3**, embora validações completas não tenham sido conduzidas, independentemente da abordagem de aplicação - quantitativa ou qualitativa.

Tabela 3- Trabalhos de avaliação de desempenho ou aplicação do método DR-CALUX® em matrizes alimentares.

| Referência | Matriz | Tipo de amostra | Níveis de concentração | Repetições por nível | Bateladas | Tipo de análise/validação | Parâmetros | Utilização do termo “validação” |
|-----------------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|--|--|-----------|---------------------------------|--|---------------------------------|
| Tsutsumi <i>et al.</i> , 2003 | Peixe | Natural | 2 (2 amostras de espécies diferentes) | 3replicatas do mesmo extrato analisadas no mesmo dia e 2 replicatas do mesmo extrato analisadas em 2 dias diferentes | 2 | Quantitativa | Repetibilidade, reprodutibilidade | Sim |
| | Curva de TCDD | - | 8 | 4 | 4 | Quantitativa | Acurácia e precisão | |
| Vanloco <i>et al.</i> , 2004 | Óleo vegetal, leite, óleo de peixe | Fortificada | Variou para cada matriz | 2 | 3 | Quantitativa, interlaboratorial | Repetibilidade, reprodutibilidade, limite de quantificação, seletividade | Sim |
| Jeong, <i>et al.</i> , 2005 | Carne bovina e ração | Fortificada* | 6 | 3 | 8 | Quantitativa | Limite de detecção, limite de quantificação, precisão | Sim |
| Gizzi <i>et al.</i> , 2005 | Ração e óleo de peixe. | Fortificada | 4 | 2 por laboratório 14 laboratórios** | - | Quantitativa; interlaboratorial | Repetibilidade, reprodutibilidade | Sim |
| Hoogenboom <i>et al.</i> , 2006 | Óleo de peixe | Fortificada | 4 | 6 | 5 | Quantitativa | Repetibilidade, %DP dias diferentes | Sim |
| | Peixe | Natural (aplicação do método) | 153 amostras | - | - | Quantitativa | Comparação com CG-EMAR, falso-positivos, falso-negativos | Não |
| Fochi <i>et al.</i> , 2008 | Leite de cabra | Fortificada (aplicação do método) | 6 | 3 do mesmo extrato | 5 | Quantitativa | Repetibilidade Comparação com CG-EMAR | Não |
| | Leite bovino | Natural (aplicação do método) | - | - | - | Quantitativa | | |
| Vanderperren <i>et al.</i> , 2010 | Ração, leite, peixe, ovo, gordura | Natural (aplicação do método) | - | - | - | Semi-quantitativa | Falso-positivos, falso-negativos | Não |

| animal | | | | | | | | |
|--------------------------------|---|-------------------------------|---|---|---|-------------------|--|-----|
| Vrommam <i>et al.</i> , 2012 | Lácteos, ovo, peixe, gordura animal e óleo vegetal | Natural (aplicação do método) | - | - | - | Quantitativa | Comparação com CG-EMAR | Não |
| Husain <i>et al.</i> , 2014 | Carne bovina, frango, ovo, leite, peixe e ração. | Natural (aplicação do método) | - | - | - | Quantitativa | Comparação com CG-EMAR | Sim |
| Piskorska <i>et al.</i> , 2017 | Ração, óleo vegetal, óleo de peixe, gordura animal. | Fortificada e Natural | 4 | 6 | 2 | Semi-quantitativa | Linearidade, limite de detecção, repetibilidade, reprodutibilidade | Sim |

CG-EMAR: Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas de alta resolução; %DP: desvio padrão relativo; *Foi feito o preparo de duas curvas de calibração, uma com cada matriz. Os resultados são das análises dessas curvas. Posteriormente, os autores analisaram 10 amostras de cada matriz, por CG-EMAR e por DR CALUX, utilizando as curvas anteriormente preparadas como curvas padrão no bioensaio; **Quatro e três laboratórios foram excluídos anteriormente à análise estatística dos dados de ração e óleo de peixe, respectivamente, devido a altos níveis *background* e/ou ausência de resposta dose-dependente.

O método DR CALUX[®] utiliza células geneticamente modificadas que respondem a compostos que se ligam ao receptor AhR. Tal qual nos ensaios químicos, as etapas de extração e purificação das amostras são etapas críticas para este bioensaio (REINER *et al.*, 2006; TSUTSUMI *et al.*, 2003).

Assim como no método confirmatório, cada congênera possui um valor de resposta relativa na triagem por DR CALUX[®], o valor de potencial relativo (REP do inglês *relative potency*), que foi determinado pela resposta das células DR CALUX[®] para cada congênera, em relação à resposta para o 2,3,7,8-TCDD, cujo valor de REP é 1. O somatório dos valores individuais de REP, multiplicados pela concentração de seu respectivo congênera, resulta no valor de BEQ da mistura, correspondente ao valor de TEQ da análise confirmatória (BENISCH *et al.*, 2001; PISKORSKA *et al.*, 2017; HOOGENBOOM *et al.*, 2006).

A utilização do valor de BEQ é mais adequada, uma vez que o método não detecta diretamente a concentração de cada analito presente na amostra, mas sim mede seu potencial de ativar o receptor AhR (BASTON *et al.*, 2011). Os valores de REP de cada congênera são exibidos na **Tabela 4**.

Tabela 4- Valores de REP (potencial relativo) para dibenzo-p-dioxinas (PCDDs), dibenzofuranos (PCDFs) e bifenilas policloradas (PCBs).

| Composto | REP |
|---------------------|--------|
| PCDDs | |
| 2,3,7,8-TCDD | 1 |
| 1,2,3,7,8-PeCDD | 0,54 |
| 1,2,3,4,7,8-HxCDD | 0,3 |
| 1,2,3,6,7,8-HxCDD | 0,14 |
| 1,2,3,7,8,9-HxCDD | 0,066 |
| 1,2,3,4,6,7,8-HpCDD | 0,05 |
| OCDD | 0,0001 |

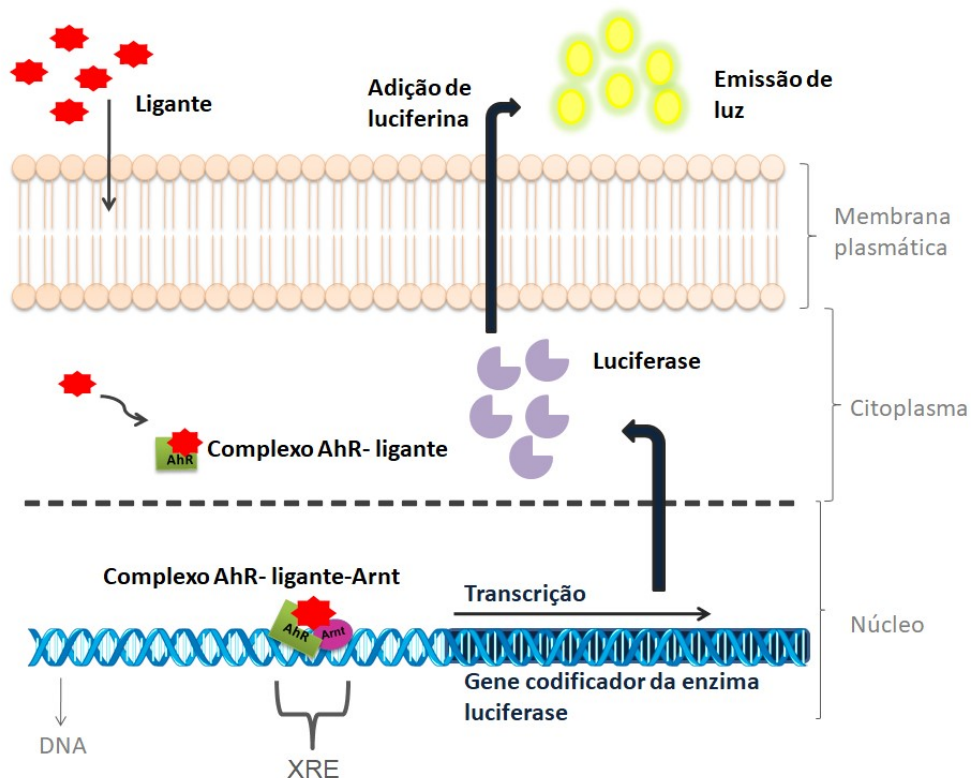
| PCDFs | |
|-----------------------|-------------|
| 2,3,7,8-TCDF | 0,32 |
| 1,2,3,7,8-PeCDF | 0,21 |
| 2,3,4,7,8-PeCDF | 0,5 |
| 1,2,3,4,7,8-HxCDF | 0,13 |
| 1,2,3,6,7,8-HxCDF | 0,039 |
| 1,2,3,7,8,9-HxCDF | 0,11 |
| 2,3,4,6,7,8-HxCDF | 0,18 |
| 1,2,3,4,6,7,8-HpCDF | 0,032 |
| 1,2,3,4,7,8,9-HpCDF | 0,041 |
| OCDF | 0,0001 |
| PCBs não-orto | |
| PCB-77 | 0,0013 |
| PCB-81 | 0,0001 |
| PCB-126 | 0,67 |
| PCB-169 | 0,0034 |
| PCBs mono-orto | |
| PCB-105 | 0,000012 |
| PCB-114 | 0,000048 |
| PCB-118 | 0,000000001 |
| PCB-123 | - |
| PCB-156 | 0,00021 |
| PCB-157 | 0,00008 |
| PCB-167 | 0,00001 |
| PCB-189 | 0,0001 |

2,3,7,8-TCDF: 2,3,7,8-tetraclorodibenzofurano; 2,3,7,8-TCDD: 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina; 1,2,3,7,8-PeCDF: 1,2,3,7,8-pentaclorodibenzofurano; 2,3,4,7,8-PeCDF: 2,3,4,7,8-pentaclorodibenzofurano; 1,2,3,7,8-PeCDD: 1,2,3,7,8-pentaclorodibenzo-p-dioxina; 1,2,3,4,7,8-HxCDF: 1,2,3,4,7,8-hexaclorodibenzofurano; 1,2,3,6,7,8-HxCDF: 1,2,3,6,7,8-hexaclorodibenzofurano; 2,3,4,6,7,8-HxCDF: 2,3,4,6,7,8-hexaclorodibenzofurano; 1,2,3,4,7,8-HxCDD: 1,2,3,4,7,8-hexaclorodibenzo-p-dioxina; 1,2,3,6,7,8-HxCDD: 1,2,3,6,7,8-hexaclorodibenzo-p-dioxina; 1,2,3,7,8,9-HxCDD: 1,2,3,7,8,9-hexaclorodibenzo-p-dioxina; 1,2,3,7,8,9-HxCDF: 1,2,3,7,8,9-hexaclorodibenzofurano; 1,2,3,4,6,7,8-HpCDF: 1,2,3,4,6,7,8-heptaclorodibenzofurano; 1,2,3,4,6,7,8-HpCDD: 1,2,3,4,6,7,8-heptaclorodibenzo-p-dioxina; 1,2,3,4,7,8,9-HpCDF: 1,2,3,4,7,8,9-heptaclorodibenzofurano; OCDD: octaclorodibenzo-p-dioxina; OCDF: octaclorodibenzofurano, PCB: bifenila policlorada.

Fonte: Adaptado de BDS, 2016.

As células DR CALUX[®] possuem um gene que codifica a enzima luciferase e cuja expressão é modulada por um complexo formado após a interação entre AhR e seu ligante. Uma vez em contato com dioxinas, o complexo será formado no interior dessas células e elas irão produzir a enzima luciferase, de forma dose-dependente. Sendo assim, é possível estimar o teor de dioxinas de uma amostra por meio da análise da atividade da luciferase de células DR CALUX[®] que foram expostas a esta amostra. A atividade da enzima luciferase é medida por leitura espectrofotométrica do produto da reação da enzima com seu substrato, a luciferina, e o resultado é comparado com os valores encontrados para uma curva padrão de 2,3,7,8-TCDD (WINDAL *et al.*, 2005). A atividade das células DR CALUX[®] é ilustrada da **Figura 5**.

Figura 5- Atividade das células DR CALUX[®]. AhR: receptor de aril hidrocarbonetos; Arnt: translocador nuclear de AhR; DNA: ácido desoxirribonucleico; XRE: elemento de resposta a xenobióticos.



Fonte: Adaptado de BioDetection Systems (BDS), 2017).

3.2.4. Validação de Métodos Qualitativos

Os resultados obtidos em análises de alimentos podem ser o fundamento para tomada de decisões que influenciarão na economia e saúde pública dos países produtores e consumidores desses produtos. Por este motivo, os métodos de ensaio utilizados nas análises de alimentos precisam apresentar rastreabilidade, comparabilidade e confiabilidade nos seus resultados (GONDIM *et al.*, 2011; GOWIK, 2009). O processo de validação objetiva garantir a qualidade metrológica dos resultados analíticos obtidos num método, conferindo as características acima mencionadas aos seus resultados (BRASIL, 2011; ABNT NBR ISO/IEC 17025:2017).

Segundo López *et al.* (2015), o processo de validação garante que determinado método atende aos objetivos a que se propõe, pois ele mostra que o método está apto a cumprir as expectativas para determinada aplicação. Existem protocolos bem estabelecidos para a validação de métodos quantitativos; entretanto, são escassos os estudos sobre protocolos e terminologias relacionados à validação de métodos qualitativos. Uma vez que os princípios metrológicos clássicos não se adéquam às análises qualitativas, alguns autores propõem metodologias e conceitos que se apliquem melhor às análises qualitativas (GONDIM *et al.*, 2011, 2014; LÓPEZ *et al.*, 2015).

Analisando dados da literatura, percebe-se que os parâmetros a serem avaliados na validação de métodos qualitativos estão relacionados com aqueles das validações dos métodos quantitativos, conforme **Tabela 5** (GONDIM *et al.*, 2011, 2014; LÓPEZ *et al.*, 2015; TRULLOLS *et al.*, 2004). Não necessariamente todos os parâmetros precisam ser avaliados, a depender, por exemplo, da natureza do problema analítico (LÓPEZ *et al.*, 2015).

Tabela 5- Comparação entre os parâmetros avaliados nas validações de métodos qualitativos e quantitativos.

| Métodos Qualitativos | Métodos Quantitativos |
|--|---|
| Taxas de falso-positivos (TFP), falso-negativos (TFN) e confiabilidade (TCF) | Veracidade |
| Acordância (ACO) | Repetibilidade (precisão) |
| Concordância (CON) | Reprodutibilidade (precisão) |
| Taxa de sensibilidade (TSB) | Sensibilidade |
| Taxa de seletividade (TST) | Seletividade |
| Região de perda de confiabilidade (RPC) | Incerteza |
| Limite de detecção (LD) | Limite de detecção/ Limite de quantificação/ Limite de decisão |
| Robustez | Robustez |

Fonte: Adaptado de GONDIM *et al.*, 2011; LÓPEZ *et al.*, 2014; TRULLOLS *et al.*, 2004.

A TFP indica a probabilidade de se obter um resultado positivo dado que o analito não está presente na amostra. Ela é estimada pela proporção de resultados incorretos (positivos) para as amostras sabidamente negativas (que não contêm o analito). A TFN representa a probabilidade de se obter um resultado negativo para uma amostra que contém o analito e pode ser estimada pela proporção de resultados incorretos (negativos) para amostras que contêm o analito (ELLISON & FEARN, 2005; GONDIM *et al.*, 2011).

A TCF pode ser definida como a proporção de resultados corretos de uma bateria analítica composta por testes independentes. Numericamente é calculada pela diferença entre o total de resultados (100%) e a somas das taxas TFP e TFN (GONDIM *et al.*, 2011).

ACO é a probabilidade de se obter o mesmo resultado para duas amostras idênticas, testadas no mesmo laboratório sob condições de repetibilidade. Enquanto CON é a probabilidade de se obter o mesmo resultado para duas amostras idênticas, testadas em laboratórios diferentes sob condições de reprodutibilidade ou em diferentes baterias analíticas num mesmo laboratório, sob condições de precisão intermediária (ELLISON & FEARN, 2005; GONDIM *et al.*, 2011; GONDIM *et al.*, 2014).

As TST e TSB se referem às capacidades do método de responder corretamente a amostras positivas (que contêm o analito) e negativas (que não contêm o analito), respectivamente (LÓPEZ *et al.*, 2015). A RPC é definida pelos limites superiores e inferiores de concentração entre os quais a probabilidade de se tomar uma decisão incorreta (de se obter um falso positivo ou um falso negativo) é maior que um valor determinado, normalmente 5%. O LD de um método qualitativo é a menor concentração do analito que pode ser detectada, confiavelmente como positiva. Este parâmetro pode ser calculado como o limite superior ou inferior da RPC, de acordo com o critério do analista (limite onde há 5% de resultados falso-negativos ou 5% de falso-positivos respectivamente) (BRASIL, 2011; GONDIM *et al.*, 2011; GONDIM *et al.*, 2014; LÓPEZ *et al.*, 2015; TRULLOLS *et al.*, 2004).

A robustez é um parâmetro que deve ser determinado em diferentes níveis de concentrações do analito. Assim como nas análises quantitativas, a robustez avalia o quão sensível o método é a variações de fatores que podem influenciar o resultado (por exemplo: origem dos reagentes, tamanho da amostra, condições ambientais, etc.) (BRASIL, 2011; GONDIM *et al.*, 2011; GONDIM *et al.*, 2014).

Gondim *et al.* (2014) propuseram uma metodologia de validação para métodos qualitativos e demonstraram sua aplicabilidade. Os parâmetros de desempenho são determinados após a realização de diferentes baterias analíticas, envolvendo ensaios com amostras de concentrações conhecidas dos analitos. As taxas TFP, TFN e de TCF são determinadas pelo uso de tabelas de contingência, a RPC e o LD são determinados pela utilização de curvas de desempenho, os parâmetros que avaliam a precisão, ACO e CON, são estimados por equações baseadas em cálculos de análise combinatória, e a seletividade e a robustez são avaliadas pela alteração nas TCF (GONDIM *et al.*, 2014).

4. Material e Métodos

As análises foram realizadas no Laboratório de Dioxinas e PCBS (LDP/PL) do Laboratório Nacional Agropecuário de Minas Gerais (LANAGRO/MG). O método CG-EMAR, empregado na etapa de aplicação e comparação, foi acreditado pelo INMETRO, segundo requisitos da norma ISO/IEC 17025 sob N° CRL 0350.

4.1 Equipamentos

- Agitador para preparo de sílica ácida (Marconi, MA 160/8).
- Agitador tipo Vortex (LogenScientific, LSM 5614).
- Autoclave (Luferco, 39 2016- VAPOR).
- Balança analítica com resolução 0,0001 g e capacidade máxima de 220,0000 g, calibrada (Shimadzu, AUX 220).
- Balança analítica com resolução de 0,01 g e capacidade máxima de 620,00 g, calibrada (Shimadzu, UX 620H).
- Banho aquecedor com fluxo de nitrogênio (Caliper, Turbo Vap).
- Banho termostático (Marconi, Banho Metabólico Dubnoff MA 093 reciprocante).
- Banho de ultrassom (Unique, UltraCleaner 1400).
- Bloco aquecedor com fluxo de nitrogênio (Pierce, React-Therm).
- Bomba de vácuo.
- Cabina de segurança biológica (CSB) (Veco, BiosafePLus Classe II Tipo CA).
- Dispensador (Brand, Dispensette® organic).
- Estufa (Thermo, Heraeuscautherm VT 6130 P).
- Extrator acelerado por solvente (Thermo/Dionex, ASE 350).
- Forno de microondas (Electrolux MEX55).
- Freezer (Consul, Biplax CRD498E).
- Incubadora com controle de CO₂, temperatura e umidade (ThermoScientific, Series 8000 WJ CO2 Incubator).

- Luminômetro (Tecan, Infinite M200 PRO).
- Mesa agitadora (IKA® MTS 2/4 digital).
- Micropipetas de 20 a 200 µL (Rainin, Pipet-Lite XLS), de 2 a 20 µL (Rainin, Pipet-Lite XLS), multicanal de 30 µL e 8 canais (ThermoScientific, Finnpipette tipo 148) e multicanal de 100 µL e 8 canais (ThermoScientific, Finnpipette tipo 148), calibradas.
- Microscópio invertido com objetiva de 4X, 10X e 20X (Olympus, CK40-SIP-F200).
- Pipetador automático (Brand, accu-jet® pro).
- Refrigerador (Sanyo, Biomedical freezer).
- Software Magellan™ - Data Analysis Software.
- Softwares Datafit versão 5.1.1 (Oakdale Engineering), MedCalc® Versão 14.8.1 e Minitab Versão 18.1.
- Termômetro digital calibrado (Maxitrac, digital 7665).

4.2 Material

- Algodão lavado (submetido a pré-tratamento com solventes orgânicos em extrator acelerado por solvente).
- Bandeja de aço inox.
- Béqueres de 10, 50, 100 e 250 mL.
- Câmara de Neubauer.
- Colunas de vidro pequena (diâmetro interno de 15,5 mm e 130 mm de comprimento mínimo) e grande (diâmetro interno de 26 mm e 275 mm de comprimento mínimo).
- Criotubo de 1,8 mL.
- Dessecador de vidro.
- Espátula de inox.
- Faca de inox.
- Frasco coletor de 50 mL.
- Frasco para preparo e agitação de sílica ácida de vidro de 2 L.

- Frasco tipo Duran de 40 mL para extração de gordura com hexano.
- Frascos para Turbo Vap.
- Funil de haste de vidro de 50 mm de diâmetro.
- Garrafas para cultivo celular de 75 cm² com tampa para CO₂ (GreinerBio-one, 658175 ou equivalente).
- Gaze estéril.
- Gral de porcelana.
- Luva nitrílica.
- Papel de filtro qualitativo diâmetro de 70 mm.
- Pipetas de Pasteur.
- Pipetas de vidro graduadas de 2, 5 e 10 mL estéreis.
- Pisseta de 500 mL.
- Placas de 24, 48 e 96 poços de fundo chato estéril.
- Ponteiras estéreis para pipetas automáticas de 5 a 40 µL, 100 µL, 20 a 200 µL, 30 µL, e 0,5 a 10 µL.
- Provetas de 10, 20, 50 e 100 mL.
- Reservatório para pipeta multicanal estéril.
- Tubo de plástico com tampa estéril de 50 mL (Greiner, 210261 ou equivalente).
- Vials de 1,1 mL.
- Todo material foi limpo previamente ao seu uso, primeiramente, com diclorometano puro e, então, com hexano puro, com o auxílio de pissetas.

4.3 Reagentes

- Ácido acético glacial grau para cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (Sigma Aldrich).
- Ácido sulfúrico 95 a 97% grau para análise (p.a.) (Merck).
- Água grau CLAE.

- Álcool etílico, puro $\geq 99,5\%$ (Sigma).
- Cilindro de gás carbônico SM.
- Corante Azul de Trypan.
- Dimetilsulfóxido (DMSO) p.a. (AcrosOrganics).
- Éter etílico p.a. (Merck).
- Hexano para análise de resíduos (p.a.r.) (Biosolve).
- Sílica gel 60 para cromatografia em coluna 0,063 a 0,2 mm (70 a 230 mesh) (Merck).
- Sulfato de sódio anidro p.a. (JT Backer ou CRQ).

4.4 Kit, Soluções e Misturas

- As seguintes soluções e misturas foram preparadas: sílica ácida a 20% e 33%; solução de ácido acético a 25%; e solução de hexano:éter etílico (97:3, v/v).
- Os seguintes itens foram adquiridos para o bioensaio:
- Amostras de referência para cálculo da recuperação aparente do bioensaio, BRM 18, BRM 11 e BRM 29.
- Células DR CALUX[®].
- Soluções para análise da atividade do receptor Ah mediada por luciferase em células DR CALUX[®].
- Meio de cultura α -MEM (*Minimum Essential Media*, Invitrogen, 22561-021 ou equivalente) com vermelho de fenol como indicador de pH e suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB).
- Curva analítica de 2,3,7,8-TCDD em DMSO, controle de crescimento celular (BRM-07).
- Solução salina fosfatada tamponada (PBS) pH 7,2 (GIBCO 20012-019 ou equivalente).
- Solução de tripsina a 0,05%.

- Solução de lise (Tris 25 mM; 1,4 ditioneitol (DTT) 2,0 mM; ácido trans-1,2,diaminociclohexano,N,N,N',N'-tetraacético monohidratado (CDTA) 2,0 mM; glicerol a 10% e Triton® x-100 a 1%).
- Solução reveladora (BDS iluminatemix, composta por tricina 20,0 mM, carbonato de magnésio 1,07 mM, ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA) 0,10 mM, DTT 1,5 mM, D-Luciferina 539 µM e adenosina-5-trifosfato 5,49 mM).

4.5 Amostras

4.5.1 Validação do Método

Para a etapa de validação do método, foram selecionadas amostras de gordura de aves, as quais foram coletadas no âmbito do PNCRC Animal e analisadas no Laboratório Nacional Agropecuário em Minas Gerais (LANAGRO/MG), nos anos de 2015, 2016 e 2017, empregando o método confirmatório de CG/EMAR. Os limites de detecção e quantificação do referido método para os diferentes congêneres pesquisados encontram-se relacionados na **Tabela 6**.

Tabela 6- Limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) do método confirmatório cromatográfico para os diferentes congêneres de dibenzo-p-dioxinas (PCDDs), dibenzofuranos (PCDFs) e bifenilas policloradas (PCBs).

| Composto | LQ (pg/g) | LD (fg) |
|---------------------|-----------|---------|
| PCDDs | | |
| 2,3,7,8-TCDD | 0,08 | 40 |
| 1,2,3,7,8-PeCDD | 0,17 | 100 |
| 1,2,3,4,7,8-HxCDD | 0,17 | 200 |
| 1,2,3,6,7,8-HxCDD | 0,17 | 200 |
| 1,2,3,7,8,9-HxCDD | 0,17 | 200 |
| 1,2,3,4,6,7,8-HpCDD | 0,42 | 100 |
| OCDD | 11,67 | 100 |

| PCDFs | | |
|-----------------------|-------|-----|
| 2,3,7,8-TCDF | 0,23 | 80 |
| 1,2,3,7,8-PeCDF | 0,42 | 200 |
| 2,3,4,7,8-PeCDF | 0,17 | 100 |
| 1,2,3,4,7,8-HxCDF | 0,42 | 100 |
| 1,2,3,6,7,8-HxCDF | 0,17 | 200 |
| 1,2,3,7,8,9-HxCDF | 0,17 | 200 |
| 2,3,4,6,7,8-HxCDF | 0,17 | 200 |
| 1,2,3,4,6,7,8-HpCDF | 0,42 | 50 |
| 1,2,3,4,7,8,9-HpCDF | 0,42 | 100 |
| OCDF | 11,67 | 200 |
| PCBs não-orto | | |
| PCB-77 | 10,95 | 45 |
| PCB-81 | 4,17 | 45 |
| PCB-126 | 2,08 | 90 |
| PCB-169 | 4,17 | 90 |
| PCBs mono-orto | | |
| PCB-105 | 83,33 | 100 |
| PCB-114 | 83,33 | 50 |
| PCB-118 | 83,33 | 50 |
| PCB-123 | 83,33 | 100 |
| PCB-156 | 83,33 | 100 |
| PCB-157 | 83,33 | 100 |
| PCB-167 | 83,33 | 50 |
| PCB-189 | 83,33 | 50 |

2,3,7,8-TCDF: 2,3,7,8-tetraclorodibenzofurano; 2,3,7,8-TCDD: 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina; 1,2,3,7,8-PeCDF: 1,2,3,7,8-pentaclorodibenzofurano; 2,3,4,7,8-PeCDF: 2,3,4,7,8-pentaclorodibenzofurano; 1,2,3,7,8-PeCDD: 1,2,3,7,8-pentaclorodibenzo-p-dioxina; 1,2,3,4,7,8-HxCDF: 1,2,3,4,7,8-hexaclorodibenzofurano; 1,2,3,6,7,8-HxCDF: 1,2,3,6,7,8-hexaclorodibenzofurano; 2,3,4,6,7,8-HxCDF: 2,3,4,6,7,8-hexaclorodibenzofurano; 1,2,3,4,7,8-HxCDD: 1,2,3,4,7,8-hexaclorodibenzo-p-dioxina; 1,2,3,6,7,8-HxCDD: 1,2,3,6,7,8-hexaclorodibenzo-p-dioxina; 1,2,3,7,8,9-HxCDD: 1,2,3,7,8,9-hexaclorodibenzo-p-dioxina; 1,2,3,7,8,9-HxCDF: 1,2,3,7,8,9-hexaclorodibenzofurano; 1,2,3,4,6,7,8-HpCDF: 1,2,3,4,6,7,8-heptaclorodibenzofurano; 1,2,3,4,6,7,8-HpCDD: 1,2,3,4,6,7,8-heptaclorodibenzo-p-dioxina; 1,2,3,4,7,8,9-HpCDF: 1,2,3,4,7,8,9-heptaclorodibenzofurano; OCDD: octaclorodibenzo-p-dioxina; OCDF: octaclorodibenzofurano, PCB: bifenilas policloradas.

As amostras do PNCRC (aproximadamente 1 kg) foram mantidas envoltas por papel alumínio e embaladas em saco plástico incolor, de polipropileno, devidamente lacrado, armazenadas sob temperatura inferior ou igual a $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o momento das análises.

Foram escolhidas amostras que resultaram em quatro diferentes níveis de concentração de dioxinas, furanos e PCBs, TEQ, para constituírem os níveis da validação, incluindo o branco (nível zero ou amostra não contaminada).

No preparo do branco foram utilizadas três amostras para as quais foram obtidos resultados não detectados no método confirmatório de CG/EMAR, para todos os congêneres pesquisados. Cada amostra foi cortada com faca, em uma bandeja de inox, em pequenos pedaços, os quais foram colocados em frascos de vidro tipo Duran de 40 mL e aquecidos em forno microondas (por cerca de 15 minutos a 350 W) até que uma fase límpida fosse visualizada. Em seguida, as fases límpidas das três amostras foram transferidas para uma mesma garrafa, a qual foi submetida à agitação, em mesa agitadora, à temperatura ambiente, por aproximadamente 3 horas. A amostra se manteve fundida durante o processo de agitação. Posteriormente, a amostra branca foi aliqüotada em frascos Duran de 250 mL, que foram armazenados sob refrigeração ($2\text{ a }8\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Para o preparo das amostras contaminadas, foram selecionadas três amostras de níveis de contaminação distintos (**Tabela 7**). O procedimento conduzido foi o mesmo descrito para a amostra branca.

Tabela 7- Níveis de contaminação das amostras empregadas na validação, por congêneres e equivalência tóxica total (TEQ) da Organização Mundial de Saúde (OMS), determinados pelo método confirmatório cromatográfico.

| Composto | Concentração | | | | | |
|---------------------|--------------|----------|-----------|----------|-----------|----------|
| | Amostra 1 | | Amostra 2 | | Amostra 3 | |
| | pg/g | TEQ-OMS | pg/g | TEQ-OMS | pg/g | TEQ-OMS |
| 2,3,7,8-TCDF | 3,000 | 0,300 | 3,000 | 0,300 | 3,170 | 0,317 |
| 2,3,7,8-TCDD | 0,309 | 0,309 | 0,309 | 0,309 | 0,280 | 0,280 |
| 1,2,3,7,8-PeCDF | 0,933 | 0,028 | 0,933 | 0,028 | 1,370 | 0,041 |
| 2,3,4,7,8-PeCDF | 0,864 | 0,259 | 0,864 | 0,259 | 2,330 | 0,699 |
| 1,2,3,7,8-PeCDD | <0,17 | 0,170 | <0,17 | 0,170 | 0,470 | 0,470 |
| 1,2,3,4,7,8-HxCDF | <0,42 | 0,042 | <0,42 | 0,042 | 0,970 | 0,097 |
| 1,2,3,6,7,8-HxCDF | 0,181 | 0,018 | 0,181 | 0,018 | 0,760 | 0,076 |
| 2,3,4,6,7,8-HxCDF | <0,17 | 0,017 | <0,17 | 0,017 | 0,770 | 0,077 |
| 1,2,3,4,7,8-HxCDD | <0,17 | 0,017 | <0,17 | 0,017 | 0,350 | 0,035 |
| 1,2,3,6,7,8-HxCDD | <0,17 | 0,017 | <0,17 | 0,017 | 0,320 | 0,032 |
| 1,2,3,7,8,9-HxCDD | <0,17 | 0,017 | <0,17 | 0,017 | <0,05 | 0,005 |
| 1,2,3,7,8,9-HxCDF | <0,17 | 0,017 | <0,17 | 0,017 | <0,05 | 0,005 |
| 1,2,3,4,6,7,8-HpCDF | <0,42 | 0,004 | <0,42 | 0,004 | 0,390 | 0,004 |
| 1,2,3,4,6,7,8-HpCDD | <0,42 | 0,004 | <0,42 | 0,004 | 0,310 | 0,003 |
| 1,2,3,4,7,8,9-HpCDF | <0,42 | 0,004 | <0,42 | 0,004 | <0,05 | 0,001 |
| OCDD | <11,67 | 0,004 | <11,67 | 0,004 | <0,2 | 0,000 |
| OCDF | <11,67 | 0,004 | <11,67 | 0,004 | <0,2 | 0,000 |
| PCB-81 | <4,17 | 0,001251 | <4,17 | 0,001251 | <4,17 | 0,001251 |
| PCB-77 | <10,95 | 0,001095 | <10,95 | 0,001095 | <10,95 | 0,001095 |
| PCB-126 | <2,08 | 0,208 | <2,08 | 0,208 | <2,08 | 0,208 |
| PCB-169 | <4,17 | 0,1251 | <4,17 | 0,1251 | <4,17 | 0,1251 |
| PCB-123 | <83,33 | 0,0025 | <83,33 | 0,0025 | <83,33 | 0,0025 |
| PCB-118 | <83,33 | 0,0025 | <83,33 | 0,0025 | <83,33 | 0,0025 |
| PCB-114 | <83,33 | 0,0025 | <83,33 | 0,0025 | <83,33 | 0,0025 |
| PCB-105 | <83,33 | 0,0025 | <83,33 | 0,0025 | <83,33 | 0,0025 |
| PCB-167 | <83,33 | 0,0025 | <83,33 | 0,0025 | <83,33 | 0,0025 |
| PCB-156 | <83,33 | 0,0025 | <83,33 | 0,0025 | <83,33 | 0,0025 |

| | | | | | | |
|----------------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| PCB-157 | <83,33 | 0,0025 | <83,33 | 0,0025 | <83,33 | 0,0025 |
| PCB-189 | <83,33 | 0,0025 | <83,33 | 0,0025 | <83,33 | 0,0025 |
| <i>Lowerbound</i> | | 0,24 | | 0,91 | | 2,13 |
| <i>Upperbound</i> | | 0,58 | | 1,23 | | 2,14 |
| <i>Upperbound incluindo PCBs</i> | | 0,94 | | 1,59 | | 2,50 |

2,3,7,8-TCDF: 2,3,7,8-tetraclorodibenzofurano; 2,3,7,8-TCDD: 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina; 1,2,3,7,8-PeCDF: 1,2,3,7,8-pentaclorodibenzofurano; 2,3,4,7,8-PeCDF: 2,3,4,7,8-pentaclorodibenzofurano; 1,2,3,7,8-PeCDD: 1,2,3,7,8-pentaclorodibenzo-p-dioxina; 1,2,3,4,7,8-HxCDF: 1,2,3,4,7,8-hexaclorodibenzofurano; 1,2,3,6,7,8-HxCDF: 1,2,3,6,7,8-hexaclorodibenzofurano; 2,3,4,6,7,8-HxCDF: 2,3,4,6,7,8-hexaclorodibenzofurano; 1,2,3,4,7,8-HxCDD: 1,2,3,4,7,8-hexaclorodibenzo-p-dioxina; 1,2,3,6,7,8-HxCDD: 1,2,3,6,7,8-hexaclorodibenzo-p-dioxina; 1,2,3,7,8,9-HxCDD: 1,2,3,7,8,9-hexaclorodibenzo-p-dioxina; 1,2,3,7,8,9-HxCDF: 1,2,3,7,8,9-hexaclorodibenzofurano; 1,2,3,4,6,7,8-HpCDF: 1,2,3,4,6,7,8-heptaclorodibenzofurano; 1,2,3,4,6,7,8-HpCDD: 1,2,3,4,6,7,8-heptaclorodibenzo-p-dioxina; 1,2,3,4,7,8,9-HpCDF: 1,2,3,4,7,8,9-heptaclorodibenzofurano; OCDD: octaclorodibenzo-p-dioxina; OCDF: octaclorodibenzofurano, PCB: bifenila policlorada; *Lowerbound*: resultado (TEQ-OMS) para o somatório de dioxinas e furanos, quando se utiliza o valor "zero" como limite de quantificação para cada congêneres não quantificados; *Upperbound*: resultado (TEQ-OMS) para o somatório de dioxinas e furanos, utilizando-se o valor do limite de quantificação para os analitos não quantificados; *Upperbound incluindo PCBs*: resultado (TEQ-OMS) para o somatório de dioxinas, furanos e PCBs, utilizando-se o valor do limite de quantificação para os analitos não quantificados.

4.5.2 Aplicação do Método e Comparação com CG-EMAR

Para a etapa de aplicação do método, foram selecionadas 36 amostras de gordura de aves coletadas no âmbito do PNCR, nos anos de 2017 (n=7) e 2018 (n=29), para monitoramento de dioxinas, furanos e PCBs. Tais amostras foram provenientes de sete diferentes Unidades Federativas, sendo duas de Goiás, quatro de Minas Gerais, oito de Pernambuco, 12 do Paraná, duas do Rio Grande do Sul, quatro de Santa Catarina e três de São Paulo, além de uma do Distrito Federal. As amostras recebidas (aproximadamente 1 kg) foram mantidas em temperatura inferior ou igual a -10 °C até o momento das análises.

4.6 Metodologia de Análise DR CALUX®

O método foi executado segundo orientações do fabricante (FELZEL, 2009, 2012, 2014, 2016).

4.6.1 Cultivo Celular

Todo o material utilizado foi previamente esterilizado por uma hora em autoclave a 121°C. O meio de cultura utilizado foi MEM ou α -MEM, com vermelho de fenol como indicador de pH e suplementado com SFB. As soluções utilizadas nas culturas, exceto as soluções de amostra e aquelas utilizadas na etapa de leitura, foram previamente aquecidas em banho termostático a 37 °C por 30 minutos. O manuseio da cultura celular foi sempre realizado em cabine de segurança biológica.

4.6.1.1 Descongelamento

As células DR CALUX[®] foram recebidas congeladas, contidas em criotubos e foram mantidas em bujão de nitrogênio líquido sob temperatura de -196 °C (FRESHNEY, 2005) até que se iniciasse o cultivo das mesmas. Um criotubo foi descongelado por vez, sempre que necessário iniciar o cultivo das células (quando os critérios de qualidade das células em cultivo, como características morfológicas e tempo de multiplicação celular, não estavam mais adequados).

Para o descongelamento, duas garrafas de cultivo celular de 75 cm², novas e estéreis, eram adicionadas de 10 mL de meio de cultura e incubadas em incubadora de CO₂ a 37 °C por 30 minutos.

Um criotubo contendo cultura de células congelada (volume total de 1 mL) foi retirado do bujão de nitrogênio líquido e mantido em banho termostático a 37 °C até que nenhum cristal de gelo fosse visualizado na solução. Neste momento, foram transferidos 0,5 mL da cultura para cada garrafa que estava na incubadora. A viabilidade da cultura foi checada com o corante azul de trypan.

As garrafas foram mantidas na incubadora (37 °C, 5% de CO₂) até que houvesse confluência suficiente para se fazer uma nova passagem (confluência entre 80 e 95%).

A observação da confluência foi utilizada para o acompanhamento do crescimento celular, por meio da visualização das células em microscópio.

4.6.1.2 Manutenção

O desenvolvimento das culturas foi acompanhado por visualização em microscópio e observação a olho nu da turbidez do meio (para verificar a possível ocorrência de contaminação). A cultura foi submetida ao processo de tripsinização a cada dois dias, desde que tivesse alcançado confluência entre 80% e 95%, para obtenção de uma nova passagem de células (subcultura).

Neste procedimento, o meio foi retirado da garrafa, seguido pela lavagem com 5 mL de solução de PBS para remoção das células não aderidas. A solução foi retirada da garrafa e foram acrescentados 2 mL de solução de tripsina a 0,05%, que foram descartados após leve agitação. A garrafa foi tampada e deixada com a superfície de crescimento das células voltada para cima, por cerca de 3 minutos na incubadora. Após este período, foram adicionados 10 mL de meio à garrafa.

Feita a tripsinização e a adição de meio de cultura à garrafa, a suspensão de células foi quantificada em câmara de Neubauer. Para isto, 100 μ L de suspensão foram adicionados a 400 μ L de PBS e, após homogeneização, 100 μ L desta solução foram adicionados a 100 μ L de azul de Trypan. Esta nova solução foi homogeneizada e 10 μ L foram adicionados de cada lado da câmara para contagem.

Após a contagem, um volume de suspensão contendo 6 ou 4 milhões de células (6 para a próxima subcultura após dois dias e 4 para três dias) foi adicionado à nova garrafa, e seu volume foi completado para 10 mL com meio de cultura.

4.6.1.3 Montagem das placas

O teste para avaliação da presença ou não de dioxinas nas amostras (análise da atividade de luciferase mediada por receptor Ah em células DR CALUX®) utilizou a cultura de células em placas de 96 poços (placas de microtitulação).

As placas foram preparadas após a tripisinização da cultura, sendo utilizado um volume de suspensão que provesse uma quantidade de 80.000 células por poço da placa; portanto, 4,8 milhões de células para cada placa. O volume final da suspensão foi de 8 mL por placa.

Com o auxílio de pipetas multicanal, os 36 poços externos foram preenchidos com 20 μ L de PBS e cada um dos 60 poços restantes, com 100 μ L da suspensão de subcultura recém preparada, conforme ilustrado na **Figura 6**.

Figura 6. Representação esquemática da placa de microtitulação após adição da suspensão de células (representada por C) e de tampão PBS (P).

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|
| A | P | P | P | P | P | P | P | P | P | P | P | P |
| B | P | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | P |
| C | P | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | P |
| D | P | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | P |
| E | P | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | P |
| F | P | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | P |
| G | P | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | P |
| H | P | P | P | P | P | P | P | P | P | P | P | P |

O PBS foi adicionado a fim de se evitar a secagem da placa. A placa foi deixada na incubadora por 24 horas, para aderência das células ao fundo dos poços. Após este período, os extratos das amostras, cuja preparação está

descrita a seguir, foram adicionados aos poços. Este procedimento é chamado de exposição da placa.

4.6.2 Preparo de amostras

Foram pesados 3,0 g de amostra, previamente fundida em microondas, em frasco Duran de 40 mL. A este frasco foram adicionados 3 mL de hexano e o mesmo foi agitado em Vortex por aproximadamente 30 segundos na velocidade máxima. Após agitação, o frasco foi colocado em banho de ultrassom por 30 minutos em temperatura ambiente (25 ± 5 °C).

Para cada amostra utilizou-se duas colunas grandes, e para o branco de reagentes utilizou-se uma coluna pequena. Em cada batelada, uma amostra de branco de reagentes e uma amostra de referência foram analisadas, sendo o resultado desta última utilizado para o cálculo da recuperação aparente do bioensaio. As colunas foram montadas colocando-se algodão lavado ao fundo e adicionando-se os adsorventes na seguinte ordem: para coluna grande - 15 g de sílica acida a 33%, 15 g de sílica acida a 20% e sulfato de sódio em quantidade suficiente para atingir altura de 1 cm na coluna; para coluna pequena - 5 g de sílica ácida a 33%, 5 g de sílica ácida a 20% e sulfato de sódio em quantidade suficiente para 1 cm na coluna. Após a montagem da coluna, foi procedida à adição dos solventes e amostras de acordo com a **Tabela 8**.

Tabela 8- Condições cromatográficas para purificação do extrato de amostra

| Coluna grande | Coluna pequena |
|--|---|
| Condicionamento com 40 mL de solução de hexano:éter etílico (97:3, v/v) | Condicionamento com 20 mL de solução de hexano:éter etílico (97:3, v/v) |
| Transferência da amostra com pipeta de Pasteur | Transferência da amostra com pipeta de Pasteur |
| Lavagem da amostra com 2mL da solução de hexano:éter etílico (97:3, v/v) (2 vezes) | Troca do frasco coletor quando a coluna estiver quase seca |
| Adição de 5mL de solução de hexano:éter etílico (97:3, v/v) | Lavagem da amostra com 1mL da solução de hexano: éter etílico (97:3, v/v) (3 vezes) |
| Adição de 15 mL de solução de hexano: éter etílico (97:3, v/v) | |
| Troca do frasco coletor quando a coluna estiver quase seca | Adição de 5mL de solução hexano/éter etílico 97:3 |
| Adição de 60 mL de solução de hexano:éter etílico (97:3, v/v) | Adição de 28 mL de solução de hexano: éter etílico (97:3, v/v) |

Os extratos purificados obtidos na etapa de cromatografia foram transferidos, quantitativamente, para frascos de Turbo Vap (transferência da amostra e lavagem do resíduo duas vezes com hexano utilizando pisseta). Em seguida, foram levados para secagem a 50 °C no Turbo Vap. O conteúdo obtido foi transferido para vial de fundo cônico e o resíduo foi lavado duas vezes com 200 µL de hexano, seguido de secagem em bloco aquecedor com fluxo de nitrogênio a 40 °C. Após secagem completa, foram acrescentados 25 µL de DMSO, obtendo-se a amostra 1x.

A partir da amostra 1x foram preparadas as diluições 3x e 10x. Para o preparo da diluição 3x, 4 µL da amostra 1x foi adicionado a 8 µL de DMSO. Para o preparo da amostra 10x, 4 µL da amostra 1x foi adicionado a 36 µL de DMSO. As três diluições foram submetidas à análise.

4.6.3 Análise da atividade do receptor Ah mediada por luciferase em células DR CALUX®

Em placa de poliestireno (de 48, 24 ou 12 poços, a depender do volume final de solução), as amostras foram diluídas em meio de cultura, seguindo a proporção de 350 µL de meio de cultura para cada 5,6 µL das amostras. Foram preparadas soluções das amostras nas diluições 1x, 3x e 10x, da amostra de referência BRM-07, utilizada para controle da resposta celular, do DMSO e dos pontos da curva de calibração, todos previamente agitados em agitador do tipo Vortex. A placa foi levada à mesa agitadora por 10 minutos, sob agitação de 300 giros por minuto. O DMSO foi o mesmo utilizado na retomada e diluição das amostras para análise.

Cada uma dessas soluções foi adicionada em triplicata na placa do teste, sendo utilizados 100 µL por poço, conforme **Figura 7**.

As concentrações finais de 2,3,7,8 TCDD (curva de calibração) foram de 0 (C0), 0,3 (C1), 0,6 (C2), 0,8 (C3), 1,0 (C4), 1,5 (C5), 2,0 (C6), 2,5 (C7) e 3,0 (C8) pM/ poço.

Figura 7- Representação esquemática da placa de microtitulação após exposição, C representa as amostras da curva de calibração, D o dimetilsulfóxido (DMSO), R a amostra padrão BRM 07, utilizada para controle de crescimento celular e S as amostras.

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|---|----|-----------|----------|----------|-----------|----------|----------|-----------|----------|----------|----|
| A | | | | | | | | | | | | |
| B | | C0 | C1 | C2 | C3 | C4 | C5 | C6 | C7 | C8 | D | |
| C | | C0 | C1 | C2 | C3 | C4 | C5 | C6 | C7 | C8 | D | |
| D | | C0 | C1 | C2 | C3 | C4 | C5 | C6 | C7 | C8 | D | |
| E | | R | S1 10X | S1 3X | S1 1X | S2 10X | S2 3X | S2 1X | S3 10X | S3 3X | S3 1X | |
| F | | R | S1 10X | S1 3X | S1 1X | S2 10X | S2 3X | S2 1X | S3 10X | S3 3X | S3 1X | |
| G | | R | S1 10X | S1 3X | S1 1X | S2 10X | S2 3X | S2 1X | S3 10X | S3 3X | S3 1X | |
| H | | | | | | | | | | | | |

A placa foi incubada por 48 horas na incubadora de CO₂ a 37 °C. Após este período, foi feita a leitura do resultado.

4.6.4 Leitura de resultados

A placa foi retirada da incubadora e observada em microscópio para verificar a possível ocorrência de contaminação e toxicidade (que causariam morte celular). Diante da não observação desses eventos, a placa foi aberta em cabine de segurança biológica, o sobrenadante foi retirado dos poços com o auxílio de um sistema de vácuo, e descartado. Em seguida, adicionou-se 100 µL de PBS em cada poço, para lavagem do resíduo de meio de cultura. O tampão foi removido também com o sistema de vácuo e os poços foram acrescidos de 30 µL de solução de lise, com uma pipeta multicanal. A placa foi colocada em mesa agitadora por 10 minutos em velocidade de 300 giros por minuto.

Após agitação, a placa foi submetida à leitura no equipamento de leitura (luminômetro). Ela foi inserida, sem tampa, no equipamento, onde foram adicionados 100 µL da solução reveladora em cada poço e a luminescência foi medida durante 4 segundos. Para interromper a reação, 100 µL de solução de ácido acético a 0,25% foram adicionados em cada poço. O Software Magellan™ foi utilizado para obtenção dos resultados, na unidade RLU (*relative light unit*- unidade relativa de luz), que foram convertidos em teor de dioxinas por meio dos cálculos feitos na planilha do programa Excel®, fornecida pelo fabricante.

O valor máximo aceitável para o resultado do branco foi de 1,0 pM TCDD, conforme orientações do fabricante (BDS, 2016). O intervalo aceitável de recuperação aparente do bioensaio foi de 30% a 130% e o valor de corte assumido para as amostras foi de 1,2 pg BEQ/g de gordura, de acordo com diretrizes da UE (EC, 2017), ou seja, foram consideradas suspeitas as amostras com resultados BEQ acima deste limite e conformes as amostras com resultados abaixo deste limite.

4.7 Delineamento Experimental

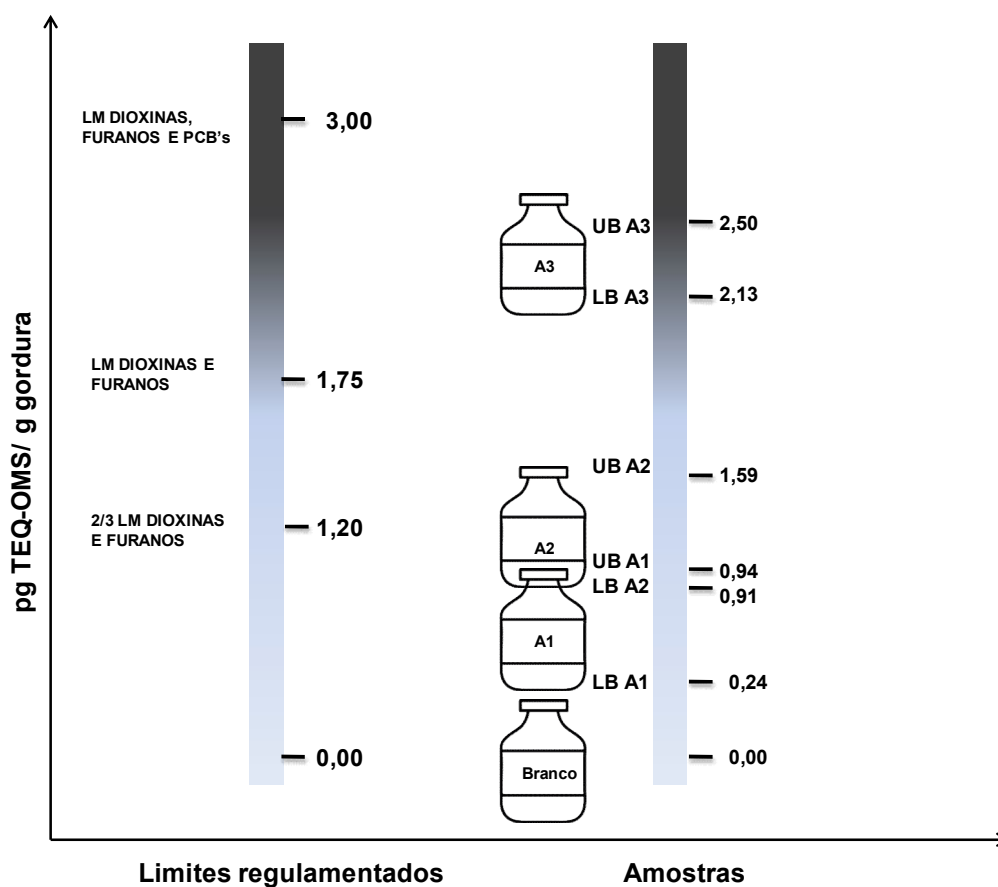
4.7.1 Validação do Método

Considerando a aplicação do método para triagem, foi priorizada uma faixa de concentração para a validação que estivesse próxima aos limites regulamentados na legislação brasileira para gordura de aves, ou seja, 1,75 pg TEQ-OMS/g de gordura para dioxinas e furanos e 3,00 pg TEQ-OMS/g de gordura para dioxinas, furanos e PCBs. Além disto, foi considerada também a regulamentação da UE que estabelece que o ponto de corte para métodos de triagem deve ser de dois terços o valor do LM estabelecido pela legislação (EC, 2017). Considerando um cenário mais rigoroso, de 1,75 pg TEQ-OMS/g de gordura, o limite de corte para a triagem seria 1,2 pg TEQ-OMS/g de gordura. Assim, a faixa de concentração das amostras selecionadas para a validação,

cobriu os níveis críticos de decisão para os métodos de triagem de dioxinas, furanos e PCBs, conforme representado na **Figura 8**.

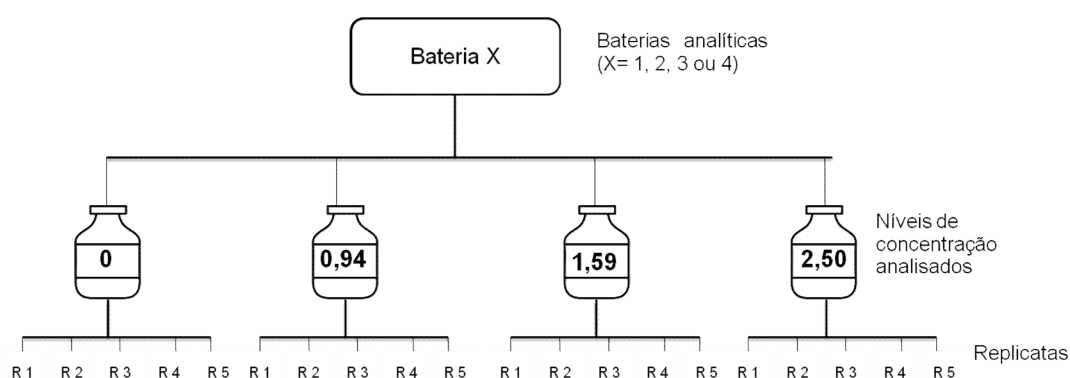
Considerando os resultados *upperbound* TEQ para dioxinas, furanos e PCBs, os níveis de contaminação do estudo de validação foram: branco (nível zero ou amostra não contaminada); 0,94 pg TEQ-OMS/g de gordura; 1,59 pg TEQ-OMS/g de gordura; e 2,50 pg TEQ-OMS/g de gordura.

Figura 8- Representação esquemática da faixa de concentração validada e sua relação com os níveis regulamentados e de decisão para a triagem de dibenzo-p-dioxinas (PCDDs), dibenzofuranos (PCDFs) e bifenilas policloradas (PCBs). LB: *lowerbound*; UB: *upperbound*; LM: limite máximo; A1: amostra 1; A2: amostra 2; A3; amostra 3.



A validação do método DR CALUX[®] foi conduzida conforme sugerido por GONDIM *et al.* (2014). Foram analisadas amostras não contaminadas e contaminadas, em quatro níveis de concentração, incluindo o branco, em quatro diferentes baterias analíticas, as quais envolveram três diferentes analistas. Devido aos custos dos materiais do método, o número de níveis de concentração foi estabelecido como três, ou seja, o mínimo que permitiu uma estimativa da RPC por modelos não lineares de dois parâmetros. Em cada bateria analítica, foram analisadas cinco replicatas de cada nível de concentração, caracterizando condições de repetibilidade e de precisão intermediária. Ao final do experimento, foram realizadas 80 análises, sendo um total de 20 por nível estudado (**Figura 9**).

Figura 9- Representação esquemática de uma bateria analítica do processo de validação. Concentrações expressas em pg TEQ-OMS/g de gordura. R: replicata por nível estudado.



O meio de cultura α -MEM suplementado com 10% de SFB foi utilizado na primeira batelada, nas demais se utilizou o meio MEM.

Foi feito o uso de tabelas de contingência para o cálculo das taxas (TFP, TFN, TST, TSB, e TCF) para cada nível de concentração estudado. O critério de TFN menor que 5% foi adotado, segundo diretrizes da EU (2017). Análise combinatória foi empregada para avaliação da precisão, por meio da estimativa

da ACO e COM, sendo aceitáveis valores iguais a 1 para níveis fora da RPC (GONDIM *et al.*, 2014). Curvas de desempenho foram construídas para determinação do LD e RPC, empregando modelos não lineares Probit (GONDIM *et al.*, 2014), Sig. 1 e Sig. 2 (Minitab 18.1). Os critérios utilizados para escolha do melhor ajuste foram: i) maior coeficientes de determinação (R^2), ii) perfil não tendencioso dos gráficos de resíduos (GONDIM *et al.*, 2014) e iii) menor soma de quadrados de resíduos. Os resultados foram analisados empregando *softwares* Microsoft Excel e Datafit.

4.7.2 Aplicação do Método e Comparação com CG-EMAR

Trinta e seis amostras coletadas no âmbito do PNCRC e recebidas pelo LANAGRO/MG, nos anos de 2017 e 2018, foram analisadas pelo método de triagem validado e pelo método confirmatório CG-EMAR. Os resultados encontrados nos dois métodos foram comparados e o teste de Bland-Altman foi aplicado, empregando o *software* Medcalc.

5 Resultados e Discussão

5.1 Validação do Método

5.1.1 Taxas de falso-positivos (TFP), falso-negativos (TFN), seletividade (TST), sensibilidade (TSB) e confiabilidade (TCF)

A estimativa das taxas de falsos resultados/de confiabilidade, de seletividade e de sensibilidade equivale à avaliação dos parâmetros veracidade, sensibilidade e seletividade de métodos quantitativos, respectivamente (GONDIM *et al.*, 2011).

Dentre as 20 replicatas de amostras brancas analisadas, houve um resultado falso-positivo na segunda e outro na quarta baterias analíticas. Assim, o valor encontrado de TFP para o nível zero foi de 10%, o que resultou em TST e TCF de 90% (**Tabela 9**).

Para o nível de 0,94 pg TEQ-OMS/g de gordura, ocorreu um resultado falso-negativo na segunda bateria analítica, resultando numa TFN de 5% e consequentes valores de TSB e TCF de 95%. Nos demais níveis pesquisados, de 1,59 e 2,50 pg TEQ-OMS/g de gordura, não houve falsos resultados, de forma que a TFN foi de 0% e as taxas TSB e TCF alcançaram o valor de 100% (**Tabela 9**).

Tabela 9- Taxas de falso-positivos (TFP), falso-negativos (TFN), seletividade (TST), sensibilidade (TSB) e confiabilidade (TCF) obtidas para a detecção de dioxinas em amostras de gordura de ave pelo método DR CALUX®.

| Nível de contaminação pg TEQ-OMS/g de gordura | Parâmetro de Validação | | | | |
|---|------------------------|-----|-----|-----|-----|
| | TFP | TFN | TST | TSB | TCF |
| 0 | 10 | - | 90 | - | 90 |
| 0,94 | - | 5 | - | 95 | 95 |
| 1,59 | - | 0 | - | 100 | 100 |
| 2,50 | - | 0 | - | 100 | 100 |

TEQ: equivalência tóxica total, OMS: Organização Mundial da Saúde.

Durante a validação do método DR CALUX® para análise de amostras de produtos destinados a alimentação animal, Piskorska *et al.* (2017) também não encontraram resultados falso-negativos em níveis acima do ponto de corte estabelecido e a taxa de falso-positivos foi menor que 1%. Os resultados encontrados por Vanderperren *et al.* 2010, ao avaliarem a aplicabilidade da triagem por DR CALUX® para matrizes de alimentos e de produtos destinados à alimentação animal, também levaram à taxas de falso-negativos de 0% e taxas de falso-positivos entre 1 e 21% para a análise de dioxinas, furanos e PCBs.

Vrommam *et al.* (2012) compararam os resultados do método DR CALUX® com CG-EMAR, para amostras de lácteos, ovos, peixes, gordura animal e óleo vegetal. Tais autores destacaram que os resultados encontrados pelo DR CALUX® foram notavelmente maiores que aqueles estimados no método confirmatório, nos níveis baixos de contaminação. Adotando-se uma abordagem qualitativa, tal observação sugere à ocorrência de resultados falso-positivos, uma vez que em concentrações abaixo do ponto de corte, e, portanto, em baixos níveis de contaminação, o método de triagem pode detectar compostos ligantes de AhR, que não se incluem no grupo das

dioxinas, furanos e PCB detectados pelo método confirmatório (GIZZI *et al.*, 2005; TSUTSUMI *et al.*, 2003; VROMMAM *et al.*, 2012).

Os valores encontrados de 0% de TFN e de 100% para as taxas TSB e TCF nos níveis acima do ponto de corte indicaram a seletividade e a sensibilidade do método. Tendo-se em vista a legislação vigente (EC, 2017), a qual determina que a taxa de resultados falso-negativos para métodos de triagem de detecção de dioxinas deve ser menor que 5%, o método foi adequado em toda a faixa validada.

5.1.2 Região de perda de confiabilidade e limite de detecção

Foram construídas curvas de desempenho utilizando três modelos não lineares.

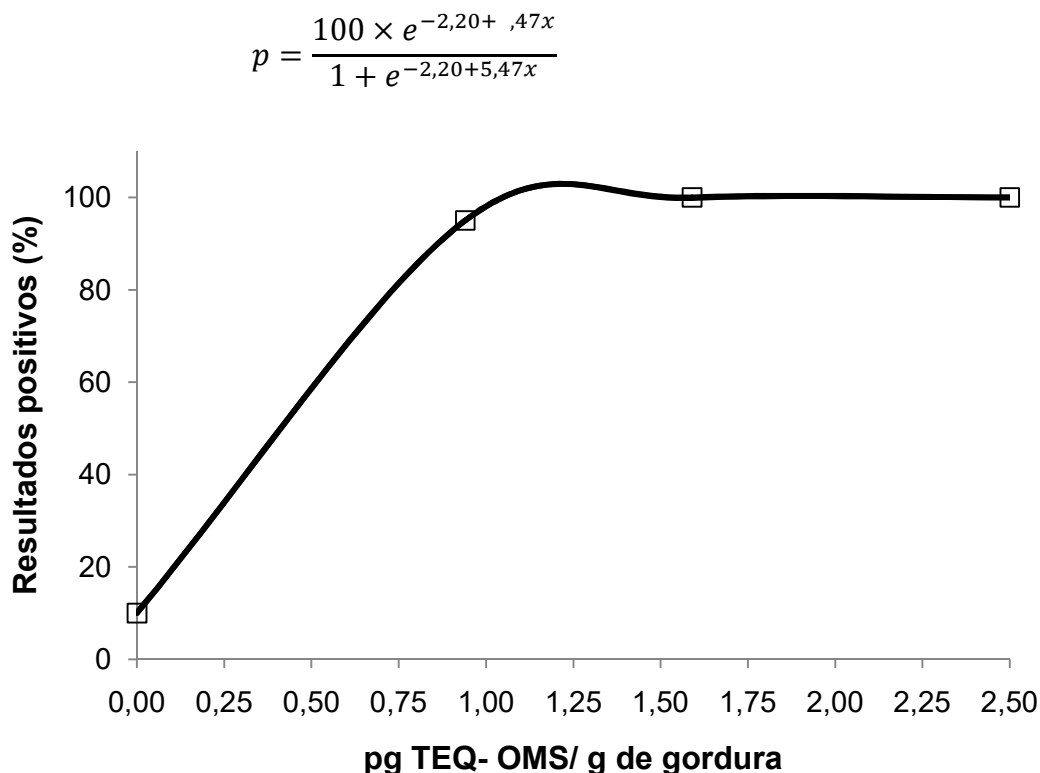
No primeiro modelo, Probit, descrito pela **Equação 2**, os valores de -2,20 e 5,47 foram obtidos para os coeficientes a e b, respectivamente. “x” representa a concentração da amostra e “p” a porcentagem de resultados positivos.

$$p = \frac{e^{a+bx}}{1 + e^{a+bx}}$$

(Eq. 2)

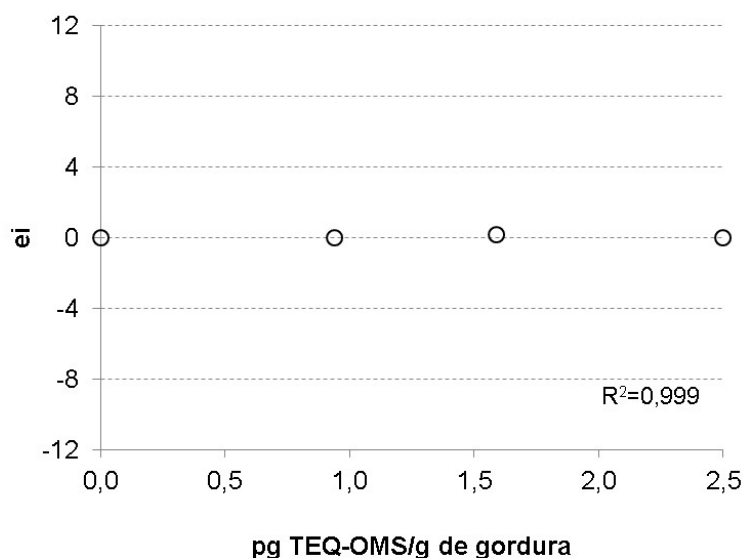
A construção da curva de desempenho do método por este modelo (**Figura 10**) resultou na definição da RPC entre as concentrações de -0,14 e 0,94 pg TEQ-OMS/g de gordura, de forma que o limite inferior da RPC não diferiu de zero. Estes limites inferior e superior da RPC corresponderam às concentrações com 5% e 95% de resultados positivos, respectivamente, sendo o LD definido como o limite superior deste faixa, portanto, 0,94 pg TEQ-OMS/g de gordura.

Figura 10- Resultados experimentais (O), curva de desempenho (—) e equação obtidos pelo modelo não linear Probit para o método DR CALUX[®] na detecção de dioxinas, furanos e bifenilas policloradas em gordura de frango.



Pelo gráfico de dispersão dos resíduos do modelo Probit (**Figura 11**) notou-se um perfil não tendencioso dos mesmos. O R^2 da curva obtida foi de 0,999 e a soma de quadrado dos resíduos $2,25 \times 10^{-2}$, indicando a adequação do modelo para a estimativa da RPC do método em análise.

Figura 11- Gráfico exploratório dos resíduos (ei) e coeficiente de determinação (R^2) obtidos para o modelo não linear Probit para o método DR CALUX[®] na detecção de dioxinas, furanos e bifenilas policloradas em gordura de frango.



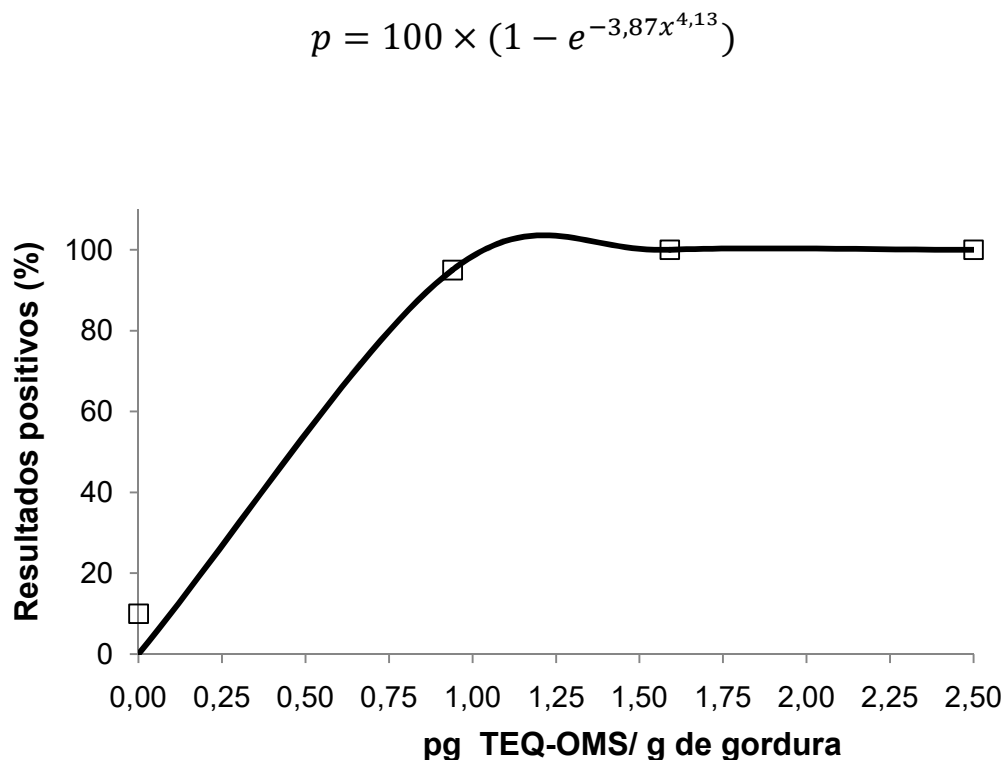
O segundo modelo testado para a construção da curva de desempenho, Sig. 1, é descrito pela **Equação 3**, cujos coeficientes a e b estimados foram de 3,87 e 4,13, respectivamente. “ x ” representa a concentração da amostra e “ p ” a porcentagem de resultados positivos.

$$p = 100 \times (1 - e^{-ax^b})$$

(Eq. 3)

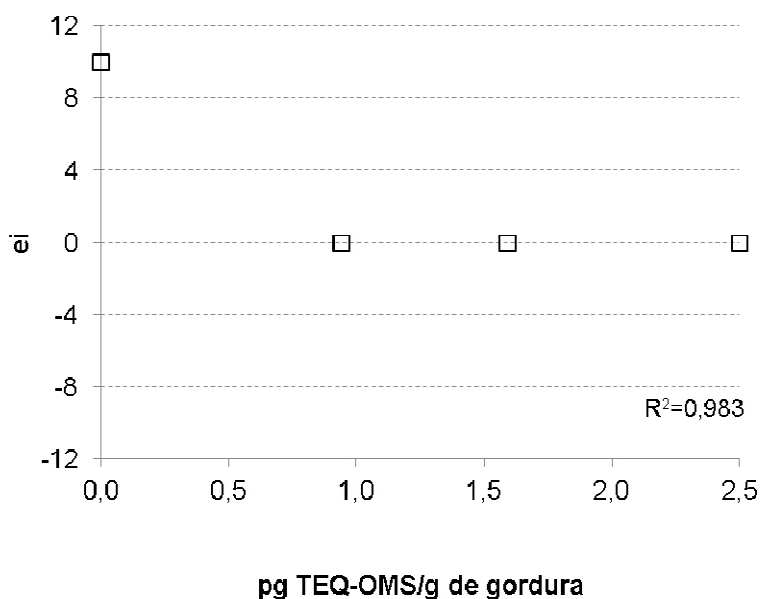
Os limites da RPC de -0,35 e 0,94 pg TEQ-OMS/g de gordura foram estimados pelo segundo modelo não linear, considerando-se porcentagens de resultados positivos de 5% e 95%, respectivamente (**Figura 12**). Desta forma, o limite inferior novamente não diferiu de zero e o limite superior coincidiu com aquele estimado pelo primeiro modelo (Probit).

Figura 12- Resultados experimentais (□), curva de desempenho (—) e equação obtidos pelo modelo não linear Sig. 1 para o método DR CALUX® na detecção de dioxinas, furanos e bifenilas policloradas em gordura de frango.



O R^2 da curva obtida pelo modelo Sig. 1 foi de 0,983 e a soma de quadrado dos resíduos foi estimada em 100,00, indicando que este modelo, seria preterido ao Probit. O gráfico de dispersão de resíduos do modelo Sig. 1 encontra-se representado na **Figura 13**.

Figura 13- Gráfico exploratório dos resíduos (e_i) e coeficiente de determinação (R^2) obtidos para o modelo não linear Sig. 1 para o método DR CALUX® na detecção de dioxinas, furanos e bifenilas policloradas em gordura de frango.



O terceiro modelo utilizado para a construção da curva de desempenho, Sig. 2, é descrito pela **Equação 4**. Os coeficientes a e b estimados foram de -2,25 e -3,56, respectivamente. “x” representa a concentração da amostra e “p” a porcentagem de resultados positivos.

$$p = 1 - e^{-e^{a-bx}}$$

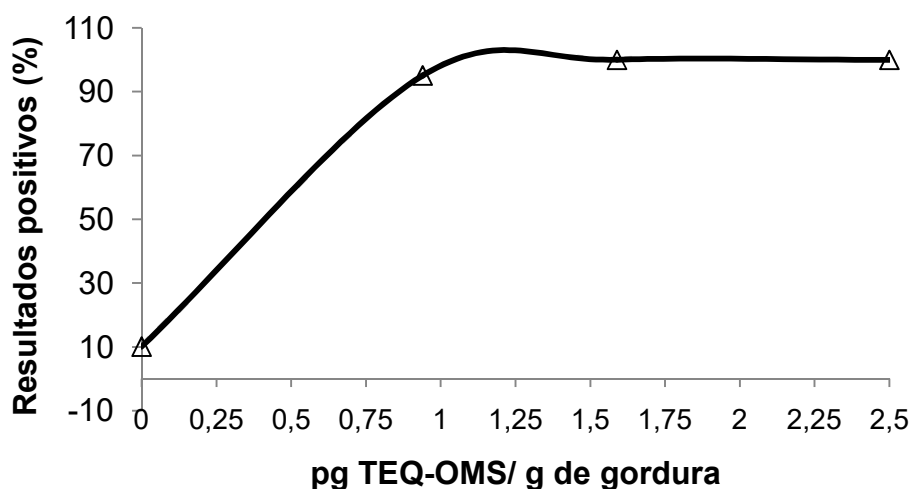
(Eq. 4)

A construção da curva de desempenho por este terceiro modelo definiu os limites da RPC como -0,20 e 0,94 pg TEQ-OMS/g de gordura,

considerando-se porcentagens de resultados positivos de 5% e 95%, respectivamente (**Figura 14**). Desta forma, o limite inferior novamente não diferiu de zero e o limite superior coincidiu com aqueles estimados pelos modelos Probit e Sig. 1. Portanto, considerando-se o LD como o limite superior da RPC, o mesmo valor foi encontrado para os três modelos avaliados no presente estudo, de 0,94 pg TEQ-OMS/g de gordura.

Figura 14- Resultados experimentais (Δ), curva de desempenho (—) e equação obtidos pelo modelo não linear Sig. 2 o para o método DR CALUX[®] na detecção de dioxinas, furanos e bifenilas policloradas em gordura de frango.

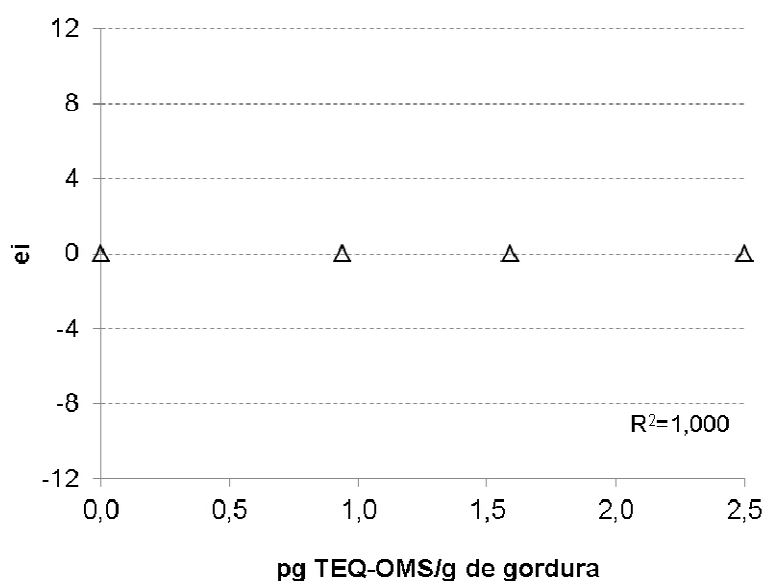
$$p = 100 \times (1 - e^{-e^{-2,25-3,56x}})$$



O R^2 da curva obtida pelo modelo Sig. 2 foi de 1,00 e a soma de quadrado de resíduos foi estimada em $4,78 \times 10^{-12}$. Um perfil não tendencioso (aleatório) foi visualizado no gráfico de dispersão de resíduos (**Figura 15**), indicando que este modelo foi o mais adequado para a estimativa da RPC do

método DR CALUX[®], tendo em vista os critérios adotados para definição do melhor ajuste.

Figura 15- Gráfico exploratório dos resíduos (e_i) e coeficiente de determinação (R^2) obtidos para o modelo não linear Sig. 2 para o método DR CALUX[®] na detecção de dioxinas, furanos e bifenilas policloradas em gordura de frango.



O LD encontrado pelo modelo escolhido, Sig. 2, de 0,94pg TEQ-OMS/g de gordura, sinalizou o potencial para aplicação do método na triagem de dioxinas, furanos e PCBs, visto que o mesmo foi inferior ao limite regulamentado, de 1,75 pg TEQ-OMS/g de gordura, e também ao ponto de corte utilizado no teste de triagem, de 1,2 pg TEQ-OMS/g de gordura.

Cumprir destacar que o método em questão possui um critério de ponto de corte correspondente a 2/3 do limite regulamentado (BRASIL, 2018a; EC, 2017). Portanto, apesar de os níveis compreendidos pela RPC corresponderem a níveis de amostras positivas, eles estão abaixo do ponto de corte e possuem baixos níveis de contaminação, correspondendo a amostras não violadas.

Em geral, os trabalhos que calcularam o LD do método DR CALUX[®] utilizaram uma abordagem quantitativa para analisar os resultados (EICHBAUM *et al.*, 2014; GIZZI *et al.*, 2005; HOOGENBOOM *et al.*, 2006; PISKORSKA *et al.*, 2017). Desta maneira, este parâmetro foi estimado a partir dos resultados da curva padrão de TCDD e não a partir dos resultados obtidos com amostras (EICHBAUM *et al.*, 2014). Devido às diferenças entre os valores de REPs e TEFs-OMS (HOOGENBOM *et al.*, 2006), bem como ao fato de que esta abordagem não leva em conta os resultados do branco de reagentes e da recuperação do método, ela pode não estimar adequadamente o LD.

5.1.3 Acordância e Concordância

Os falso-resultados obtidos nas baterias dois e quatro impactaram na precisão do método. Valores máximos de ACO foram estimados para todos os níveis estudados em todas as baterias analíticas, com exceção dos níveis zero e 0,94 pg TEQ-OMS/g de gordura na bateria 2 e do nível zero na bateria 4. Assim, valores médios de ACO corresponderam a 0,80 para o nível zero; 0,90 para o nível de 0,94 pg TEQ-OMS/g de gordura e 1,0 para os demais níveis. A CON refletiu este perfil, e os valores encontrados para este parâmetro foram de 0,81 para o nível zero; 0,90 para o nível de 0,94 pg TEQ-OMS/g de gordura e de 1,00 para os demais níveis (**Tabela 10**).

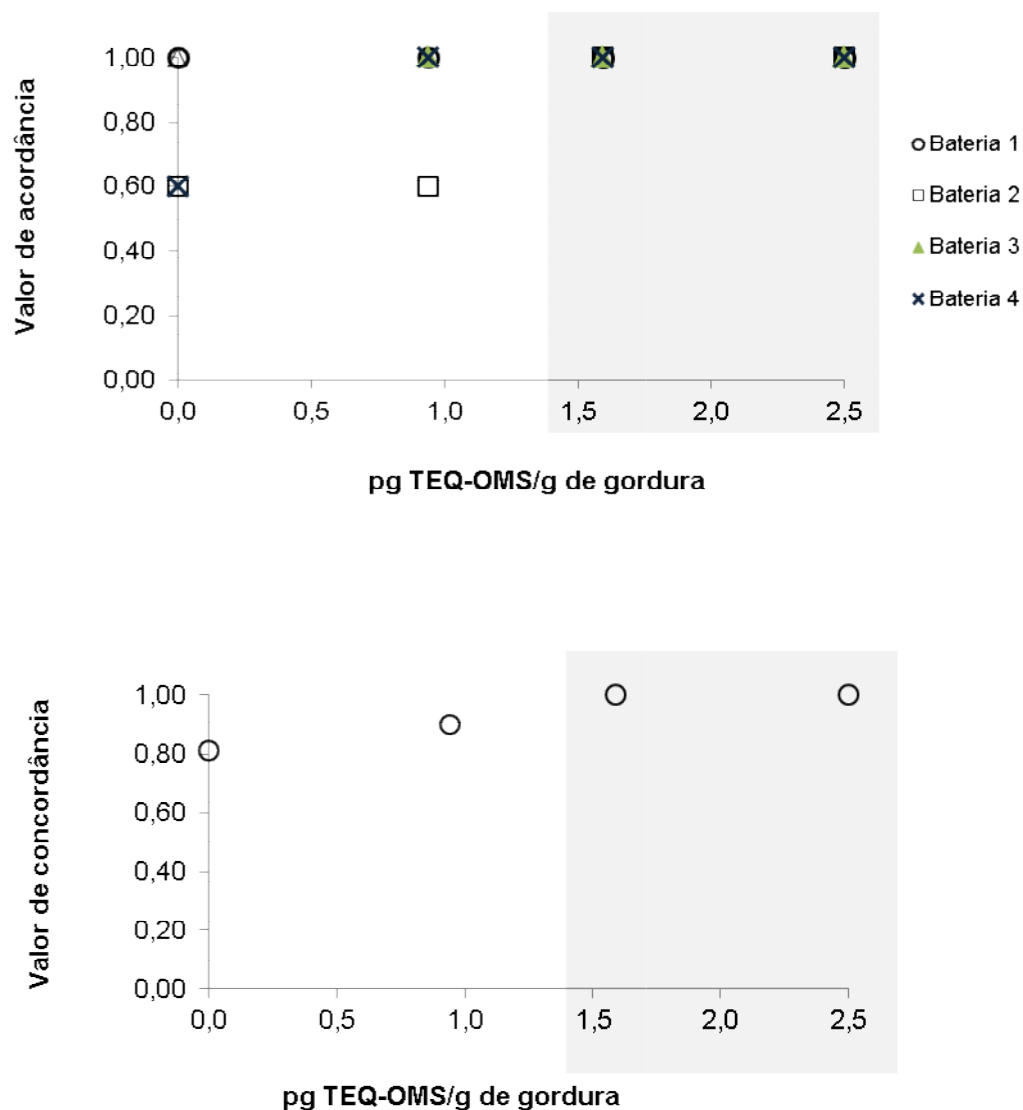
Tabela 10- Valores de acordância (ACO) e condordância (CON) obtidos na detecção de dioxinas em amostras de gordura de ave pelo método DR CALUX®.

| Nível de contaminação pg TEQ-OMS/ g de gordura | ACO | | | | ACO média | CON |
|--|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|------|
| | Bateria 1 | Bateria 2 | Bateria 3 | Bateria 4 | | |
| 0 | 1,00 | 0,60 | 1,00 | 0,60 | 0,80 | 0,81 |
| 0,94 | 1,00 | 0,60 | 1,00 | 1,00 | 0,90 | 0,90 |
| 1,59 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 |
| 2,50 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 |

TEQ: equivalência tóxica total, OMS: Organização Mundial da Saúde; Área sombreada: níveis externos à região de perda de confiabilidade.

A representação gráfica dos valores de acordância e concordância obtidos encontra-se na **Figura 16**.

Figura 16- Valores de acordância e concordância em função das concentrações estudadas de dioxinas, furanos e bifenilas policloradas, expressas em equivalência tóxica total (TEQ) segundo Organização Mundial da Saúde (OMS), com destaque para os níveis externos à região de perda de confiabilidade - área sombreada.



Os resultados das quatro baterias analíticas foram concordantes entre si para os níveis fora da RPC. Os valores estimados de ACO e CON iguais a 1,00, fora da RPC, indicaram precisão do método. Isto porque, na interpretação

dos resultados de ACO e CON, valores iguais a 1,00 são considerados aceitáveis nas faixas de concentração do analito em que o método apresenta 100% de confiabilidade (ELLISON & FEARN, 2005; GONDIN *et al.*, 2014).

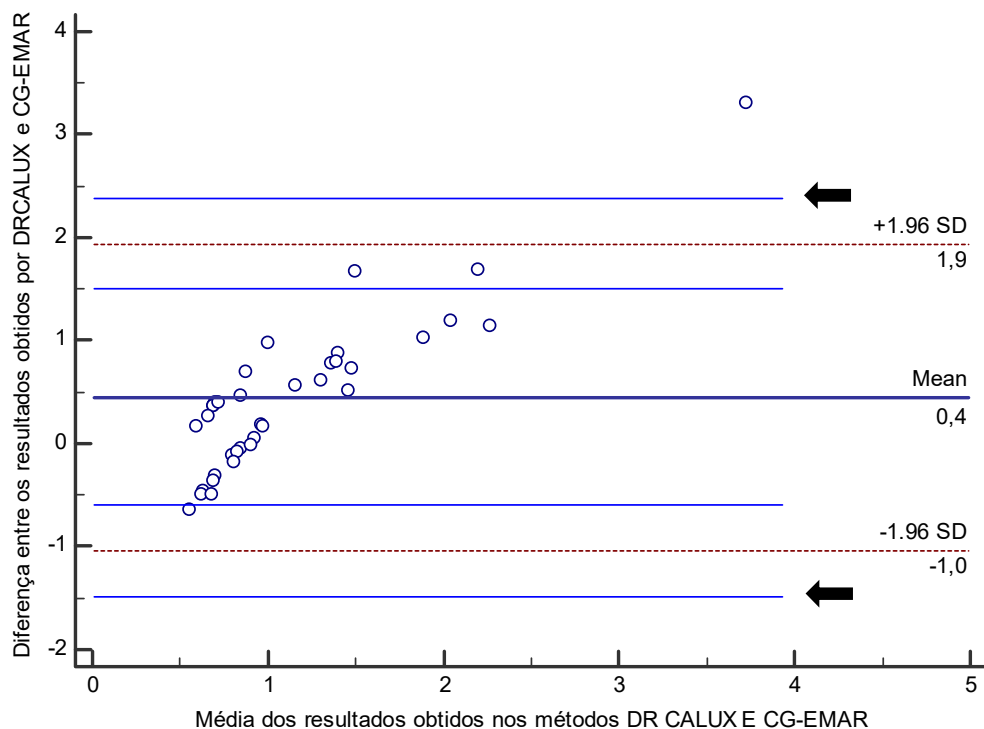
Nos demais estudos publicados nos quais o método DR-CALUX[®] teve seu desempenho avaliado numa abordagem qualitativa, não foram evidenciadas estimativas dos parâmetros relacionados à precisão – ACO e CON.

Nos estudos quantitativos, valores de repetibilidade e reprodutibilidade abaixo do que é atualmente estabelecido pela legislação (de 20 e 25% respectivamente) (EC, 2017) foram encontrados pelos autores Hoogenboom *et al.* (2006) e Fochi *et al.* (2008), sendo que apenas repetibilidade foi avaliada pelo último. Gizzi *et al.* (2005) encontrou valores de repetibilidade abaixo de 20% para duas das 4 amostras analisadas, enquanto os valores de reprodutibilidade encontrados foram todos acima de 25%. Tsutsumi *et al.* (2003) obtiveram valores de repetibilidade e reprodutibilidade de, respectivamente, 5,7 a 11,7% e 19 a 25,4%, enquanto Vanloco *et al.* (2004) encontraram valores em torno de 15% para repetibilidade e de 79% para reprodutibilidade interlaboratorial. Desta forma, na maior parte dos casos a reprodutibilidade não cumpriu os requisitos definidos pela EU (< 25%), indicando que o perfil de aplicação do bioensaio em questão seria qualitativo e não quantitativo.

5.2 Aplicação do método

Na etapa de aplicação do método, 36 amostras foram analisadas e os resultados foram comparados com aqueles obtidos por CG-EMAR (**Tabela 11**). O teste de Bland-Altman foi utilizado para a comparação dos dois métodos e o resultado é representado graficamente na **Figura 17**.

Figura 17- Comparação dos resultados obtidos pelo método DR CALUX[®] e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas de alta resolução (CG-EMAR) pelo teste de Bland-Altman. Mean: diferença média entre as respostas dos dois métodos, SD: desvio padrão.



O aspecto visual do gráfico indica que a variação de pelo menos um dos métodos depende da magnitude das medidas (METHOD COMPARISON & METHOD EVALUATION, 2017), ou seja, a intensidade da resposta varia com a variação do nível de contaminação.

Vromman *et al.* (2012) utilizaram este mesmo teste para a comparação dos resultados das análises feitas por DR CALUX[®] e CG-EMAR para as matrizes ovo, óleo vegetal, peixes, produtos lácteos e gordura animal. Os resultados encontrados pelos autores levaram à conclusão de que a resposta da triagem é significativamente mais alta em níveis mais baixos de contaminação. Segundo os autores, em níveis acima dos limites máximos, a diferença entre as respostas dos dois métodos tende a valores próximos de zero.

Todavia, o intervalo de concentrações avaliado no presente trabalho é cerca de 20 vezes menor que o intervalo avaliado por Vromman, *et al.* (2012), que alcançou concentrações próximas de 5, 10, 20, 30 e 40 pg TEQ-OMS/g de gordura. Sendo assim, apesar de os resultados indicarem uma tendência de variação na resposta do método de triagem com a variação da concentração de dioxinas, furanos e PCBs na amostra, não ficou claro como esta variação ocorre e também não é possível afirmar qualquer tendência para níveis altos de contaminação (acima de 2 pg TEQ-OMS/g de gordura).

Adicionalmente, os limites de acordo (linhas pontilhadas em vermelho na **Figura 17**), determinados pela diferença média dos resultados dos dois métodos, mais ou menos 1,96 vezes o desvio padrão das diferenças dos resultados, não excederam a diferença máxima permitida entre os dois métodos (indicadas por setas na **Figura 17**). Considerou-se, portanto, que os métodos estavam em acordo e poderiam ser utilizados para o mesmo propósito (BLAND & ALTMAN, 2012; GIAVARINA, 2015; HARTNACK, 2014; METHOD COMPARISON & METHOD EVALUATION, 2017).

Como apresentado na **Tabela 11**, todas as amostras com resultados conformes pelo método de triagem, ou seja, com resultados abaixo do ponto de corte, eram de fato amostras com níveis de dioxinas, furanos e PCBs inferiores aos LM regulamentados e, portanto, conformes. Desta forma, pode-se concluir que o método não apresentou falso-negativos.

Tabela 11- Resultados das análises de 36 amostras expressos em pg TEQ-OMS/g de gordura (*upperbound*) para o método confirmatório por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas de alta resolução (CG-EMAR) e expressos em BEQ para o método de triagem DR CALUX®.

| Amostra | pg TEQ-OMS/ g gordura | BEQ |
|---------|--------------------------|------|
| 1 | 0,5 | 0,9 |
| 2 | 0,51 | 0,87 |
| 3 | 0,51 | 0,67 |
| 4 | 0,51 | 0,87 |
| 5 | 0,52 | 1,49 |
| 6 | 0,52 | 0,91 |
| 7 | 0,53 | 1,23 |
| 8 | 0,53 | 0,8 |
| 9 | 0,61 | 1,08 |
| 10 | 0,66 | 2,33 |
| 11 | 0,86 | 0,40 |
| 12 | 0,86 | 0,74 |
| 13 | 0,86 | 0,54 |
| 14 | 0,87 | 0,82 |
| 15 | 0,87 | 0,78 |
| 16 | 0,87 | 1,05 |
| 17 | 0,87 | 0,23 |
| 18 | 0,87 | 0,51 |
| 19 | 0,87 | 0,38 |
| 20 | 0,88 | 1,44 |
| 21 | 0,89 | 1,05 |
| 22 | 0,90 | 0,95 |
| 23 | 0,90 | 0,71 |
| 24 | 0,91 | 0,90 |
| 25 | 0,93 | 0,43 |
| 26 | 0,96 | 1,84 |
| 27 | 0,98 | 1,75 |
| 28 | 0,99 | 1,79 |
| 29 | 1,00 | 1,61 |
| 30 | 1,12 | 1,84 |
| 31 | 1,2 | 1,71 |
| 32 | 1,35 | 3,04 |

| | | |
|----|------|------|
| 33 | 1,38 | 2,40 |
| 34 | 1,45 | 2,64 |
| 35 | 1,70 | 2,84 |
| 36 | 2,08 | 5,38 |

Área sombreada: amostras com resultados acima do ponto de corte, 1,2 pg BEQ/g de gordura, consideradas suspeitas pelo método de triagem.

Dentre as 15 amostras consideradas suspeitas pelo método DR CALUX[®] apenas uma era o não-conforme, ou seja, com nível de contaminação que violasse o LM (1,75 pg TEQ-OMS/g de gordura). No entanto, seis delas tinham de fato níveis acima do ponto de corte (1,2 pg TEQ-OMS/g de gordura) e cinco delas tinham níveis entre o LD do método de triagem (0,94pg TEQ-OMS/g de gordura) e o ponto de corte (1,2 pg TEQ-OMS/ g de gordura). Quatro amostras tidas como suspeitas pelo método de triagem tinham níveis inferiores ao seu LD, sendo consideradas, portanto, falso-positivas. Possivelmente, tais amostras apresentavam outros compostos ligantes de AhR, diferentes do analitos de interesse, o que pode ter resultado em detecção de contaminação pelas células DR CALUX[®]. Além disso, outro fator que pode influenciar nas diferenças encontradas entre os resultados dos dois métodos é a diferença entre os valores de REP e TEF de cada congênere. Esses resultados obtidos, ausência de falso-negativos e ocorrência de falso-positivos corroboram com o que tem sido reportado na literatura (HOOGENBOM *et al.*, 2006; PISKORSKA *et al.*, 2017; TSUTSUMI *et al.*, 2003; VROMMAN *et al.*, 2012).

Analisando-se as decisões que seriam tomadas a partir destes resultados, conclui-se que amostras violadas (com níveis de contaminação acima do LM) foram tidas como suspeitas pelo método de triagem e, portanto, a violação foi detectada. Aquelas amostras tidas como conformes na triagem foram amostras para as quais também se obteve resultado conforme (não-violada) no método confirmatório.

5.3 Análise da aplicabilidade do método considerando o histórico de amostras recebidas no LANAGRO/MG

De um total de 238 amostras de gordura de aves analisadas no LANAGRO/MG no ano de 2018, 87% possuíam níveis de contaminação abaixo de 0,94pg TEQ-OMS/g de gordura, 4% apresentavam níveis acima de 1,2 pg TEQ-OMS/g de gordura), e os 9% restantes possuíam níveis entre 0,94 e 1,2 pg TEQ-OMS/g de gordura).

No ano de 2017, 77% das amostras analisadas pelo método confirmatório possuíam níveis de contaminação abaixo de 0,94 pg TEQ-OMS/g de gordura, 9% possuíam níveis acima de 1,2 pg TEQ-OMS/g de gordura e 14% possuíam níveis entre esses dois valores.

Este histórico indica que a utilização do método de triagem na rotina levará a uma diminuição considerável do número de amostras destinadas ao método confirmatório. A maior parte das amostras analisadas nos últimos dois anos possuía níveis de contaminação abaixo do LD do método de triagem. Portanto, se fossem analisadas com emprego desta estratégia, não seriam destinadas à análise por CG-EMAR, que possui maior custo e maior complexidade de execução quando comparada ao método DR CALUX[®].

Ainda que algumas amostras tenham apresentado níveis de contaminação entre o LD de 0,94 pg TEQ-OMS/g de gordura e o ponto de corte estabelecido de 1,2 pg TEQ-OMS/g de gordura, elas representam uma parcela pequena do número total de amostras (14% em 2017 e 9% em 2018). Isto indica que, apesar da possibilidade de detecção de contaminação em amostras com níveis abaixo do ponto de corte e acima do LD, a ocorrência desses resultados “falso-positivos” não será frequente a ponto de inviabilizar a triagem no programa nacional de monitoramento.

6 Conclusão

A avaliação dos parâmetros de desempenho do método validado (TFP, TFN, TSB, TCF, RPC, LD, ACO e CON) indicou a adequação do mesmo para o uso ao qual se propõe. Não foram obtidos resultados falso-negativos acima do ponto de corte, de forma que as TSB e TCF foram 100% para os níveis acima deste valor. O LD estimado foi um pouco inferior ao valor de corte do método, mas uma análise do histórico das amostras analisadas nos últimos dois anos indicou que a ocorrência de resultados “falso-positivos” não será tão frequente a ponto de inviabilizar a estratégia de triagem. Os resultados de ACO e CON iguais a 1 fora da RPC indicam precisão do método. Na aplicação do método a amostras de rotina, não foram obtidos resultados falso-negativos e ocorreram alguns resultados falso-positivos, muito provavelmente devido a fatores intrínsecos ao método. A aplicação do método validado para triagem permitirá que um maior número de amostras de gordura de aves seja analisado num menor período de tempo, e de forma simplificada, uma vez que o método é menos laborioso do que os métodos cromatográficos confirmatórios. Isto tornará o processo de monitoramento da contaminação de amostras de gordura de aves por dioxinas, furanos e PCBs mais eficiente.

7 Referências Bibliográficas

Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne. 2016. Disponível em: <http://abiec.siteoficial.ws/images/upload/sumario-pt-010217.pdf>. Acesso em: 21 nov. 2017.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR ISO/IEC 17025: **Requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaios e calibração**. Rio de Janeiro, 2017.

Associação Brasileira de Proteína Animal. Disponível em: <http://abpa-br.com.br/>. Acesso em: 04 set. 2017.

ASSUNÇÃO, J. V. de; PESQUERO, C. R. Dioxinas e furanos: origens e riscos. **Revista de Saúde Pública**, v. 33, n.5, p.523-530, 1999.

AUSTRALIAN GOVERNMENT. Department of Environment and Energy. National Dioxins Program. **National Action Plan for addressing Dioxins in Australia**. Environment Protection And Heritage Council, 2005. 63 p.

AUSTRALIAN GOVERNMENT. Department of Environment and Energy. **National Dioxins Program**. Disponível em: <https://www.environment.gov.au/protection/chemicals-management/dioxins>. Acesso em: 20 fev. 2019.

BASTON, David S.; DENISON, Michael S.. Considerations for potency equivalent calculations in the Ah receptor-based CALUX bioassay: Normalization of superinduction results for improved sample potency estimation. **Talanta**, [s.l.], v. 83, n. 5, p.1415-1421, fev. 2011.

BEHNISCH, P. A.; HOSOE, K.; SAKAI, S. I. Bioanalytical screening methods for dioxins and dioxin-like compounds- A review of bioassay/biomarker technology. **Environment International**, v. 27, n. 5, p. 413–439, 2001.

BDS: BioDetection Systems. Disponível em: <https://www.biodetectionsystems.com/products/bioassays.html> >. Acesso em 20 ago. 2017.

BLAND, J. M.; ALTMAN, D. G. Agreed Statistics: Measurement Method Comparison. **Anesthesiology**, v. 116, n. 1, p. 182-185, 2012.

BDS: BioDetection Systems. **Training course DR CALUX**, 2016. Apostila.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Guia de validação e controle de qualidade analítica: fármacos em produtos para alimentação e medicamentos veterinários / Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Secretaria de Defesa Agropecuária. – Brasília: Mapa/ ACS, 2011. 73 p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº 42, de 20 de dezembro de 1999. Diário Oficial da União de 22 de dez. 1999, Brasília, Seção 1, p.213.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº 07, de 27 de março de 2013. Disponível em <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/inspecao/produtos-animal/plano-de-nacional-de-controle-de-residuos-e-contaminantes>>. Acesso em 30 julho 2017.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº 60, de 07 de maio de 2014. Disponível em <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/inspecao/produtos-animal/plano-de-nacional-de-controle-de-residuos-e-contaminantes>>. Acesso em 30 julho 2017.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº 22, de 7 de abril de 2015a. Disponível em <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/inspecao/produtos-animal/plano-de-nacional-de-controle-de-residuos-e-contaminantes>>. Acesso em 30 julho 2017.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº 9, de 21 de fevereiro de 2017a. Disponível em <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/inspecao/produtos-animal/plano-de-nacional-de-controle-de-residuos-e-contaminantes/documentos-da-pncrc/pncrc-2017.pdf>>. Acesso em 04 janeiro 2019.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº 20, de 26 de julho de 2018a. Disponível em <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/inspecao/produtos-animal/plano-de-nacional-de-controle-de-residuos-e-contaminantes/documentos-da-pncrc/PNCRC_PlanoAmostragemPNCRC2018_v1120.pdf>. Acesso em 04 janeiro 2019.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Manual de procedimento do plano nacional de controle de resíduos e contaminantes: PNCRC para laboratórios : área animal / vegetal / Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento.** Secretaria de Defesa Agropecuária. – Brasília : Mapa/ ACS, 2010. 79, 53 p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes PNCRC/ Animal.** 20 nov. 2018b. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/inspecao/produtos-animal/plano-de-nacional-de-controle-de-residuos-e-contaminantes>. Acesso em 10 fev. 2019.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Resultados gerais do subprograma de monitoramento e subprograma exploratório do Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes- PNCRC 2015b.** Disponível em <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/inspecao/produtos-animal/plano-de-nacional-de-controle-de-residuos-e-contaminantes>>. Acesso em 30 julho 2017.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Resultados gerais do subprograma de monitoramento e subprograma exploratório do Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes- PNCRC 2016.** Disponível em <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/inspecao/produtos-animal/plano-de-nacional-de-controle-de-residuos-e-contaminantes>>. Acesso em 30 julho 2017.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Resultados do Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes- PNCRC 2017b.** Disponível em <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/inspecao/produtos-animal/plano-de-nacional-de-controle-de-residuos-e-contaminantes>>. Acesso em 10 outubro 2018.

BRASILAGRO. **Missão irá à China este mês para esclarecer contaminação de frango.** 15 de out. 2015. Disponível em: <https://brasilagro.wordpress.com/2015/10/15/missao-ira-a-china-este-mes-para-esclarecer-contaminacao-de-frango/>. Acesso em: 07 jan. 2019.

BRETTHAUER, E. W., KRAUS, H. W., and DI DOMENICO, A. (1991). *Dioxin Perspectives. A Pilot Study on International Interchange on Dioxins and Related Compounds.* Plenum Press, New York.

CANADIAN FOOD INSPECTION AGENCY. Disponível em: <http://www.inspection.gc.ca/animals/feeds/regulatory-guidance/rg-8/eng/1347383943203/1347384015909?chap=2>. Acessado em: 12 nov. 2017.

CHAN, Y. L. **Sample clean-up for the DR CALUX® assay.** BioDetection Systems, 2013.10p. Apostila.

CHOBTANG, J. *et al.* The need and potential o

f biosensors to detect dioxins and dioxin-like polychlorinated biphenyls along the milk, eggs and meat food chain. **Sensors**, v. 11, n. 12, p. 11692–11716, 2011.

CIFUENTES, Alejandro. *Food Analysis: Present, Future, and Foodomics.* **Isrn Analytical Chemistry**, [s.l.], v. 2012, p.1-16, 2012.

EC (European Commission). Commission Regulation N° 644/2017 of 05 April 2017. **Laying down methods of sampling and analysis for the control of levels of dioxins, dioxin-like PCBs and non-dioxin-like PCBs in certain foodstuffs and repealing Regulation (EU) No 589/2014.** Official Journal of the European Communities, L 164/19.

EC (European Commission). Commission Regulation N° 1259/2011 of 2 December 2011. **Amending Regulation (EC) N° 1881/2006 as regards maximum levels for dioxins, dioxin-like PCBs and non dioxin-like PCBs in foodstuffs.** Official Journal of the European Union, L 320/18.

EFSA, 2012: European Food Safety Authority. Disponível em: <https://www.efsa.europa.eu/en/press/news/150529>. Acesso em: 05 dez. 2017.

EFSA. **Update of the monitoring of dioxins and PCBs levels in food and feed.** EFSA Journal 2012; 10(7): 2832. [82 pp.] doi:10.2903/j.efsa.2012.2832. Disponível em: www.efsa.europa.eu/efsajournal. Acesso em: 05 dez. 2017.

EFSA. 20 nov. 2018. Disponível em: <https://www.efsa.europa.eu/en/press/news/181120>. Acesso em: 13 fev. 2019.

ELLISON, S.I.R.; Fearn, T.. Characterising the performance of qualitative analytical methods: Statistics and terminology. **Trac Trends In Analytical Chemistry**, [s.l.], v. 24, n. 6, p.468-476, jun. 2005.

EICHBAUM, Kathrin *et al.* In vitro bioassays for detecting dioxin-like activity — Application potentials and limits of detection, a review. **Science Of The Total Environment**, [s.l.], v. 487, p.37-48, jul. 2014.

EMBRAPA: Empresa brasileira de pesquisa agropecuária. Disponível em: <https://www.embrapa.br/documents/1355242/9156138/Consumo+per+capita+d+o+Brasil.jpg/93f8c8ae-0c89-4e64-a7a3-038249659f49?t=1472841520017>. Acesso em: 15 nov. 2017.

FELZEL, E. **DR CALUX® bioassay for semi-quantitative testing.** BioDetection Systems, 2012.9p. Apostila.

FELZEL, E. JONAS, A. **DR CALUX® analysis guide.** BioDetection Systems, 2016.17p. Apostila.

FELZEL, E. JONAS, A. **DR CALUX® general guidelines.** BioDetection Systems, 2014.8p. Apostila.

FELZEL, E. LINDEN, S. van der. **Safety and health guidelines for DR CALUX® technology.** BioDetection Systems, 2009. 16p. Apostila.

FIRESTONE, D. (1973) Etiology of chick edema disease. **Envir. Hlth Perspect.** 5: 59-66.

FOCANT, Jean-françois. Dioxin food crises and new POPs: challenges in analysis. **Analytical And Bioanalytical Chemistry**, [s.l.], v. 403, n. 10, p.2797-2800, 16 fev. 2012.

FOCHI, I. et al. Modeling of DR CALUX® bioassay response to screen PCDDs, PCDFs, and dioxin-like PCBs in farm milk from dairy herds. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 50, p. 366-375, 2008.

FRESHNEY, R.I. (2005) **Culture of Animal Cells, a Manual of Basic Technique**. 5. Ed. John Wiley & Sons, Inc., 2005. 696 p.

GIAVARINA, D. Understanding Bland Altman analysis. **Biochemia Medica**, v. 25, n. 2, p. 141-151, 2015.

GIZZI, G *et al.* Determination of dioxins (PCDDs/PCDFs) and PCBs in food and feed using the DR CALUX® bioassay: Results of an international validation study. **Food Additives And Contaminants**, [s.l.], v. 22, n. 5, p.472-481, 2005. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/02652030500129196>.

GONDIM, Carina de Souza *et al.* An appropriate and systematized procedure for validating qualitative methods: Its application in the detection of sulfonamide residues in raw milk. **AnalyticaChimica Acta**, [s.l.], v. 830, p.11-22, jun. 2014.

GONDIM, C. S.; JUNQUEIRA, R. G.; SOUZA, S. V.C. Tendências em validação de métodos de ensaios qualitativos. **Rev.Inst Adolfo Lutz**. V. 70, n. 4, p. 433-447, 2011.

GONDIM, C. de S. **Validação de métodos qualitativos: delineamento de procedimento e aplicação na pesquisa de resíduos de sulfonamidas em leite cru**. 2012. 157f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos)-Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2012.

GOWIK, Petra. The validation of methods for regulatory purposes in the control of residues. **Journal Of Chromatography A**, [s.l.], v. 1216, n. 46, p.8051-8058, nov. 2009.

GULLET, B. K.; SAFORIM, A. F.; SMITH, K. A.; PROCACCINI, C. The role of chlorine in dioxin formation. Institutions of Chemical Engineers- **Trans IchemE**, v. 78, part. B, p. 47-52, 2000.

HARTNACK, S. Issues and pitfalls in method comparison studies. **Veterinary Anaesthesia and Analgesia**, v. 41, p. 227-232, 2014.

HITES, R. A. Dioxins: An overview and history. **Environmental Science and Technology**, v. 45, n. 1, p. 16–20, 2011.

HOOGENBOOM, L. *et al.* The CALUX bioassay: Current status of its application to screening food and feed. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 25, n. 4, p. 410-420, 2006.

HOOGENBOOM, R. *et al.* European developments following incidents with dioxins and PCBs in the food and feed chain. **Food Control**, v. 50, p. 670–683, 2015.

HUANG, H.; BUEKENS, A. On the mechanisms of dioxin formation in combustion processes. **Chemosphere**, v. 31, n. 9, p. 4099–4117, 1995.

HUFF, J. E.; WASSOM, J. S. Chlorinated Dibenzodioxins and Dibenzofurans. **Environmental Health Perspectives**, p. 283-312, 1973.

INSTITUTE OF MEDICINE (US) Committee to Review the Health Effects in Vietnam Veterans of Exposure to Herbicides. **Veterans and Agent Orange: Health Effects of Herbicides Used in Vietnam**. Washington (DC): National Academies Press (US); 1994, 36 p.

INSTITUTE OF MEDICINE (US). Committee on the Implications of Dioxin in the Food Supply. **Dioxins and Dioxin-like Compounds in the Food Supply**:

Strategies to Decrease Exposure. Washington (DC): National Academies Press (US); 2003, 340 p.

JEONG, S. *et al.* Rapid Bioassay for the Determination of Dioxins and Dioxin-like PCDFs and PCBs in Meat and Animal Feeds. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 29, p. 156-162, 2005.

JONAS, A. **Analysis of Ah-receptor mediated luciferase activity in DR CALUX® cells (quantitative analysis).** BioDetection Systems, 2013.18p. Apostila.

JONAS, A. **Cultivation and maintenance of DR CALUX® cells.** BioDetection Systems, 2013.11p. Apostila.

JONAS, A. **Ultrasonic extraction of fats and oils for DR CALUX® assay.** BioDetection Systems, 2009.6p. Apostila.

LÓPEZ, M. Isabel; CALLAO, M. Pilar; RUISÁNCHEZ, Itziar. A tutorial on the validation of qualitative methods: From the univariate to the multivariate approach. **Analytica Chimica Acta**, [s.l.], v. 891, p.62-72, set. 2015.

LUPTON, Sara J. *et al.* Survey of polychlorinated dibenzo-p-dioxins, polychlorinated dibenzofurans and non-ortho-polychlorinated biphenyls in US meat and poultry, 2012–13: toxic equivalency levels, patterns, temporal trends and implications. **Food Additives & Contaminants: Part A**, [s.l.], v. 34, n. 11, p.1970-1981, 11 jul. 2017.

MALISCH, Rainer; KOTZ, Alexander. Dioxins and PCBs in feed and food — Review from European perspective. **Science Of The Total Environment**, [s.l.], v. 491-492, p.2-10, set. 2014.

MARTINS, V. China suspende compra de carne de frango da BRF. **Revista Exame**. Setembro, 2015. Disponível em: <http://exame.abril.com.br/negocios/china-suspende-compra-de-frango-da-brf/>.

Acesso em: 07 jan. 2019.

MMA: Ministério do Meio Ambiente. **Estudo sobre as bifenilas policloradas - Proposta para atendimento à “Convenção de Estocolmo”, Anexo A – Parte II.** Brasília, s/d. Disponível em: http://www.mma.gov.br/estruturas/sqa_prorisc_upml/_arquivos/estudo_sobre_as_bifenilas_policloradas_82.pdf. Acesso em: 10 fev. 2019.

MENDES, L. H.; ZAIA, C. Dioxinas em frango deve afetar vendas do Brasil à China. **Valor Econômico**. Setembro, 2015. Disponível em: <https://www.valor.com.br/agro/4232660/dioxina-em-frango-deve-afetar-vendas-do-brasil-china>. Acesso em: 20 fev. 2019.

METHOD COMPARISON & METHOD EVALUATION. In *Medcalc Software Manual*, v. 17.9, 2017, p.196-213.

MORE: Mecanismo online para referências, versão 2.0. Florianópolis: UFSC Rexlab, 2013. Disponível em: < <http://www.more.ufsc.br/> >. Acesso em: 20 fev. 2019.

PENTEADO, J. C. P.; VAZ, J. M. O legado das bifenilas policloradas (PCBs). **Química Nova**, v. 24, n. 3, p. 390-398, 2001.

PISKORSKA-PLISZCZYŃSKA, J. *et al.* Application of the AhR reporter gene assay for the determination of PCDD/Fs and DL-PCBs in feed samples. **Journal Of Veterinary Research**, [s.l.], v. 61, n. 4, p.473-481, 1 dez. 2017.

REINER, E. J. *et al.* Advances in analytical techniques for polychlorinated dibenzo-p-dioxins, polychlorinated dibenzofurans and dioxin-like PCBs. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 386, n. 4, p. 791–806, 2006.

RYSAVY, Noel M.; MAAETOFT-UDSEN, Kristina; TURNER, Helen. Dioxins: diagnostic and prognostic challenges arising from complex mechanisms. **Journal Of Applied Toxicology**, [s.l.], v. 33, n. 1, p.1-8, 19 maio 2012.

ROSE, M.; FERNANDES, A. Other Environmental Organic Contaminants in Foods. In: **Chemical Contaminants and Residues in Food**. 2 ed. Woodhead Publishing, 2017. p. 91-115.

SCHRENK, D.; CHOPRA, M. Dioxins and polychlorinated biphenyls in foods. In: SCHRENK, D. **Chemical Contaminants and Residues in Food**. 2012. p. 101-213.

SCHECTER, A. (Ed.) **Dioxins and Health Including Other Persistent Organic Pollutants and Endocrine Disruptors**. 3 ed. New Jersey: Wiley, 2012. 680 p.

SCHECTER, A.; BIRNBAUM, L.; RYAN, J.; CONSTABLE, J. Dioxins: An overview. **Environmental Research**, v. 101, p. 419-428, 2006.

SORG, O. AhR signalling and dioxin toxicity. **Toxicology Letters**, v. 230, n. 2, p. 225–233, 2014.

STOCKHOLM CONVENTION: Protecting human health and the environment from persistent organic pollutants. Disponível em: <<http://www.pops.int/TheConvention/ThePOPs/The12InitialPOPs/tabid/296/Default.aspx>>. Acesso em 21 julho 2017.

TRULLOLS, Esther; RUISÁNCHEZ, Itziar; RIUS, F.xavier. Validation of qualitative analytical methods. **Trac Trends In Analytical Chemistry**, [s.l.], v. 23, n. 2, p.137-145, fev. 2004

TSUTSUMI, Tomoaki *et al.* Validation of the CALUX bioassay for the screening of PCDD/Fs and dioxin-like PCBs in retail fish. **The Analyst**, [s.l.], v. 128, n. 5, p.486-492, 16 abr. 2003.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. **Dioxins in the food chain: Background**. 2015. 10 p.

VANDERPERREN, H. *et al.* Application of the XDS-CALUX[®] bioassay in routine: semi-quantitative screening using al-beq cut-off values. **Organohalogen Compounds**, v. 72, p. 701-704, 2010.

VANLOCO, J. The international validation of bio- and chemical-analytical screening methods for dioxins and dioxin-like PCBs: the difference project rounds 1 and 2. **Talanta**, [s.l.], v. 63, n. 5, p.1169-1182, 2004.

VROOMMAN, V; *et al.* Evaluation of the use of CALUX results for dioxins and dioxin-like PCBs analysis for quantitative human exposure assessments. **Food Control**, v. 27, p. 314-321, 2012.

WHO. Joint FAO/ WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). **Polychlorinated dibenzodioxins, polychlorinated dibenzofurans, and coplanar polychlorinated biphenyls**. WHO Food Additives Series, v. 48, 2002, 114 p.

WHO. The International Programme on Chemical Safety. 7 julho 2006. Disponível em: www.who.int/ipcs/assessment/tef_values.pdf. Acesso em: 10 ago. 2017.

WHO: **Dioxins and their effects on human health**. 4 de outubro de 2016. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs225/en/>. Acesso em: 10 ago. 2017.

WINDAL, I. *et al.* Chemically activated luciferase gene expression (CALUX) cell bioassay analysis for the estimation of dioxin-like activity: Critical parameters of the CALUX procedure that impact assay results. **Environmental Science and Technology**, v. 39, n. 19, p. 7357–7364, 2005.

ZHOU, Hui *et al.* A review of dioxin-related substances during municipal solid waste incineration. **Waste Management**, [s.l.], v. 36, p.106-118, 2015.

ZOBER, A.; OTT, M. G.; MESSERER, P. Morbidity follow up study of BASF employees exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) after a 1953 chemical reactor incident. **Occupational and environmental medicine**, v. 51, p. 479-486, 1994.

