

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

FACULDADE DE FARMÁCIA

CAROLINA MARIANA NUNES

**PRODUÇÃO E AVALIAÇÃO DE MATERIAL DE
REFERÊNCIA PARA O ESCOPO DIOXINAS,
FURANOS E BIFENILAS POLICLORADAS EM FILÉ
DE PESCADO**

Belo Horizonte, MG

2015

CAROLINA MARIANA NUNES

**PRODUÇÃO E AVALIAÇÃO DE MATERIAL DE
REFERÊNCIA PARA O ESCOPO DIOXINAS,
FURANOS E BIFENILAS POLICLORADAS EM FILÉ
DE PESCADO**

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 título de Mestre em Ciência de Alimentos.

Orientadora: Scheilla Vitorino Carvalho de Souza

Co-orientador: Roberto Gonçalves Junqueira

Área de concentração: Ciência de Alimentos

Belo Horizonte, MG

2015

Nunes, Carolina Mariana.

N972p Produção e avaliação de material de referência para o escopo dioxinas, furanos e bifenilas policloradas em filé de pescado / Carolina Mariana Nunes. – 2015.
125 f. : il.

Orientadora: Scheilla Vitorino Carvalho de Souza.
Co-orientador: Roberto Gonçalves Junqueira.

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

1. Tilapia (Peixe) – Teses. 2. Dioxinas - Teses. 3. Furanos - Teses. 4. Bifenila policloradas – Teses. I. Souza, Scheilla Vitorino Carvalho de. II. Junqueira, Roberto Gonçalves. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. IV. Título.

CDD: 639.31



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Faculdade de Farmácia
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS - PPGCA

CAROLINA MARIANA NUNES

PRODUÇÃO E AVALIAÇÃO DE MATERIAL DE REFERÊNCIA PARA O
ESCOPO DIOXINAS, FURANOS E BIFENILAS POLICLORADAS
EM FILÉ DE PESCADO

TESE APROVADA EM 25 DE FEVEREIRO DE 2015

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. SCHEILLA VITORINO CARVALHO DE SOUZA FERREIRA
Orientadora e Presidente da Comissão

Prof. Dr. ROBERTO GONÇALVES JUNQUEIRA
Coorientador

Profa. Dra. SILVANA DA MOTTA

Profa. Dra. ELIANA APARECIDA NONATO KNUPP

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 PCB (LDP) e Unidade Instrumental de Cromatografia Gasosa (UI/CGEM) 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

À professora Scheilla Vitorino Carvalho de Souza, pela orientação, ensinamentos, dedicação, disposição e confiança.

Ao professor Roberto Gonçalves Junqueira pela co-orientação, por toda a colaboração e disponibilidade.

Ao Rafael Pissinatti, Eleonora Vieira dos Santos e Daniella Augusti, pela disposição, dedicação e amizade.

Aos membros da Banca Examinadora Dra. Eliana Aparecida Nonato Knupp, Dra. Silvana da Motta e Dr. Roberto Gonçalves Junqueira pelas considerações e sugestões que muito contribuíram para a melhoria da qualidade do presente trabalho.

Aos colegas do LANAGRO-MG, pelo apoio e dedicação.

Aos meus familiares, minha mãe e irmã por sempre acreditarem e torcerem por mim.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	20
2. OBJETIVOS	23
2.1. OBJETIVO GERAL.....	23
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
3. REVISÃO DE LITERATURA	24
3.1. PESCADO.....	24
3.1.1. Aspectos econômicos	24
3.1.2. Aspectos nutricionais	29
3.2. DIOXINAS, FURANOS E PCB	31
3.2.1. Propriedades físico-químicas.....	31
3.2.2. Toxicidade.....	36
3.2.3. Regulamentação	39
3.2.4. Contaminação em alimentos	41
3.2.5. Métodos de análise	44
3.3. MATERIAIS DE REFERÊNCIA.....	48
3.3.1. Produção e avaliação	50
3.3.2. Homogeneidade.....	51
3.3.2.1 Homogeneidade para material de referência.....	52
3.3.2.2 Homogeneidade para ensaio de proficiência.....	52
3.3.3. Estabilidade.....	55

3.3.3.1	Estabilidade para material de referência	55
3.3.3.2	Estabilidade para ensaio de proficiência	56
3.3.4.	Caracterização	57
3.3.5.	Disponibilidade de MR para o escopo de dioxinas, furanos e PCB em pescado ..	58
4.	MATERIAL E MÉTODOS	62
4.1.	EQUIPAMENTOS	62
4.2.	MATERIAIS.....	63
4.3.	REAGENTES	64
4.4.	SOLUÇÕES E MISTURAS	65
4.5.	AMOSTRAS	66
4.6.	MÉTODO ANALÍTICO	67
4.6.1.	Extração utilizando ELP	67
4.6.2.	Concentração do extrato no multi evaporador.....	68
4.6.3.	Purificação com coluna de sílica ácida.....	68
4.6.4.	Purificação com coluna de florisil	68
4.6.5.	Purificação com coluna de carvão.....	69
4.6.6.	Concentração.....	69
4.6.7.	Determinação.....	70
5.	PRODUÇÃO DO MATERIAL.....	71
5.1.	Procedimento piloto.....	71
5.2.	Preparo do material.....	73
5.3.	Avaliação da homogeneidade.....	74

5.4. Avaliação da estabilidade.....	75
5.4.1. Estabilidade em curto prazo	75
5.4.2. Estabilidade em longo prazo.....	76
5.4.3. Estimativa das incertezas	77
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	78
6.1. PRODUÇÃO DO MATERIAL	78
6.1.1. Procedimento piloto	78
6.1.2. Preparo do material	85
6.1.3. Estabilidade em curto prazo	89
6.1.4. Estabilidade em longo prazo.....	91
6.1.5. Caracterização	105
7. CONCLUSÃO	109
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	110
Apêndice A. Materiais de referência para dibenzo-p-dioxinas policloradas (dioxinas), dibenzo-furano policlorados (furanos) e bifenilas policloradas (PCB) em pescado disponibilizados por provedores internacionais.....	120

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição nutricional da espécie Tilápia	30
Tabela 2. Congêneres e isômeros das dibenzo-p-dioxinas policloradas (dioxinas), dibenzo-furano policlorados (furanos) e bifenilas policloradas (PCB)	31
Tabela 3. Propriedades físico-químicas da 2,3,7,8 tetraclorodibenzo-p-dioxina (2,3,7,8 TCDD), do 2,3,7,8 tetraclorodibenzofurano (2,3,7,8 TCDF) e da 3,3',4,4' tetraclorobifenila (PCB-77).....	33
Tabela 4. Valores dos fatores de equivalência de toxicidade (TEF) estabelecidos pela Organização Mundial de Saúde (OMS), em 1998 e 2005, para dibenzo-p-dioxinas policloradas (dioxinas), dibenzo-furano policlorados (furanos) e bifenilas policloradas semelhantes às dioxinas (dl-PCB)	38
Tabela 5. Limites máximos permitidos para dibenzo-p-dioxinas policloradas (dioxinas), dibenzo-furano policlorados (furanos) e bifenilas policloradas semelhantes às dioxinas (dl-PCB) em diversos gêneros alimentícios na União Europeia, em Toxicidade Equivalente (TEQ), conforme estabelecido pela Organização Mundial de Saúde (OMS)	40
Tabela 6. Critérios de desempenho para métodos de análise de dibenzo-p-dioxinas policloradas (dioxinas), dibenzo-furano policlorados (furanos) e bifenilas policloradas (PCB)	41
Tabela 7. Ocorrência de dibenzo-p-dioxinas policloradas (dioxinas), dibenzo-furano policlorados (furanos) e bifenilas policloradas semelhantes às dioxinas (dl-PCB) em peixes, por continente	42
Tabela 8. Alíquotas de amostras para determinação de dibenzo-p-dioxinas policloradas (dioxinas), dibenzo-furano policlorados (furanos) e bifenilas policloradas (PCB) em diversas matrizes.....	45

Tabela 9. Avaliação da homogeneidade dos sublotos adicionados de padrão em nonano e óleo de peixe, segundo critérios do protocolo harmonizado pela IUPAC, para os 29 mensurandos pesquisados.....	79
Tabela 10. Avaliação da homogeneidade dos sublotos adicionados de padrão em nonano e óleo de peixe, segundo critérios da ISO 13528:2005, para os 29 mensurandos pesquisados.....	81
Tabela 11. Porcentagens de recuperação dos 29 mensurandos pesquisados obtidas para os sublotos adicionados de padrão em nonano e óleo de peixe, considerando os valores teóricos adicionados ao filé de peixe e aqueles determinados no material liofilizado.....	84
Tabela 12. Avaliação da homogeneidade do material produzido, segundo critérios do protocolo harmonizado pela IUPAC e da norma ISO 13528:2005, para os 29 mensurandos pesquisados.....	86
Tabela 13. Resultados obtidos para o material produzido em estudo isócrono de estabilidade em curto prazo, com armazenamento a 45 ± 2 °C por zero, três, seis e nove dias.....	90
Tabela 14. Avaliação das premissas da regressão linear no estudo da estabilidade em longo prazo do material, segundo ISO GUIA 35	93
Tabela 15. Avaliação da estabilidade do material de referência produzido, durante quatro meses, segundo critérios do protocolo da IUPAC	100
Tabela 16. Avaliação da estabilidade do material de referência produzido, durante quatro meses, segundo critérios da norma ISO 13528:2005	102
Tabela 17. Fontes de contribuição para certificação: incertezas-padrão da avaliação da homogeneidade e da estabilidade em longo e curto prazos dos materiais de referência, segundo critérios do ISO Guia 35.....	106

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Produção de pescado na aquicultura marinha e continental de 1980 a 2010 no Brasil.	26
Figura 2. Produção de pescado na pesca extrativa marinha e continental de 1950 a 2010 no Brasil.	27
Figura 3. Produção de pescado nacional em 2009 e 2010 discriminada por Unidade da Federação.	28
Figura 4. A distribuição percentual e produção nacional de peixes em 2010, considerando as principais espécies.	28
Figura 5. Fórmula estrutural de dibenzo-p-dioxinas policloradas (dioxinas), dibenzofurano policlorados (furanos) e bifenilas policloradas(PCB) e numeração dos átomos de carbono.	32
Figura 6. Processo de distribuição dos poluentes orgânicos persistentes (POPs) no ambiente e vias de exposição.	35
Figura 7. Analisador de setor magnético.	47
Figura 8. Etapas características da produção de um material de referência certificado (MRC).	51
Figura 9. Fluxograma do piloto para avaliar a incorporação do padrão.	73
Figura 10. Fluxograma de preparo do material de referência (MR).	74
Figura 11. Delineamento para o teste de homogeneidade do material produzido. ...	75
Figura 12. Delineamento para o teste de estabilidade em curto prazo.	76
Figura 13. Delineamento para teste de estabilidade dos materiais de referência produzidos.	77

Figura 14. Material de referência de filé de tilápia liofilizado, contaminado com dibenzo-p-dioxinas policloradas (dioxinas), dibenzo-furano policlorados (furanos) e bifenilas policloradas (PCB), acondicionado em frascos de vidro âmbar de 30 g com tampa de rosca de polietileno.....	85
Figura 15. Curva obtida por regressão linear para avaliação da estabilidade do material de referência produzido, durante quatro meses, segundo critérios do ISO Guia 35.....	96
Figura 16. Curva obtida por regressão linear para avaliação da estabilidade do material de referência produzido, durante quatro meses, segundo critérios do ISO Guia 35.....	97
Figura 17. Curva obtida por regressão linear para avaliação da estabilidade do material de referência produzido, durante quatro meses, segundo critérios do ISO Guia 35.....	98
Figura 18. Curva obtida por regressão linear para avaliação da estabilidade do material de referência produzido, durante quatro meses, segundo critérios do ISO Guia 35.....	99

LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

ANOVA	Análise de Variância
ADH	cido Docosahexanico
AEP	cido Eicosapentaenóico
AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemists</i>
ASE	<i>Accelerated Solvent Extraction</i>
BFR	Retardantes de Chama Bromados
CG-EMAR	Cromatografia a Gás Acoplada  Espectrometria de Massas de Alta Resoluo
CIL	<i>Cambridge Isotope Laboratories</i>
EC	<i>European Commission</i>
EFSA	<i>European Food Safety Authority</i>
EI	Impacto de Elétrons
ELP	Extrao Líquida Pressurizada
EM	Espectrometria de massas
EP	Ensaio de proficiência
FAO	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>
HAH	Hidrocarbonetos Aromáticos Halogenados
HPA	Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos
K	Constante da Lei de Henry
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
ISO	<i>International Standards Organization</i>
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
LANAGRO-MG	Laboratório Nacional de Agropecuário em Minas Gerais
LDP	Laboratório de Dioxinas e PCB
MAE	Extrao Assistida por Microondas
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MPA	Ministério da Pesca e Aquicultura
MR	Material de Referência
MRC	Material de Referência Certificado
NIST	<i>National Institute of Standards and Technology</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
PA	Para análise
PAR	Para análise de resíduo
PBDE	Bifenilas Polibromadas
PCB	Bifenilas Policloradas
PCDD	Dibenzo-p-dioxinas Policloradas
PCDF	Dibenzo-furanos Policlorados
PLE	<i>Pressurized Liquid Extraction</i>
PNCRC	Programa Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes
POPs	Poluentes Orgânicos Persistentes
PUFA	Ácidos Graxos Poliinsaturados
PVC	Polivinil Cloreto
SFE	Extração com Fluido Supercrítico
SGQ	Sistema de Gestão da Qualidade
SI	Sistema Internacional de Unidades
SIM	Monitoramento de Íon Seleccionado
SUDEPE	Superintendência de Desenvolvimento da Pesca
TEF	Fator de Equivalência de Toxicidade
TEQ	Toxicidade Equivalente
u	Incerteza
U	Incerteza expandida
UE	União Europeia
USEPA	<i>United States Environmental Protection Agency</i>
VP	Pressão de Vapor
WS	Solubilidade da Água
ω	Ômega

1,2,3,4-TCDD	1,2,3,4-Tetraclorodibenzo-p-dioxina
2,3,7,8-TCDD	2,3,7,8-Tetraclorodibenzo-p-dioxina
2,3,7,8-TCDF	2,3,7,8-Tetraclorodibenzofurano
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
2,3,4,7,8-PeCDF	2,3,4,7,8-Pentaclorodibenzofurano
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
1,2,3,6,7,8-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
2,3,4,6,7,8-HxCDF	2,3,4,6,7,8-Hexaclorodibenzofurano
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
OCDD	Octaclorodibenzo-p-dioxina
OCDF	Octaclorodibenzofurano
3,3',4,4'-CB ou PCB-77	3,3',4,4'-Tetraclorobifenila
3,4,4',5-CB ou PCB-81	3,4,4',5-Tetraclorobifenila
3,4,4',5-CB ou PCB-126	3,3',4,4',5-Pentaclorobifenila
3,3',4,4',5,5'-CB ou PCB-169	3,3',4,4',5,5'-Hexaclorobifenila
2',3,4,4',5-CB ou PCB-123	2',3,4,4',5-Pentaclorobifenila

2,3',4,4',5-CB ou PCB-118	2,3',4,4',5-Pentaclorobifenila
2,3,4,4',5-CB ou PCB-114	2,3,4,4',5-Pentaclorobifenila
2,3,3',4,4'-CB ou PCB-105	2,3,3',4,4'-Pentaclorobifenila
2,3',4,4',5,5'-CB ou PCB-167	2,3',4,4',5,5'-Hexaclorobifenila
2,3,3',4,4',5-CB ou PCB-156	2,3,3',4,4',5-Hexaclorobifenila
2,3,3',4,4',5'-CB ou PCB-157	2,3,3',4,4',5'-Hexaclorobifenila
7 2,3,3',4,4',5,5'-CB ou PCB-189	7 2,3,3',4,4',5,5'-Heptaclorobifenila

RESUMO

As dibenzo-p-dioxinas policloradas (PCDD), os dibenzo-furanospoliclorados (PCDF), conhecidos com dioxinas e furanos, respectivamente, e as bifenilaspolicloradas (PCB) compreendem uma classe de poluentes orgânicos persistentes formados em quantidades traços em processos de combustão e térmicos, que apresentam características carcinogênicas. A presença destes poluentes nos alimentos é um importante tópico da segurança alimentar, com destaque para a matriz pescado. A pesca no Brasil encontra-se em expansão, especialmente a aquicultura, sendo a tilápia (*Oreochromis niloticus*) a espécie mais produzida. Neste contexto, a produção de um material de referência (MR) para o referido escopo analítico é de grande importância para a garantia da confiabilidade dos resultados produzidos em programas de monitoramento. Para a produção do MR, a melhor condição de incorporação do padrão nativo das dioxinas, furanos e PCB na matriz filé de tilápia foi investigada, incluindo óleo de peixe e nonano. Recuperações médias foram obtidas de 67 % para nonano e de 87 % para óleo de peixe, sendo este último selecionado. O MR foi produzido por adição de padrão de 29 contaminantes na matriz, seguido de liofilização e homogeneização. O MR foi envasado em frascos de vidro âmbar com tampas de rosca e armazenado sob refrigeração (2 a 10) °C. O material foi considerado homogêneo para todos os contaminantes, conforme critérios estabelecidos no protocolo harmonizado pela IUPAC e norma ISO 13528:2005. Estabilidade em curto prazo foi demonstrada para 27 compostos, quando o material foi mantido a (45 ± 2) °C durante 9 dias, simulando condições drásticas de temperatura no transporte. Estabilidade em longo prazo foi avaliada nos tempos 2, 4, 6 e 8 meses, sendo demonstrada para 22 contaminantes até o quarto mês de armazenamento, considerando critérios do ISO Guia 35, ISO 13528:2005 e do protocolo harmonizado pela IUPAC. As contribuições das incertezas devidas à homogeneidade, estabilidade em curto e longo prazos foram estimadas.

Palavras-chave: peixe, tilápia, dioxinas, furanos, bifenilas policloradas, material de referência, controle de qualidade analítico.

ABSTRACT

Polychlorinated dibenzo-p-dioxins (PCDD), polychlorinated dibenzo-furans (PCDF), dioxin and furans, respectively, and polychlorinated biphenyls (PCB) comprise a class of persistent organic pollutants formed in trace amounts in combustion and thermal processes, which presents carcinogenic properties. The presence of these pollutants in food is an important topic of food safety, highlighting the fish matrix. Fishing is expanding in Brazil, especially aquaculture, being tilapia (*Oreochromis niloticus*) the most produced specie. In this context, the production of a reference material (RM) for this analytical scope is of great importance for ensuring the reliability of the results produced in monitoring programs. For the production of RM, the best condition for the incorporation of native standard of dioxins, furans and PCBs in tilapia filletmatrix was investigated, including fish oil and nonane. Mean recoveries of 67% was obtained for nonane and 87% for fish oil, being this last one selected. The RM was produced by spiking thematrix with standard solution of 29 contaminants, followed by lyophilization and homogenization. The RM was filled in amber glass bottleswith a screw capsand stored under refrigeration (2 to 10) °C. The material was considered homogeneous for all of the analytes based on the criteria established by the IUPAC and ISO 13528:2005. The short-term stability was demonstrated for 27compounds, when the material was kept at (45 ± 2) °C during 9 days, simulating drastic temperature conditions in transportation. Long-term stability was evaluated in 2, 4, 6 and 8 months and demonstrated for 22 contaminants up to four months of storage, considering criteria defined in ISO Guide 35, ISO 13528:2005 and in the IUPAC harmonized protocol. The contributions of the homogeneity, stability in the short and long term uncertainties were estimated.

Keywords: fish, tilapia, dioxins, furans, polychlorinated biphenyls, reference material, analytical quality control.

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, a segurança dos alimentos tornou-se uma questão prioritária para órgãos de regulamentação, indústrias e consumidores. A presença de contaminantes químicos em alimentos representa um perigo potencial para a saúde humana, segundo a *International Agency for Research on Cancer* (IARC) (IARC, 2012). Estes compostos podem ser classificados em quatro principais categorias: i) medicamentos veterinários; ii) agrotóxicos; iii) produtos químicos ambientais persistentes; e iv) substâncias naturalmente tóxicas (SUN *et al.*, 2011).

Dibenzo-p-dioxinas policloradas (PCDD- *polychlorinated-p-dibenzodioxins*) e dibenzo-furanospoliclorados (PCDF - *polychlorinated-p-dibenzofurans*), conhecidos com dioxinas e furanos, respectivamente, e as bifenilas policloradas (PCB) são grupos de contaminantes que enquadram na categoria de produtos químicos persistentes, os quais são amplamente distribuídos no ambiente, representando risco potencial para a saúde humana de acordo com a *European Food Safety Authority* (EFSA) (EFSA, 2012). Suas propriedades tóxicas incluem potencial carcinogênico, imunotoxicidade e uma série de efeitos endócrinos relacionados à reprodução (NAKATANI *et al.*, 2011).

As dioxinas e furanos são grupos de moléculas de alta toxicidade constituídas por dois anéis benzênicos. São formados como subprodutos em diferentes processos, a partir da combustão, incluindo incineração de lixo hospitalar e doméstico, queimas não controladas, processos industriais que empregam cloro, como a resina plástica polivinil cloreto (PVC) e agrotóxicos (CHOVANCOVÁ *et al.*, 2005; KIM *et al.*, 2011). Para as dioxinas existem 75 congêneres, para os furanos 135, totalizando 210 compostos, enquanto os PCB possuem 209 congêneres (EFSA, 2010; CHOVANCOVÁ, *et al.*, 2005).

Devido à deposição aérea e da contaminação difusa pelo ar e do solo, dioxinas, furanos e PCB são encontrados em alimentos de origem vegetal. A contaminação dos alimentos para animais, pastagens e alguns organismos leva a bioacumulação de dioxinas, furanos e PCB no tecido adiposo de animais, e,

portanto, sua presença em alimentos que contenham gorduras de origem animal, como carnes, leite, ovos e derivados. A contaminação do sedimento do ambiente marinho leva ao acúmulo de dioxinas, furanos e PCB em peixes, mariscos e produtos da pesca (FAO, 2004). Estudos indicam a ingestão de alimentos contaminados com dioxinas, furanos e PCB como a principal fonte de contaminação dos seres humanos (NAKATANI *et al.*, 2011).

Considerando a crescente importância econômica do pescado no Brasil, que figura como décimo segundo maior produtor mundial, e as atuais tendências nutricionais que incentivam seu consumo, o pescado se destaca como uma importante matriz para monitoramento de dioxinas, furanos e PCB (FAO, 2015; HUSS, 1997; ZAGO, 2012).

O Brasil apresenta condições extremamente favoráveis para a aquicultura e pesca, principalmente por conter 12 % da água doce disponível do planeta em reservatórios naturais e artificiais e mais de 8.000 km de costa litorânea (ZAGO, 2012).

No Brasil, as espécies de maior destaque, em 2010, na aquicultura, foram a tilápia (*Oreochromis niloticus*), carpa comum (*Cyprinus carpio*) e tambaqui (*Colossoma macropomum*), enquanto na pesca extrativa foram curimatã (*Prochilodus spp*), piramutaba (*Branchy platystoma Vaillant*) e jaraqui (*Semaprochilodus theraponura*) (BRASIL, 2012; KUBITZA *et al.*, 2012).

Métodos analíticos confiáveis são necessários para o monitoramento de substâncias tóxicas em alimentos, como os produtos químicos persistentes. A análise quantitativa de dioxinas, furanos e PCB é particularmente difícil devido aos baixos níveis de concentração destes compostos e à presença de inúmeros interferentes nas amostras (DANIELSSON, 2007).

No Brasil, a legislação que regulamenta os limites máximos permitidos para dioxinas, furanos e PCB em alimentos é restrita, porém, para peixes o limite é de 6,5 pg/g de peixe fresco em Toxicidade Equivalente (TEQ) conforme definido pela

Organização Mundial de Saúde (OMS), considerando o somatório de dioxinas, furanos e PCB semelhantes a dioxinas (BRASIL, 2013).

Laboratórios envolvidos nas análises químicas estão se tornando cada vez mais conscientes da necessidade de implementação de sistemas de gestão da qualidade (SGQ), dentro ou fora do quadro de sistemas de acreditação (AMIGO *et al.*, 2004).

Segundo o guia harmonizado pela *Association of Official Analytical Chemists (AOAC International)*, *International Standards Organization (ISO)* e *International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC)* para validação intralaboratorial de métodos, os valores de referência necessários para a realização de experimentos de veracidade podem ser obtidos com diferentes tipos de materiais, incluindo materiais de referência (MR) e materiais de referência certificados (MRC) (THOMPSON *et al.*, 2002).

Embora os MR e MRC desempenhem um papel chave nos SGQ laboratoriais, tanto em processos de validação de métodos e como no desenvolvimento de programas de controle de qualidade interno para avaliação da veracidade, tais materiais ainda são restritos, ficando descobertos muitos escopos de análises químicas realizadas atualmente. Além disto, os MR disponíveis são extremamente caros, principalmente devido às etapas de produção e certificação (RODRIGUES *et al.*, 2009). Desta forma, a produção e avaliação de MR para aplicação no controle das análises de monitoramento da contaminação de pescado por dioxinas, furanos e PCB constitui um tema de fundamental relevância para a garantia da qualidade analítica e, conseqüentemente, para a eficácia das ações decorrentes de promoção da segurança alimentar.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Produzir e avaliar, por meio de método validado de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas de alta resolução (CG-EMAR), um MR para o escopo de dioxinas, furanos e PCB em filé de tilápia liofilizado, visando subsidiar ações de garantia da qualidade analítica na rede de laboratórios do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA).

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar um experimento piloto, visando avaliar diferentes formas de incorporação do padrão de dioxinas, furanos e PCB ao filé de tilápia, bem como a viabilidade das etapas de liofilização, homogeneização, envase e armazenamento.
- Preparar um MR, nas condições selecionadas e otimizadas no experimento piloto.
- Avaliação da homogeneidade dos MR preparados, em conformidade com guias internacionais relacionados a produção de MR e ensaio de proficiência (EP).
- Avaliação da estabilidade dos MR preparados, em curto e longo prazos, segundo guias internacionais, relacionados a produção de MR e EP.
- Estimar as contribuições das incertezas padrão devidas à homogeneidade e à estabilidade em curto e longo prazos.
- Avaliar o potencial de emprego do MR preparado e avaliado como MRC ou como material destinado a EP.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. PESCADO

Em muitas regiões do mundo, o pescado faz parte da dieta alimentar, principalmente como fonte protéica. Atualmente, um número cada vez maior de pessoas dá preferência ao peixe como uma alternativa saudável à carne. O baixo teor de gordura de muitas espécies de peixe (peixes magros ou espécies demersais) e os efeitos dos ácidos graxos poli-insaturados são aspectos extremamente importantes e considerados para a promoção da saúde, em particular nos países desenvolvidos, onde a mortalidade por doença cardiovascular é elevada (HUSS, 1997).

O conceito de pesca extrativa (captura) é a retirada de organismos aquáticos da natureza sem prévio cultivo. Esse tipo de atividade pode ocorrer em escala industrial ou artesanal, tanto no mar (pesca marítima) quanto no continente (pesca continental). Já a aquicultura é o processo de produção em cativeiro de organismos com habitat predominantemente aquático, tais como peixes, camarões, rãs, algas, entre outras espécies. Pode ser realizada no mar (aquicultura marítima) ou em águas continentais (aquicultura continental). Quando se avalia, especificamente, a criação de camarões em viveiros, está se referindo à carcinicultura, ao passo que a produção de peixes como subtipo da aquicultura denomina-se piscicultura (SEBRAE, 2007).

3.1.1. Aspectos econômicos

A produção mundial de pescado atingiu 183 milhões de toneladas em 2012, com uma previsão de aumento para 195 milhões de toneladas em 2022, segundo relatório publicado pela *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO). Do montante desta produção que foi destinado à alimentação, 46 % foi

fresco, 29 % congelado, 12 % seco, salgado, defumado ou curado e 13 % em outras formas de preparação (FAO, 2014).

Do pescado produzido em 2012, 90,43 milhões de toneladas foram provenientes da aquicultura e 92,42 milhões de toneladas da pesca extrativa. Os países maiores produtores mundiais, considerando a aquicultura, foram a China, Índia, Vietnã, Indonésia e Bangladesh. O Brasil ocupou a décima segunda posição com uma produção de 708 mil toneladas. Considerando a pesca extrativa, os maiores produtores foram China, Indonésia, Estados Unidos, Peru e Rússia, tendo o Brasil uma produção de 843 mil toneladas. Destacou-se, assim, a produção chinesa, a qual contribuiu com 35 % da produção mundial de pescado (FAO, 2015).

Na aquicultura, as espécies de peixes mais produzidas foram carpa capim (*Ctenopharyngodon idellus*), carpa prateada (*Hypophthalmichthys molitrix*) e carpa comum, enquanto na pesca extrativa foram anchova (*Engraulis ringens*), badejo do Alaska (*Theragra chalcogramma*) e bonito listrado (*Katsuwonus pelamis*). A tilápia ocupou quinta e quinquagésima sexta posição nas produções mundiais por aquicultura e pesca extrativa, respectivamente (FAO, 2015).

O Brasil apresenta condições extremamente favoráveis para a aquicultura e pesca, principalmente devido ao seu grande potencial hídrico, o qual inclui mais de 8.000 km de zona costeira e cinco milhões de hectares de água doce em reservatórios naturais e artificiais (ZAGO, 2012).

De acordo com a FAO, a produção aquícola brasileira teve início em 1968, quando foi reportada menos de 0,5 tonelada. Desde então, a aquicultura nacional tem mostrado um crescimento gradual, atingindo o pico de produção em 2003, com 273.268 toneladas. Após uma pequena queda nos anos de 2004 e 2005, a produção retomou o crescimento (**Figura 1**) (BRASIL, 2012).

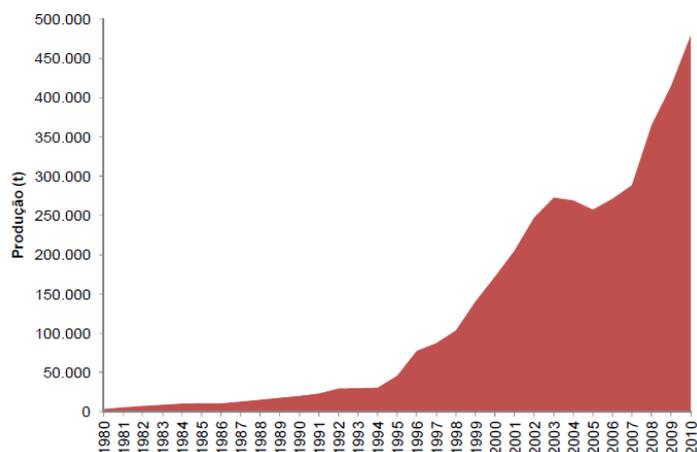


Figura 1. Produção de pescado na aquicultura marinha e continental de 1980 a 2010 no Brasil.

Fonte: Brasil (2012).
t: tonelada.

Analisando-se a série histórica de 1950 a 2010 da produção pesqueira do Brasil por captura, observa-se um crescimento de 1950 até 1985, quando foi registrada a maior produção, atingindo 956.684 toneladas. Episódios como o programa de industrialização da pesca no final da década de 50, a criação da Superintendência de Desenvolvimento da Pesca (SUDEPE) em 1962 e a promulgação do Código de Pesca em 1967 impulsionaram este crescimento. Entre 1986 e 1990 houve um declínio gradativo das capturas, quando a produção pesqueira diminuiu de 946.560 toneladas para 619.805 toneladas, evidenciado pelo início do processo de sobre pesca de alguns estoques, além da desativação dos incentivos fiscais em meados da década de 80. De 1990 até o ano 2000, a produção pesqueira ficou caracterizada por um período de estabilidade. A partir do ano 2000, a produção voltou a crescer, passando de 666.846 toneladas para 825.164 toneladas, em 2009, devido à recuperação de alguns estoques e à criação da Secretaria Especial de Aquicultura e Pesca, atual Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA). Embora tenha ocorrido um declínio da captura entre 2009 e 2010, quando foi registrada uma produção de 785.366 toneladas, o período entre 2000 e 2010

caracterizou-se pela recuperação da produção em relação à década precedente (**Figura 2**) (BRASIL, 2012).

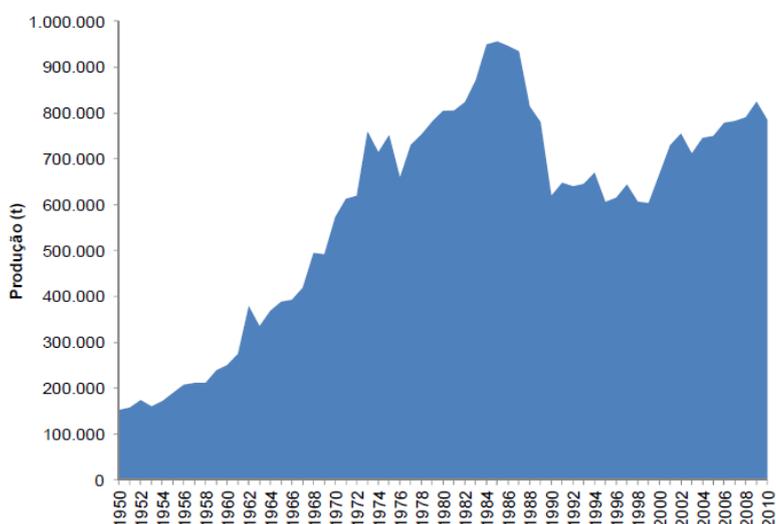


Figura 2. Produção de pescado na pesca extrativa marinha e continental de 1950 a 2010 no Brasil.

Fonte: Brasil (2012).
t: tonelada.

Em 2010, a Região Nordeste foi a que assinalou a maior produção de pescado do país, com 410,5 mil toneladas, respondendo por 32,5 % da produção nacional. As regiões sul, norte, sudeste e centro-oeste produziram, respectivamente, 311,7 mil toneladas (24,6 %), 274,0 mil toneladas (21,7 %), 185,6 mil toneladas (14,7 %) e 82,9 mil toneladas (6,6 %), respectivamente (BRASIL, 2012).

O Estado de Santa Catarina foi o maior polo produtor de pescado do Brasil, com 183,7 mil toneladas, seguido pelos Estados do Pará com 143,0 mil toneladas e Bahia com 114,5 mil toneladas. Embora tenha permanecido como maior produtor do Brasil, o Estado de Santa Catarina, em relação ao total produzido em 2009, apresentou uma queda de 7,8 % em 2010. Os Estados de Pernambuco, Amapá e Rio Grande do Norte também apresentaram reduções, em relação ao produzido em 2009, de 12,2 %, 8,7 % e 4,2 %, respectivamente. No entanto, para os Estados do

Rio Grande do Sul, Acre e Piauí foi observado um incremento na produção de pescado em relação ao ano de 2009, com um crescimento de 24,5 %, 17,8 % e 12,3 %, respectivamente (**Figura 3**) (BRASIL, 2012).

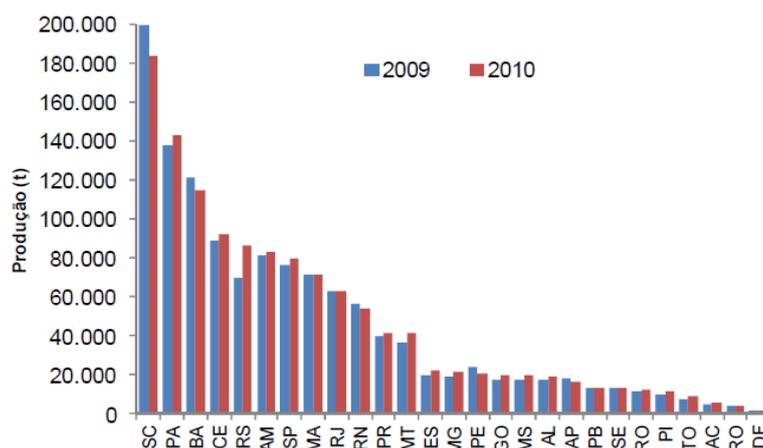


Figura 3. Produção de pescado nacional em 2009 e 2010 discriminada por Unidade da Federação.

Fonte: Brasil (2012).
t: tonelada.

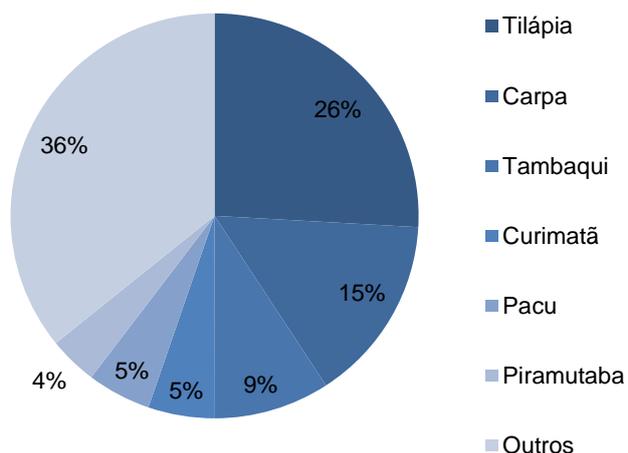


Figura 4. A distribuição percentual e produção nacional de peixes em 2010, considerando as principais espécies.

Fonte: Brasil (2012).
t: tonelada.

As tilápias são as espécies de peixes mais produzidas no Brasil. Em 2010, na aquicultura, as espécies de peixes mais produzidas foram tilápia, carpa e tambaqui, enquanto na pesca extrativa foram curimatã, piramutaba e jaraqui, sendo que a tilápia ocupou oitava posição (**Figura 4**) (BRASIL, 2012; KUBITZA *et al.*, 2012). Destacam-se como características das tilápias: curto ciclo de produção, rápido crescimento, tolerância a ambientes superpovoados e consumo de alimento natural, bem como de rações balanceadas e resíduos agropecuários de origem animal e vegetal, além da qualidade da carne, ausência de mioespinhas, facilidade de filetar e de industrialização da carcaça, boa aceitação do filé no mercado consumidor e resistência ao manejo e às doenças (ZAGO, 2012).

3.1.2. Aspectos nutricionais

A carne de pescado apresenta atualmente um grande potencial no mercado, pois esse produto, industrializado ou *in natura*, pode atender às necessidades do consumidor não somente em relação aos aspectos nutricionais, mas também sensoriais (sabor agradável, suave e característico), de conveniência (fácil preparo ou pré-pronto) e econômicos (preços acessíveis) (FERREIRA *et al.*, 2002).

A composição do pescado e, conseqüentemente, seu valor nutritivo varia em função de numerosos fatores: espécie, idade, habitat, tipo de alimentação, época de captura, peso, entre outros. Em geral, a composição do pescado varia em: umidade de 64 a 90 %; proteína de 8 a 23 %; gordura de 0,5 a 25 %; resíduo mineral de 1 a 2 %; e carboidratos menos que 1 %. Destaca-se o fato de que o pescado contém elevado nível de proteínas de alto valor biológico e alta digestibilidade (ALMEIDA *et al.*, 2006).

Os peixes podem ser divididos em quatro categorias, quanto ao seu teor de gordura: i) magros (menor que 2 % de gordura); ii) baixo teor de gordura (de 2 a 4 % de gordura); iii) semigordos (de 4 a 8 % de gordura); e iv) altamente gordos (maior que 8 % de gordura) (ANDRADE *et al.*, 2009; GIGLIOTTI *et al.*, 2008).

Na **Tabela 1**, encontra-se descrita a composição nutricional da tilápia, que apresenta valores de AEP (ácido eicosapentaenóico) e ADH (ácido docosahexaenóico), inferiores a 2 %. Ao contrário de outros peixes, como as trutas (*Salmo sp*), cujo percentual de ácidos graxos como poliinsaturados (*Poly Unsaturated Fatty Acids*- PUFAs) é superior a 27 %, sendo 1,69 % de AEP e 11,89 % de ADH (SUÁREZ-MAHECHA *et al.*, 2002).

Tabela 1. Composição nutricional da espécie Tilápia

Componente	Tilápia	
	Teor por 100g	
Umidade (g)	78,08	
Energia (Kcal)	96	
Proteína (g)	20,08	
Lipídeos totais (g)	1,7	
Carboidratos por diferença (g)	0	
Açúcares totais (g)	0	
Fibra alimentar (g)	0	
Minerais		
Cálcio (mg)	10	
Ferro (mg)	0,56	
Magnésio (mg)	27	
Fósforo (mg)	170	
Potássio (mg)	302	
Sódio (mg)	52	
Zinco (mg)	0,33	
Vitaminas		
Vitamina A (IU)	0	
Vitamina A, RAE (µg)	0	
Tiamina (B1) (mg)	0,041	
Riboflavina (B2) (mg)	0,063	
Niacina (B3) (mg)	3,903	
Piridoxina (B6) (mg)	0,162	
Cianocobalamina (B12) (µg)	1,52	
Vitamina C (mg)	0	
Vitamina D (IU)	124	
Vitamina (D2+D3) (µg)	3,1	

Vitamina E (alfa tocoferol) (mg)	0,4
Vitamina K (µg)	1,4
Folato DFE (µg)	24
Lipídeos	
Ácidos graxos saturados (g)	0,585
Ácidos graxos monoinsaturados (g)	0,498
Ácidos graxos poliinsaturados (g)	0,363
Colesterol (mg)	50

Fonte: USDA (2013).

3.2. DIOXINAS, FURANOS E PCB

3.2.1. Propriedades físico-químicas

As dioxinas e furanos compreendem duas classes de compostos aromáticos tricíclicos, de função éter, com estrutura quase planar e que possuem propriedades físicas e químicas semelhantes. Os átomos de cloro se ligam aos anéis benzênicos, possibilitando a formação de um grande número de congêneres, 75 para as dioxinas e 135 para os furanos, totalizando 210 compostos (ASSUNÇÃO & PESQUERO, 1999; EFSA, 2012). As PCB fazem parte de uma classe de compostos organoclorados provenientes do acréscimo de átomos de cloro à bifenila. Tais compostos possuem diversas substituições possíveis dos átomos de cloro, que variam de um a dez átomos, originando 209 congêneres (**Tabela 2**) (CHOVANCOVÁ *et al.*, 2005). Suas fórmulas estruturais são representadas na **Figura 5**.

Tabela 2. Congêneres e isômeros das dibenzo-p-dioxinas policloradas (dioxinas), dibenzo-furano policlorados (furanos) e bifenilas policloradas (PCB)

Átomos de cloro	Isômeros de		
	Dioxinas	Furanos	PCB
1	2	4	3

2	10	16	12
3	14	28	24
4	22	38	42
5	14	28	46
6	10	16	42
7	2	4	24
8	1	1	12
9	-	-	3
10	-	-	1
Congêneres	75	135	209

Fonte: adaptado de EPA (2008) e Assunção & Pesquero (1999).

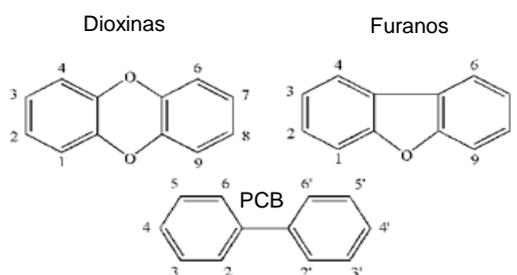


Figura 5. Fórmula estrutural de dibenzo-p-dioxinas policloradas (dioxinas), dibenzofuranopoliclorados (furanos) e bifenilas policloradas(PCB) e numeração dos átomos de carbono.

Fonte: Fiedler (2003) e ATSDR (2014).

A OMS, em colaboração com a Organização para a Alimentação e Agricultura (FAO), por meio da junção FAO/OMS *Codex Alimentarius Commission*, criou o “Code of practice for the prevention and reduction of dioxins and dioxin-like PCB contamination in foods and feeds (CAC/RCP 62-2006)” (CODEX ALIMENTARIUS, 2012). Por serem grupos de contaminantes orgânicos persistentes (POPs) e amplamente distribuídos no ambiente, apresentando risco potencial para a saúde

humana. Suas propriedades tóxicas incluem potencial carcinogênico, imunotoxicidade e uma série de efeitos endócrinos relacionados à reprodução (STORELLI *et al.*, 2011).

O conhecimento das propriedades físico-químicas é essencial para a compreensão do comportamento destes compostos orgânicos no meio ambiente. As propriedades mais importantes para a determinação do comportamento ambiental são solubilidade em água (WS), a pressão de vapor (VP), coeficiente de partição octanol/água (log K_{oa}), coeficiente orgânico de partição de carbono (log K_{oc}) e rendimento quântico fotoquímico. A razão entre VP e WS pode ser usada para calcular a constante da Lei de Henry (K) para soluções diluídas de compostos orgânicos, quando o VP e WS são medidos à mesma temperatura e no mesmo estado físico. A constante da Lei de Henry é um índice de partição de um determinado composto entre a atmosférica e a fase aquosa (ATSDR, 1998).

Na **Tabela 3** são relacionadas propriedades características da dioxina 2,3,7,8 tetraclorodibenzo-p-dioxina (2,3,7,8 TCDD) considerada o congênere de maior importância sob aspectos toxicológicos, do furano 2,3,7,8 tetraclorodibenzofurano (2,3,7,8 TCDF) e da bifenilapoliclorada 3,3',4,4' tetraclorobifenila (PCB-77).

Tabela 3. Propriedades físico-químicas da 2,3,7,8 tetraclorodibenzo-p-dioxina (2,3,7,8 TCDD), do 2,3,7,8 tetraclorodibenzofurano (2,3,7,8 TCDF) e da 3,3',4,4' tetraclorobifenila (PCB-77)

Propriedades	2,3,7,8 Tetraclorodibenzo-p- dioxina	2,3,7,8 Tetraclorodibenzofurano	3,3',4,4'Tetraclorobifenila
Fórmula química	C ₁₂ H ₄ Cl ₄ O ₂	C ₁₂ H ₄ Cl ₄ O	C ₁₂ H ₆ Cl ₄
Total de isômeros	22	-	-
Cor	Branco ou incolor	Incolor	Incolor a luz amarela
Estado físico	Sólido cristalino	Sólido	-
Massa molecular	322 g/mol	305,96 g/mol	291,98 g/mol
Ponto de fusão	305 - 306 °C	219 - 221 °C	173 °C

Ponto de ebulição	446,5 °C	-	360 °C
Densidade a 25 °C	1,83 g/mL	$6,92 \times 10^{-4}$ mg/L	1,20 g/mL
Solubilidade a 25 °C	$7,9 \times 10^{-6}$ - $3,2 \times 10^{-4}$ mg/L	$1,4 \times 10^{-9}$ mg/L	0,175 mg/L
Pressão de vapor a 25 °C	$7,4 \times 10^{-10}$ mm Hg	$9,2 \times 10^{-7}$ mm Hg	$4,4 \times 10^{-7}$ mm Hg
Coeficientes de Partição			
LogKoa	6,1 - 7,1	5,9	6,0 - 6,6
LogKoc	6,4 - 7,6	5,6	4,4 - 5,8
Constante da Lei de Henry a 25 °C	$16,1 \times 10^{-6}$ - $101,7 \times 10^{-6}$ atm.m ³ /mol	$1,5 \times 10^{-5}$ atm.m ³ /mol	$0,4 \times 10^{-4}$ - $0,9 \times 10^{-4}$ atm.m ³ /mol

Fonte: adaptado de ATSDR (1994, 1998, 2000) e Fiedler (2003).

- Informação não disponível.

A formação de dioxinas, furanos e PCB ocorre de forma não-intencional em determinadas condições. Além dessa formação, eles podem estar presentes em matérias-primas, contaminando, assim, os processos em que são introduzidos. As rotas de formação destes contaminantes podem ser divididas em duas grandes categorias: i) formação em processos térmicos, em quantidades traços, em processos de combustão quando carbono, oxigênio, hidrogênio e cloro estão presentes em uma faixa de temperatura entre 200 e 650 °C; e ii) formação em processos químicos industriais, sendo necessários cloro, carbono, oxigênio e hidrogênio, como nos processos térmicos, embora a geração dos compostos contaminantes seja favorecida por condições como temperaturas elevadas (150 °C), condições alcalinas, catálise por metais, vazamentos ou incêndios em transformadores, capacitores, ou outros produtos que contenham PCB, e radiação ultravioleta (UV) ou substâncias que geram radicais (ASSUNÇÃO & PESQUERO, 1999; UNEP, 2005; UNEP, 2008).

Em 1929, as PCB eram usadas no setor industrial em transformadores e condensadores devido à sua alta estabilidade térmica e outras propriedades. No entanto, essas propriedades resultaram em uma contaminação ambiental generalizada em muitas partes do mundo (GANDHI *et al.*, 2014). Estes equipamentos podem ser usados durante 30 anos ou mais, sendo que os mais velhos ainda podem conter PCB. Luminárias fluorescentes, dispositivos e aparelhos

elétricos, tais como televisores e geladeiras, mais antigos podem, portanto, conter PCB. Quando esses dispositivos elétricos são aquecidos, durante sua operação, pequenas quantidades de PCB podem se dissipar no ar, aumentando os níveis ambientais e podendo também ser uma fonte de exposição (ATSDR, 2000).

A contaminação dos seres humanos por dioxinas, furanos e PCB ocorre por duas principais vias de exposição: i) direta (vias respiratórias e contato com a pele); e ii) indireta (pela contaminação da água e alimentos que são ingeridos) (ASSUNÇÃO & PESQUERO, 1999). Estudos têm demonstrado que a maior fonte de contaminação dos seres humanos ocorre pela ingestão de alimentos, especialmente carne, pescado, leite e seus derivados, uma vez que as dioxinas, furanos e PCB são lipossolúveis e se acumulam na cadeia alimentar (**Figura 6**) (NAKATANI *et al.*, 2011).

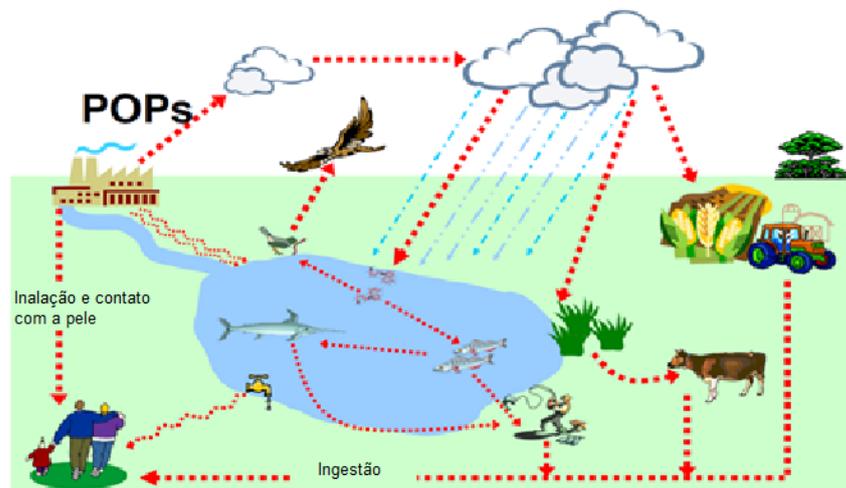


Figura 6. Processo de distribuição dos poluentes orgânicos persistentes (POPs) no ambiente e vias de exposição.

Fonte: Mechlin'ska *et al.* (2010).

A entrada destes compostos na cadeia alimentar é devida, principalmente, as suas propriedades físico-químicas. Estes podem sofrer ao longo da cadeia alimentar, um processo de bioconcentração e biomagnificação. Bioconcentração é o

mecanismo pelo qual o aumento da concentração do contaminante nos organismos, comparado ao meio abiótico, ou seja, é quando a velocidade de absorção da substância tóxica por meio da água excede a velocidade de eliminação da mesma, gerando dessa forma, um acúmulo nos tecidos dos organismos. Biomagnificação resulta do processo de acúmulo da concentração do contaminante nos tecidos dos organismos vivos na passagem de cada nível trófico da cadeia alimentar. O potencial de biomagnificação do contaminante na cadeia trófica é determinado pela lipofilicidade dos congêneres, pela estrutura e pela dinâmica da cadeia alimentar na qual a concentração do contaminante aumenta com o nível trófico (PENTEADO & VAZ, 2001).

3.2.2. Toxicidade

As primeiras avaliações de risco foram focadas apenas no composto mais tóxico, a dioxina 2,3,7,8 tetraclorodibenzeno-p-dioxina (2,3,7,8-Cl₄DD = 2,3,7,8-TCDD). Logo foi reconhecido que todas as dioxinas e furanos com substitutos nas posições 2, 3,7 ou 8 são altamente tóxicos (FIEDLER, 2003).

As dioxinas são tóxicas para animais, no entanto, a maioria das informações disponíveis referem-se a 2,3,7,8-TCDD, sendo decorrentes de exposições orais em altas doses para animais. Existe uma ampla variedade na sensibilidade à letalidade devida às dioxinas em animais. Os sinais e sintomas de envenenamento com produtos contaminados com a 2,3,7,8-TCDD em seres humanos são semelhantes aos observados em animais. Testes em ratos mostraram que a absorção transpulmonar da 2,3,7,8-TCDD foi menos eficaz do que a absorção oral (ATSDR, 1998). Exposições de dioxinas para os seres humanos estão associadas a um aumento do risco de lesões graves na pele (cloroacne e hiperpigmentação), à alteração nas funções hepáticas e metabolismo lipídico, fraqueza geral associada à drástica perda de peso, alterações na atividade de várias enzimas hepáticas, depressão do sistema imunológico e sistema endócrino, além de anormalidades do sistema nervoso (ATSDR, 1998; FIEDLER, 2003; SCHECTER *et al.*, 2006).

Em 1997, a IARC classificou a 2,3,7,8-TCDD como pertencente ao grupo 1, ou seja, com evidências suficientes de carcinogenicidade em humanos e animais, assim como as PCB semelhantes às dioxinas (EFSA, 2012; IARC, 2012). Porém, as outras dioxinas e furanos não foram classificados quanto à sua carcinogenicidade, permanecendo no grupo 3, ou seja, com evidências inadequadas de carcinogenicidade em humanos e evidências limitadas em animais experimentais (IARC, 1997).

A toxicidade da 2,3,7,8-TCDD é muito variável para diferentes tipos de animais. Para cobaias (*Cavia porcellus*), a dose letal (via oral) é de cerca de 1 mg/kg de peso corporal, enquanto para hamsters, a dose tóxica aguda é de cerca de 3.000 a 4.000 mg/kg de peso corporal (ASSUNÇÃO & PESQUERO, 1999; IARC, 1997). Efeitos imunológicos das PCB em macacos incluem diminuição a respostas de anticorpos, aumento da susceptibilidade às infecções bacterianas. Em macacos adultos, as PCB apresentaram efeitos imunossupressores em doses tão baixas quanto 0,005 mg/kg/dia (IARC, 2000).

Recentemente, a *United States Environmental Protection Agency* (USEPA), em uma reavaliação das principais questões relacionadas com a toxicidade das dioxinas, propôs uma dose de referência para exposição oral crônica de 7×10^{-10} mg/kg de peso corporal por dia, o que é equivalente a 4,9 µg/kg de peso corporal por semana (EPA, 2012).

O potencial genotóxico para alguns congêneres de PCB depende de sua conformação espacial. Esta conformação é classificada em planar (não-orto) ou coplanar (mono-orto), sendo definida pelo número e posição dos átomos de cloro na molécula das PCB. A conformação coplanar é considerada a mais tóxica possuindo ação semelhante a da 2,3,7,8-TCDD. Assim, os efeitos toxicológicos dos congêneres de PCB podem ser avaliados comparando-os aos efeitos da 2,3,7,8-TCDD. Isso é possível devido à similaridade estrutural (PENTEADO & VAZ, 2001).

O Regulamento (CE) nº 1259/2011/UE divide as PCB em dois grupos conforme as propriedades toxicológicas. Doze destes compostos apresentam

propriedades toxicológicas semelhantes às dioxinas, sendo denominados dl-PCB (*dioxins like* - semelhante as dioxinas). As demais PCB não apresentam toxicidade semelhante às dioxinas, sendo comumente chamadas de ndl-PCB (*dioxins non-like* - não semelhantes às dioxinas) (UE, 2011).

TEQ tem sido utilizada para correlacionar a toxicidade dos diversos compostos do grupo das dioxinas, furanos e PCB, com aquela considerada mais tóxica, ou seja, a 2,3,7,8-TCDD, para a qual é assumido o valor de um (ASSUNÇÃO & PESQUERO, 1999). Os fatores de equivalência de toxicidade (TEF) para as outras dioxinas tóxicas estão entre zero e um, o que indica a magnitude da sua toxicidade em comparação com a 2,3,7,8-TCDD. Os valores de TEF foram propostos pela OMS em 1997 e atualizados em 2005 (VAN DEN BERG, *et al.*, 2006), conforme mostrado na **Tabela 4**.

Tabela 4. Valores dos fatores de equivalência de toxicidade (TEF) estabelecidos pela Organização Mundial de Saúde (OMS), em 1998 e 2005, paradibenzo-p-dioxinas policloradas (dioxinas), dibenzo-furano policlorados (furanos) e bifenilas policloradas semelhantes às dioxinas (dl-PCB)

Composto	OMS-TEF, 1998	OMS-TEF, 2005
Dioxinas		
2,3,7,8-TCDD	1	1
1,2,3,7,8-PeCDD	1	1
1,2,3,4,7,8-HxCDD	0,1	0,1
1,2,3,6,7,8-HxCDD	0,1	0,1
1,2,3,7,8,9-HxCDD	0,1	0,1
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	0,01	0,01
OCDD	0,0001	0,0003
Furanos		
2,3,7,8-TCDF	0,1	0,1
1,2,3,7,8-PeCDF	0,05	0,03
2,3,4,7,8-PeCDF	0,5	0,3
1,2,3,4,7,8-HxCDF	0,1	0,1
1,2,3,6,7,8-HxCDF	0,1	0,1
1,2,3,7,8,9-HxCDF	0,1	0,1
2,3,4,6,7,8-HxCDF	0,1	0,1
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0,01	0,01
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	0,01	0,01
OCDF	0,0001	0,0003
Não-orto PCB		
3,3',4,4'-tetraCB (PCB-77)	0,0001	0,0001
3,4,4',5-tetraCB (PCB-81)	0,0001	0,0003

3,3',4,4',5-pentaCB (PCB-126)	0,1	0,1
3,3',4,4',5,5'-hexaCB (PCB-169)	0,01	0,03
Mono-orto PCB		
2,3,3',4,4'-pentaCB (PCB-105)	0,0001	0,00003
2,3,4,4',5-pentaCB (PCB-114)	0,0005	0,00003
2,3',4,4',5-pentaCB (PCB-118)	0,0001	0,00003
2',3,4,4',5-pentaCB (PCB-123)	0,0001	0,00003
2,3,3',4,4',5-hexaCB (PCB-156)	0,0005	0,00003
2,3,3',4,4',5'-hexaCB (PCB-157)	0,0005	0,00003
2,3',4,4',5,5'-hexaCB (PCB-167)	0,00001	0,00003
2,3,3',4,4',5,5'-heptaCB (PCB-189)	0,0001	0,00003

Fonte: adaptado de Van den Berg *et al.* (2006).

2,3,7,8-TCDD: 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina; 1,2,3,7,8-PeCDD: 1,2,3,7,8-pentaclorodibenzo-p-dioxina; 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; 1,2,3,4,6,7,8-HpCDD: 1,2,3,4,6,7,8-heptaclorodibenzo-p-dioxina; OCDD: octaclorodibenzo-p-dioxina; 2,3,7,8-TCDF: 2,3,7,8-tetraclorodibenzofurano; 1,2,3,7,8-PeCDF: 1,2,3,7,8-pentaclorodibenzofurano; 2,3,4,7,8-PeCDF: 2,3,4,7,8-pentaclorodibenzofurano; 1,2,3,4,7,8-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; 1,2,3,7,8,9-HxCDF: 1,2,3,7,8,9-hexaclorodibenzofurano; 2,3,4,6,7,8-HxCDF: 2,3,4,6,7,8-hexaclorodibenzofurano; 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; OCDF: octaclorodibenzofurano; 3,3',4,4'-tetraCB ou PCB-77: 3,3',4,4'-tetraclorobifenila; 3,4,4',5-tetraCB ou PCB-81: 3,4,4',5-tetraclorobifenila; 3,3',4,4',5-pentaCB ou PCB-126: 3,3',4,4',5-pentaclorobifenila; 3,3',4,4',5,5'-hexaCB ou PCB-169: 3,3',4,4',5,5'-hexaclorobifenila; 2,3,3',4,4'-pentaCB ou PCB-105: 2,3,3',4,4'-pentaclorobifenila; 2,3,4,4',5-pentaCB ou PCB-114: 2,3,4,4',5-pentaclorobifenila; 2,3',4,4',5-pentaCB ou PCB-118: 2,3',4,4',5-pentaclorobifenila; 2',3,4,4',5-pentaCB ou PCB-123: 2',3,4,4',5-pentaclorobifenila; 2,3,3',4,4',5-hexaCB ou PCB-156: 2,3,3',4,4',5-hexaclorobifenila; 2,3,3',4,4',5'-hexaCB ou PCB-157: 2,3,3',4,4',5'-hexaclorobifenila; 2,3',4,4',5,5'-hexaCB ou PCB-167: 2,3',4,4',5,5'-hexaclorobifenila; 2,3,3',4,4',5,5'-heptaCB ou PCB-189: 2,3,3',4,4',5,5'-heptaclorobifenila.

3.2.3. Regulamentação

No Brasil, a legislação que trata sobre os limites de dioxinas e furanos em alimentos é restrita. O MAPA, em 2003, estabeleceu um limite máximo de 500 pg/kg OMS-TEQ, de dioxinas e furanos, para cal (CaO) como ingrediente para uso no processamento de farelo de polpa cítrica e de outros produtos destinados à alimentação animal (BRASIL, 2003). Mais recentemente, foram definidos limites máximos de 1,75 µg/kg OMS-TEQ para aves e de 6,5 pg/g de peixe fresco OMS-TEQ (aquicultura e pesca extrativa), sendo OMS-TEQ o somatório de dioxinas, furanos e PCB, definido com base nos OMS-TEF para cada congênera (BRASIL, 2012; BRASIL, 2013).

A União Europeia, em seu regulamento 1881/2006/CE, alterado pelo regulamento 1259/2011/UE, fixou os teores máximos permitidos para dioxinas, furanos e PCB, cujos valores são mostrados na **Tabela 5**. Até 2011, o teor máximo era aplicado apenas para somatório de dioxinas e furanos (OMS-TEQ) e somatório de PCB semelhante às dioxinas (OMS-TEQ). A alteração incluiu o somatório dos compostos PCB-28, PCB-52, PCB-101, PCB-138, PCB-153 e PCB-180 (UE, 2011).

Tabela 5. Limites máximos permitidos para dibenzo-p-dioxinas policloradas (dioxinas), dibenzo-furano policlorados (furanos) e bifenilas policloradas semelhantes às dioxinas (dl-PCB) em diversos gêneros alimentícios na União Europeia, em Toxicidade Equivalente (TEQ), conforme estabelecido pela Organização Mundial de Saúde (OMS)

Gêneros alimentícios	Teores máximos		
	Somatório de dioxinas (dioxinas e furanos OMS-TEQ)	Somatório de dioxinas e dl-PCB (dioxinas/furanos/dl-PCBOMS-TEQ)	Somatório de PCB28, PCB52, PCB101, PCB138, PCB153 e PCB18
Carne e produtos à base de carne (com exceção de miúdos comestíveis) dos seguintes animais:			
- bovinos e ovinos,	2,5 pg/g de gordura	4,0 pg/g de gordura	40 ng/g de gordura
- aves domésticas,	1,75 pg/g de gordura	3,0 pg/g de gordura	40 ng/g de gordura
- suínos.	1,0 pg/g de gordura	1,2 pg/g de gordura	40 ng/g de gordura
Parte comestível do peixe e dos produtos da pesca e derivados, com exceção de:			
- enguia (<i>Anguilla anguilla</i>) capturada no meio natural,			
- peixe de água doce capturado no meio natural, com exceção das espécies diádromos capturadas em água doce,	3,5 pg/g de peso fresco	6,5 pg/g de peso fresco	75 ng/g de peso fresco
- fígado de peixe e produtos derivados,			
- óleos de origem marinha.			
Parte comestível de peixes de água doce, capturados no meio natural, com exceção de espécies diádromos capturadas em água doce, e respectivos produtos.	3,5 pg/g de peso fresco	6,5 pg/g de peso fresco	125 ng/g de peso fresco
Parte comestível da enguia, capturada no meio natural, e produtos derivados.	3,5 pg/g de peso fresco	10,0 pg/g de peso fresco	300 ng/g de peso fresco
Óleos de origem marinha (óleo de peixe, óleo de fígado de peixe e óleos de outros organismos marinhos destinados ao consumo humano).	1,75 g/g de gordura	6,0 pg/g de gordura	200 ng/g de gordura

Fonte: adaptado de UE (2011).

Na União Europeia, foram regulamentados, ainda, tópicos relacionados aos métodos de amostragem e de análise para o controle oficial dos teores de dioxinas, furanos e PCB, sob a forma de dioxina. Os critérios de desempenho estabelecidos para métodos de análise na legislação europeia, no regulamento número 1883/2006/UE, são discriminados na **Tabela 6** (UE, 2006).

Tabela 6. Critérios de desempenho para métodos de análise de dibenzo-p-dioxinas policloradas (dioxinas), dibenzo-furano policlorados (furanos) e bifenilas policloradas (PCB)

Parâmetro	Valor/Comentário
Aplicabilidade	Alimentos especificados no Regulamento (EC) número 1881/2006
Limite de detecção	TEQ (10^{-12} g) picogramas ¹
Limite de quantificação	Cerca de 1/5 do teor requerido
Precisão	< 15 % ²
Recuperação	60 a 120 %
Seletividade	Livre de interferências de matriz ou espectrais, verificação de detecção positiva
Método de confirmação (CG/EMAR)	Separação dos isômeros (< 25 % de pico a pico entre 1,2,3,4,7,8- HxCDF e 1,2,3,6,7,8-HxCDF).

Fonte: UE (2012).

¹Para os congêneres de PCB, a sensibilidade na gama dos nanogramas (10^{-9} g) é suficiente. No entanto, para os congêneres de PCB semelhante a dioxina mais tóxica (designadamente, congêneres não-orto substituídos), deve ser conseguida a mesma sensibilidade que para dioxinas e furanos.

²Método de confirmação.

EC: Comissão Europeia; TEQ: toxicidade equivalente; CG/EMAR: cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas de alta resolução; 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.

3.2.4. Contaminação em alimentos

Os alimentos de origem animal constituem a fonte predominante da exposição humana às dioxinas, furanos e PCB, sendo as gorduras de peixe, carne e produtos lácteos responsáveis por cerca de 80 a 90 % da exposição. Níveis de dioxinas, furanos e PCB nos alimentos podem estar relacionados com a contaminação do ambiente e com determinados processos de produção como, secagem artificial (CODEX, 2012).

Ocorrência de dioxinas, furanos e PCB em peixes capturados e/ou cultivados em áreas poluídas ou nas quais tenha acontecido algum desastre ecológico apresentam maiores teores de contaminação. A FAO (2004) disponibilizou um resumo sobre a ocorrência de dioxinas, furanos e PCB em vários grupos de alimentos. Os dados compreendem os níveis de OMS-TEQ de dioxinas, furanos e PCB em peixes, expressos em produto fresco, nos diferentes continentes (**Tabela 7**).

Tabela 7. Ocorrência de dibenzo-p-dioxinas policloradas (dioxinas), dibenzo-furano policlorados (furanos) e bifenilas policloradas semelhantes às dioxinas (dl-PCB) em peixes, por continente

Continentes	Dioxinas e furanos (pg/g produto OMS-TEQ)	dl-PCB (pg/g produto OMS-TEQ)	Dioxinas e dl-PCB (pg/g produto OMS-TEQ)
Europa	0,01 - 8,9	0,03 - 9	- ¹
América do Norte	0,033 - 0,53	0,11 - 0,28	- ¹
América do Sul	- ¹	- ¹	5 - 12,5
Ásia	0,002 - 10,2	0,004 - 2,0	- ¹
Austrália – Nova Zelândia	0,02 - 0,12	0,03 - 0,16	- ¹
África	- ¹	- ¹	- ¹

Fonte: adaptado de FAO (2004).

¹Continentes que não apresentaram dados da ocorrência de dioxinas, furanos e PCB em peixes.

No Brasil, desde 1999, o MAPA realiza o controle de resíduos e contaminantes em produtos de origem animal (MAPA, 1999), no âmbito do Programa Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes da área animal (PNCRC-Animal). A partir de 2003, quando foram estabelecidos limites máximos para dioxinas na matriz cal para suplemento à alimentação animal, tais contaminantes foram monitorados na referida matriz (BRASIL, 2003). Apesar da análise de dioxinas e furanos não ter sido prevista no escopo analítico do PNCRC-Animal de 2012 (BRASIL, 2012), foram analisadas, no referido ano, 28 amostras provenientes da aquicultura e 20 amostras de pesca extrativa, sendo que todas foram consideradas conformes. No ano de 2013, foram previstas análises de

dioxinas e furanos em 120 amostras de peixe, 60 de pesca extrativa e 60 de aquicultura (BRASIL, 2013). Dentre as 132 amostras efetivamente analisadas, apenas 23 (17,4 %) continham níveis quantificáveis de pelo menos uma dioxina ou furano, o congênere 2,3,7,8 TCDF foi encontrado em 19 amostras (82,6 %) com uma variação de 0,03 a 0,39 pg/g OMS-TEQ, encontrou-se o congênere OCDD em duas amostras e 2,3,4,7,8-PeCDF, 1,2,3,7,8 PeCDD e 1,2,3,4,6,7,8-HpCDF em uma amostra cada. Todos os resultados foram, no entanto, abaixo do valor permitido para dioxinas e furanos de 3,5 pg/g OMS-TEQ (AUGUSTI *et al.*, 2014a).

No ano de 2014, foram previstas análises de dioxinas, furanos e PCB em 120 amostras de pescado, sendo 60 provenientes da aquicultura e 60 de pesca extrativa (BRASIL, 2014), contudo, os resultados ainda não foram publicados.

BRITO *et al.* (2012) e DORNELES *et al.* (2013) fizeram análises de dioxinas, furanos e PCB em cetáceos, animais marinhos pertencentes à classe dos mamíferos, da região costeira do Brasil. As amostras de gordura de seis cetáceos, foram coletadas a partir de animais capturados, incidentalmente, em operações de pesca ou encalhados. No trabalho de BRITO *et al.* (2012) foram evidenciadas elevadas concentrações de organoclorados, com predominância para as PCB, onde o somatório de PCB variou de 0,60 a 257,20 mg/g. Segundo DORNELES *et al.* (2013) as dl-PCB foram responsáveis por mais de 98,8 % do TEQ total para as amostras analisadas, sendo que a maior contribuição foi das PCB mono-orto, que variaram de 49 a 80 % do TEQ total. A PCB-118 foi o composto de maior importância entre os congêneres de PCB mono-orto, com uma média contribuição de 34 % para o TEQ total. As dioxinas e furanos foram responsáveis por menos de 1,2 % da TEQ total. A OCDD teve a maior contribuição para as dioxinas ($19,4 \pm 29,0$ pg/g) e o 1,2,3,4,7,8-HxCDF para os furanos ($6,7 \pm 5,4$ pg/g).

Nos trabalhos supracitados os autores declararam que os valores encontrados nas amostras de cetáceos são considerados altos, o que ressalta a importância de estudos toxicológicos em animais marinhos e bem como a implantação de programas de monitoramento no país.

3.2.5. Métodos de análise

Para o monitoramento das substâncias tóxicas como POPs, é preciso desenvolver métodos analíticos confiáveis. As análises quantitativas de dioxinas, furanos e PCBs são particularmente difíceis devido, principalmente, aos níveis extremamente baixos que estes compostos são encontrados nos alimentos e da complexidade das matrizes alimentares, o que gera a presença de inúmeras substâncias interferentes. As principais etapas para a análise de dioxinas, furanos e PCB, são: i) amostragem; ii) preparação das amostras; iii) extração; iv) purificação; e v) determinação (DANIELSSON, 2007).

O método EPA 1613 revisão B de 1994 e o método EPA 1668 revisão B de 2008 contemplam todas as etapas de extração, purificação e quantificação de dioxinas, furanos e PCB (EPA, 1994; EPA, 2008), contudo, estes métodos tradicionais demandam grandes quantidades de solventes

A massa a ser pesada para cada tipo de matriz dependerá de como é expresso o OMS-TEQ (pg/g de gordura ou pg/g de peso fresco), conforme descrito na **Tabela 8**.

Tabela 8. Alíquotas de amostras para determinação de dibenzo-p-dioxinas policloradas (dioxinas), dibenzo-furano policlorados (furanos) e bifenilas policloradas (PCB) em diversas matrizes

Matrizes	Porcentagem de sólidos (%)	Quantidade extraída
Água potável	< 1	1000 mL
Solo seco	> 20	10 g
Cinza	> 20	10 g
Peixe	-	10 g
Tecido adiposo humano	-	10 g
Pasta de papel	1 - 100	10 g
lodo industrial	1 -100	10 g

Fonte: adaptado de EPA (1994).

Ao longo dos anos, muitas tentativas têm sido feitas para desenvolver técnicas mais rápidas e automatizadas de extração, visando reduzir os custos destas análises. A primeira técnica utilizada foi o Soxhlet, com tempo mínimo de 16 h por amostra e consumo de quantidades significativas de solventes (EPA, 1994; STORELLI *et al.*, 2011; WEI *et al.*, 2011). Estudos visando aperfeiçoar a análise de dioxinas, furanos e PCB foram realizados por HAWTHORNE (1990) e MANNILA *et al.* (2002), utilizando extração com fluido supercrítico (SFE), reduzindo o volume de solvente utilizado. Outra técnica estudada foi a extração assistida por microondas (MAE) (ELJARRAT *et al.*, 1998; CAMEL, 2000; MECHLINSKA *et al.*, 2010). Demais autores (SIMM *et al.*, 2006; SUBEDI & USENKO, 2012) estudaram o emprego da extração líquida pressurizada (ELP), do inglês *Pressurized Liquid Extraction* (PLE) ou *Accelerated Solvent Extraction* (ASE), para este escopo analítico. O emprego da ELP teve início em 1995, sendo que em 1996 foi aprovada como método padrão

EPA para análise de contaminantes orgânicos, como agrotóxicos, dioxinas, furanos e PCB em matrizes ambientais (MITRA, 2003).

Alguns equipamentos de ELP permitem, ainda, a adição de adsorventes na cela de extração para que seja feita uma purificação simultânea à extração. Para matrizes de menor complexidade, é possível otimizar a realização das etapas de extração e purificação em uma única etapa (KIM *et al.*, 2003). Contudo, considerando os alimentos, a maioria dos autores utiliza esta opção visando uma pré-purificação dentro da cela, de forma a simplificar as etapas posteriores de purificação. Os adsorventes mais utilizados são alumina, sílica ou florissil (STORELLI *et al.*, 2011; WEI *et al.*, 2011).

A etapa de purificação é utilizada para limpar o extrato e retirar os interferentes indesejáveis, que podem causar diminuição do desempenho da coluna cromatográfica (EPA, 1994). Muitos estudos (EPA, 1994; ELJARRAT *et al.*, 1998; DANIELSSON, 2007; NAKATANI *et al.*, 2011; SUN *et al.*, 2012; LAN DO *et al.*, 2013) utilizaram colunas de purificação com multicamadas, para obtenção de extratos purificados sem interferentes.

Colunas com sílica ácida e básica, alumina e florissil são frequentemente usadas para remover interferentes polares e não polares. A alumina e o florissil são utilizados para remover e/ou separar as PCB. A mistura de carvão carbopak e celite é usada para remover as interferências não polares (EPA, 1994).

Muitos autores reportam o uso de cromatografia a gás acoplada à CG-EMAR como técnica de detecção e quantificação na análise de dioxinas, furanos e PCB (EPA, 1994; ELJARRAT *et al.*, 1998; MANNILA *et al.*, 2002; WITTSIEPE *et al.*, 2007; WEI *et al.*, 2011).

A espectrometria de massas, operada no modo de monitoramento de íon selecionado (SIM), com uma resolução de 10.000 ppm (5 % no vale), tem sido reportada para obtenção de melhores respostas (NAKATANI *et al.*, 2011).

Para análise de dioxinas, furanos e PCB são comumente utilizados analisadores de setor magnético, que utilizam um campo elétrico estático ou um setor magnético ou, ainda, a combinação de ambos, para afetar a trajetória e a velocidade dos íons até sua chegada ao detector. Os íons são submetidos a uma trajetória circular, de forma que os íons com maiores valores de razão entre massa e carga (m/z) percorrem uma trajetória maior, enquanto que os íons de menores valores de m/z percorrem uma trajetória menor, sendo, então, separados (**Figura 7**). Como estes campos elétricos ou magnéticos alteram o percurso dos íons durante sua passagem, eles podem ser utilizados para selecionar apenas íons desejados, para que estes sejam posteriormente fragmentados (HOFFMANN & STROOBANT, 2007; DASS, 2007).

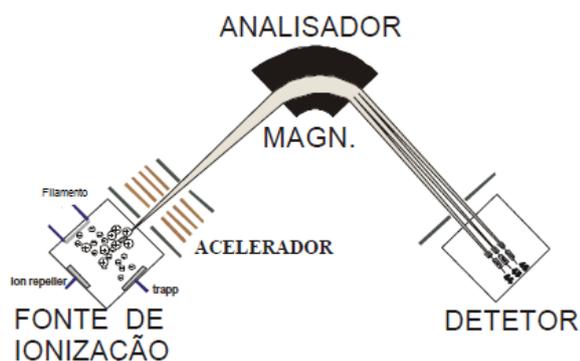


Figura 7. Analisador de setor magnético.

Fonte: Souza, 2008.

Padrões internos representam uma importante ferramenta de garantia da qualidade de métodos para determinação de dioxinas, furanos e PCB. A técnica de diluição isotópica consiste em alterar a composição isotópica natural de um mensurando, por meio da adição de uma quantidade conhecida de um análogo isotopicamente marcado, geralmente $^{13}\text{C}_{12}$ e ^{37}C , como padrão interno. A adição do padrão interno é feita no início do procedimento analítico de forma a compensar ou conhecer erros em todo o processo, visto que a percentagem de recuperação pode ser calculada e utilizada como uma medida indireta da recuperação do mensurando

(MECHLINSKA *et al.*, 2010; SARGENT *et al.*, 2002). Outro recurso utilizado é o de padrão de seringa, que é adicionado ao extrato purificado para sua reconstituição e posterior injeção no sistema cromatográfico, permitindo avaliar a resposta dos padrões internos (EPA, 1994 & 2003).

3.3. MATERIAIS DE REFERÊNCIA

A implementação de sistema de gestão de qualidade (SGQ) nas organizações tem sido justificada pela necessidade de garantia do fornecimento de produtos e serviços com eficiência. Neste contexto, os laboratórios envolvidos em análises químicas estão se tornando cada vez mais conscientes da necessidade de implementação de SGQ (AMIGO *et al.*, 2004).

Tais sistemas são fundamentados em oito princípios básicos, que incluem: i) foco no cliente; ii) liderança; iii) envolvimento das pessoas; iv) abordagem de processo; v) abordagem sistêmica para a gestão; vi) melhoria contínua; vii) abordagem factual para tomada de decisão; e viii) benefícios mútuos nas relações com os fornecedores (ABNT, 2005).

Os requisitos específicos para a estruturação de SGQ em laboratórios são definidos em normas como: i) a ISO/IEC 17025 aplicável a laboratórios de prestação de serviços (ABNT, 2005); ii) a NM ISO 15189 específica para laboratórios de prestação de serviços na área clínica (ABNT, 2008); e iii) a norma de Boas Práticas de Laboratórios (BPL) que abrange processos organizacionais e as condições nas quais estudos não clínicos de saúde e de segurança ao meio ambiente são planejados, desenvolvidos, monitorados, registrados, arquivados e relatados (INMETRO, 2009).

Nos SGQ laboratoriais, os MR constituem elementos fundamentais para a implantação de ferramentas de garantia da qualidade, como a validação de métodos e os controles de qualidade internos e externos.

MR é um material ou substância que tem um ou mais valores de propriedades que são suficientemente homogêneos e bem estabelecidos para ser usado na calibração de um aparelho, na avaliação de um método, na atribuição de valores a materiais (ABNT, 2011), e para fins controle de qualidade interno e garantia da qualidade externa (ensaios de proficiência) (INMETRO, 2010).

Os MR podem ser caracterizados para uma identidade (como estrutura química, tipo de fibra e espécies microbiológicas) ou para valores de propriedades (como quantidade de substância química específica e dureza). Alguns tipos de materiais de referência comumente encontrados são: i) substâncias puras caracterizadas para pureza química e/ou traços de impureza; ii) soluções padrão e misturas gasosas, frequentemente preparadas gravimetricamente a partir de substâncias puras e usadas para fins de calibração; iii) materiais de referência em matrizes, caracterizados para a composição de componentes químicos principais, secundários ou elementos-traço. Tais materiais podem ser preparados a partir de matrizes contendo os componentes de interesse ou por meio da preparação de misturas sintéticas; iv) materiais de referência físico-químicos caracterizados para propriedades tais como ponto de fusão, viscosidade e densidade óptica; v) objetos ou artefatos de referência caracterizados para propriedades funcionais tais como sabor, odor, octanagem, ponto de fulgor e dureza. Este tipo também inclui espécimes microscópicos caracterizados para propriedades que vão de tipo de fibra a espécimes microbiológicos (INMETRO, 2010).

MRC é um MR acompanhado por um certificado, com um ou mais valores de propriedade, certificado por um procedimento que estabelece sua rastreabilidade à obtenção exata da unidade na qual os valores da propriedade são expressos, e cada valor certificado é acompanhado por uma incerteza para um nível de confiança (EMONS *et al.*, 2004; INMETRO, 2010).

Os valores de propriedade ou valores certificados dos MRC devem ser rastreáveis ao Sistema Internacional de Unidades (SI), sempre que viável. A rastreabilidade é, no entanto, um conceito relativamente novo no campo de medições químicas e, como consequência, poucos MR químicos são explicitamente

rastreáveis ao SI. Uma hierarquia de métodos é, então, usada para atribuir valores de propriedade a materiais (método primário, método de tendência conhecida, métodos independentes ou comparação interlaboratorial) e, mesmo que não esteja declarada, a rastreabilidade pode ser obtida (INMETRO, 2010).

3.3.1. Produção e avaliação

A produção de um MR passa por etapas de preparação, avaliação de homogeneidade, estabilidade, caracterização interlaboratorial, certificação e venda, conforme apresentado na **Figura 8**.

Atualmente, existem documentos aceitos internacionalmente para a orientação dos produtores destes materiais, incluindo a série 30 de normas ISO: i) ISO Guia 30 (ABNT, 2011), que apresenta termos e definições fundamentais relacionados aos MR; ii) ISO Guia 31 (ABNT, 2004a), que tem por objetivo auxiliar os produtores na elaboração de certificados claros e concisos para acompanhar os MR; iii) ISO Guia 32 (ABNT, 2000), que esclarece sobre o uso de MRC na calibração em química analítica; iv) ISO Guia 33 (ABNT, 2002), que refere-se à utilização de MRC, incluindo recomendações para desenvolver critérios de avaliação da precisão e exatidão de um processo de medição no qual se utiliza um MRC; v) ISO Guia 34 (ABNT, 2004b), que contém todos os requisitos de direção e técnicos para a implantação de um SGQ de produtores de MR e para seu reconhecimento de competência; e vi) ISO Guia 35 (ABNT, 2012), que trata os princípios gerais e estatísticos para certificação de MR, incluindo aspectos de homogeneidade (entre frascos), estabilidade e repetibilidade (dentro dos frascos ou analítica) para a composição da incerteza global atribuída ao parâmetro certificado do material.

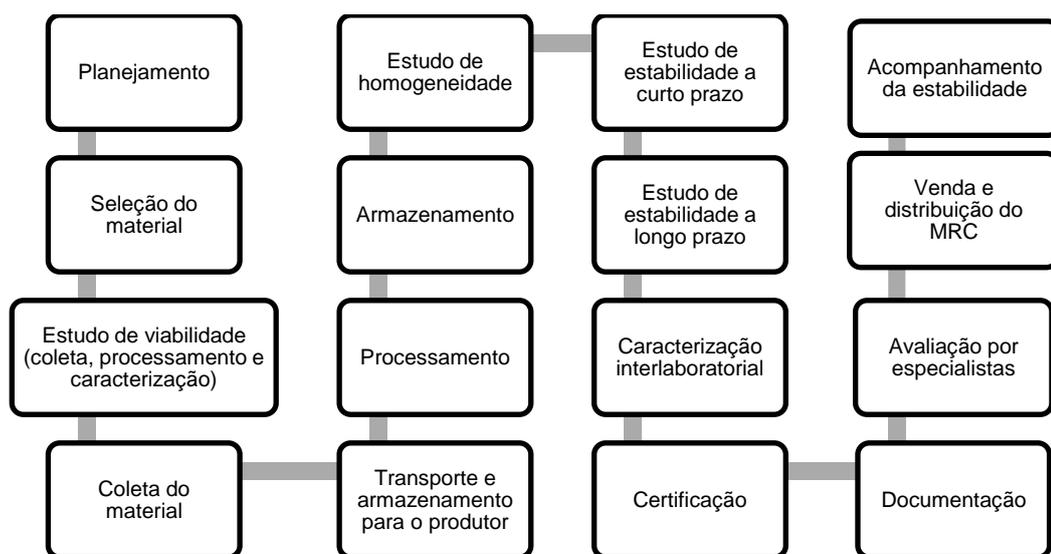


Figura 8. Etapas características da produção de um material de referência certificado (MRC).

Fonte: EMONS *et al.*, 2004.

3.3.2. Homogeneidade

Estudos de homogeneidade são de fundamental importância em projetos de certificação de lotes para demonstrar que esses são suficientemente homogêneos (ABNT, 2012). Para estudos de homogeneidade, existem dois tipos importantes que devem ser considerados. Primeiramente, há a homogeneidade dentro de cada unidade ou frasco que pode ser minimizada com instruções apropriadas para utilização do material como mistura da amostra ou o consumo mínimo de amostra, para o qual a incerteza estabelecida ainda é válida. Um segundo tipo de homogeneidade, entre unidades ou frascos, a qual se refere à variação de unidade para unidade e depende muito da natureza do material (LINSINGER *et al.*, 2001, ABNT, 2012).

A avaliação da homogeneidade envolve a análise de unidades representativas do lote produzido, conforme um plano de amostragem, que pode ser aleatório simples, aleatório estratificado ou sistemático. De acordo com o ISO Guia 35, o número mínimo entre 10 e 30 unidades deve ser selecionado aleatoriamente. Um delineamento experimental deve ser elaborado no qual k unidades do material

são selecionadas e n replicatas de determinações são efetuadas para cada unidade. Os números k e n devem ser suficientemente grandes para permitir a detecção de falta de homogeneidade a um nível predeterminado. As determinações devem ser realizadas em ordem aleatória para evitar que possíveis variações sistemáticas de tempo afetem os resultados (ABNT, 2012).

3.3.2.1 Homogeneidade para material de referência

Segundo o ISO Guia 35 (ABNT, 2012), a incerteza-padrão entre frascos (u_{bb}), é estimada a partir da variância entre frascos (s^2_{bb}), deve ser calculada pela diferença entre as variâncias entre (MQ_{Entre}) e dentro (MQ_{Dentro}) dos frascos, dividida pelo número de replicatas de amostras (n_o). Tais variâncias devem ser estimadas por análise de variância (ANOVA) fator único, quando o número de determinações for $n > 1$ (**Equação 1**). Então, MQ_{Entre} inclui a heterogeneidade entre frascos e a MQ_{Dentro} inclui a incerteza devido à medição, transformação e subamostragem.

$$s^2_{bb} = u^2_{bb} = \frac{MQ_{Entre} - MQ_{Dentro}}{n_o} \quad (\text{Eq. 1})$$

O ISO Guia 35 (ABNT, 2012) não define um critério para avaliação da homogeneidade, mas adota a contribuição da variação entre frascos como um componente do erro na estimativa da incerteza do material produzido.

3.3.2.2 Homogeneidade para ensaio de proficiência

Documentos relacionados à organização e desenvolvimento de ensaios de proficiência, como o documento da IUPAC (THOMPSON *et al.*, 2006) e a norma ISO 13528:2005 (ISO, 2005) definem critérios para avaliação da homogeneidade dos materiais produzidos e distribuídos.

Segundo o documento da IUPAC (THOMPSON *et al.*, 2006), primeiramente, deve ser realizado o tratamento de *outliers* dos resultados obtidos, empregando o

teste de *Cochran*. Neste documento é descrito, ainda, um critério para avaliação da repetitividade do método.

Para a estatística do teste de *Cochran* (C), a razão entre o D_{\max}^2 , (maior diferença ao quadrado) e S_{DD} (soma dos quadrados das diferenças) é estimada (**Equações 2 e 3**).

$$C = \frac{D_{\max}^2}{S_{DD}} \quad (\text{Eq. 2})$$

$$S_{DD} = \sum D_i^2 \quad (\text{Eq. 3})$$

onde D_i é a diferença entre os valores das duplicatas e m o número de pares de duplicatas. O valor estimado é, então, comparado com os valores críticos tabelados.

O critério empregado para avaliação da repetitividade do método é descrito na **Equação 4**:

$$\frac{\sigma_{an}}{\sigma_p} < 0,5 \quad (\text{Eq. 4})$$

Sendo σ_{an} o desvio padrão de repetibilidade e σ_p o desvio padrão do ensaio de proficiência.

Então, para avaliação da homogeneidade suficiente, são estimadas as variâncias analítica (s_{an}^2) e amostral (s_{sam}^2), por ANOVA fator único, como as variâncias dentro dos grupos e entre grupos, respectivamente. Finalmente, calcula-se a variância amostral permitida (σ_{all}^2) (**Equação 5**), que é utilizada para estimar o valor crítico (c) (**Equação 6**), sendo F_1 e F_2 valores estimados a partir das distribuições de chi-quadrado e F, respectivamente, sendo g o número de amostras (**Equações 7 e 8**). O lote é considerado homogêneo se s_{sam}^2 for menor que o valor crítico c.

$$\sigma^2_{\text{all}} = (0,3 \times \sigma_p)^2 \quad (\text{Eq. 5})$$

$$c = (F_1 \times \sigma^2_{\text{all}}) + (F_2 \times s^2_{\text{an}}) \quad (\text{Eq. 6})$$

$$F_1 = \frac{1}{(g-1)} \chi^2_{\alpha, g-1} \quad (\text{Eq. 7})$$

$$F_2 = \frac{1}{2} F_{\alpha, g-1, g} \quad (\text{Eq. 8})$$

Conforme a norma ISO 13528:2005 (ISO, 2005), primeiramente, são estimadas as médias das replicatas ou porções teste de cada amostra (x_{tk}), as diferenças entre as porções teste (\bar{w}) e a média geral ($x_{t,k}$) (**Equações 9 a 11**).

$$x_{t,k} = \frac{(x_{t,1} + x_{t,2})}{2} \quad (\text{Eq. 9})$$

$$w_t = |x_{t,1} - x_{t,2}| \quad (\text{Eq. 10})$$

$$\bar{x}_{t,k} = \frac{\sum x_{t,k}}{g} \quad (\text{Eq. 11})$$

onde t representa a amostra ($t=1,2,\dots,g$), k a porção tomada para teste ($k=1,2$) e g o número de amostras.

O padrão das médias das amostras (s_x) e o desvio padrão dentro das amostras (s_w) são calculados pelas **Equações 12 e 13**. O desvio padrão entre amostras (s_s) é estimado pela **Equação 14** e o lote é considerado homogêneo se s_s for menor ou igual a $0,3\hat{\sigma}$, sendo $\hat{\sigma}$ o desvio padrão da proficiência.

$$s_x = \sqrt{\frac{\sum (x_{tk} - \bar{x}_{t,k})^2}{g-1}} \quad (\text{Eq. 12})$$

$$s_w = \sqrt{\sum w_t^2 / (2 \times g)} \quad (\text{Eq. 13})$$

$$s_s = \sqrt{s_x^2 - \left(\frac{s_w^2}{2} \right)} \quad (\text{Eq. 14})$$

O critério proposto para avaliação da homogeneidade na norma ISO 13528:2005 (ISO, 2005) é, assim, mais rigoroso que o descrito no documento da IUPAC (THOMPSON *et al.*, 2006).

3.3.3. Estabilidade

Considerando que os alimentos são misturas complexas, a estabilidade dos mensurandos e as propriedades dos componentes da matriz devem ser levadas em conta durante a preparação, armazenamento, transporte e análise do MR. Geralmente, os MR são secos para evitar alterações químicas e microbiológicas, o que pode ser feito por aquecimento ou por liofilização, em função da volatilidade dos mensurandos e dos componentes da matriz. Alguns materiais podem ser esterilizados por irradiação, mas deve-se considerar que a irradiação destrói substâncias orgânicas, tais como agrotóxicos. O congelamento é simples e fácil, mas não é muito prático devido à dificuldade de transporte (MAIER *et al.*, 1993).

3.3.3.1 Estabilidade para material de referência

O teste de estabilidade, juntamente com o teste de homogeneidade, é crucial para o processo de avaliação e certificação de um MR. O valor da propriedade a ser medido em um MR deve ser constante durante toda a validade do material. Outro requisito é que durante o transporte, sob condições a serem especificadas, a estabilidade do material deve ser garantida pelo produtor. Por exemplo, efeitos da luz, umidade e temperatura devem ser avaliados em função do tempo para estimar

um tempo de vida do MR e, conseqüentemente, estabelecer um período de validade do certificado, no caso de MRC (VAN DER VEEN *et al.*, 2001).

No ISO Guia 35 (ABNT, 2012) a aproximação linear é descrita como o modelo adequado, se existirem pequenos problemas de instabilidade com mecanismos cinéticos desconhecidos. Nos casos em que um mecanismo bem definido é a razão para a instabilidade, tal modelo deve ser preferido ao modelo linear (empírico). Nos casos de ausência de modelos bem definidos, a avaliação deve ser conduzida pela estimativa da significância da inclinação ou significância da regressão obtida por ANOVA.

Neste Guia (ABNT, 2012), dois tipos de estabilidade/instabilidade são considerados para a certificação de materiais: i) a estabilidade em longo prazo (como o tempo de prateleira); e ii) a estabilidade em curto prazo (como a estabilidade do material sob condições de transporte). Além disto, durante a vida útil do material certificado, convém que seja demonstrada a validade da incerteza no certificado.

Para estimativa da incerteza devida à estabilidade a longo prazo (u_{lts}) a **Equação 15** é considerada:

$$u_{lts} = s_{b1} \times T \quad (\text{Eq. 15})$$

onde s_{b1} é o erro padrão da inclinação e T_0 tempo do estudo de estabilidade.

3.3.3.2 Estabilidade para ensaio de proficiência

A avaliação da estabilidade pela ISO 13528:2005 (ISO, 2005) baseia-se na comparação da média geral dos valores obtidos no teste de homogeneidade ($\bar{x}_{t,k}$) com a média geral obtida no teste de estabilidade ($\bar{y}_{t,k}$), sendo consideradas estáveis as amostras cuja diferença entre as médias atender ao critério da **Equação 16**:

$$|\bar{x}_{t,k} - \bar{y}_{t,k}| \leq 0,3 \times \hat{\sigma} \quad (\text{Eq. 16})$$

A comparação das médias dos grupos controle (X_c) e experimental (X_e), segundo a IUPAC (THOMPSON *et al.*, 2006) pode ser conduzida pelo emprego do teste de t com variância combinada ou pelo critério definido na **Equação 17**:

$$|\bar{x}_c - \bar{y}_e| \leq 0,1 \times \sigma_p \quad (\text{Eq. 17})$$

Então, também para a avaliação de estabilidade do protocolo da IUPAC (THOMPSON *et al.*, 2006) e ISO 13528:2005 (ISO, 2005) possuem critérios distintos, embora, neste caso, o primeiro seja mais rigoroso.

3.3.4. Caracterização

Espera-se que os valores certificados não estejam desviados do valor verdadeiro mais do que a incerteza de medição declarada. Segundo o ISO Guia 34 (ABNT, 2004b) quatro abordagens básicas podem ser implementadas para a caracterização de um material: i) medição por meio de um método primário único em um único laboratório; ii) medição por meio de dois ou mais métodos de referência independentes em um laboratório; iii) medição por meio de uma rede de laboratórios empregando um ou mais métodos com veracidade demonstrável; e iv) uma abordagem com método específico em uma rede de laboratórios.

O aspecto mais importante a ser considerado ao escolher uma abordagem para a caracterização consiste em qual extensão os diferentes componentes de incerteza irão contribuir para a incerteza associada ao valor da propriedade. Além disso, é importante que o valor da propriedade atribuído e sua incerteza sejam demonstráveis.

Assim, o valor de propriedade de um MRC (X_{MRC}) é expresso pela **Equação 18**:

$$X_{MRC} = x_{Car} + \delta x_{bb} + \delta x_{lts} + \delta x_{sts} \quad (\text{Eq. 18})$$

onde X_{MRC} corresponde ao valor de propriedade obtido na caracterização do material (x_{Car}), visto que os componentes de erros devidos à variação entre frascos (δx_{bb}) instabilidade a longo prazo (δx_{lts}) e instabilidade a curto prazo (δx_{sts}), geralmente, não diferem de zero.

A incerteza destes componentes, por sua vez, não é nula e, assumindo a independência das variáveis, a incerteza-padrão associada ao valor de propriedade (u_{MRC}) será expressa conforme expresso na **Equação 19**:

$$u_{MRC} = k \sqrt{u_{Car}^2 + u_{bb}^2 + u_{lts}^2 + u_{sts}^2} \quad (\text{Eq. 19})$$

onde u_{Car} , u_{bb} , u_{lts} e u_{sts} as incertezas-padrão devidas à caracterização, homogeneidade, estabilidade em longo prazo e estabilidade em curto prazo, respectivamente, e k o fator de abrangência (ABNT, 2012).

3.3.5. Disponibilidade de MR para o escopo de dioxinas, furanos e PCB em pescado

Ainda não há MRC ou MR para todas as análises químicas realizadas em laboratórios, somente estão disponíveis materiais para as técnicas analíticas mais rotineiras e para um número pequeno de matrizes (SANTO *et al.*, 2005). Segundo GUILLEBLON *et al.* (2001), soma-se a este quadro crítico da escassez de materiais disponíveis, a falta de conhecimento dos profissionais dos laboratórios com respeito à existência e utilização dos MRC ou MR. Um tópico relevante para obtenção de um MRC ou MR é o elevado custo, que está diretamente relacionado à falta de informação e limitada utilização. Os laboratórios investem em equipamentos sofisticados, automatizados e tentam compensar tais custos com a redução de despesas com pessoal e consumíveis. MR, como parte deste custo, não são adquiridos, o que reflete uma má compreensão da importância desses materiais.

As matrizes alimentares são em sua maioria complexas e difíceis, com espécies químicas importantes que variam significativamente em suas

concentrações (de traços a componentes principais). O principal fator limitante para o uso de MRC em laboratórios de análises de alimentos é a sua disponibilidade restrita, considerando as diversas possibilidades de combinações de mensurandos / níveis de concentração / matrizes a serem analisados (EMONS *et al.*, 2006).

Análise dos contaminantes orgânicos tais como dioxinas, furanos e PCB, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA), benzenos clorados e agrotóxicos organoclorados em matrizes ambientais e alimentares são complexas. Os contaminantes são misturas constituídas de diversos congêneres diferentes (BOER & McGOVERN, 2001).

BOER e McGOVERN (2001) contabilizaram, em 2001, cerca de 20 materiais considerados como MRC para PCB em óleos de fígado de bacalhau, óleo de cavala, tecido de mexilhões, carpa e outros. No âmbito da União Europeia, em 1986, foram produzidos os primeiros materiais, que incluíram o MR de óleo de fígado de bacalhau (BRC 349) e o óleo de cavala. O MR de mexilhão (BCR CRM 682), produzido em 2001, foi considerado o primeiro material molhado e esterilizado para PCB, que foi embalado em latas, as quais puderam ser facilmente transportadas e armazenados à temperatura ambiente.

Alguns materiais de mexilhão também foram produzidos pelo *United States National Institute of Standards and Technology* (NIST) a partir de 1997. Tais materiais foram liofilizados e armazenados em média de 10 g, incluindo o SRM 1974a de 1997, o SRM 1974b de 2003 e o SRM 2974 de 2009 (NIST, 2015).

Atualmente, não existe MR ou MRC disponível de provedor nacional para análise de dioxinas, furanos e PCB para qualquer matriz. Poucos MR são produzidos no mundo relacionados a dioxinas, furanos e PCB, especialmente com relação a matrizes alimentares (BOER & McGOVERN, 2001; VAN LEEUWEN *et al.*, 2006).

No **APÊNDICE A** estão relacionados os materiais para análise de dioxinas, furanos e PCB disponíveis em pescado, atualmente, incluindo três materiais produzidos por Cambridge Isotope Laboratories, Inc (CIL) (peixe branco, peixe naturalmente contaminado, certificado para 29 mensurandos e peixe adicionado de

padrão certificado para 29 mensurandos) e dois materiais produzidos pela Wellington Laboratories (músculo de peixe certificado para 29 mensurandos e músculo de peixe – *Cyprinus carpio* – liofilizado certificado para nove mensurandos). Este último ainda possui disponível um material para dioxinas, furanos e PCB em sedimento de lago. Dentre os cinco materiais da matriz peixe, somente um dos três materiais produzidos pela *Wellington Laboratories* é de músculo de peixe liofilizado. O método de liofilização consiste na remoção lenta de cristais de água congelada por sublimação, sob vácuo. É o processo mais indicado para o preparo de materiais envasados em embalagens individuais e para a produção, distribuição e armazenamento de lotes, em pequena, média e grande escalas, demandando armazenamento simples e pouco espaço, com alta viabilidade durante a estocagem, embora exista um custo elevado para a implantação deste processo (ROSAS, 2009).

Os materiais da *Cambridge Isotope Laboratories* (CIL) foram acondicionados em frascos de vidro de 10 g. A empresa CIL citou nos certificados dos três MR que os produtos contêm traços de dioxinas, furanos, PCB, retardantes de chama bromados(BFR),HPA e agrotóxicos. O fabricante ressaltou que os materiais deveriam ser tratados de acordo com as diretrizes da *Occupational Safety and Health Administration* (OSHA) para material perigoso, além de cuidados como proteção contra exposição à luz e armazenamento em temperatura ambiente. No certificado da CIL foi descrito, ainda, que o material foi incluído na segunda rodada de um estudo interlaboratorial internacional, organizado pela mesma e pela *Cerilliant Corporation*. Para a maioria dos compostos, os valores certificados corresponderam às médias de consenso e respectivos desvios padrão obtidos no referido estudo, enquanto para os demais foram utilizados os valores de consenso da primeira rodada. O certificado foi emitido em dezembro de 2006 e os MR produzidos foram considerados válidos até agosto de 2016. Não foram declaradas no certificado informações sobre a avaliação da homogeneidade e estabilidade, assim como sobre critérios e normas de referência adotadas (CIL, 2006).

O MR (músculo de peixe liofilizado) produzido pela *Wellington Laboratories* foi armazenado em frascos de vidro âmbar de 10 g. Para o teste de homogeneidade

foram utilizados mais de 10 frascos. Para certificação, o fabricante descreveu que no início de 2002 o material foi submetido a um estudo interlaboratorial com mais de 70 laboratórios, obtendo assim média de consenso e respectivos desvios padrão para as dioxinas, furanos, PCB e bifenilas polibromadas (PBDE). Alguns dados foram provisórios e foram fornecidos apenas para fins informativos. O fabricante informou que à medida que mais análises forem realizadas, os valores atribuídos poderão ser atualizados (WELLINGTON LABORATORIES, 2014).

Considerando as incertezas declaradas para os quatro materiais disponíveis, não brancos, observou-se que dos 96 mensurandos certificados, 20 (20,8 %) tiveram incertezas que variaram de 0 a 25 % dos valores de propriedade declarados, 45 (46,9 %) incertezas entre 25 e 50 % dos valores declarados, e 31 (32,3 %) incertezas maiores que 50% dos valores de propriedade declarados. Sendo assim, para parte significativa dos mensurandos certificados, os materiais disponíveis não constituiriam uma ferramenta apropriada para estudos de veracidade e avaliação de tendência.

4. MATERIAL E MÉTODOS

As análises foram realizadas no Laboratório de Dioxinas e PCB (LDP) do Laboratório Nacional Agropecuário - Minas Gerais (LANAGRO-MG) do MAPA, acreditado pelo Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO), segundo requisitos da norma ISO/IEC 17025, sob o número CRL 0350, para o referido escopo analítico.

4.1. EQUIPAMENTOS

- Agitador de peneiras (Produtest, Mod. T).
- Agitadores de tubos tipo Vortex (Ika, MS 3 basic).
- Agitador tipo Wagner (Marconi, MA 160).
- 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).
- Bloco aquecedor com fluxo de nitrogênio (Pierce, React-Therm).
- Conjunto de peneiras Retsch nas granulometrias de 250 µm, 500 µm e 1 mm.
- Cromatógrafo (Agilent, 6890N) com injetor split/splitless (Agilent, 7683B).
- Espectrômetro de massas de alta resolução (Waters, AutoSpec Premier Dioxin System).
- Estufa para secagem (Heraeus Vacutherm, VT 6000).
- Extrator acelerado por solvente (Thermo/Dionex, ASE 350).
- Freezer Biomedical -30 °C/-20 °C (Sanyo, MDF-U537D).
- Homogeneizador de amostras, tipo moedor, com lâminas (Foss, 2096).
- Homogeneizador de amostras, tipo moedor, com lâminas (Geiger, GUM-12).
- Homogeneizador do tipo vórtex, com capacidade de 3000 rpm (Ika, T25 basic).

- Homogeneizador tipo V (Engendrar, tipo V).
- Liofilizador (Thermo, Super Modulyo).
- Misturador Drum (Marconi, MA 160/4).
- Micropipetas automáticas de 10 a 1000 μL calibradas (Nichiryo, Nichipet Ex e Gilson, P1000).
- Micropipeta eletrônica monocanal de 20 a 300 μL calibradas (Eppendorf, Eppendorf Research[®] pro 20-300 μL).
- Mufla (Thermolyne Furnace, 30400).
- Processador (Buchi Mixer, B-400).
- Refrigeradores (Consul, CRC24CBANA e Eletrolux, DFF37 Premium).
- Sistema de evaporação a vácuo com banho aquecedor (Buchi, Multivapor P6).
- Sistema de purificação de água (Millipore, Direct Q 3UV).
- Termômetros digitais tipo cabo sensor, com memória de máxima e mínima, calibrados (Incotherm).

4.2. MATERIAIS

- Algodão hidrófilo.
- Balões volumétricos de 5 e 10 mL calibrados.
- Bandejas adaptáveis ao liofilizador.
- Bandejas de aço inox.
- Béqueres de 100 mL.
- Cápsulas de porcelana.
- Celas do extrator acelerado por solvente de 34 mL e 66 mL de capacidade.
- Coluna cromatográfica capilar para GC-MS, tipo HP-5MS baixo sangramento de 60 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 μm de espessura do filme.
- Coluna de vidro (25 mm de diâmetro e altura mínima de 25 cm) com torneira e reservatório.

- Coluna de vidro (10,5 mm de diâmetro e altura mínima de 20 cm) com torneira e reservatório.
- Coluna de vidro (6,5 cm de diâmetro e altura mínima de 84 cm) com torneira.
- Dessecador de vidro com sílica dessecante.
- Filtros de fibra de vidro ou de celulose de 30 mm (Dionex Corporation).
- Frascos âmbar com tampa de rosca de polietileno, com capacidade para 10 g.
- Frascos de vidro com apêndice, adaptáveis ao banho aquecedor Turbo Vap, com capacidade para 200 mL.
- Frascos de vidro adaptáveis ao misturador Drum com 1000 mL de capacidade.
- Frascos de vidro para guarda de solução padrão de 20 mL.
- Funil de haste de vidro.
- Luvas de nitrila descartáveis.
- Papel de filtro qualitativo, filtração média, com diâmetro de 12,5 cm \pm 1 cm.
- Pêra de borracha para pipeta de Pasteur.
- Pipeta de Pasteur, de vidro boro silicato, de 150 mm.
- Ponteiras para micropipetas automáticas.
- Provetas de 25, 50 e 100 mL.
- Vial de 2 mL com *insert* de 200 μ L para injetor automático.

4.3. REAGENTES

- Ácido Sulfúrico 95-97 % grau para análise (p.a.).
- Carvão ativado Carbopack C (80-100 mesh).
- Celite (terra diatomácea) ácida para cromatografia (grau reagente).
- Diclorometano grau para análise de resíduos (p.a.r.).
- Florisil, tamanho de partícula 0,15 a 0,25 mm (60-100 mesh).
- Gás hélio 5.0 analítico, com sistema de fornecimento.
- Gás nitrogênio industrial, com sistema de fornecimento.

- Hexano grau p.a.r.
- Nonano grau p.a.r.
- Óleo de fígado de bacalhau norueguês, comercial, declarado como isento de PCB.
- Sílica gel 60 para cromatografia em coluna 0,063-0,2 mm (70-230 mesh).
- Sulfato de sódio anidro p.a.

4.4. SOLUÇÕES E MISTURAS

- Solução de padrões nativos de dioxinas e furanos (EPA1613 Stock ou EDF7999-10x), contendo: 2,3,7,8-TCDF; 2,3,7,8-TCDF; 2,3,7,8-TCDD; 1,2,3,7,8-PeCDF; 1,2,3,7,8-PeCDD; 2,3,4,7,8-PeCDF; 1,2,3,4,7,8-HxCDF; 1,2,3,6,7,8-HxCDF; 2,3,4,6,7,8-HxCDF; 1,2,3,4,7,8-HxCDD; 1,2,3,7,8,9-HxCDD; 1,2,3,6,7,8-HxCDD; 1,2,3,7,8,9-HxCDF; 1,2,3,4,6,7,8-HpCDF; 1,2,3,4,6,7,8-HpCDD; 1,2,3,4,7,8,9-HpCDF; OCDD; OCDF. Concentração: 400 pg/μL para tetras, 2.000 pg/μL para pentas, hexas e heptas, e 4.000 pg/μL para octas.
- Solução estoque de dioxinas e furanos: uma alíquota de 1000 μL da solução de padrões nativos de dioxinas e furanos foi transferida para um balão volumétrico de 10 mL, completando o volume com nonano. Concentração: 40 pg/μL para tetras, 200 pg/μL para pentas, hexas e heptas e 400 pg/μL para octas.
- Solução intermediária de dioxinas e furanos: uma alíquota de 500 μL da solução estoque de dioxinas e furanos foi transferida para um balão volumétrico de 10 mL, completando o volume com nonano. Concentração: 2 pg/μL para tetras, 10 pg/μL para pentas, hexas e heptas e 20 pg/μL para octas.
- Solução de padrões internos de dioxinas e furanos isotopicamente marcados com ¹³C12 (EPA1613LCS ou EDF8999), contendo: ¹³C12-2,3,7,8-TCDD; ¹³C12-1,2,3,7,8-PeCDD; ¹³C12-1,2,3,4,7,8-HxCDD; ¹³C12-1,2,3,6,7,8-HxCDD; ¹³C12-1,2,3,4,6,7,8-HpCDD; ¹³C12-OCDD; ¹³C12-2,3,7,8-TCDF; ¹³C12-1,2,3,7,8-PeCDF; ¹³C12-2,3,4,7,8-PeCDF; ¹³C12-1,2,3,4,7,8-HxCDF; ¹³C12-1,2,3,6,7,8-HxCDF; ¹³C12-1,2,3,7,8,9-HxCDF; ¹³C12-2,3,4,6,7,8-HxCDF; ¹³C12-1,2,3,4,6,7,8-HpCDF; ¹³C12-1,2,3,4,7,8,9-HpCDF. Concentração: 100 pg/μL para tetras, pentas, hexas e heptas, e 200 pg/μL para octas.
- Solução de padrões de seringa de dioxinas isotopicamente marcadas com ¹³C12 (EPA-1613ISS ou EDF5999), contendo: ¹³C12-1,2,3,4-TCDD; ¹³C12-1,2,3,7,8,9-HxCDD. Concentração: 200 ng/mL.
- Solução de padrões nativos de PCB não-orto(CIL EC-4986), contendo: PCB-77, PCB-81, PCB-126, PCB-169. Concentração: 10 pg/μL.

- Solução estoque de PCB não-orto: uma alíquota de 1 mL do padrão nativo foi transferida para um balão volumétrico de 10 mL, completando o volume com nonano. Concentração: 1000 pg/μL.
- Solução intermediária de PCB não-orto: uma alíquota de 50 μL da solução estoque foi transferida para um balão volumétrico de 10 mL, completando o volume com nonano. Concentração: 5 pg/μL.
- Solução de padrões internos de PCB não-orto isotopicamente marcadas com ¹³C12 (CIL EC-4187 ou SVO-ALURE-237), contendo: PCB-77-¹³C12, PCB-81-¹³C12, PCB-126-¹³C12, PCB-169-¹³C12. Concentração: 1,0 μg/mL.
- Solução de padrões nativos de PCB mono-orto (CIL EC-4987 SVO-ALURE-236), contendo: PCB-105, PCB-114, PCB-118, PCB-123, PCB-156, PCB-157, PCB-167, PCB-189. Concentração: 10 pg/μL.
- Solução estoque de PCB mono-orto: uma alíquota de 1 mL do padrão nativo foi transferida para um balão volumétrico de 10 mL, completando o volume com nonano. Concentração: 1000 pg/μL.
- Solução intermediária de PCB mono-orto: uma alíquota de 1000 μL da solução estoque de PCB mono-orto foi transferida para um balão volumétrico de 5 mL, completando o volume com nonano. Concentração: 200 pg/μL.
- Solução intermediária de dioxinas, furanos e PCB mono-orto e não-orto em óleo de peixe: alíquotas de 52,5 μL da solução intermediária de dioxinas, furanos, 790 μL da solução intermediária de PCB não-orto e 131,5 μL de solução intermediária de PCB mono-orto foram adicionadas no frasco, evaporadas e retomadas com 974 μL de óleo de peixe seguido de homogeneização.
- Solução de padrões internos de PCB mono-orto isotopicamente marcadas com ¹³C12 (CIL EC-4188), contendo: PCB-105-¹³C12, PCB-114-¹³C12, PCB-118-¹³C12, PCB-123-¹³C12, PCB-156-¹³C12, PCB-157-¹³C12, PCB-167-¹³C12, PCB-189-¹³C12. Concentração: 1 μg/mL.
- Solução de padrão de definição de janela cromatográfica. Referência Well-Labs 5TDWD.

4.5. AMOSTRAS

Amostras de filé de tilápia (30 kg) congelado foram coletadas por fiscais do MAPA de um produtor nacional, do Estado do Espírito Santo, no ano de 2013. As amostras foram envolvidas em papel alumínio, acondicionadas em 20 embalagens

plásticas de 1,5 kg, congeladas a temperaturas menores que -20 °C, acondicionadas em caixas térmicas e encaminhadas para o laboratório, via Correios.

No laboratório, as amostras foram mantidas sob temperatura de congelamento (< -20 °C) até momento do preparo dos materiais.

4.6. MÉTODO ANALÍTICO

O método de extração de dioxinas, furanos e PCB em filé de tilápia liofilizado por CG-EMAR foi baseado no método previamente validado. O referido método apresentou faixa linear de 0,05 a 100,00 pg/g de peixe para tetras PCDD e PCDF; 0,25 a 500,00 pg/g de peixe para pentas, hexas e heptas PCDD e PCDF; 0,50 a 1000,00 pg/g de peixe para OCDD e OCDF; 0,25 a 1000,00 pg/g de peixe para PCB não-orto; 2,00 a 800,00 pg/g de peixe para PCB mono-orto. As porcentagens de recuperação variaram de 91,8 a 118,4 %, desvios padrão relativos de repetitividade entre 1,1 e 13,1 % e de precisão intermediária de 1,3 a 14,8 %, além de limites de detecção e quantificação de 10 a 200 fg e 0,05 a 50 pg/g, respectivamente (AUGUSTI *et al.*, 2014b).

Todo o material utilizado não descartável foi lavado com detergente neutro, enxaguado e seco, sendo previamente lavado com hexano p.a.r. antes do uso. Os resíduos gerados foram descartados em frascos de vidro âmbar, sendo classificados em clorados e não clorados e, posteriormente, coletados por empresa para devido tratamento.

4.6.1. Extração utilizando ELP

Foram pesados 4 g de filé de peixe liofilizado em balança analítica com resolução de 0,01 g, correspondentes a 20 g de filé tilápia fresco. Para a extração no ELP foram utilizadas celas de 33 mL de capacidade, com dois papéis de filtro de fibra de vidro (ou celulose) na parte inferior de cada cela. Foram adicionados

50,00 ±1 µL de padrão interno (C13) de dioxinas, PCB mono-orto e PCB não-orto nas amostras. Na parte superior da cela colocou-se um papel de filtro de fibra de vidro (ou celulose), fechando-a.

O método de extração seguiu as seguintes condições: solvente hexano; temperatura de 100 °C; tempo estático de 15 min; número de ciclos 3; volume de enxague 90 % da cela de 33 mL; tempo de purga 240 s.

4.6.2. Concentração do extrato no multievaporador

O extrato obtido foi transferido, quantitativamente, para os frascos do multievaporador, lavando 3 vezes com cerca de 5 mL de hexano. O extrato foi concentrado até atingir aproximadamente 10 mL, a 50 ± 2 °C e 180 a 200 psi.

4.6.3. Purificação com coluna de sílica ácida

Para a purificação do extrato, previamente concentrado, foi empregada uma coluna de vidro (25 mm de diâmetro e altura mínima de 25 cm) empacotada com algodão, 30 g de sílica ácida, 50 mL de hexano e 2 g de sílica gel lavada e ativada.

O hexano foi eluído até aproximadamente 1 cm acima do topo da camada de sílica e descartado. O extrato foi transferido, quantitativamente, para a coluna, adicionando 150 mL de hexano e recolhendo o eluato. O extrato foi concentrado no multievaporador até aproximadamente 5 mL, sob as mesmas condições descritas anteriormente.

4.6.4. Purificação com coluna de florissil

Uma coluna de vidro (10,5 mm de diâmetro e altura mínima de 20 cm) foi empacotada com algodão, 1 g de sulfato de sódio anidro na parte inferior e superior da coluna e 1,5 g de florissil ativado a 600 °C, por cerca de 12 h. Para o

acondicionamento dos adsorventes foram eluídos e descartados 15 mL de solução de diclorometano:hexano (5:95) v/v. Em seguida, o eluato da purificação anterior foi acrescentado, sendo adicionados 30 mL de solução de diclorometano:hexano (5:95) v/v, que foram recolhidos em frasco de multievaporador, contendo a fração de PCB. Posteriormente, foram transferidos 35 mL de diclorometano na coluna, que foram recolhidos em frasco de Turbo Vap, correspondendo à fração de dioxinas.

4.6.5. Purificação com coluna de carvão

Uma coluna de vidro (10,5 mm de diâmetro e altura mínima de 20 cm) foi empacotada com algodão e 0,5 g de carvão/celite (18 %) na parte inferior da coluna. O excesso de carvão/celite (18 %) foi removido das paredes da coluna com algodão e, posteriormente, adicionou-se algodão antes de adicionar 1,5 g de florisil ativado e, novamente, algodão na parte superior da coluna. Para o acondicionamento dos adsorventes foram eluídos e descartados 20 mL de diclorometano. Após eluição, foram adicionados 30 mL de hexano. Em seguida, acrescentou-se o eluato da purificação anterior, fração de PCB, sendo adicionados 20 mL de hexano, recolhidos em frasco de Turbo Vap, correspondendo à fração de PCB mono-orto. Posteriormente, foram transferidos 35 mL de diclorometano para a coluna, recolhendo-se a fração de PCB não-orto no mesmo frasco de Turbo Vap da fração de dioxinas.

4.6.6. Concentração

A fração PCB mono-orto foi concentrada em Turbo Vap até cerca de 0,5 mL, à temperatura de 40 ± 4 °C e pressão 7 bar ou 12 psi. Foram adicionados 100 ± 1 µL de padrão de seringa. As paredes do tubo foram lavadas com 5 mL de hexano e homogeneizadas em vortex. Uma nova concentração foi feita, em TurboVap, até 0,5mL, sendo transferidos 200 µL do extrato purificado para o *insert* e o *vial* foi fechado.

A fração dioxinas, furanos e PCB não-orto foi concentrada no Turbo Vap até cerca de 0,5 mL, à temperatura de 40 ± 4 °C e pressão 7 bar ou 12 psi, os quais foram transferidos, quantitativamente, para o *insert* previamente inserido no *vial*. Em seguida, foi realizada evaporação suave no bloco aquecedor, à temperatura de 40 ± 4 °C, até quase secura. Foram adicionados 20 ± 1 µL de padrão de seringa, homogeneizados em vórtex e o *vial* foi fechado.

4.6.7. Determinação

A detecção e quantificação foram realizadas por CG-EMAR. O EM foi operado no modo impacto de elétrons (EI), com ionização positiva. A coluna para o CG foi uma HP-5 MS (60 m x 25 mm x 0,25 µm). As condições do equipamento utilizadas foram:

Fração PCB mono-orto:

- Rampa de temperatura do forno: temperatura inicial de 140°C por 4 min, seguido de taxa de aquecimento de 8 °C/min até 220 °C, taxa de aquecimento de 1,4 °C/min até 243 °C, taxa de aquecimento de 2,4 °C/min até 260 °C por 5 min, e taxa de aquecimento de 20 °C/min até 310 °C.
- Fluxo de gás hélio de 1 mL/min.
- Temperatura do injetor 280 °C.
- Temperatura do *inlet*, capilares 1 e 2, e *re-entrant* 310 °C (opcionalmente, septo 160 °C).
- Tempo de corrida de 45 min.
- Modo de injeção *splitless*.
- Volume de injeção 2 µL.

Fração dioxinas, furanos e PCB não-orto:

- Rampa de temperatura do forno: temperatura inicial de 140 °C por 4 min, taxa de aquecimento de 8 °C/min até 220 °C, taxa de aquecimento de 1,4 °C/min até 260 °C, taxa de aquecimento de 7 °C/min até 285 °C, por 6 min, e taxa de aquecimento de 25 °C/min até 315 °C.
- Fluxo de gás hélio de 1 mL/min.
- Temperatura do injetor de 280 °C.
- Temperaturas do *inlet*, capilares 1 e 2, e *re-entrant* 310 °C (opcionalmente, septo 160 °C).
- Tempo de corrida de 53 min.
- Modo de injeção *splitless*.
- Volume de injeção de 2 µL.

5. PRODUÇÃO DO MATERIAL

5.1. Procedimento piloto

No experimento piloto foram investigadas as melhores condições para a incorporação do padrão nativo na amostra de filé de tilápia, sendo avaliado: i) a forma de apresentação do padrão de dioxinas a ser incorporado ao filé processado, padrão solubilizado em solvente ou em óleo de peixe; ii) a possibilidade de adição do padrão em uma alíquota da amostra com posterior incorporação ao restante do material liofilizado, visando a minimização da quantidade de material contaminado a ser manipulado.

A concentração teórica escolhida foi estabelecida levando-se em consideração o limite de quantificação do método utilizado para a avaliação do material e a proximidade com a TEQ regulamentada para dioxinas, furanos e dl-PCB em pescado. Sendo assim, teores teóricos de 2 pg/g de peixe para tetras PCDD e PCDF; 10 pg/g de peixe para pentas, hexas e heptas PCDD/Fs; 20 pg/g de peixe

para OCDD e OCDF; 75 pg/g de peixe para PCB não-orto e 500 pg/g de peixe para PCB mono-orto foram escolhidos para a contaminação do material no procedimento piloto.

Primeiramente, 500,00 g das amostras de filé de tilápia foram retirados do congelador e mantidos a temperatura ambiente (19 a 25 °C) por 20 min. Em seguida, os filés foram processados em homogeneizador tipo moedor com lâminas, por cerca de 30 min, até obtenção de uma pasta. A amostra processada foi dividida em dois sublotes de 250,00 g. Foram retirados 62,50 g de amostra de cada sublote. A uma das porções foram adicionados $52,5 \pm 1 \mu\text{L}$ da solução padrão intermediária de dioxinas e furanos, de $790 \pm 1 \mu\text{L}$ da solução padrão de uso de PCB não-orto e $131,5 \pm 1 \mu\text{L}$ da solução padrão intermediária de PCB mono-orto, preparadas em nonano. A outra porção foi adicionada dos $974 \pm 1 \mu\text{L}$ da solução padrão intermediária preparada em óleo de peixe. Os padrões foram incorporados às alíquotas por homogeneização em turrax, durante 10 min. As alíquotas contaminadas e respectivas porções restantes de cada sublote foram colocadas em bandejas de liofilizador e congeladas para liofilização. A liofilização ocorreu à temperatura e pressão máxima de $-40 \text{ }^\circ\text{C}$ e 10^{-1} torr, até obtenção de massa constante. O tempo de liofilização foi de aproximadamente 36 h. Cada sublote liofilizado, foi, então, homogeneizado manualmente em gral e peneirado para obtenção de partículas homogêneas, em um agitador de peneiras com conjunto de peneiras nas granulometrias de 1 mm, 500 μm e 250 μm , por cerca de 15 min por batelada, repetindo-se o procedimento se necessário. Após o peneiramento de todos os sublotes, as alíquotas contaminadas foram adicionadas ao sublote não contaminado homogeneizando em um misturador Drum por 12 h. Finalmente, foi feito o acondicionamento em quatro frascos de vidro âmbar de 10 g, com tampa de rosca.

Foram tomados três materiais, de cada sublote, os quais foram analisados, pelo método descrito no item 4.6, em duplicata, para avaliação da homogeneidade, totalizando 12 ensaios (**Figura 9**). Além da homogeneidade, foram estimadas as

recuperações médias de cada material, visando avaliar as perdas no processo de produção.

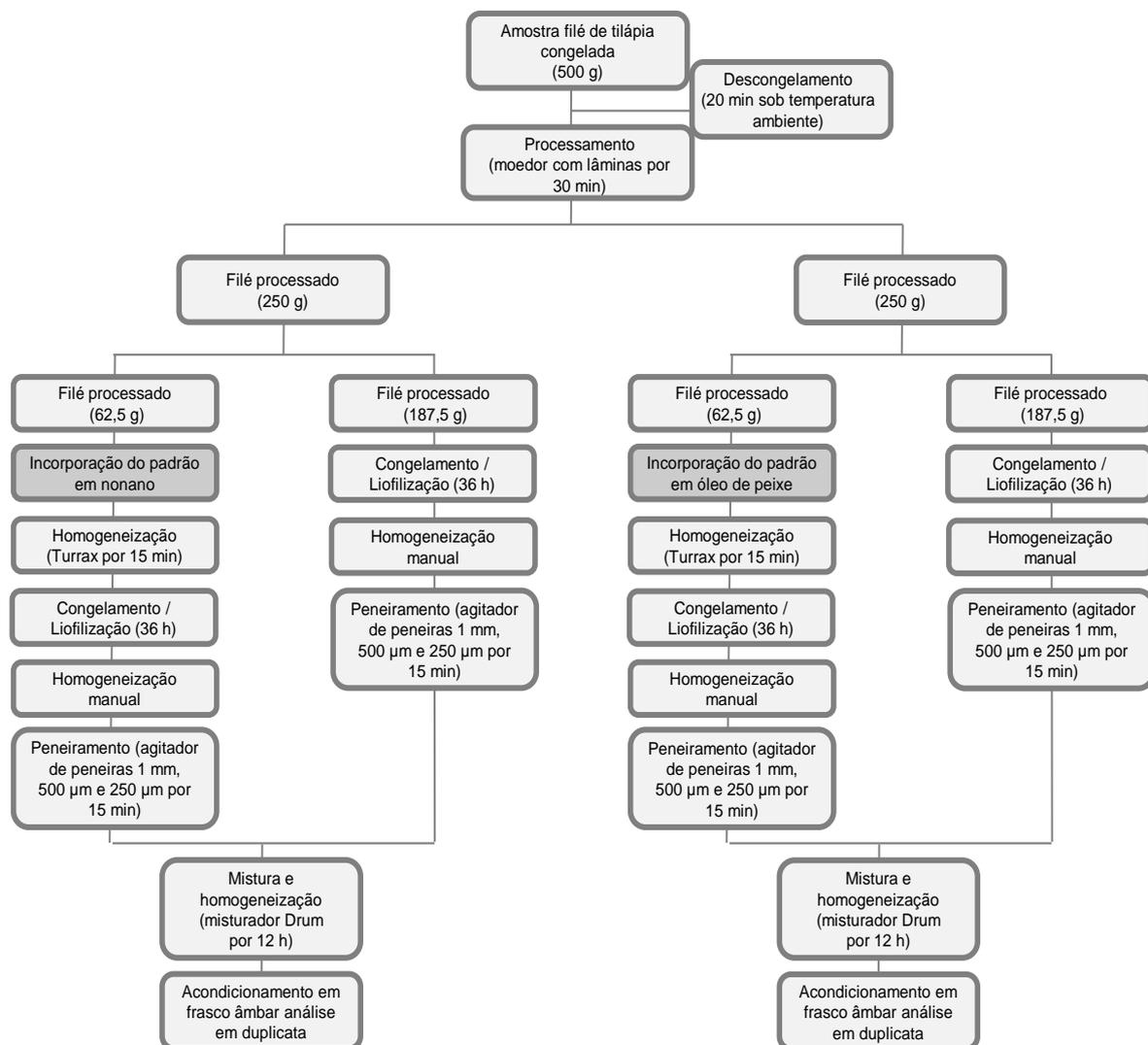


Figura 9. Fluxograma do piloto para avaliar a incorporação do padrão.

5.2. Preparo do material

As amostras de tilápia (7331,6 g) foram homogeneizadas e preparadas conforme a condição otimizada na etapa piloto, sendo tomada uma alíquota proporcional (1,4 kg) para a incorporação do padrão de dioxinas. O produto

liofilizado e peneirado foi acondicionado em 138 frascos de vidro âmbar de 10 g e armazenados sob refrigeração (2 a 8 °C) (**Figura 10**).

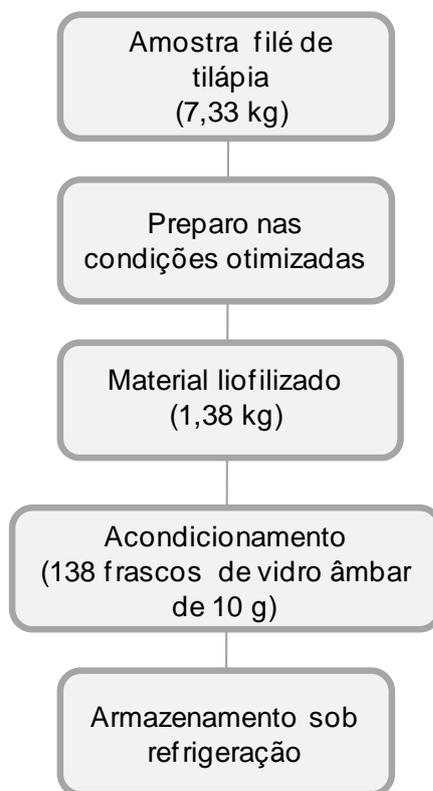


Figura 10. Fluxograma de preparo do material de referência (MR).

5.3. Avaliação da homogeneidade

Dez unidades do material preparado foram tomadas, aleatoriamente, e analisadas em duplicata, pelo método descrito no item 4.6 (**Figura 11**), totalizando 20 ensaios. Para estimativa da incerteza padrão devida à homogeneidade do material, para cada um dos 29 mensurandos, aplicou-se ANOVA (ABNT, 2012).

Os dados também foram analisados segundo os critérios estabelecidos na norma ISO 13528:2005 (ISO, 2005) e IUPAC (THOMPSON *et al.*, 2006), visando avaliar também a adequação do material preparado para a avaliação de

desempenho de laboratórios por meio de EP. Nestes casos, σ_p o desvio padrão do ensaio de proficiência foi estimado pelo modelo de Horwitz (1982).

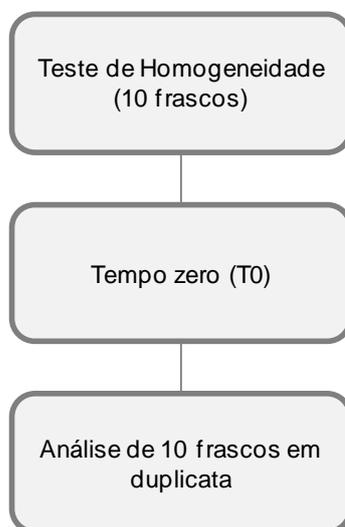


Figura 11. Delineamento para o teste de homogeneidade do material produzido.

5.4. Avaliação da estabilidade

5.4.1. Estabilidade em curto prazo

O teste de estabilidade em curto prazo, isócrono, foi realizado durante nove dias consecutivos com 12 frascos no total, sendo que três unidades do material preparado foram mantidas na temperatura de referência (refrigerado) e os outros 9 frascos foram submetidos a uma temperatura extrema de 45 ± 2 °C. A cada três dias foram retirados três frascos da estufa, os quais foram retornados para temperatura de refrigeração de referência. Após nove dias, os frascos foram analisados em duplicata pelo método escrito no item 4.6, totalizando 24 ensaios (**Figura 12**).

A estabilidade do material foi avaliada, para os 29 mensurandos, empregando-se ANOVA e Teste de Tukey para a comparação dos resultados dos

tratamentos zero, três, seis e nove dias, com nível de significância de $\alpha = 0,05$ (ABNT, 2012).

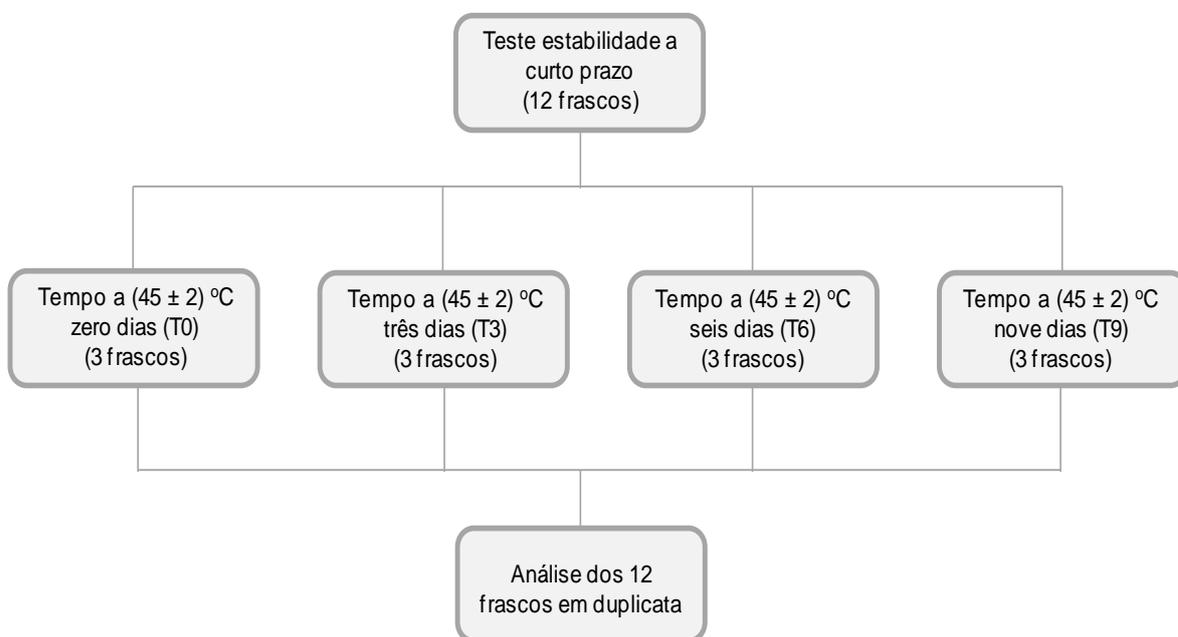


Figura 12. Delineamento para o teste de estabilidade em curto prazo.

5.4.2. Estabilidade em longo prazo

Três unidades do material preparado foram selecionadas, aleatoriamente, em intervalos de dois, quatro, seis e oito meses e analisadas em duplicata pelo método descrito no item 4.6, totalizando seis ensaios a cada dois meses, durante o período (Figura 13).

A estabilidade do MR preparado foi avaliada, para os 29 mensurandos, pela análise de regressão dos resultados obtidos em função do tempo (em meses), sendo primeiramente avaliada a adequação do modelo, conforme descrito por Souza & Junqueira (2005).

Em seguida, foi avaliada a significância da regressão, bem como do parâmetro inclinação, como estabelecido no ISO Guia 35 (ABNT, 2012). Os dados também foram analisados segundo critérios da norma ISO 13528:2005 (ISO, 2005) e

IUPAC (THOMPSON *et al.*, 2006), visando a avaliar também a potencialidade do material para EP.

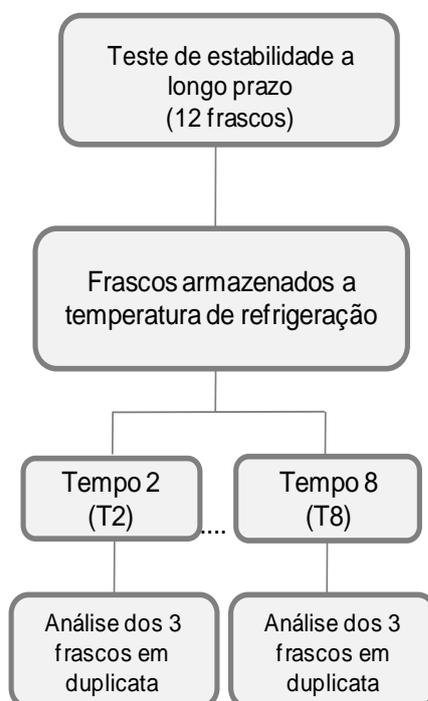


Figura 13. Delineamento para teste de estabilidade dos materiais de referência produzidos.

A regressão é uma técnica altamente sensível à presença de *outliers*, os quais podem subestimar o coeficiente de determinação (R^2), bem como interferir na estimativa dos parâmetros, inclinação e intercepção e, em muitos casos, levar a falsas conclusões sobre o modelo (WALFISH, 2006).

5.4.3. Estimativa das incertezas

As incertezas-padrão devidas à homogeneidade, estabilidade em curto prazo e estabilidade em longo prazo, a serem associadas aos valores de propriedade do material produzido, foram estimadas, conforme descrito no ISO Guia 35 (ABNT, 2012).

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. PRODUÇÃO DO MATERIAL

6.1.1. Procedimento piloto

Houve indicação de homogeneidade para a maior parte dos mensurandos nas duas formas de apresentação do padrão incorporado ao pescado (nonano e óleo de peixe), quando considerados os critérios da IUPAC (THOMPSON *et al.*, 2006), conforme apresentado na **Tabela 9**. Para o mensurando 1,2,3,7,8-PeCDD, quando incorporado com nonano, não foi evidenciada homogeneidade, enquanto que para o mensurando PCB-167 a homogeneidade não pôde ser avaliada, visto que o critério para avaliação da repetibilidade do método não foi atingido, tanto para o sublotado incorporado com nonano como para o de óleo de peixe. Considerando o critério da ISO 13528:2005 (ISO, 2005), não foi observada homogeneidade para nenhum dos mensurandos nas duas formas de apresentação do padrão incorporado ao peixe (nonano e óleo de peixe). Isto ocorreu devido ao critério da segunda norma ser mais restritivo que o estabelecido na primeira (**Tabela 10**).

Apesar do número de materiais preparados e analisados neste experimento piloto ter sido inferior aquele recomendado nos guias e normas relacionado à produção de MR e ensaios de proficiência, mínimo de 10, os resultados foram interpretados como promissores para a produção do material, com relação ao quesito homogeneidade.

Tabela 9. Avaliação da homogeneidade dos sublotes adicionados de padrão em nonano e óleo de peixe, segundo critérios do protocolo harmonizado pela IUPAC, para os 29 mensurandos pesquisados

Mensurando	Média (pg/g) (n=6)	Sublote Nonano					Média (pg/g) (n=6)	Sublote Óleo de peixe				
		S^2_{an}	S^2_{sam}	c	σ_p	Conclusão		S^2_{an}	S^2_{sam}	c	σ_p	Conclusão
2,3,7,8-TCDF	1,289	0,002	0,000	0,029	0,284	Homogêneo	1,741	0,001	0,007	0,045	0,383	Homogêneo
2,3,7,8-TCDD	1,154	0,001	0,004	0,020	0,254	Homogêneo	1,538	0,010	0,000	0,074	0,338	Homogêneo
1,2,3,7,8-PeCDF	6,048	0,007	0,003	0,506	1,330	Homogêneo	7,728	0,010	0,004	0,822	1,700	Homogêneo
2,3,4,7,8-PeCDF	6,007	0,005	0,000	0,493	1,322	Homogêneo	7,721	0,037	0,000	0,937	1,699	Homogêneo
1,2,3,7,8-PeCDD	10,095	0,212	3,549	2,235	2,221	Heterogêneo	15,071	0,526	3,148	5,212	3,316	Homogêneo
1,2,3,4,7,8-HxCDF	6,107	0,016	0,000	0,557	1,344	Homogêneo	7,821	0,003	0,004	0,813	1,721	Homogêneo
1,2,3,6,7,8-HxCDF	6,103	0,003	0,006	0,499	1,343	Homogêneo	7,833	0,025	0,000	0,908	1,723	Homogêneo
2,3,4,6,7,8-HxCDF	6,089	0,011	0,002	0,529	1,340	Homogêneo	7,705	0,034	0,000	0,918	1,695	Homogêneo
1,2,3,4,7,8-HxCDD	6,167	0,016	0,000	0,565	1,357	Homogêneo	7,771	0,031	0,011	0,920	1,710	Homogêneo
1,2,3,6,7,8-HxCDD	6,265	0,015	0,000	0,576	1,378	Homogêneo	7,912	0,016	0,000	0,886	1,741	Homogêneo
1,2,3,7,8,9-HxCDD	6,174	0,031	0,000	0,630	1,358	Homogêneo	7,870	0,029	0,038	0,930	1,731	Homogêneo
1,2,3,7,8,9-HxCDF	6,095	0,010	0,000	0,528	1,341	Homogêneo	7,567	0,080	0,000	1,089	1,665	Homogêneo

1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	6,367	0,005	0,002	0,550	1,401	Homogêneo	8,029	0,077	0,022	1,168	1,766	Homogêneo
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	8,520	0,023	0,027	1,044	1,874	Homogêneo	10,181	0,040	0,023	1,524	2,240	Homogêneo
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	6,274	0,066	0,041	0,795	1,380	Homogêneo	8,075	0,272	0,041	2,013	1,776	Homogêneo
OCDD	18,228	0,053	0,204	4,562	4,010	Homogêneo	20,921	0,155	0,000	6,633	4,603	Homogêneo
OCDF	11,891	0,041	0,172	2,022	2,616	Homogêneo	16,103	0,089	0,112	3,766	3,543	Homogêneo
PCB-81	43,674	0,471	0,000	26,903	9,608	Homogêneo	59,067	0,620	0,000	48,162	12,995	Homogêneo
PCB-77	103,210	1,629	1,422	145,971	22,706	Homogêneo	132,418	5,753	0,000	253,416	29,132	Homogêneo
PCB-126	48,359	0,189	0,002	31,325	10,639	Homogêneo	58,558	3,739	0,000	60,733	12,883	Homogêneo
PCB-169	44,235	0,997	0,708	29,800	9,732	Homogêneo	50,145	7,167	2,394	63,459	11,032	Homogêneo
PCB-123	265,107	25,036	0,000	1024,187	58,323	Homogêneo	357,770	6,115	10,434	1696,465	78,709	Homogêneo
PCB-118	332,874	42,818	0,000	1629,030	73,232	Homogêneo	518,830	94,326	0,261	3916,035	114,143	Homogêneo
PCB-114	281,301	39,307	0,000	1200,682	61,886	Homogêneo	376,162	15,443	21,185	1912,504	82,766	Homogêneo
PCB-105	314,575	63,720	0,000	1563,811	69,207	Homogêneo	441,381	41,561	13,213	2719,969	97,104	Homogêneo
PCB-167	313,814	1560,530	0,000	7957,996	69,039	-	421,849	740,877	0,000	5490,257	92,807	-
PCB-156	302,066	270,251	0,000	2346,281	66,454	Homogêneo	395,193	167,994	192,242	2756,375	86,942	Homogêneo
PCB-157	301,671	271,066	0,000	2346,656	66,368	Homogêneo	377,275	255,812	18,278	2951,274	83,001	Homogêneo
PCB-189	305,219	5,541	1,662	405,800	67,148	Homogêneo	373,745	5,195	21,433	1845,019	82,224	Homogêneo

S_{an}^2 : variância de repetibilidade; S_{am}^2 : variância amostral ou variação entre grupos; c: valor crítico para o teste de homogeneidade suficiente; critério para avaliação da repetibilidade: $s_{an} < 0,5 \sigma_p$; critério para avaliação da homogeneidade: $s_{sam}^2 \leq c \cdot \sigma_p$; desvio padrão alvo. Não houve detecção de outliers para nenhum mensurando ($p > 0,05$); -: avaliação da homogeneidade não realizada, visto que o critério para repetibilidade do método não foi atendido.

2,3,7,8-TCDD: 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina; 2,3,7,8-TCDF: 2,3,7,8-tetraclorodibenzofurano; 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-81: 3,4,4',5'-tetraclorobifenila; PCB-77: 3,3',4,4'-tetraclorobifenila; PCB-126: 3,3',4,4',5'-pentaclorobifenila; PCB-169: 3,3',4,4',5,5'-hexaclorobifenila; PCB-123: 2',3,4,4',5-pentaclorobifenila; PCB-118: 2,3',4,4',5-pentaclorobifenila; PCB-105: 2,3,3',4,4'-pentaclorobifenila; PCB-167: 2,3',4,4',5,5'-hexaclorobifenila; PCB-156: 2,3,3',4,4',5-hexaclorobifenila; PCB-157: 2,3,3',4,4',5-hexaclorobifenila; PCB-189: 2,3,3',4,4',5,5'-heptaclorobifenila.

Tabela 10. Avaliação da homogeneidade dos sublotes adicionados de padrão em nonano e óleo de peixe, segundo critérios da ISO 13528:2005, para os 29 mensurandos pesquisados

Mensurando	Média (pg/g) (n=6)	Sublote Nonano			Média (pg/g) (n=6)	Sublote Óleo de peixe		
		S _s	σ _p	Conclusão		S _s	σ _p	Conclusão
2,3,7,8-TCDF	1,289	0,622	0,284	Heterogêneo	1,741	0,841	0,383	Heterogêneo
2,3,7,8-TCDD	1,154	0,558	0,254	Heterogêneo	1,538	0,740	0,338	Heterogêneo
1,2,3,7,8-PeCDF	6,048	2,921	1,330	Heterogêneo	7,728	3,733	1,700	Heterogêneo
2,3,4,7,8-PeCDF	6,007	2,901	1,322	Heterogêneo	7,721	3,727	1,699	Heterogêneo
1,2,3,7,8-PeCDD	10,095	4,948	2,221	Heterogêneo	15,071	7,314	3,316	Heterogêneo
1,2,3,4,7,8-HxCDF	6,107	2,949	1,344	Heterogêneo	7,821	3,778	1,721	Heterogêneo
1,2,3,6,7,8-HxCDF	6,103	2,948	1,343	Heterogêneo	7,833	3,782	1,723	Heterogêneo
2,3,4,6,7,8-HxCDF	6,089	2,941	1,340	Heterogêneo	7,705	3,720	1,695	Heterogêneo
1,2,3,4,7,8-HxCDD	6,167	2,978	1,357	Heterogêneo	7,771	3,753	1,710	Heterogêneo
1,2,3,6,7,8-HxCDD	6,265	3,025	1,378	Heterogêneo	7,912	3,821	1,741	Heterogêneo
1,2,3,7,8,9-HxCDD	6,174	2,980	1,358	Heterogêneo	7,870	3,801	1,731	Heterogêneo
1,2,3,7,8,9-HxCDF	6,095	2,943	1,341	Heterogêneo	7,567	3,650	1,665	Heterogêneo
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	6,367	3,076	1,401	Heterogêneo	8,029	3,875	1,766	Heterogêneo

1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	8,520	4,115	1,874	Heterogêneo	10,181	4,917	2,240	Heterogêneo
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	6,274	3,028	1,380	Heterogêneo	8,075	3,889	1,776	Heterogêneo
OCDD	18,228	8,806	4,010	Heterogêneo	20,921	10,102	4,603	Heterogêneo
OCDF	11,891	5,746	2,616	Heterogêneo	16,103	7,778	3,543	Heterogêneo
PCB-81	43,674	21,091	9,608	Heterogêneo	59,067	28,527	12,995	Heterogêneo
PCB-77	103,210	49,852	22,706	Heterogêneo	132,418	63,942	29,132	Heterogêneo
PCB-126	48,359	23,358	10,639	Heterogêneo	58,558	28,257	12,883	Heterogêneo
PCB-169	44,235	21,362	9,732	Heterogêneo	50,145	24,176	11,032	Heterogêneo
PCB-123	265,107	128,018	58,323	Heterogêneo	357,770	172,819	78,709	Heterogêneo
PCB-118	332,874	160,730	73,232	Heterogêneo	518,830	250,545	114,143	Heterogêneo
PCB-114	281,301	135,814	61,886	Heterogêneo	376,162	181,700	82,766	Heterogêneo
PCB-105	314,575	151,853	69,207	Heterogêneo	441,381	213,176	97,104	Heterogêneo
PCB-167	313,814	149,289	69,039	Heterogêneo	421,849	202,897	92,807	Heterogêneo
PCB-156	302,066	145,468	66,454	Heterogêneo	395,193	190,837	86,942	Heterogêneo
PCB-157	301,671	145,266	66,368	Heterogêneo	377,275	181,979	83,001	Heterogêneo
PCB-189	305,219	147,429	67,148	Heterogêneo	373,745	180,543	82,224	Heterogêneo

s_s : desvio padrão entre amostras; critério para avaliação da homogeneidade: $s_s \leq 0,3 \sigma_p$; σ_p : desvio padrão alvo

2,3,7,8-TCDD: 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina; 2,3,7,8-TCDF: 2,3,7,8-tetraclorodibenzofurano; 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-81: 3,4,4',5'-tetraclorobifenila; PCB-77: 3,3',4,4'-tetraclorobifenila; PCB-126: 3,3',4,4',5'-pentaclorobifenila; PCB-169: 3,3',4,4',5,5'-hexaclorobifenila; PCB-123: 2',3,4,4',5'-pentaclorobifenila; PCB-118: 2,3',4,4',5'-pentaclorobifenila; PCB-114: 2,3,4,4',5'-pentaclorobifenila; PCB-105: 2,3,3',4,4'-pentaclorobifenila; PCB-167: 2,3',4,4',5,5'-hexaclorobifenila; PCB-156: 2,3,3',4,4',5'-hexaclorobifenila; PCB-157: 2,3,3',4,4',5'-hexaclorobifenila; PCB-189: 2,3,3',4',5,5'-heptaclorobifenila.

As recuperações foram estimadas considerando-se os valores teóricos adicionados ao filé de peixe e os valores estimados para os materiais liofilizados, por análise laboratorial. Os valores de recuperação média para incorporação com nonano foram de 67% e de 87 % para o óleo de peixe (**Tabela11**). Desta forma, apesar do perfil de homogeneidade não ter diferido para os dois sublotes, ou condições de incorporação do padrão, melhores porcentagens de recuperação foram alcançadas quando o óleo de peixe foi empregado. Esta última condição foi, então, escolhida para a produção do material, fundamentada pelas melhores recuperações, embora seja importante destacar que o óleo de peixe também constitui uma apresentação mais interessante em termos de custo.

Provavelmente, a incorporação do padrão de dioxinas foi facilitada pelo óleo de peixe, devido sua assimilação nos depósitos de armazenamento de gordura do filé de tilápia, pois estes são de fácil acesso. De acordo com SILVA *et al.* (2013) o óleo obtido do peixe com carne gorda ou do fígado de peixe magro é denominado óleo de peixe e é caracterizado por ser rico em graxos poliinsaturados de cadeia longa.

Tabela 11. Porcentagens de recuperação dos 29 mensurandos pesquisados obtidas para os sublotes adicionados de padrão em nonano e óleo de peixe, considerando os valores teóricos adicionados ao filé de peixe e aqueles determinados no material liofilizado

Mensurando	Concentração teórica adicionada ao filé (pg/g)	Recuperação no liofilizado (%)	
		Sublote Nonano	Sublote Óleo de peixe
2,3,7,8-TCDF	2	64,47	87,03
2,3,7,8-TCDD	2	57,70	76,90
1,2,3,7,8-PeCDF	10	60,48	77,28
2,3,4,7,8-PeCDF	10	60,07	77,21
1,2,3,7,8-PeCDD	10	104,28	150,71
1,2,3,4,7,8-HxCDF	10	61,07	78,21
1,2,3,6,7,8-HxCDF	10	61,03	78,33
2,3,4,6,7,8-HxCDF	10	60,89	77,05
1,2,3,4,7,8-HxCDD	10	61,67	77,71
1,2,3,6,7,8-HxCDD	10	62,65	79,12
1,2,3,7,8,9-HxCDD	10	61,74	78,70
1,2,3,7,8,9-HxCDF	10	60,95	75,67
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	10	63,67	80,29
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	10	85,20	101,81
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	10	62,74	80,75
OCDD	20	91,14	104,61
OCDF	20	59,45	80,51
PCB-81	75	58,23	78,76
PCB-77	75	137,61	176,56
PCB-126	75	64,48	78,08
PCB-169	75	58,98	66,86
PCB-123	500	53,02	71,55
PCB-118	500	66,57	103,77
PCB-114	500	56,26	75,23
PCB-105	500	62,92	88,28
PCB-167	500	62,76	84,37
PCB-156	500	64,08	79,04
PCB-157	500	64,33	75,46

2,3,7,8-TCDD: 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina; 2,3,7,8-TCDF: 2,3,7,8-tetraclorodibenzofurano; 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-81: 3,4,4',5-tetraclorobifenila; PCB-77: 3,3',4,4'-tetraclorobifenila; PCB-126: 3,3',4,4',5-pentaclorobifenila; PCB-169: 3,3',4,4',5,5'-hexaclorobifenila; PCB-123: 2',3,4,4',5-pentaclorobifenila; PCB-118: 2,3',4,4',5-pentaclorobifenila; PCB-114: 2,3,4,4',5-pentaclorobifenila; PCB-105: 2,3,3',4,4'-pentaclorobifenila; PCB-167: 2,3',4,4',5,5'-hexaclorobifenila; PCB-156: 2,3,3',4,4',5-hexaclorobifenila; PCB-157: 2,3,3',4,4',5'-hexaclorobifenila; PCB-189: 2,3,3',4',5,5'-heptaclorobifenila.

6.1.2. Preparo do material

Na **Figura 14** encontram-se ilustrados os materiais produzidos devidamente identificados e embalados.



Figura 14. Material de referência de filé de tilápia liofilizado, contaminado com dibenzo-p-dioxinas policloradas (dioxinas), dibenzo-furano policlorados (furanos) e bifenilas policloradas (PCB), acondicionado em frascos de vidro âmbar de 30 g com tampa de rosca de polietileno.

No preparo do material, houve indicação de homogeneidade para todos os 29 mensurandos quando considerados tanto os critérios da IUPAC (THOMPSON *et al.*, 2006) como os da ISO 13528:2005 (ISO, 2005) **Tabela 12.** Cumpre destacar que, como os testes foram realizados empregando método analítico que adotava alíquotas de 4 g do material liofilizado, a homogeneidade entre e dentro dos frascos foi assegurada com a restrição de uso de alíquotas iguais ou superiores a 4 g de material, o que corresponde a 20 g de peixe fresco.

Tabela 12. Avaliação da homogeneidade do material produzido, segundo critérios do protocolo harmonizado pela IUPAC e da norma ISO 13528:2005, para os 29 mensurandos pesquisados

Mensurando	Média (pg/g) (n=20)	IUPAC		ISO 13528		σ_p	Conclusão
		S^2_{an}	S^2_{sam}	c	S_s		
2,3,7,8-TCDF	1,086	0,002	0,000	0,011	0,024	0,239	Homogêneo
2,3,7,8-TCDD	1,046	0,001	0,000	0,010	0,017	0,230	Homogêneo
1,2,3,7,8-PeCDF	5,444	0,009	0,000	0,252	0,079	1,198	Homogêneo
2,3,4,7,8-PeCDF	5,313	0,018	0,000	0,249	0,075	1,169	Homogêneo
1,2,3,7,8-PeCDD	5,272	0,016	0,000	0,244	0,056	1,160	Homogêneo
1,2,3,4,7,8-HxCDF	5,850	0,021	0,000	0,302	0,096	1,287	Homogêneo
1,2,3,6,7,8-HxCDF	5,852	0,018	0,000	0,298	0,113	1,287	Homogêneo
2,3,4,6,7,8-HxCDF	5,764	0,008	0,000	0,281	0,069	1,268	Homogêneo
1,2,3,4,7,8-HxCDD	5,847	0,019	0,000	0,299	0,041	1,286	Homogêneo
1,2,3,6,7,8-HxCDD	5,756	0,018	0,000	0,290	0,069	1,266	Homogêneo
1,2,3,7,8,9-HxCDD	5,288	0,020	0,000	0,249	0,077	1,163	Homogêneo
1,2,3,7,8,9-HxCDF	5,471	0,024	0,000	0,269	0,064	1,204	Homogêneo
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	6,070	0,007	0,000	0,309	0,099	1,336	Homogêneo
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	5,597	0,013	0,000	0,270	0,079	1,231	Homogêneo
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	5,554	0,017	0,000	0,269	0,049	1,222	Homogêneo
OCDD	10,343	0,101	0,000	0,978	0,308	2,276	Homogêneo
OCDF	10,401	0,149	0,000	1,037	0,343	2,288	Homogêneo
PCB-81	39,482	0,381	0,000	13,151	0,491	8,686	Homogêneo
PCB-77	62,034	3,462	0,000	35,011	2,994	13,648	Homogêneo
PCB-126	42,650	0,203	0,000	15,102	0,484	9,383	Homogêneo

PCB-169	43,436	1,031	0,000	16,492	0,597	9,556	Homogêneo
PCB-123	266,960	7,180	0,000	590,882	1,604	58,731	Homogêneo
PCB-118	310,378	9,371	0,000	798,373	4,276	68,283	Homogêneo
PCB-114	271,985	9,833	0,000	615,742	3,359	59,837	Homogêneo
PCB-105	285,848	22,379	0,000	691,742	4,084	62,887	Homogêneo
PCB-167	296,251	3,575	0,000	722,338	3,229	65,175	Homogêneo
PCB-156	290,846	7,643	0,000	700,462	5,013	63,986	Homogêneo
PCB-157	284,535	5,168	0,000	668,227	3,864	62,598	Homogêneo
PCB-189	294,888	17,612	0,000	729,920	2,002	64,875	Homogêneo

IUPAC : S_{an}^2 : variância de repetibilidade; s_{am}^2 : variância amostral ou variação entre grupos; c: valor crítico para o teste de homogeneidade suficiente; critério para avaliação da repetibilidade: $s_{an} < 0,5 \sigma_p$; critério para avaliação da homogeneidade: $s_{sam}^2 \leq c$.

ISO 13528:2005: s_s : desvio padrão entre amostras; critério para avaliação da homogeneidade: $s_s \leq 0,3 \sigma_p$.

σ_p : desvio padrão alvo.

2,3,7,8-TCDD: 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina; 2,3,7,8-TCDF: 2,3,7,8-tetraclorodibenzofurano; 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-81: 3,4,4',5'-tetraclorobifenila; PCB-77: 3,3',4,4'-tetraclorobifenila; PCB-126: 3,3',4,4',5'-pentaclorobifenila; PCB-169: 3,3',4,4',5,5'-hexaclorobifenila; PCB-123: 2',3,4,4',5'-pentaclorobifenila; PCB-118: 2,3',4,4',5'-pentaclorobifenila; PCB-114: 2,3,4,4',5'-pentaclorobifenila; PCB-105: 2,3,3',4,4'-pentaclorobifenila; PCB-167: 2,3',4,4',5,5'-hexaclorobifenila; PCB-156: 2,3,3',4,4',5'-hexaclorobifenila; PCB-157: 2,3,3',4,4',5'-hexaclorobifenila; PCB-189: 2,3,3',4',5,5'-heptaclorobifenila.

Apesar da equivalência nas estimativas das variâncias, os critérios adotados para a homogeneidade diferem entre si. O critério proposto para avaliação da homogeneidade no protocolo harmonizado pela IUPAC (THOMPSON *et al.*, 2006) é mais permissivo do que o estabelecido na norma ISO 13528:2005 (ISO, 2005). O critério da IUPAC é originário de um trabalho de FEARN & THOMPSON (2001), no qual estes autores argumentam que, devido à homogeneidade suficiente ser uma premissa razoável e os custos dos testes de homogeneidade serem frequentemente altos, seria mais apropriado, na produção de MR, enfatizar a prevenção de erros tipo I (rejeição de um material satisfatório).

CLEUVENBERGEN *et al.* (1998) prepararam um MR de cinzas volantes, ou cinzas de combustível pulverizadas e, posteriormente, caracterizaram como um MRC para cinco dioxinas e sete furanos. Para o teste de homogeneidade foram selecionados, aleatoriamente, 20 frascos e realizada ANOVA.

Segundo VAN LEEUWEN *et al.* (2006) que testaram candidatos a MRC para dioxinas, furanos, PCB e BFR em amostras ambientais e alimentícias, os materiais foram produzidos de acordo com o ISO GUIA 35. A homogeneidade foi determinada pela análise de algumas PCB tratadas como “alvo” pelos autores, não sendo avaliados todos os mensurandos do escopo. Assim, foram analisadas PCB-52, PCB-101, PCB-118, PCB-153 e PCB-180 para o material de mexilhão (BCR682); PCB-77, PCB-81 e PCB-126 para o material de arenque (BCR-718); e PCB-169 para o material de caboz (BCR-719). ANOVA foi realizada para avaliação da homogeneidade entre materiais (realizada com 20 unidades) e dentro dos materiais (realizada com cinco alíquotas de uma mesma unidade). Segundo os autores, a homogeneidade foi demonstrada para 18 g do material de mexilhão, 6 g do material de arenque e 20 g do material de caboz.

No trabalho de OTAKE *et al.* (2010), foi produzido um material com algumas PCB e agrotóxicos organoclorados, na mesma matriz proposta no presente estudo, que também foi liofilizada e armazenada em frascos com 10 g. Para o ensaio de homogeneidade, aproximadamente dez frascos foram tomados, aleatoriamente, e foram analisados em duplicata em ordem aleatória. ANOVA foi utilizada para avaliação da homogeneidade.

ULRICH (2011) descreveu que a utilização da ANOVA para o estudo de homogeneidade pode conduzir a conclusões errôneas em duas situações: i) se o método analítico usado for pouco preciso, possíveis heterogeneidades não são detectadas e o teste indicará que o material é homogêneo; e ii) se o método analítico for bastante preciso, o teste indicará que o material é heterogêneo, pois qualquer pequena diferença entre a composição dos frascos produzirá um resultado significativo de heterogeneidade.

6.1.3. Estabilidade em curto prazo

Não houve diferença significativa entre os tratamentos para 27 dos 29 mensurandos estudados ($p > 0,05$), o que permitiu concluir que, para tais compostos, a exposição à faixa de temperatura de 45 ± 2 °C, por até nove dias, não prejudicaria a qualidade do material. Os resultados obtidos na avaliação da estabilidade em curto prazo estão apresentados na **Tabela 13**.

Diferenças significativas foram observadas para OCDD e PCB-167 ($p < 0,05$). Para OCDD, os materiais expostos à faixa de temperatura de 45 ± 2 °C por seis e nove dias apresentaram resultados que diferiram significativamente daqueles obtidos para os materiais não expostos e expostos por três dias ($p < 0,05$), os quais não diferiram entre si ($p > 0,05$). Considerando a PCB-167, os materiais submetidos às condições extremas de temperatura de transporte por seis e nove dias diferiram daqueles não expostos ($p < 0,05$), embora não tenham diferido dos expostos por três dias ($p > 0,05$), que por sua vez também não diferiram dos não expostos ($p > 0,05$). Desta forma, foi possível inferir que para os compostos OCDD e PCB-167 a estabilidade em curto prazo foi assegurada quando condições extremas de temperatura durante o transporte, na faixa de 45 ± 2 °C, não excederem a três dias.

Tabela 13. Resultados obtidos para o material produzido em estudo isócrono de estabilidade em curto prazo, com armazenamento a 45 ± 2 °C por zero, três, seis e nove dias

Mensurando	Média (pg/g)				F	p
	0 dias	3 dias	6 dias	9 dias		
2,3,7,8-TCDF	1,234 ^a	0,999 ^a	1,119 ^a	1,070 ^a	2,017	0,144
2,3,7,8-TCDD	1,241 ^a	1,140 ^a	0,820 ^a	1,078 ^a	1,486	0,249
1,2,3,7,8-PeCDF	6,464 ^a	6,081 ^a	5,688 ^a	5,985 ^a	2,227	0,116
2,3,4,7,8-PeCDF	6,130 ^a	6,148 ^a	5,526 ^a	5,731 ^a	2,245	0,114
1,2,3,7,8-PeCDD	5,892 ^a	6,050 ^a	5,736 ^a	5,945 ^a	0,129	0,942
1,2,3,4,7,8-HxCDF	6,412 ^a	6,334 ^a	6,102 ^a	6,114 ^a	0,284	0,836
1,2,3,6,7,8-HxCDF	6,353 ^a	6,255 ^a	5,979 ^a	6,502 ^a	0,516	0,676
2,3,4,6,7,8-HxCDF	6,297 ^a	6,542 ^a	6,338 ^a	6,208 ^a	0,305	0,822
1,2,3,4,7,8-HxCDD	6,549 ^a	6,678 ^a	6,013 ^a	5,774 ^a	2,610	0,080
1,2,3,6,7,8-HxCDD	6,327 ^a	6,311 ^a	5,677 ^a	5,775 ^a	2,589	0,081
1,2,3,7,8,9-HxCDD	5,998 ^a	5,755 ^a	5,155 ^a	5,592 ^a	2,441	0,094
1,2,3,7,8,9-HxCDF	6,051 ^a	5,976 ^a	5,590 ^a	5,836 ^a	0,694	0,566
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	6,709 ^a	6,644 ^a	6,706 ^a	6,330 ^a	0,534	0,664
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	7,537 ^a	7,140 ^a	7,110 ^a	6,955 ^a	0,373	0,773
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	6,239 ^a	6,501 ^a	6,118 ^a	6,085 ^a	0,690	0,569
OCDD	20,923 ^a	21,117 ^a	14,786 ^b	14,888 ^b	7,862	0,001
OCDF	11,742 ^a	11,035 ^a	10,026 ^a	10,719 ^a	1,396	0,273
PCB-81	42,559 ^a	41,425 ^a	39,927 ^a	39,714 ^a	0,869	0,474
PCB-77	75,690 ^a	76,636 ^a	74,201 ^a	74,300 ^a	0,172	0,914
PCB-126	43,866 ^a	44,176 ^a	42,549 ^a	42,475 ^a	0,585	0,632
PCB-169	44,687 ^a	45,904 ^a	42,911 ^a	43,856 ^a	1,245	0,320
PCB-123	281,803 ^a	274,824 ^a	277,793 ^a	266,975 ^a	1,565	0,229
PCB-118	336,502 ^a	340,654 ^a	328,726 ^a	324,237 ^a	0,927	0,446
PCB-114	276,622 ^a	269,425 ^a	271,790 ^a	266,557 ^a	0,627	0,606
PCB-105	286,351 ^a	287,411 ^a	282,031 ^a	272,818 ^a	0,944	0,438
PCB-167	308,460 ^a	295,294 ^{a,b}	288,554 ^b	291,047 ^b	4,041	0,021
PCB-156	299,233 ^a	297,536 ^a	288,369 ^a	281,070 ^a	2,301	0,108

PCB-157	293,661 ^a	288,314 ^a	280,767 ^a	276,934 ^a	1,846	0,171
PCB-189	287,729 ^a	291,770 ^a	285,269 ^a	284,057 ^a	0,420	0,741

F: estatística de F; p: significância; Médias seguidas de mesma letra minúscula, na horizontal, não diferem entre si, pelo Teste de Tukey ($p > 0,05$).

2,3,7,8-TCDD: 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina; 2,3,7,8-TCDF: 2,3,7,8-tetraclorodibenzofurano; 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-81: 3,4,4',5-tetraclorobifenila; PCB-77: 3,3',4,4'-tetraclorobifenila; PCB-126: 3,3',4,4',5-pentaclorobifenila; PCB-169: 3,3',4,4',5,5'-hexaclorobifenila; PCB-123: 2',3,4,4',5-pentaclorobifenila; PCB-118: 2,3',4,4',5-pentaclorobifenila; PCB-114: 2,3,4,4',5-pentaclorobifenila; PCB-105: 2,3,3',4,4'-pentaclorobifenila; PCB-167: 2,3',4,4',5,5'-hexaclorobifenila; PCB-156: 2,3,3',4,4',5-hexaclorobifenila; PCB-157: 2,3,3',4,4',5'-hexaclorobifenila; PCB-189: 2,3,3',4',5,5'-heptaclorobifenila.

No trabalho de VAN LEEUWEN *et al.* (2006), um estudo de estabilidade em curto prazo foi conduzido, de acordo como o modelo isócrono, embora estes autores não tenham avaliado todos os mensurandos do escopo, como feito no presente trabalho. Os MR produzidos para dioxinas, furanos, PCB e BFR foram armazenados nas temperaturas de 37 e 50 °C durante três meses para os materiais de arenque (BCR-718) e de caboz (BCR 719) e seis meses para o material de mexilhão (BCR-682). A temperatura de -25 °C foi adotada como referência. Após cada período de armazenamento, os PCB selecionados pelos autores como “alvo” foram analisados, sendo tomadas cinco replicatas, de cada condição de temperatura. Como os tempos do estudo de estabilidade em curto prazo foram espaçados, a análise foi realizada juntamente com o estudo de estabilidade em longo prazo, sendo assim realizada a análise de regressão.

Para os demais trabalhos reportados na literatura, de escopo similar ao do presente estudo, não foram apresentados resultados de estudos estabilidade em curto prazo (CLEUVENBERGEN *et al.*, 1998; OTAKE *et al.*, 2010).

6.1.4. Estabilidade em longo prazo

O ensaio de estabilidade visa definir o prazo de validade e período de utilização, considerando a embalagem e condições de estocagem determinadas.

Desta forma, a estabilidade do material produzido foi avaliada conforme estabelecido no ISO Guia 35 (ABNT, 2012). Apesar de não ser prevista pelo ISO Guia 35, a verificação do atendimento às premissas da regressão foi apontada como fundamental na avaliação da estabilidade, visto que a falta de ajuste ao modelo linear, por exemplo, poderia ser um indicativo de falta de estabilidade, não detectada quando empregados os critérios do ISO Guia 35 (GANDRA, 2013). Na **Tabela 14** encontram-se sumarizados os resultados da análise de regressão, conforme procedimento definido por Souza & Junqueira (2005), incluindo resultados obtidos nas análises do materiais nos tempos zero, dois e quatro meses.

Para o material produzido, a média de *outliers* detectados foi de 2,6, sendo que para o composto PCB-123 nenhum valor disperso foi diagnosticado, enquanto para os compostos 1,2,3,4,7,8-HxCDD, 1,2,3,4,7,8,9-HpCDF, OCDF, PCB-126 e PCB-169 foram detectados cinco *outliers*. Para o PCB 167 o número de *outliers* detectados foi superior ao limite máximo recomendado de 2/9 do número de dados originais. Com a realização dos testes subsequentes, sem remoção dos referidos dados, houve confirmação da falta de estabilidade do material para o referido mensurando.

As premissas de normalidade e homoscedasticidade foram confirmadas para todos os mensurandos. Autocorrelação positiva dos resíduos foi evidenciada para os compostos PCB-81, PCB-77, PCB-167 e PCB-156 ($p < 0,10$). Para estes mesmos mensurandos, além da OCDD, PCB-126 e PCB-169, foi confirmada significância da regressão ($p < 0,05$), ou seja, instabilidade. Para os demais 22 mensurandos a regressão não foi significativa ($p > 0,05$), indicando estabilidade do material até o quarto mês.

Para todos os mensurandos considerados estáveis foi confirmado ajuste ao modelo linear ($p > 0,05$), enquanto que para os compostos PCB-81, PCB-77, PCB-126, PCB-169, PCB-167 e PCB-156 houve indicação de desvio da linearidade ($p < 0,05$).

Tabela 14. Avaliação das premissas da regressão linear no estudo da estabilidade em longo prazo do material, segundo ISO GUIA 35

Mensurando	Equação	R ²	n	Normalidade		Independência		Homoscedasticidade		Regressão		Desvio da linearidade	
				R	p	d	p	F ₁	p	F	p	F	p
2,3,7,8-TCDF	y = (-0,0092±0,0055)x + (1,0856±0,0087)	0,0925	29	0,9484	>0,01	2,217	>0,10	0,212	0,810	2,751	0,109	0,035	0,853
2,3,7,8-TCDD	y = (-0,0011±0,0041)x + (1,0412±0,0059)	0,0027	27	0,9738	>0,10	1,727	>0,10	0,060	0,942	0,067	0,797	0,788	0,384
1,2,3,7,8-PeCDF	y = (0,0226±0,0136)x + (5,4248±0,0241)	0,0958	28	0,9880	>0,10	1,250	>0,10	1,135	0,338	2,756	0,109	1,741	0,199
2,3,4,7,8-PeCDF	y = (0,0177±0,0133)x + (5,3080±0,0214)	0,0638	28	0,9908	>0,10	1,738	>0,10	0,467	0,632	1,771	0,195	1,898	0,181
1,2,3,7,8-PeCDD	y = (0,0016±0,0098)x + (5,2658±0,0178)	0,0011	27	0,9852	>0,10	2,383	>0,10	1,311	0,288	0,027	0,872	0,345	0,562
1,2,3,4,7,8-HxCDF	y = (0,0154±0,0154)x + (5,8085±0,0272)	0,0382	27	0,9948	>0,10	1,918	>0,10	0,580	0,568	0,992	0,329	6,740 x 10 ⁻⁶	0,998
1,2,3,6,7,8-HxCDF	y = (0,0191±0,0185)x + (5,8350±0,0321)	0,0394	28	0,9869	>0,10	2,237	>0,10	0,216	0,807	1,065	0,312	0,891	0,354
2,3,4,6,7,8-HxCDF	y = (0,0306±0,0156)x + (5,7777±0,0249)	0,1293	28	0,9924	>0,10	2,291	>0,10	0,565	0,575	3,860	0,060	0,137	0,714
1,2,3,4,7,8-HxCDD	y = (0,0262±0,0149)x + (5,8200±0,0224)	0,1178	25	0,9806	>0,10	1,882	>0,10	0,327	0,724	3,072	0,093	2,177	0,154
1,2,3,6,7,8-HxCDD	y = (0,0062±0,0173)x + (5,7756±0,0300)	0,0050	28	0,9860	>0,10	1,867	>0,10	0,566	0,575	0,129	0,722	0,347	0,561
1,2,3,7,8,9-HxCDD	y = (0,0330±0,0170)x + (5,2701±0,0296)	0,1230	29	0,9905	>0,10	1,871	>0,10	0,678	0,516	3,787	0,062	0,001	0,976
1,2,3,7,8,9-HxCDF	y = (-0,0271±0,0195)x + (5,4982±0,0316)	0,0741	26	0,9893	>0,10	1,973	>0,10	0,280	0,758	1,921	0,178	0,373	0,547
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	y = (0,0232±0,0141)x + (6,0859±0,0276)	0,0884	30	0,9929	>0,10	1,758	>0,10	1,435	0,256	2,717	0,110	0,001	0,978
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	y = (0,0022±0,0133)x + (5,5941±0,0258)	0,0010	30	0,9832	>0,10	1,678	>0,10	0,025	0,976	0,028	0,867	0,242	0,627
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	y = (-0,0145±0,0124)x + (5,6179±0,0227)	0,0543	26	0,9890	>0,10	2,017	>0,10	0,076	0,927	1,378	0,252	3,653	0,069
OCDD	y = (0,5179±0,0575)x + (10,3668±0,1042)	0,7575	28	0,9853	>0,01	1,932	>0,10	0,364	0,698	81,234	1,762 x 10 ⁻⁹	1,585	0,220
OCDF	y = (0,0404±0,0308)x + (10,5102±0,0531)	0,0642	27	0,9803	>0,10	1,413	>0,10	2,023	0,154	1,714	0,202	0,615	0,441
PCB-81	y = (0,8533±0,1056)x + (39,5961±0,1921)	0,7076	29	0,9660	>0,05	0,830	<0,10	0,146	0,865	65,342	1,101 x 10 ⁻⁸	11,734	0,002

PCB-77	$y = (1,6994 \pm 0,4833)x + (62,6853 \pm 0,9338)$	0,3063	30	0,9827	>0,10	1,506	<0,10	1,711	0,200	12,366	0,002	18,405	$2,047 \times 10^{-4}$
PCB-126	$y = (1,1951 \pm 0,0843)x + (42,7825 \pm 0,1338)$	0,8893	27	0,9800	>0,10	1,664	>0,10	1,203	0,318	$\frac{200,85}{6}$	$1,877 \times 10^{-13}$	4,780	0,039
PCB-169	$y = (0,9250 \pm 0,0848)x + (43,3518 \pm 0,1566)$	0,8263	27	0,9466	>0,01	1,423	>0,10	1,774	0,191	$\frac{118,90}{4}$	$5,434 \times 10^{-11}$	11,214	0,003
PCB-123	$y = (0,0316 \pm 0,3325)x + (266,7976 \pm 0,6439)$	0,0003	32	0,9915	>0,10	1,487	>0,10	0,481	0,623	0,009	0,925	1,062	0,311
PCB-118	$y = (-0,0783 \pm 0,5296)x + (309,9087 \pm 1,0420)$	0,0008	31	0,9721	>0,10	1,670	>0,10	0,148	0,863	0,022	0,884	0,031	0,862
PCB-114	$y = (-1,2259 \pm 0,6114)x + (271,9385 \pm 1,1199)$	0,1217	31	0,9923	>0,10	1,623	>0,10	1,915	0,166	4,020	0,054	0,029	0,865
PCB-105	$y = (0,7169 \pm 0,7413)x + (286,0569 \pm 1,3801)$	0,3233	30	0,9898	>0,10	1,498	>0,10	0,171	0,844	0,935	0,342	2,942	0,098
PCB-167	$y = (6,3692 \pm 0,9135)x + (298,2081 \pm 1,7690)$	0,6184	32	0,9696	>0,05	1,179	<0,10	1,729	0,195	48,612	$9,562 \times 10^{-8}$	61,686	$1,161 \times 10^{-8}$
PCB-156	$y = (5,8388 \pm 0,8201)x + (291,9202 \pm 1,4046)$	0,6442	30	0,9898	>0,10	0,673	<0,10	1,278	0,295	50,692	$9,539 \times 10^{-8}$	16,763	$3,447 \times 10^{-4}$
PCB-157	$y = (0,1263 \pm 0,6194)x + (284,7151 \pm 1,1953)$	0,0015	29	0,9769	>0,10	1,930	>0,10	1,700	0,202	0,042	0,840	0,669	0,421
PCB-189	$y = (-0,0940 \pm 0,5979)x + (294,6496 \pm 1,1552)$	0,0009	30	0,9871	>0,10	1,975	>0,10	0,639	0,535	0,025	0,876	0,994	0,328

n = número de observações, R = coeficiente de correlação de Ryan-Joiner, p = significância, F_L = estatística F de Levene, d = estatística de Durbin-Watson, F = razão entre variâncias.
2,3,7,8-TCDD: 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina; 2,3,7,8-TCDF: 2,3,7,8-tetraclorodibenzofurano; 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-81: 3,4,4',5'-tetraclorobifenila; PCB-77: 3,3',4,4'-tetraclorobifenila; PCB-126: 3,3',4,4',5'-pentaclorobifenila; PCB-169: 3,3',4,4',5,5'-hexaclorobifenila; PCB-123: 2',3,4,4',5-pentaclorobifenila; PCB-118: 2,3',4,4',5-pentaclorobifenila; PCB-114: 2,3,4,4',5-pentaclorobifenila; PCB-105: 2,3,3',4,4'-pentaclorobifenila; PCB-167: 2,3',4,4',5,5'-hexaclorobifenila; PCB-156: 2,3,3',4,4',5-hexaclorobifenila; PCB-157: 2,3,3',4,4',5'-hexaclorobifenila; PCB-189: 2,3,3',4',5,5'-heptaclorobifenila.

Nas **Figuras 15 a 18** estão representados os gráficos x-y de regressão linear simples obtidos ao longo de quatro meses. Observou-se, então, que a inclinação foi significativa para sete compostos, OCDD, PCB-81, PCB-77, PCB-126, PCB-169, PCB-167 e PCB-156 ($p < 0,010$), indicando falta de estabilidade. Para os demais 22 mensurandos, as probabilidades p_{b1} variaram de 0,0544 a 0,9250, confirmando a estabilidade do material para tais compostos durante o período de armazenamento de quatro meses.

O estudo da estabilidade dos mensurandos em longo prazo foi analisado também de acordo com o protocolo da IUPAC (THOMPSON *et al.*, 2006) e pela ISO 13528:2005 (ISO, 2005).

O teste de estabilidade, está representado na **Tabela 15**, após quatro meses, conforme as duas abordagens propostas no protocolo harmonizado da IUPAC (THOMPSON *et al.*, 2006), o critério mais restrito. Considerando a análise da estabilidade pelo teste t , foi evidenciada estabilidade de 22 mensurandos, para os quais não houve diferença significativa entre os grupos controle e experimental ($p > 0,05$). Os compostos para os quais a estabilidade não foi comprovada, OCDD, PCB-81, PCB-77, PCB-126, PCB-169, PCB-167 e PCB-156, foram os mesmos indicados como instáveis quando os critérios do ISO Guia 35 (ABNT, 2012) foram aplicados. Porém, quando utilizado o critério de desvio padrão alvo, também descrito no documento da IUPAC, somente 20 mensurandos foram considerados estáveis, o que confirmou o caráter mais restritivo desta segunda abordagem. Neste caso, os mensurandos 1,2,3,4,7,8,9-HpCDF e OCDF também foram apontados como instáveis no período de 4 meses.

Segundo critérios da norma ISO 13528:2005 (**Tabela 16**), 24 mensurandos foram considerados estáveis, sendo apontados como instáveis os compostos OCDD, PCB-77, PCB-126, e PCB-167, também indicados como instáveis pelas análises segundo critérios do ISO Guia 35 (ABNT, 2012) e protocolo da IUPAC (THOMPSON *et al.*, 2006). Tais resultados também reiteram o perfil menos rigoroso da norma 13528:2005 para avaliação da estabilidade quando comparada com os demais documentos.

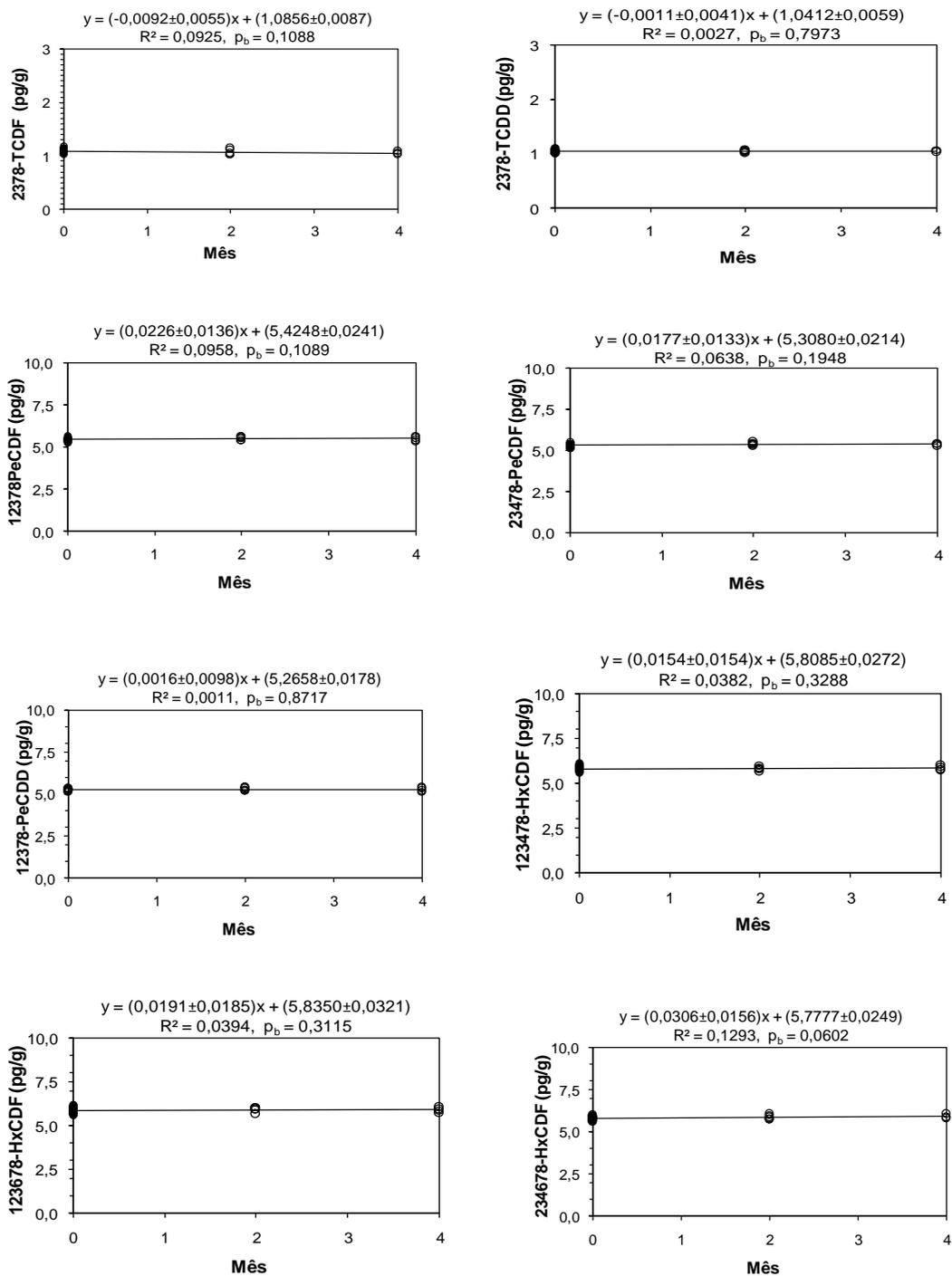


Figura 15. Curva obtida por regressão linear para avaliação da estabilidade do material de referência produzido, durante quatro meses, segundo critérios do ISO Guia 35.

y = mensurandos (pg/g), x = tempo em meses, R^2 = coeficiente de determinação, p_{b1} : probabilidade da significância da inclinação. 2,3,7,8-TCDD: 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina; 2,3,7,8-TCDF: 2,3,7,8-tetraclorodibenzofurano; 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.

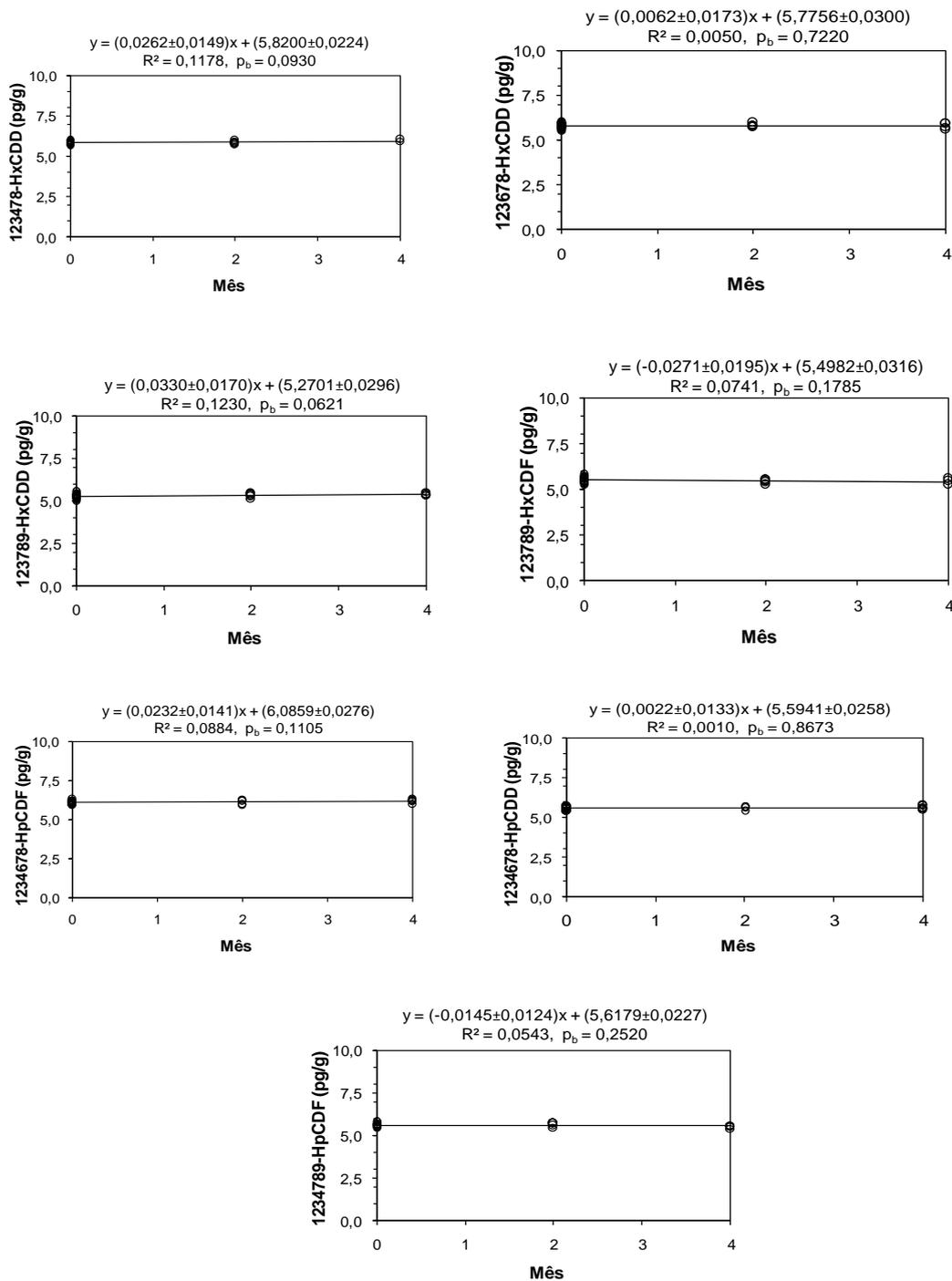


Figura 16. Curva obtida por regressão linear para avaliação da estabilidade do material de referência produzido, durante quatro meses, segundo critérios do ISO Guia 35.

y = mensurandos (pg/g), x = tempo em meses, R^2 = coeficiente de determinação, p_{b1} : probabilidade da significância da inclinação. 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.

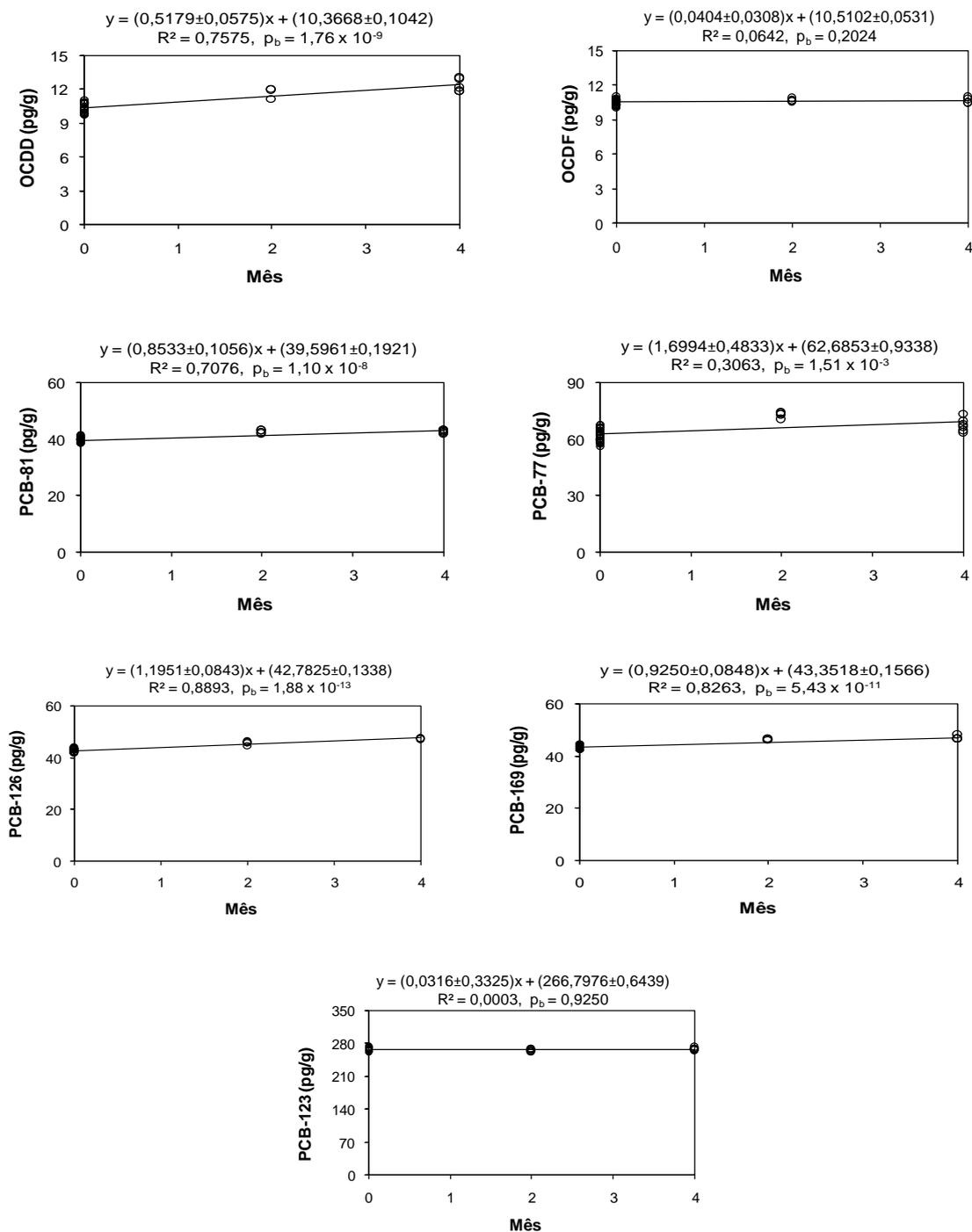


Figura 17. Curva obtida por regressão linear para avaliação da estabilidade do material de referência produzido, durante quatro meses, segundo critérios do ISO Guia 35.

y = mensurandos (pg/g), x = tempo em meses, R^2 = coeficiente de determinação, p_{b1} : probabilidade da significância da inclinação. OCDD: octaclorodibenzo-p-dioxina; OCDF: octaclorodibenzofurano; PCB-81: 3,4,4',5-tetraclorobifenila; PCB-77: 3,3',4,4'-tetraclorobifenila; PCB-126: 3,3',4,4',5-pentaclorobifenila; PCB-169: 3,3',4,4',5,5'-hexaclorobifenila; PCB-123:2',3,4,4',5-pentaclorobifenila.

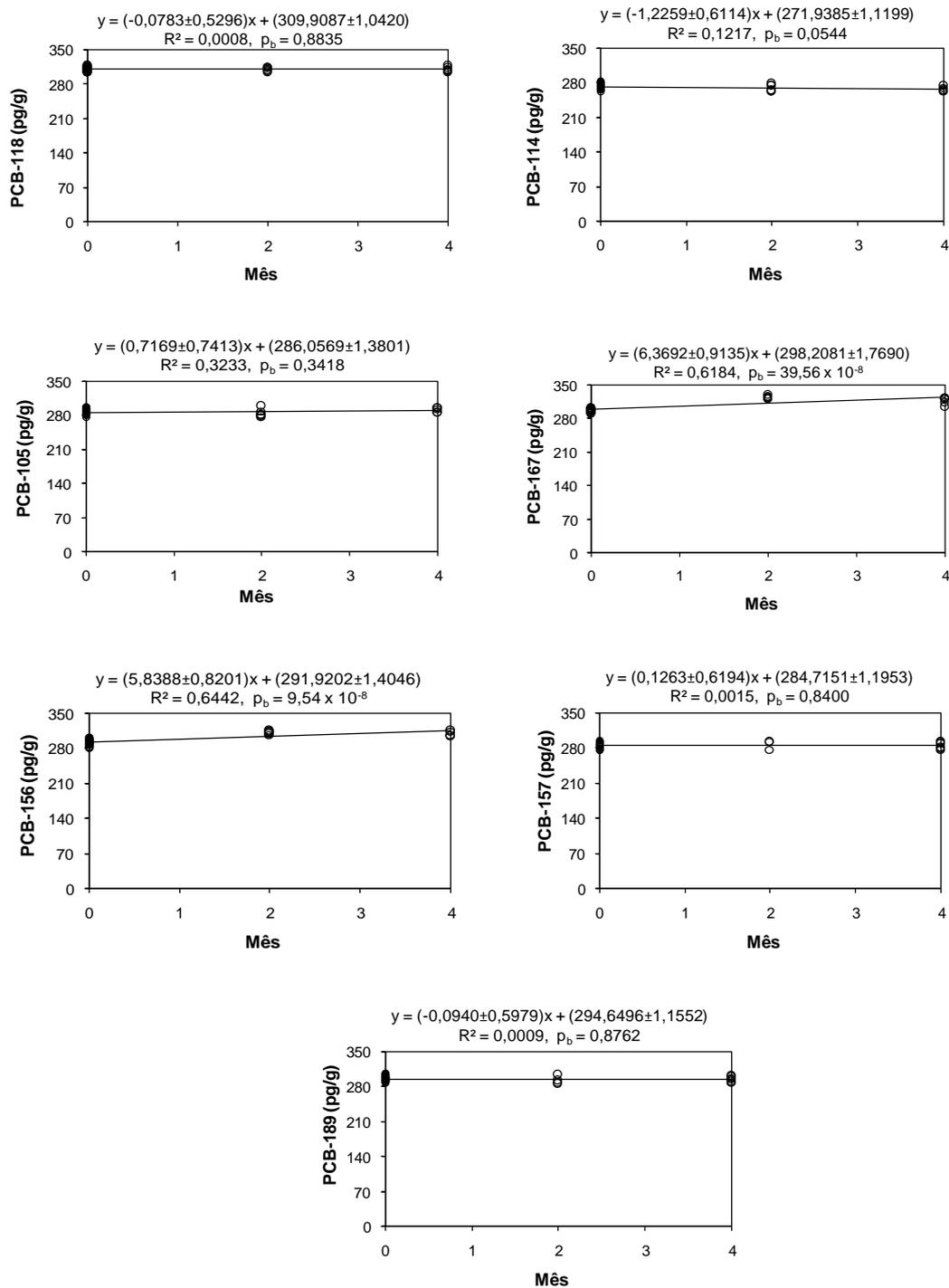


Figura 18. Curva obtida por regressão linear para avaliação da estabilidade do material de referência produzido, durante quatro meses, segundo critérios do ISO Guia 35.

y = mensurandos (pg/g), x = tempo em meses, R^2 = coeficiente de determinação, p_{b1} : probabilidade da significância da inclinação. PCB-118: 2,3',4,4',5-pentaclorobifenila; PCB-114: 2,3,4,4',5-pentaclorobifenila; PCB-105: 2,3,3',4,4'-pentaclorobifenila; PCB-167: 2,3',4,4',5,5'-hexaclorobifenila; PCB-156: 2,3,3',4,4',5-hexaclorobifenila; PCB-157: 2,3,3',4,4',5'-hexaclorobifenila; PCB-189: 2,3,3',4',5,5'-heptaclorobifenila

Tabela 15. Avaliação da estabilidade do material de referência produzido, durante quatro meses, segundo critérios do protocolo da IUPAC

Mensurando	Estatística							
	\bar{X}_c	\bar{X}_e	$ \bar{X}_c - \bar{X}_e $	Critério teste de t*			Critério σ_p^{**}	
				t	p	Conclusão	$0,1\sigma_p$	Conclusão
2378-TCDF	1,086	1,076	0,010	0,460	0,650	Estável	0,024	Estável
2378-TCDD	1,086	1,078	0,008	0,226	0,823	Estável	0,024	Estável
12378-PeCDF	5,444	5,480	-0,037	-0,536	0,597	Estável	0,120	Estável
23478-PeCDF	5,315	5,274	0,041	0,654	0,520	Estável	0,117	Estável
12378-PeCDD	5,272	5,261	0,011	0,194	0,848	Estável	0,116	Estável
123478-HxCDF	5,850	5,870	-0,020	-0,210	0,836	Estável	0,129	Estável
123678-HxCDF	5,852	5,879	-0,027	-0,298	0,769	Estável	0,129	Estável
234678-HxCDF	5,764	5,808	-0,044	-0,639	0,529	Estável	0,127	Estável
123478-HxCDD	5,847	5,767	0,080	0,867	0,395	Estável	0,129	Estável
123678-HxCDD	5,756	5,782	-0,025	-0,303	0,764	Estável	0,127	Estável
123789-HxCDD	5,288	5,401	-0,113	-1,354	0,189	Estável	0,116	Estável
123789-HxCDF	5,471	5,535	-0,065	-0,644	0,526	Estável	0,120	Estável
1234678-HpCDF	6,070	6,178	-0,107	-1,846	0,077	Estável	0,134	Estável
1234678-HpCDD	5,597	5,612	-0,015	-0,279	0,783	Estável	0,123	Estável
1234789-HpCDF	5,554	5,411	0,143	1,768	0,090	Estável	0,122	Instável
OCDD	10,343	12,547	-2,204	-9,285	0,000	Instável	0,228	Instável
OCDF	10,401	9,939	0,462	1,303	0,205	Estável	0,229	Instável
PCB-81	39,482	41,702	-2,220	-3,937	0,001	Instável	0,869	Instável
PCB-77	62,034	67,312	-5,278	-3,236	0,004	Instável	1,365	Instável
PCB-126	42,650	45,683	-3,034	-5,689	0,000	Instável	0,938	Instável
PCB-169	43,436	46,215	-2,779	-5,635	0,000	Instável	0,956	Instável
PCB-123	266,960	267,465	-0,505	-0,359	0,723	Estável	5,873	Estável
PCB-118	310,378	309,448	0,930	0,395	0,697	Estável	6,828	Estável

PCB-114	271,985	269,127	2,859	1,272	0,216	Estável	5,984	Estável
PCB-105	285,848	286,546	-0,698	-0,192	0,850	Estável	6,289	Estável
PCB-167	296,251	317,160	-20,910	-9,097	0,000	Instável	6,518	Instável
PCB-156	290,846	305,040	-14,194	-4,667	0,000	Instável	6,399	Instável
PCB-157	284,535	284,622	-0,086	-0,037	0,971	Estável	6,260	Estável
PCB-189	294,888	295,068	-0,180	-0,082	0,935	Estável	6,488	Estável

\bar{X}_c : média controle; \bar{X}_e : média experimental; *critério teste t: $p \geq 0,05$: lote estável; **critério σ_p : $|\bar{X}_c - \bar{X}_e| \leq 0,1x\sigma_p$

2,3,7,8-Tetrachlorodibenzofuran; 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin; 1,2,3,7,8-Pentachlorodibenzofuran; 2,3,4,7,8-Pentachlorodibenzofuran; 1,2,3,7,8-Pentachlorodibenzo-p-dioxin; 1,2,3,4,7,8-Hexachlorodibenzofuran; 1,2,3,6,7,8-Hexachlorodibenzofuran; 2,3,4,6,7,8-Hexachlorodibenzofuran; 1,2,3,4,7,8-Hexachlorodibenzo-p-dioxin; 1,2,3,6,7,8-Hexachlorodibenzo-p-dioxin; 1,2,3,7,8,9-Hexachlorodibenzo-p-dioxin; 1,2,3,7,8,9-Hexachlorodibenzofuran; 1,2,3,4,6,7,8-Heptachlorodibenzofuran; 1,2,3,4,6,7,8-Heptachlorodibenzo-p-dioxin; 1,2,3,4,7,8,9-Heptachlorodibenzofuran; Octachlorodibenzo-p-dioxin; Octachlorodibenzofuran; 3,4,4',5-Tetrachlorobiphenyl; 3,3',4,4'-Tetrachlorobiphenyl; 3,3',4,4',5-Pentachlorobiphenyl; 3,3',4,4',5,5'-Hexachlorobiphenyl; 2',3,4,4',5-Pentachlorobiphenyl; 2,3',4,4',5-Pentachlorobiphenyl; 2,3,4,4',5-Pentachlorobiphenyl; 2,3,3',4,4'-Pentachlorobiphenyl; 2,3',4,4',5,5'-Hexachlorobiphenyl; 2,3,3',4,4',5-hexachlorobiphenyl; 2,3,3',4,4',5'-Hexachlorobiphenyl; 7 2,3,3',4,4',5,5'-Heptachlorobiphenyl

Tabela 16. Avaliação da estabilidade do material de referência produzido, durante quatro meses, segundo critérios da norma ISO 13528:2005

Mensurando	Estatística				Conclusão*
	$\bar{x}_{t,k}$	$\bar{y}_{t,k}$	$ \bar{x}_{t,k} - \bar{y}_{t,k} $	$0,3\sigma_p$	
2378-TCDF	1,086	1,076	0,010	0,072	Estável
2378-TCDD	1,086	1,078	0,008	0,072	Estável
12378-PeCDF	5,444	5,480	0,037	0,359	Estável
23478-PeCDF	5,315	5,274	0,041	0,351	Estável
12378-PeCDD	5,272	5,261	0,011	0,348	Estável
123478-HxCDF	5,850	5,870	0,020	0,386	Estável
123678-HxCDF	5,852	5,879	0,027	0,386	Estável
234678-HxCDF	5,764	5,808	0,044	0,380	Estável
123478-HxCDD	5,847	5,767	0,080	0,386	Estável
123678-HxCDD	5,756	5,782	0,025	0,380	Estável
123789-HxCDD	5,288	5,401	0,113	0,349	Estável
123789-HxCDF	5,471	5,535	0,065	0,361	Estável
1234678-HpCDF	6,070	6,178	0,107	0,401	Estável
1234678-HpCDD	5,597	5,612	0,015	0,369	Estável
1234789-HpCDF	5,554	5,411	0,143	0,367	Estável
OCDD	10,343	12,547	2,204	0,683	Instável
OCDF	10,401	9,939	0,462	0,686	Estável
PCB-81	39,482	41,702	2,220	2,606	Estável
PCB-77	62,034	67,312	5,278	4,094	Instável
PCB-126	42,650	45,683	3,034	2,815	Instável
PCB-169	43,436	46,215	2,779	2,867	Estável
PCB-123	266,960	267,465	0,505	17,619	Estável
PCB-118	310,378	309,448	0,930	20,485	Estável
PCB-114	271,985	269,127	2,859	17,951	Estável
PCB-105	285,848	286,546	0,698	18,866	Estável

PCB-167	296,251	317,160	20,910	19,553	Instável
PCB-156	290,846	305,040	14,194	19,196	Estável
PCB-157	284,535	284,622	0,086	18,779	Estável
PCB-189	294,888	294,068	0,180	19,463	Estável

$\bar{X}_{t,k}$: média geral obtida no teste de homogeneidade; $\bar{Y}_{t,k}$: média geral obtida no teste de estabilidade; *critério: $|\bar{X}_{t,k} - \bar{Y}_{t,k}| \leq 0,3 \times \sigma_p$

2,3,7,8-Tetrachlorodibenzofuran; 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin; 1,2,3,7,8-Pentachlorodibenzofuran; 2,3,4,7,8-Pentachlorodibenzofuran; 1,2,3,7,8-Pentachlorodibenzo-p-dioxin; 1,2,3,4,7,8-Hexachlorodibenzofuran; 1,2,3,6,7,8-Hexachlorodibenzofuran; 2,3,4,6,7,8-Hexachlorodibenzofuran; 1,2,3,4,7,8-Hexachlorodibenzo-p-dioxin; 1,2,3,6,7,8-Hexachlorodibenzo-p-dioxin; 1,2,3,7,8,9-Hexachlorodibenzo-p-dioxin; 1,2,3,7,8,9-Hexachlorodibenzofuran; 1,2,3,4,6,7,8-Heptachlorodibenzofuran; 1,2,3,4,6,7,8-Heptachlorodibenzo-p-dioxin; 1,2,3,4,7,8,9-Heptachlorodibenzofuran; Octachlorodibenzo-p-dioxin; Octachlorodibenzofuran; 3,4,4',5-Tetrachlorobiphenyl; 3,3',4,4'-Tetrachlorobiphenyl; 3,3',4,4',5-Pentachlorobiphenyl; 3,3',4,4',5,5'-Hexachlorobiphenyl; 2',3,4,4',5-Pentachlorobiphenyl; 2,3',4,4',5-Pentachlorobiphenyl; 2,3,4,4',5-Pentachlorobiphenyl; 2,3,3',4,4'-Pentachlorobiphenyl; 2,3',4,4',5,5'-Hexachlorobiphenyl; 2,3,3',4,4',5-hexachlorobiphenyl; 2,3,3',4,4',5'-Hexachlorobiphenyl; 7,2,3,3',4,4',5,5'-Heptachlorobiphenyl

Vale a pena destacar que o perfil de resultados obtido em dois meses foi similar ao apresentado para quatro meses. Com seis e oito meses de armazenamento, todos os mensurandos tiveram indicação de perda de estabilidade, segundo critérios de todas as normas consideradas no presente trabalho.

As PCB não-orto, PCB-81, PCB-77, PCB-126 e PCB-169 e mono-orto, PCB-167 e PCB-156 foram consideradas instáveis desde o primeiro tempo avaliado, segundo critérios do ISO Guia 35 (ABNT, 2012) e IUPAC (THOMPSON *et al.*, 2006). Segundo JENSEN *et al.* (2010), as PCB não-orto apresentam grande afinidade por outros POPs, como hidrocarbonetos aromáticos halogenados (HAH), com destaque para a PCB-126. As PCB mono-orto também possuem afinidade em relação aos HAH, embora menor. Essa interação poderia justificar a perda de estabilidade observada para os compostos supramencionados, visto que os HAH poderiam estar contidos na matriz, já que são onipresentes no ambiente marinho.

CLEUVENBEREEN *et al.* (1998) avaliaram a estabilidade do MR de cinzas volantes, tanto em seis quanto em 12 meses após a fabricação, utilizando as razões R entre as médias das medições após armazenamento a 20 e 40 °C, respectivamente, com a média das medições na condição de referência de -20 °C. No caso ideal de estabilidade, R deveria ser 1, mas, na prática, as variações aleatórias foram assumidas como devida às incertezas das medições. A falta de

rastreabilidade da pureza, a variação na recuperação e a não linearidade de resposta instrumental na faixa de trabalho durante a análise foi considerada insuficiente para certificar os compostos 1,2,3,4,6,7,8 HpCDD, OCDD, 1,2,3,4,6,7,8 HpCDF, 1,2,3,4,7,8,9 HpCDF e OCDF.

OCDD foi um mensurando que também no presente trabalho não apresentou estabilidade, independente do critério ou documento de referência utilizado. Observou-se, ainda, que os dois mensurandos que não apresentaram estabilidade segundo o critério mais rigoroso do documento da IUPAC, 1,2,3,4,7,8,9 HpCDF e OCDF, também foram reportados como instáveis por CLEUVENBEREEN *et al.* (1998).

A determinação dos mensurandos OCDD e OCDF, que apresentaram-se instáveis neste estudo, foi discutida no método EPA 1613 revisão B (EPA, 1994) como susceptível às interferências provenientes do procedimentos de limpeza, da extração ou da concentração, já que o análogo marcado de OCDF não é adicionado a amostra e sim o marcado OCDD. Esta seria, então, uma provável justificativa para a variabilidade observada nos resultados destes mensurandos na avaliação da estabilidade do presente trabalho.

VAN LEEUWEN *et al.* (2006) analisou a estabilidade a curto e longo prazo dos MR de mexilhão (BCR-682), arenque (BCR-718) e caboz (BCR-719), por análise de regressão de acordo com as recomendações do ISO GUIA 35 de 1985. A análise de regressão não foi significativa para quase todas as PCB nos MR em questão. No entanto, os MR apresentam concentrações crescentes, cujas causas tratadas pelos autores foram possíveis interferências analíticas. Com relação ao material preparado para caboz, as PCB-126 e PCB-169 apresentaram variações significativas na análise de regressão. Para a PCB 169, a causa da diminuição foi atribuída pelos autores à uma imprecisão no método analítico. Tais resultados corroboram com aqueles observados no presente estudo.

No trabalho de OTAKE *et al.* (2010), os autores declaram, que o estudo da estabilidade em curto e longo prazo, seria conduzido em intervalos regulares após a certificação do material produzido.

Cumprir destacar que um desvio padrão relativo máximo de 15 %, sob condição de reprodutibilidade, é estabelecido pela União Europeia (UE, 2012) como requisito de desempenho analítico para métodos de confirmação de análises de dioxinas, furanos e PCB. Os desvios padrão relativos máximos obtidos, sob condição de precisão intermediária, na validação do método empregado neste trabalho para estudo de homogeneidade e estabilidade, cumpriram com este requisito, sendo os maiores valores observados para OCDD, OCDF, PCB-77, PCB-81, PCB-118 e PCB-169. Existe, então, a possibilidade da instabilidade observada neste trabalho ter sido devida à variabilidade analítica e não do material, para alguns mensurandos como OCDD, PCB-77, PCB-81 e PCB-169.

6.1.5. Caracterização

Para a caracterização do MR produzido, foram estimados os fatores que poderiam contribuir significativamente para a incerteza associada aos valores de propriedade do MR devidos à homogeneidade e estabilidade (em curto e longo prazos). A incerteza devida à caracterização (incerteza do valor certificado ou do valor de propriedade), que dependerá da realização de estudo interlaboratorial futuro, não foi calculada (ABNT, 2012).

Empregando as referidas incertezas-padrão na estimativa das incertezas combinadas e expandidas do material produzido, os valores obtidos variaram de 1 a 9 % dos valores médios atribuídos a cada mensurando, indicando que o material seria adequado na avaliação de tendências de 22 compostos. Na **Tabela 17** estão discriminados os valores de incertezas calculados para os vinte e dois mensurandos que apresentaram estabilidade segundo a ISO 35.

Tabela 17. Fontes de contribuição para certificação: incertezas-padrão da avaliação da homogeneidade e da estabilidade em longo e curto prazos dos materiais de referência, segundo critérios do ISO Guia 35

Mensurando	Média (pg/g)	Incerteza		
		U _{bb}	U _{lts}	U _{sts}
2378-TCDF	1,086	0,011	0,022	0,028
2378-TCDD	1,046	0,012	0,016	0,060
12378-PeCDF	5,444	0,025	0,054	0,088
23478-PeCDF	5,313	0,043	0,053	0,084
12378-PeCDD	5,272	0,028	0,039	0,149
123478-HxCDF	5,850	0,007	0,062	0,120
123678-HxCDF	5,852	0,027	0,074	0,125
234678-HxCDF	5,764	0,044	0,062	0,104
123478-HxCDD	5,847	0,049	0,060	0,109
123678-HxCDD	5,756	0,068	0,069	0,088
123789-HxCDD	5,288	0,097	0,068	0,093
123789-HxCDF	5,471	0,106	0,078	0,099
1234678-HpCDF	6,070	0,021	0,056	0,101
1234678-HpCDD	5,597	0,020	0,053	0,166
1234789-HpCDF	5,554	0,042	0,049	0,093
OCDF	10,401	0,089	0,123	0,246
PCB-123	266,960	1,157	1,330	2,047
PCB-118	310,378	2,031	2,118	3,145
PCB-114	271,985	2,049	2,446	2,196
PCB-105	285,848	2,404	2,965	2,791

PCB-157	284,535	1,596	2,578	2,255
PCB-189	294,888	0,679	2,392	2,145

U_{bb} : incerteza-padrão da homogeneidade; U_{lis} : incerteza-padrão da estabilidade ao longo prazo; U_{sts} : incerteza-padrão da estabilidade a curto prazo

2,3,7,8-Tetrachlorodibenzofuran; 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin; 1,2,3,7,8-Pentachlorodibenzofuran; 2,3,4,7,8-Pentachlorodibenzofuran; 1,2,3,7,8-Pentachlorodibenzo-p-dioxin; 1,2,3,4,7,8-Hexachlorodibenzofuran; 1,2,3,6,7,8-Hexachlorodibenzofuran; 2,3,4,6,7,8-Hexachlorodibenzofuran; 1,2,3,4,7,8-Hexachlorodibenzo-p-dioxin; 1,2,3,6,7,8-Hexachlorodibenzo-p-dioxin; 1,2,3,7,8,9-Hexachlorodibenzo-p-dioxin; 1,2,3,7,8,9-Hexachlorodibenzofuran; 1,2,3,4,6,7,8-Heptachlorodibenzofuran; 1,2,3,4,6,7,8-Heptachlorodibenzo-p-dioxin; 1,2,3,4,7,8,9-Heptachlorodibenzofuran; Octachlorodibenzo-p-dioxin; Octachlorodibenzofuran; 3,4,4',5-Tetrachlorobiphenyl; 3,3',4,4'-Tetrachlorobiphenyl; 3,3',4,4',5-Pentachlorobiphenyl; 3,3',4,4',5,5'-Hexachlorobiphenyl; 2',3,4,4',5-Pentachlorobiphenyl; 2,3',4,4',5-Pentachlorobiphenyl; 2,3,4,4',5-Pentachlorobiphenyl; 2,3,3',4,4'-Pentachlorobiphenyl; 2,3',4,4',5,5'-Hexachlorobiphenyl; 2,3,3',4,4',5-hexachlorobiphenyl; 2,3,3',4,4',5'-Hexachlorobiphenyl; 7 2,3,3',4,4',5,5'-Heptachlorobiphenyl

O trabalho de LISINGER *et al.* (2001) mostra que era dada pouca ênfase as características como homogeneidade e estabilidade ao produzir um MR ou MRC, bem como o emprego da contribuição destas fontes na incerteza declarada para o material.

CLEUVENBEREEN *et al.* (1998) declaram as incertezas expandidas, que foram estimadas como o coeficiente de variação de cada série de medições, os quais variaram de 0,012 a 0,4 %.

VAN LEEUWEN *et al.* (2006) estimaram a incerteza da homogeneidade apenas, afirmando que para quase todos as PCB as incertezas foram menores do que 10 % dos valores certificados tanto para o material de arenque (BCR-718) quanto para o material de caboz (BCR-719). Entretanto, para o material de mexilhão (BCR-682), os autores reportaram que as incertezas foram superiores a 10 % dos valores certificados.

No trabalho de OTAKE *et al.* (2010) as incertezas foram estimadas de acordo com o ISO GUIA 35, embora tenham sido consideradas as contribuições das incertezas devidas à caracterização e à homogeneidade, não sendo considerada a fonte de incerteza de estabilidade. As incertezas expandida das PCB variam de 0,06 a 0,6 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

No presente trabalho, os valores de incerteza-padrão do MR produzido sinalizaram para a possibilidade de preparo de um novo lote e candidatura do mesmo a MRC, com estudos de caracterização por diferentes laboratórios e/ou métodos, podendo assim estimar a incerteza expandida, combinando todas contribuições necessárias (caracterização, homogeneidade e estabilidade em curto e longo prazos) (ABNT, 2012).

7. CONCLUSÃO

A incorporação dos padrões ao filé de peixe, empregando óleo de peixe foi mais eficiente, visto que maiores valores médios de recuperação foram alcançados nesta condição, 86 %. As etapas de liofilização, homogeneização, envase e armazenamento foram satisfatórias para a produção do material.

O material produzido foi considerado homogêneo para os 29 mensurandos estudados, conforme critérios da norma ISO 13528:2005 e do protocolo harmonizado da IUPAC, apesar do maior rigor da primeira.

O material foi considerado instável para 7 mensurandos segundo critério da IUPAC e para 4 mensurandos quando adotado o critério da ISO 13538:2005, durante 4 meses de armazenamento sob refrigeração, confirmando o maior rigor da primeira. Os compostos instáveis foram a OCDD e as PCB-81, PCB-77, PB-126, PCB-169, PCB-167, PCB-156.

O processo de produção do material foi considerado adequado para preparo de novos lotes destinado a EP para determinação de 22 contaminantes.

Estabilidade em longo prazo foi evidenciada para 22 dos 29 compostos segundo critérios do ISO Guia 35, durante quatro meses de armazenamento sob refrigeração. Os compostos instáveis coincidiram com aqueles evidenciados quando empregados os critérios das normas de EP.

A estabilidade em curto prazo foi observada, conforme critérios do ISO Guia 35, para 27 mensurandos com exposição do material a 45 ± 2 °C, por nove dias. Contudo, todos os 29 mensurandos foram estáveis quando a exposição à referida condição extrema de transporte perdurou por três dias.

As incertezas-padrão devidas à homogeneidade e estabilidade em curto e longo prazo indicaram que o processo proposto permitirá a produção de novos lotes de material, candidatos a MRC, e submissão do mesmo a estudos de caracterização interlaboratoriais para certificação.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas) ISO (International Standard Organization). *ABNT NBR ISO/IEC 17025. Requisitos gerais para a competência de laboratório de ensaio e calibração*. Rio de Janeiro: ABNT, 2005. 31 p.
- ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas) ISO (International Standard Organization). *ABNT NBR NM ISO 15189. Laboratórios de análises clínicas - Requisitos especiais de qualidade e competência*. Rio de Janeiro: ABNT, 2008. 57 p.
- INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial) *INMETRO NIT-DICLA-35 Princípios de boas práticas de laboratório - BPL*. Rio de Janeiro: INMETRO, 2009. 19 p.
- ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas). *ABNT ISO Guia 31:2004. Materiais de referência – Conteúdo de certificados e rótulos*. Rio de Janeiro, 2004. 8 p. (a)
- ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas). *ABNT ISO Guia 30. Termos e definições relacionados com materiais de referência*. Rio de Janeiro, 2011. 10 p.
- ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas). *ABNT ISO Guia 32:2000. Calibração em química analítica e uso de materiais de referência certificados*. Rio de Janeiro, 2000. 7 p.
- ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas). *ABNT ISO GUIA 33:2002. Utilização de materiais de referência certificados*. Rio de Janeiro, 2002. 28 p.
- ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas). *ABNT ISO GUIA 34. Requisitos gerais para a competência de produtores de material de referência*. Rio de Janeiro, 2004. 25 p. (b)
- ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas). *ABNT ISO Guia 35. Materiais de referência - Princípios gerais e estatísticos para certificação*. Rio de Janeiro: ABNT, 2012. 73 p.
- ALMEIDA, N. M.; FRANCO B. M. R. Influência da dieta alimentar na composição de ácidos graxos em pescado: aspectos nutricionais e benefícios à saúde humana. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, n.65, vol.1, p.7-14, 2006.
- AMIGO, J. M., *et al.* Emerging needs for sustained production of laboratory reference materials. *Trends in Analytical Chemistry*, n.1 ,vol. 23, 2004.
- ANDRADE, G. de Q.; *et al.* Avaliação da qualidade nutricional em espécies de pescado mais produzidas no Estado da Bahia. Campinas, SP, vol. 29, p. 721-726, out –dez, 2009.

ASSUNÇÃO J. V.de, PESQUERO C. R. Dioxinas e furanos: origens e riscos. *Revista de Saúde Pública*, nº 5, vol. 33. p. 523-530, 1999.

ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry) Chemical And Physical Information Toxicological Profile For Chlorinated Dibenzo-P-Dioxins / A. do livro Registry Agency for Toxic Substances and Disease. Division of Toxicology/Toxicology Information Branch. Atlanta, 1998.

ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry). Toxicological Profile For Polychlorinated Biphenyls (PCB). Division of Toxicology/Toxicology Information Branch. Atlanta, 2000.

AUGUSTI, D.V. *et al.* Method validation and occurrence of dioxins and furans (PCDD/Fs) in fish from Brazil. *Anal. Methods*, v. 6, 1963-1969, 2014.a

AUGUSTI, D.V. *et al.* In-house method validation for simultaneous quantification of PCDD/PCDFs and dioxin-like PCBs in fish using pressurized liquid extraction and GC-HRMS analysis. *Organohalogen Compounds*, vol. 76, 1085-1088, 2014. Disponível em: [http:// www.dioxin20xx.org/ohc_database_search.htm](http://www.dioxin20xx.org/ohc_database_search.htm). b

BOER, de J.;McGOVERN, E. Certified reference materials for organic contaminants for use in monitoring of the aquatic environment. *Analytical Chemistry*, n. 3, vol. 20, 2001.

BRASIL, BOLETIM ESTATÍSTICO DA PESCA E AQUICULTURA: Brasil 2010 Ministério da Pesca e Aquicultura. 2012. Disponível em: http://www.mpa.gov.br/images/Docs/Informacoes_e_Estatisticas/Boletim%20Estat%20C3%ADstico%20MPA%202010.pdf. Acesso em: 05 mar. 2013.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento/Secretaria de Apoio Rural e Cooperativismo. Instrução normativa número 5, de 20 de março de 2003. *Diário Oficial da União*. Brasília, 21 mar. 2003.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento/Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução normativa número 11, de 22 de maio de 2012. *Diário Oficial da União*. Brasília, 25 mai. 2012, seção 1.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento/Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução normativa número 17, de 29 de maio de 2013. *Diário Oficial da União*. Brasília, 31 mai. 2013, seção 1.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento/Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução normativa número 11, de 07 de maio de 2014. *Diário Oficial da União*. Brasília, 07mai.2014, seção 1.

BRITO, J. L.; *et al.* Organochlorine compound accumulation in delphinids from Rio de Janeiro State, southeastern Brazilian coast. *Science of the Total Environment* vol. 433, p. 123-131, 2012.

- CAMEL V.; Microwave-assisted solvent extraction of environmental samples. *Analytical chemistry*, vol. 19, no. 4, p. 229-248, 2000.
- CIL (*Cambridge Isotope Laboratories*). Clean Fish Reference Material. EDF-2524, Lot Number: R542, revision 2, 18 December, 2006.
- CODEX ALIMENTARIUS. Prevention and Reduction of Food and Feed Contamination. World Health Organization (WHO) & Food And Agriculture Organization Of The United Nations (FAO), Roma, first edition, 2012.
- CHOVANCOVÁ, J.; *et al.* PCDDs, PCDFs and dioxin-like PCB in food of animal origin (Slovakia). *Chemosphere*, n. 61, p. 1305-1311, Apr. 2005.
- CLEUVENBEREEN, R. V.; *et al.* FLY ASH CRM 490: A New BCR Certified Reference Material for PCDD/PCDF Analysis. *Chemosphere*, n. 9-12, vol. 37, p. 2425-2438, 1998.
- DASS, C. *Fundamentals of contemporary mass spectrometry*. John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey, 2007.
- DANIELSSON, C. Trace analysis of dioxins and dioxin-like PCB using comprehensive two-dimensional gas chromatography with electron capture detection. Department of Chemistry, Environmental Chemistry. Umeå University. 2007.
- DELLA, W. M.; *et al.* Development of a candidate certified reference material of cypermethrin in green tea. *Analytica Chimica Acta.*, vol. 721, p.110-114, 2012.
- DORNELES, P.R. *et al.* High accumulation of PCDD, PCDF, and PCB congeners in marine mammals from Brazil: A serious PCB problem. *Science of the Total Environment*, vol. 463-464, p. 309-318, 2013.
- EFSA (European Food Safety Authority). Results of the monitoring of dioxin levels in food and feeds. *EFSA Journal*, n. 3, p. 1 – 36, Mar. 2010.
- EFSA (European Food Safety Authority). Update of the monitoring of dioxins and PCB 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: 18 maio. 2013.
- ELJARRAT, E.; *et al.* Microwave Vs. Soxhlet For The Extraction Of PCDDs And PCDFs From Sewage Sludge Samples. *Chemosphere*, n. 10, vol. 36, p. 2359-2366, 1998.
- EMONS, H.; *et al.* Reference materials: terminology and use. Can't one see the forest for the trees? *Analytical Chemistry*, n.6, vol. 23, 2004.

- EMONS, H.; *et al.* Reference materials as crucial tools for quality assurance and control in food analysis. *Pure and Applied Chemistry*, n. 1, vol. 78, p. 135-143, 2006.
- EPA (Environmental Protection Agency). Method 1613 Revision B Tetra- through Octa-Chlorinated Dioxins and Furans by Isotope Dilution HRGC/HRMS. Washington, D.C. October 1994.
- EPA (Environmental Protection Agency). Method 1668 Revision B Chlorinated Biphenyl Congeners in Water, Soil, Sediment, Biosolids, and Tissue by HRGC/HRMS. Washington, D.C. November 2008.
- EPA (Environmental Protection Agency). EPA's Reanalysis of Key Issues Related to Dioxin Toxicity and Response to NAS Comments, Volume 1. In Support of Summary Information on the Integrated Risk Information System (IRIS). Washington, February 2012.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). Joint fao/who food standards programme. Codex committee on food additives and contaminants. Position Paper On Dioxins And Dioxin-Like PCB. Thirty-sixth Session Rotterdam, The Netherlands, 22 - 26 March 2004.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). The State of World Fisheries and Aquaculture. Opportunities and challenges. Rome, 2014.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). Fisheries and Aquaculture Department. Fishery Statistical Collection. Disponível em: <http://www.fao.org/fishery/statistics/> Acesso em: 09 fev. 2015.
- FERREIRA, M.W.; *et al.* *Pescados Processados: Maior Vida de Prateleira e Maior Valor Agregado*. Lavras-MG: Núcleo de Estudo, 2002.
- FIEDLER, H. Dioxins and Furans (PCDD/PCDF). The Handbook of Environmental Chemistry. Berlin. *Springer*, vol. 3, chapter 6. 2003.
- FEARN, T.; THOMPSON, M. A new test for sufficient homogeneity. *Analyst*, vol. 126, p. 1414-1417, 2001.
- GANDHI, N.; *et al.* Evaluation and Interconversion of Various Indicator PCB Schemes for Σ PCB and Dioxin-Like PCB Toxic Equivalent Levels in Fish. *Environ. Sci. Technol.* 2014.
- GANDRA, R.L.P. *Produção de material de referência para o escopo umidade, cinzas, gordura total e acidez titulável em leite em pó integral*. Belo Horizonte: FAFAR/UFMG, 2013. Dissertação (Mestrado).

- GIGLIOTTI, J.C.; *et al.* Determination of the nutritional value, protein quality and safety of krill protein concentrate isolated using an isoelectric solubilization/precipitation technique *Analytical Methods*, vol. 111. p. 209-214.
- GUILLEBON, B.; *et al.* Production and use of reference materials for environmental analyses: conclusions of a workshop. *Trends in Analytical Chemistry*, n° 3, vol. 20, 2001.
- HAWTHORNE, S.B. Analytical-Scale Supercritical Fluid Extraction. *Analytical Chemistry*, n. 11, vol. 62, June 1, 1990.
- HAIR, Jr.; *et al.* Análise multivariada de dados. 6 ed. Porto Alegre: *Bookman*, p. 688 2009.
- HOFFMANN, E.; STROOBANT V. Mass Spectrometry: Principles and Applications. *John Wiley & Sons*, Chichester, UK. Third Edition 2007.
- HORWITZ, W. Evaluation of analytical methods used for regulation of food and drugs. *Anal. Chem.*, v. 54, p. 67A-76A, 1982.
- HORWITZ, W. Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies. *Pure Appl. Chem.* vol. 67, p. 331-343, 1995.
- HUSS H.H. Garantia da qualidade dos produtos da pesca. *FAO Documento Técnico sobre as Pescas*. Roma, vol. 334, p. 176, 1997.
- IARC (International Agency for Research on Cancer). Polychlorinated Dibenzo-para-Dioxins and Polychlorinated Dibenzofurans. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. *World Health Organization*, vol. 69, p. 33, 1997.
- IARC (International Agency for Research on Cancer). Chemical agents and related occupations volume 100 F A review of human carcinogens. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. *World Health Organization*, vol. 100F, p. 599, 2012.
- INAGAKI K., *et al.* Certification of methyl mercury in cod fish tissue certified reference material by species-specific isotope dilution mass spectrometric analysis. *Anal Bioanal Chem.* vol.391, p. 2047–2054, 2008.
- INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial). INMETRO DOQ-CGCRE-016 Orientação para a seleção e uso de materiais de referência. Rio de Janeiro, p. 15, 2010.
- ISO (International Standards Organization). ISO 13528:2005. Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparisons. Geneva, 2005.
- JENSEN B.A.; *et al.* Developing tools for risk assessment in protected species: Relative potencies inferred from competitive binding of halogenated aromatic

hydrocarbons to arylhydrocarbon receptors from beluga (*Delphinapterus leucas*) and mouse. *Aquatic Toxicology*, vol. 100, p. 238–245, 2010.

JOHNSTON, J. Econometric methods. *McGraw-Hill Book Company*, 3 ed, p. 287-342, 1984.

KIM M.; *et al.* Formation of polychlorinated dibenzo-p-dioxins/dibenzofurans (PCDD/Fs) from a refinery process for zinc oxide used in feed additives: A source of dioxin contamination in Chilean pork. *Chemosphere*, n^o. 82, p. 1225-1229, Jan. 2011.

KIM, J. H.; *et al.* One-step pressurized liquid extraction method for the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Analytica Chimica Acta*, vol. 498, p. 55–60, 2003.

KUBITZA F.; *et al.* Panorama da Piscicultura no Brasil. Panorama da Aquicultura. Jundiaí, SP, n^o 132, vol. 22, p. 11, agosto de 2012.

LAN D.; *et al.* Optimization of selective pressurized liquid extraction for extraction and in-cell clean-up of PCDD/Fs in soils and sediments. *Chemosphere*, vol.90, p.2414–2419, 2013.

LINSINGER T. P. J.; *et al.* Homogeneity and stability of reference materials. *Accred Qual Assur*, vol.6, p. 20–25, 2001.

MAIER, E.A.; *et al.* Interlaboratory studies as a toll for many purposes: proficiency testing, learning exercises, quality control and certification of matrix materials. *Anal.Chim.Acta*, vol. 283, p. 590-599, 1993.

MANNILA M.; *et al.* Envelopment of supercritical fluid extraction with a solid-phase trapping for fast estimation of toxic load of polychlorinated dibenzo-p-dioxins-dibenzofurans in sawmill soil. *Journal of Chromatography A*, vol. 975, p.189–198, 2002.

MAPA (Ministério da Agricultura e do Abastecimento). Instrução Normativa SDA/MAA 42/1999. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa N^o 42, de 20 de dezembro de 1999.

MARTIN C. A. Ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 e ômega-6: importância e ocorrência em alimentos. *Revista de Nutrição*. Campinas, SP. n^o 6, vol. 19, p. 761-770, nov/dez de 2006.

MECHLIN'SKA A.; *et al.* Isotope-labeled substances in analysis of persistent organic pollutants in environmental samples. *Analytical Chemistry*, n^o 8, vol. 29, 2010.

MITRA, S. Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry. New Jersey: Wiley-Interscience, p.472, 2003.

- NAKATANI, T.; *et al.* Survey of dietary intake of polychlorinated dibenzo-p-dioxins, polychlorinated dibenzofurans, and dioxin-like coplanar polychlorinated biphenyls from food during 2000–2002 in Osaka City, Japan. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, vol. 60, p. 543–555, 2011.
- NIST (National Institute of Standards and Technology). Standard Reference Materials. Disponível em: <https://www-s.nist.gov/srmors/detail.cfm>. Acesso em: 17 fev. 2015.
- OTAKE T., *et al.* Development of Certified Reference Material for Quantification of Two Pesticides in Brown Rice. *J. Agric. Food Chem.*, vol. 57, p. 8208–8212, 2009.
- OTAKE T., *et al.* Characterization of certified reference material for quantification of polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides in fish. *Anal Bioanal Chem.*, vol. 397, p. 2569–2577, 15 May 2010.
- PENTEADO J. C. P. e VAZ J. M. O legado das bifenilas policloradas (PCB). *Química Nova*, nº. 3, vol. 24, p. 390-398, 2001.
- RODRIGUES, T.; *et al.* Preparação e certificação de materiais de referência através de ensaios de proficiência: estudo de caso da rede metrológica RS. In: 49º Congresso Brasileiro de Química. Porto Alegre: Associação Brasileira de Química. p. 2, 2009.
- ROSAS, O. de C. Produção de Materiais de Referência para Ensaios de Proficiência em Microbiologia de Alimentos. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2009. Dissertação (Mestrado).
- SANTOS, M. F. P., *et al.* Estimativa da incerteza de medição da fortificação do material de referência certificado (MRC) - uma estratégia criativa. In: Encontro para a Qualidade de Laboratórios, 2005, São Paulo. Anais. São Paulo: REMESP, 2005.
- SARGENT, M., *et al.* Guidelines for achieving high accuracy in isotope dilution mass spectrometry (IDMS). Cambridge: *Royal Society of Chemistry*, 1 ed. p. 34, 2002.
- SCHECTER A., *et al.* Dioxins: An overview. *Environmental Research*. vol. 101, p. 419–428, 2006.
- SEBRAE. Criação de tilápias em tanques-redes. Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas. Nogueira Alex Costa e Rodrigues Thales. Disponível em: [http://201.2.114.147/bds/BDS.nsf/7227D4D9D30AB6CC832573A9006DF4BC/\\$File/NT0003737A.pdf](http://201.2.114.147/bds/BDS.nsf/7227D4D9D30AB6CC832573A9006DF4BC/$File/NT0003737A.pdf). Acesso em: 30jul2013.
- SILVA V.; *et al.* Biomarkers of Fish Oil Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids Intake in Humans. *Nutrition in Clinical Practice*, nº 1, vol. 29, Deceber 2013.

- SIMM M.; *et al.* PCDD/Fs in sprat (*Sprattus sprattus balticus*) from the Gulf of Finland, the Baltic Sea. *Chemosphere*, vol. 65, p.1570–1575, 5 May 2006.
- SIMOPOULOS A. P. Essential fatty acids in health and chronic disease. *The American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 70 (suppl), p. 560-569, 1999.
- SOUZA, S.V.C. Procedimento para validação intralaboratorial de métodos de ensaio: delineamento e aplicabilidade em análises de alimentos. Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia da UFMG. 2007. p. 296 (Tese, Doutorado em Ciência de Alimentos).
- SOUZA, S. V. C., JUNQUEIRA, R. G. A procedure to assess linearity by ordinary least squares method. *Anal. Chim. Acta*, vol. 552, p. 25-35, 2005.
- SOUZA S. M. G.; *et al.* C. Ácidos graxos Ômega-3 e Ômega-6 na nutrição de peixes – fontes e relações. *Revista de Ciências Agroveterinárias*, nº 1, vol.6, p. 63-71, 2007.
- SOUZA L. M DE. Aplicações da espectrometria de massas e da cromatografia líquida na caracterização estrutural de biomoléculas de baixa massa molecular. Curitiba: Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná. p. 182, 2008. (Tese, Doutorado em Ciência - Bioquímica).
- SUÁREZ-MAHECHA H.; *et al.* Importância de Ácidos Graxos Poliinsaturados Presentes Peixes de Cultivo e de Ambiente Natural para a Nutrição Humana. *Boletim do Instituto de Pesca*, São Paulo, nº1, vol. 28,p. 101 - 110, 2002.
- SUBEDIA B., USENKO S., Enhanced pressurized liquid extraction technique capable of analyzing polychlorodibenzo-p-dioxins, polychlorodibenzofurans, and polychlorobiphenyls in fish tissue. *Journal of Chromatography A*, vol. 1238, p. 30–37, 29 march 2012.
- SUN, H.; *et al.* Application of accelerated solvent extraction in the analysis of organic contaminants, bioactive and nutritional compounds in food and feed *Journal of Chromatography A*, vol. 1237, p.1–23, 2012.
- STORELLI M.M.; *et al.* Polychlorinated biphenyls (PCB), dioxins and furans (PCDD/Fs): Occurrence in fishery products and dietary intake. *Food Chemistry*, vol. 127, p. 1648–1652, 2011.
- THOMPSON M. Recent trends in inter-laboratory precision at ppb and sub-ppb concentrations in relation to fitness for purpose criteria in proficiency testing. *Analyst.*, vol. 125, p. 385-386, 2000.
- THOMPSON M.; *et al.* Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. *Pure Appl. Chem.*, vol. 74, p. 835-855, 2002.

- THOMPSON M.; *et al.* The international harmonized protocol for the proficiency testing of analytical chemistry laboratories. *Pure Appl. Chem.*, vol. 78, p. 145-196, 2006.
- ULRICH J. C. Preparação e caracterização de um material de referência de peixe. Instituto de pesquisas energéticas e nucleares. São Paulo, (Tese de Doutorado) 2011.
- UNEP (United Nations Environment Program). Standardized toolkit for identification and quantification of dioxin and furan releases. Geneva, Switzerland, p. 235, 2005.
- UNEP (United Nations Environment Program). Guidelines on best available techniques and provisional guidance on best environmental practices relevant to Article 5 and Annex C of the Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants. Geneva, Switzerland: Secretariat to the Stockholm Convention, United Nations Environment Programme, Geneva, October 2008.
- UNIÃO EUROPEIA (UE). REGULAMENTO (UE) Nº 1883/2006 DA COMISSÃO de 19 de Dezembro de 2006 que estabelece os métodos de amostragem e de análise para o controlo oficial dos teores de dioxinas e de PCB sob a forma de dioxinas em determinados géneros alimentícios. *Jornal Oficial da União Europeia*, Bruxelas, L 320, p. 18-23, 3 dez. 2011.
- UNIÃO EUROPEIA (UE). REGULAMENTO (UE) Nº 1259/2011 DA COMISSÃO de 02 de Dezembro de 2011 que altera o Regulamento (CE) n.º 1881/2006 no que se refere aos teores máximos para as dioxinas, PCB sob a forma de dioxina e PCB não semelhantes a dioxinas nos géneros alimentícios. *Jornal Oficial da União Europeia*, Bruxelas, L 364, p. 32-43, 20 dez. 2006.
- UNIÃO EUROPEIA (UE). REGULAMENTO (UE) Nº 252/2012 DA COMISSÃO de 21 de março de 2012 que estabelece métodos de amostragem e análise para o controlo oficial dos teores de dioxinas, PCB sob a forma de dioxina e PCB não semelhantes a dioxinas em determinados géneros alimentícios e que revoga o Regulamento (CE) n.º 1883/2006. *Jornal Oficial da União Europeia*, Bruxelas, L 84, p. 1-22, 23 mar 2012.
- USDA (United States Department of Agriculture). National Nutrient Database for Standard Reference. Disponível em: <http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/search/>. Acesso em: 09 set 2013.
- VAN DER VEEN A. M.H.; *et al.* Uncertainty calculations in the certification of reference materials. 2. Homogeneity study. *Accred Qual Assur.*, vol. 6, p.26–30, 2001.
- VAN DEN BERG M.; *et al.* The 2005 World Health Organization Reevaluation of Human and Mammalian Toxic Equivalency Factors for Dioxins and Dioxin-Like

Compounds Review. *Toxicological sciences*, nº 2, vol. 93, p. 223-241, 7 de July de 2006.

VAN LEEUWEN S.P.J.; *et al.* New certified and candidate certified reference materials for the analysis of PCB, PCDD/Fs, OCPs and BFRs in the environment and food. *Trends in Analytical Chemistry*, nº.4, vol. 25, 2006.

VISENTAINER J.V.; *et al.* Efeito do Tempo de Fornecimento de Ração Suplementada com Óleo de Linhaça sobre a Composição Físico-Química e de Ácidos Graxos em Cabeças de Tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*). *Ciê. Tecnol. Aliment.*, nº 3, vol. 23, p. 478-484, set 2003.

WALFISH S. A. Review of Statistical Outlier Methods. Pharmaceutical Technology. Maryland, Rockville, MD 20850, Nov 2, 2006. Disponível em: <http://www.pharmtech.com/review-statistical-outlier-methods?id=&sk=&date=&pageID=2> . Acesso em: 11 fev2015.

WELLINGTON LABORATORIES. Certified Reference Material. WMF-0. Reference Fish Tissue for Organic Contaminant Analysis. Lot LSBRM000, Canada, 18 jul2014.

WIE X.; *et al.* Assessment of risk of PCDD/Fs and dioxin-like PCB in marine and freshwater fish in Pearl River Delta, China. *Marine Pollution Bulletin*, vol. 63, p. 166–171, 2011.

WITTSIEPE J.; *et al.* PCDD/F and dioxin-like PCB in human blood and milk from German mothers. *Chemosphere*, vol. 67, p.S286–S294, 10 January 2007.

ZAGO A. C. Análise parasitológica e microbiológica de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) criadas em tanques-rede no reservatório de Água Vermelha - SP e suas inter-relações com as variáveis limnológicas e fase de criação (Dissertação de Mestrado). Botucatu, SP.2012.

APÊNDICE A. Materiais de referência para dibenzo-p-dioxinas policloradas (dioxinas), dibenzo-furano policlorados (furanos) e bifenilas policloradas (PCB) em pescado disponibilizados por provedores internacionais

Código do Material	Provedor	Matriz	Mensurandos	Valores Certificados e Incerteza (pg/g)	Apresentação	Preço (US\$)
EDF-2524	Cambridge Isotope Laboratories	Peixe branco esterilizado	2,3,7,8-Tetraclorodibenzo-p-dioxina	0,7 ± 0,06	Disponível em frasco de vidro de 10g	155
			1,2,3,7,8-Pentaclorodibenzo-p-dioxina	0,15 ± 0,03		
			1,2,3,4,7,8-Hexaclorodibenzo-p-dioxina	0,06 ± 0,03		
			1,2,3,6,7,8-Hexaclorodibenzo-p-dioxina	0,24 ± 0,14		
			1,2,3,7,8,9-Hexaclorodibenzo-p-dioxina	0,07 ± 0,05		
			1,2,3,4,6,7,8-Heptaclorodibenzo-p-dioxina	0,29 ± 0,54		
			Octaclorodibenzo-p-dioxina	0,59 ± 0,82		
			2,3,7,8-Tetraclorodibenzofurano	2,42 ± 0,74		
			1,2,3,7,8-Pentaclorodibenzofurano	2,49 ± 0,92		
			2,3,4,7,8-Pentaclorodibenzofurano	0,09 ± 0,06		
			1,2,3,4,7,8-Hexaclorodibenzofurano	0,21 ± 0,14		
			1,2,3,6,7,8-Hexaclorodibenzofurano	0,09 ± 0,14		
			1,2,3,7,8,9-Hexaclorodibenzofurano	0,08 ± 0,12		
			2,3,4,6,7,8-Hexaclorodibenzofurano	0,08 ± 0,05		
			1,2,3,4,6,7,8-Heptaclorodibenzofurano	0,17 ± 0,28		
Octaclorodibenzofurano	0,24 ± 0,58					
3,4,4',5'-Tetraclorobifenila (PCB-81)	1,27 ± 2,52					

			3,3',4,4'-Tetraclorobifenila (PCB-77)	8,82 ± 4,16		
			3,3',4,4',5-Pentaclorobifenila (PCB-126)	2,14 ± 1,24		
			3,3',4,4',5,5'-Hexaclorobifenila (PCB-169)	0,65 ± 0,46		
			2',3,4,4',5-Pentaclorobifenila (PCB-123)	11,4 ± 9,24		
			2,3',4,4',5-Pentaclorobifenila (PCB-118)	692 ± 104		
			2,3,4,4',5-Pentaclorobifenila (PCB-114)	18,6 ± 5,98		
			2,3,3',4,4'-Pentaclorobifenila (PCB-105)	280 ± 80,4		
			2,3',4,4',5,5'-Hexaclorobifenila (PCB-167)	24,7 ± 17,1		
			2,3,3',4,4',5-Hexaclorobifenila (PCB-156)	64,7 ± 18,4		
			2,3,3',4,4',5'-Hexaclorobifenila(PCB-157)	19,2 ± 8,68		
			2,3,3',4,4',5,5'-Heptaclorobifenila (PCB-189)	6,16 ± 2,72		
			2,3,7,8-Tetraclorodibenzo-p-dioxina	17,0 ± 3,9		
			1,2,3,7,8-Pentaclorodibenzo-p-dioxina	3,71 ± 0,90		
			1,2,3,4,7,8-Hexaclorodibenzo-p-dioxina	0,33 ± 0,18		
			1,2,3,6,7,8-Hexaclorodibenzo-p-dioxina	2,03 ± 0,60		
			1,2,3,7,8,9-Hexaclorodibenzo-p-dioxina	0,30 ± 0,14		
			1,2,3,4,6,7,8-Heptaclorodibenzo-p-dioxina	0,56 ± 0,62		
EDF-2525	Cambridge Isotope Laboratories	Peixe naturalmente contaminado esterilizado	Octaclorodibenzo-p-dioxina	1,71 ± 1,38	Disponível em frasco de vidro de 10g	210
			2,3,7,8-Tetraclorodibenzofurano	24,3 ± 4,74		
			1,2,3,7,8-Pentaclorodibenzofurano	4,58 ± 1,42		
			2,3,4,7,8-Pentaclorodibenzofurano	14,5 ± 4,04		
			1,2,3,4,7,8-Hexaclorodibenzofurano	5,95 ± 1,52		
			1,2,3,6,7,8-Hexaclorodibenzofurano	1,73 ± 0,54		
			1,2,3,7,8,9-Hexaclorodibenzofurano	0,10 ± 0,20		
			2,3,4,6,7,8-Hexaclorodibenzofurano	1,04 ± 0,30		

			1,2,3,4,7,8,9-Heptaclorodibenzofurano	0,59 ± 0,44		
			1,2,3,4,6,7,8-Heptaclorodibenzofurano	0,16 ± 0,32		
			Octaclorodibenzofurano	0,38 ± 0,50		
			3,4,4',5-Tetraclorobifenila (PCB-81)	161 ± 74,0		
			3,3',4,4'-Tetrachlorobiphenyl (PCB-77)	1850 ± 834		
			3,3',4,4',5-Pentaclorobifenila (PCB-126)	628 ± 242		
			3,3',4,4',5,5'-Hexaclorobifenila (PCB-169)	52,1 ± 14,0		
			2',3,4,4',5-Pentaclorobifenila(PCB-123)	3280 ± 2020		
			2,3',4,4',5-Pentachlorobifenila (PCB-118)	122000 ± 38000		
			2,3,4,4',5-Pentaclorobifenila (PCB-114)	3410 ± 1550		
			2,3,3',4,4'-Pentaclorobifenila (PCB-105)	50100 ± 15700		
			2,3',4,4',5,5'-Hexaclorobifenila (PCB-167)	7060 ± 3020		
			2,3,3',4,4',5-Hexaclorobifenila (PCB-156)	13100 ± 2620		
			2,3,3',4,4',5'-Hexaclorobifenilal (PCB-157)	3380 ± 1010		
			2,3,3',4,4',5,5'-Heptaclorobifenilal (PCB-189)	1440 ± 498		
			2,3,7,8-Tetraclorodibenzo-p-dioxina	19,8 ± 4,18		
			1,2,3,7,8-Pentaclorodibenzo-p-dioxina	39,9± 10,6		
			1,2,3,4,7,8-Hexaclorodibenzo-p-dioxina	54,9± 7,8		
			1,2,3,6,7,8-Hexaclorodibenzo-p-dioxina	5,11± 19,3		
			1,2,3,7,8,9-Hexaclorodibenzo-p-dioxina	52,9 ± 18,1		
EDF-2526	Cambridge Isotope Laboratories	Peixe Fortificado esterilizado	1,2,3,4,6,7,8-Heptaclorodibenzo-p-dioxina	70,7 ± 23,2	Disponível em frasco de vidro de 10g	475
			Octaclorodibenzo-p-dioxina	181 ± 53,4		
			2,3,7,8-Tetraclorodibenzofurano	18,7 ± 5,58		
			1,2,3,7,8-Pentaclorodibenzofurano	39 ± 7,36		
			2,3,4,7,8-Pentaclorodibenzofurano	37,8 ± 10,2		

			1,2,3,4,7,8-Hexaclorodibenzofurano	83,3 ± 23,0	
			1,2,3,6,7,8-Hexaclorodibenzofurano	62,8 ± 19,6	
			1,2,3,7,8,9-Hexaclorodibenzofurano	57,3 ± 10,9	
			2,3,4,6,7,8-Hexaclorodibenzofurano	58,6 ± 14,2	
			1,2,3,4,7,8,9-Heptaclorodibenzofurano	81,6 ± 13,7	
			1,2,3,4,6,7,8-Heptaclorodibenzofurano	76,7 ± 26,6	
			Octaclorodibenzofurano	185 ± 57,4	
			3,4,4',5-Tetraclorobifenila (PCB-81)	3,00 ± 5,60	
			3,3',4,4'-Tetraclorobifenila (PCB-77)	451 ± 179	
			3,3',4,4',5-Pentaclorobifenila (PCB-126)	431 ± 17,9	
			3,3',4,4',5,5'-Hexaclorobifenila (PCB-169)	512 ± 160	
			2',3,4,4',5-Pentaclorobifenila (PCB-123)	7,38 ± 9,58	
			2,3',4,4',5-Pentaclorobifenila (PCB-118)	348 ± 392	
			2,3,4,4',5-Pentaclorobifenila (PCB-114)	7,73 ± 4,36	
			2,3,3',4,4'-Pentaclorobifeila (PCB-105)	108 ± 73,0	
			2,3',4,4',5,5'-Hexaclorobifenila (PCB-167)	12,0 ± 9,54	
			2,3,3',4,4',5-Hexaclorobifenila (PCB-156)	23,3 ± 23,8	
			2,3,3',4,4',5'-Hexaclorobifenila (PCB-157)	9,30 ± 9,16	
			2,3,3',4,4',5,5'-Heptaclorobifenila (PCB-189)	3,51 ± 2,76	
			2,3,7,8-Tetraclorodibenzo-p-dioxina	13,1 ± 4,4	
			1,2,3,7,8-Pentaclorodibenzo-p-dioxina	2,72 ± 1,3	
WMF-01	Wellington Laboratories	Músculo de peixe liofilizado	1,2,3,4,7,8-Hexaclorodibenzo-p-dioxina	0,22 ± 0,3	Disponível em frasco de vidro âmbar de 10g
			1,2,3,6,7,8-Hexaclorodibenzo-p-dioxina	0,88 ± 0,4	
			1,2,3,7,8,9-Hexaclorodibenzo-p-dioxina	0,27 ± 0,4	
			1,2,3,4,6,7,8-Heptaclorodibenzo-p-dioxina	0,59 ± 0,7	

			Octaclorodibenzo-p-dioxina	3,91 ± 6,2	
			2,3,7,8-Tetraclorodibenzofurano	13,1 ± 4,9	
			1,2,3,7,8-Pentaclorodibenzofurano	1,53 ± 1,4	
			2,3,4,7,8-Pentaclorodibenzofurano	7,15 ± 2,2	
			1,2,3,4,7,8-Hexaclorodibenzofurano	0,86 ± 1	
			1,2,3,6,7,8-Hexaclorodibenzofurano	0,51 ± 0,7	
			1,2,3,7,8,9-Hexaclorodibenzofurano	0,25 ± 0,4	
			2,3,4,6,7,8-Hexaclorodibenzofurano	0,68 ± 1,2	
			1,2,3,4,6,7,8-Heptaclorodibenzofurano	1,01 ± 1,9	
			1,2,3,4,7,8,9-Heptaclorodibenzofurano	0,3 ± 0,5	
			Octaclorodibenzofurano	1,38 ± 2,1	
			3,4,4',5-Tetraclorobifenila (PCB-81)	201 ± 58	
			3,3',4,4'-Tetraclorobifenila (PCB-77)	2233 ± 720	
			3,3',4,4',5-Pentaclorobifenila (PCB-126)	739 ± 260	
			3,3',4,4',5,5'-Hexaclorobifenila (PCB-169)	76 ± 30	
			2',3,4,4',5-Pentaclorobifenila (PCB-123)	4233* ± 2620	
			2,3',4,4',5-Pentaclorobifenila (PCB-118)	130100 ± 32500	
			2,3,4,4',5-Pentaclorobifenila (PCB-114)	3523 ± 1670	
			2,3,3',4,4'-Pentaclorobifenila (PCB-105)	49050 ± 14200	
			2,3',4,4',5,5'-Hexaclorobifenila (PCB-167)	9750 ± 3090	
			2,3,3',4,4',5-Hexaclorobifenila (PCB-156)	14890 ± 5020	
			2,3,3',4,4',5'-Hexaclorobifenila (PCB-157)	3488 ± 870	
			2,3,3',4,4',5,5'-Heptaclorobifenila (PCB-189)	2016 ± 611	
CARP-2	Wellington Laboratories	Músculo de peixe esterilizado	2,3,7,8-Tetraclorodibenzo-p-dioxina	7,4 ± 0,7	Disponível em ampola de vidro âmbar de 10g
			1,2,3,7,8-Pentaclorodibenzo-p-dioxina	5,3 ± 1,3	

1,2,3,4,7,8-Hexaclorodibenzo-p-dioxina	1,6 ± 0,3
1,2,3,6,7,8-Hexaclorodibenzo-p-dioxina	5,8 ± 0,8
1,2,3,7,8,9-Hexaclorodibenzo-p-dioxina	0,78 ± 0,12
1,2,3,4,6,7,8-Heptaclorodibenzo-p-dioxina	6,4 ± 0,9
Octaclorodibenzo-p-dioxina	9,4 ± 1,7
2,3,7,8-Tetraclorodibenzofurano	18,2 ± 1,6
1,2,3,7,8-Pentaclorodibenzofurano	5,6 ± 0,3

Adaptado: CIL = Cambridge Isotope Laboratories; Wellington Laboratories; \$ dólar dos EUA .