

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

Igor Cabreira Pussente

Avaliação da presença de dioxinas e PCBs no meio ambiente através de estudos de caso e a viabilidade do uso de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas sequencial na análise destes compostos.

Belo Horizonte
2016

UFMG/ICEx/DQ. 1.179^a
T. 530^a

Igor Cabreira Pussente

Avaliação da presença de dioxinas e PCBs no meio ambiente através de estudos de caso e a viabilidade do uso de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas sequencial na análise destes compostos.

Tese apresentada ao Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências - Química

Belo Horizonte

2016

P987a Pussente, Igor Cabreira
2016 Avaliação da presença de dioxinas e PCBs no meio
T ambiente através de estudos de caso e a viabilidade do
uso de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria
de massas sequencial na análise destes compostos
[manuscrito] / Igor Cabreira Pussente. 2016.
[xii], 124 f. : il.

Orientador: Rodinei Augusti.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas
Gerais - Departamento de Química.
Inclui bibliografias.

1. Química Analítica - Teses 2. Análise ambiental -
Teses 3. Dioxinas - Teses 4. Cromatografia de gás -
Teses 5. Hidrocarbonetos - Teses 5. Compostos
heterocíclicos - Teses I. Augusti, Rodinei, Orientador
II. Título.

CDU 043

"Avaliação da Presença de Dioxinas e PCBs no Meio Ambiente Através de Estudos de Caso e a Viabilidade do Uso de Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas Sequencial na Análise destes Compostos"

Igor Cabreira Pussente

Tese aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:



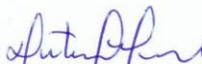
Prof. Rodinei Augusti - Orientador
UFMG



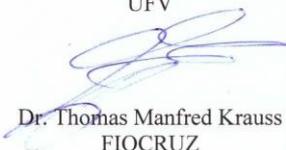
Profa. Clésia Cristina Nascentes
UFMG



Prof. Helvécio Costa Menezes
UFMG



Prof. Antônio Augusto Neves
UFV



Dr. Thomas Manfred Krauss
FIOCRUZ

Belo Horizonte, 09 de setembro de 2016.

Ediscere,

Scire,

Agere,

Vincere.

Aos meus pais, Antonio e Angela, dedico.

Agradecimento

À Deus, pelo amor incondicional e oportunidade de uma nova vida.

À minha família, exemplo de luta, nunca me deixou cair e sempre me apoiou nesta difícil jornada.

À Talita, minha companheira de amor sem igual.

À Universidade Federal de Minas Gerais e o Instituto Rikilt da Holanda, pela possibilidade de realizar esse trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida.

Ao Professor Rodinei Augusti pela orientação, amizade e confiança em meu trabalho.

Ao Guillaume ten Dam, pela incansável paciência nos ensinamentos transmitidos, e pela amizade fraternal a mim dedicada (To Guillaume, for the indefatigable patience in the transmitted teachings, and for the fraternal friendship dedicated to me).

Ao Dr. Gijs Kleter, por todo suporte incomensurável durante minhas estadias no instituto Rikilt (To Dr. Gijs Kleter, for all immeasurable support during my stays at the Rikilt Institute).

Ao Dr. Wim Traag e Dr. Stefan van Leeuwen, pela supervisão e co-orientação no instituto Rikilt (To Dr. Wim Traag and Dr. Stefan van Leeuwen, for supervision at the Rikilt Institute).

Aos colegas de laboratório do Rikilt, Cornelis and Edwin, pelos ensinamentos dentro e fora (To Rikilt's lab colleagues, Cornelis and Edwin, for the teachings inside and outside).

Aos colegas do laboratório do Departamento de Química/UFMG, pelas horas do café e momentos filosóficos.

Às meninas da Secretaria de Pós Graduação do DQ/UFMG, pelo carinho, atenção e prestação de serviços.

Aos meus amigos, que longe ou perto, estiveram presentes em meu coração durante toda esta linda jornada.

Muito obrigado!

RESUMO

Os dibenzodioxinas-policlorados (PCDD), dibenzofuranos policlorados (PCDF) e ‘*dioxin-like*’ PCB (dl-PCB) são hidrocarbonetos aromáticos polialogenados persistentes no meio ambiente devido ao baixo potencial de degradação térmica e microbiológica. O número de átomos de cloro e a posição em que estão ligados ao anel aromático determinam o potencial toxicológico destes compostos para os animais. A exposição humana e animal a estes congêneres é monitorada através de programas regulamentados pela União Européia para análise de dioxinas e PCBs em amostras ambientais e do gênero alimentício. Processos industriais e outras atividades humana, bem como incidentes indesejáveis, são as principais fontes de emissão desses compostos para o meio ambiente.

O presente trabalho é dividido em três projetos, onde o Capítulo 1 apresenta os aspectos gerais sobre dioxinas e PCBs, detalhando informações sobre os compostos estudados, suas toxicidades e os dados técnicos de análises realizadas em todo o trabalho. No Capítulo 2 apresenta o estudo de caso da ave migratória Chasco-cinzento, no qual se analisou, por cromatografia gasosa acoplada espectrometria de massas de alta resolução (GC-HRMS), os congêneres tóxicos de PCDD/Fs e dl-PCB, e os não-tóxicos ndl-PCBs em amostras ambientais (solo, ovos e embrião da ave, insetos e larvas de sua cadeia alimentar) coletadas durante o ciclo de reprodução na Holanda, para investigar possíveis rotas de contaminação da ave. Em ovos foram encontrados 13,08 pg TEQ-PCDD/Fs-dl-PCBs-WHO₂₀₀₅ g⁻¹; em larvas ‘*ritnaald*’ 7,08 pg TEQ-PCDD/Fs-dl-PCBs-WHO₂₀₀₅ g⁻¹; e em solos ao redor dos ninhos 2,21 pg TEQ-PCDD/Fs-dl-PCBs-WHO₂₀₀₅ g⁻¹. A comparação dos perfis de distribuição e as correlações de Pearson (ρ) calculadas entre as amostras, apresentam fortes indícios de que alguns insetos e larvas adquirem os congêneres de PCDD/Fs e PCBs quando em contato com o solo. Ao se alimentar dos insetos, a fêmea transfere para o ovo a contaminação adquirida. No Capítulo 3, foram apresentados os níveis de PCDD/Fs e PCBs em amostras de solos coletadas na área urbana de Belo Horizonte/MG, analisadas por GC-HRMS. A faixa de concentração total em TEQ variou de 0,43 a 4,54 ng TEQ kg⁻¹ d.m.. O maior nível médio em TEQ por área encontrado foi 2,68 (\pm 1,63) ng TEQ kg⁻¹ d.m.. Os baixos níveis em TEQ alcançados sugerem que as regiões investigadas não são afetadas pelas possíveis fontes de emissão de dioxinas, embora Belo Horizonte/MG esteja circundada por algumas

delas. No Capítulo 4 foi investigado o desempenho da técnica APGC-MS/MS como alternativa para análise de dioxinas, furanos e PCBs, em relação ao GC-HRMS e comparado com a legislação da União Europeia. O estudo apresenta os resultados de mais de 200 amostras reais, que foram obtidos e comparados com GC-HRMS, e a seletividade foi avaliada comparando-se os cromatogramas. A sensibilidade foi consideravelmente melhor no APGC-MS/MS do que a de GC-HRMS, enquanto o intervalo linear de ambas as técnicas cobriram semelhante faixa. As razões entre íons foram em sua maioria dentro da faixa de tolerância de $\pm 15\%$. concluiu-se que a determinação de dioxinas e de PCBS utilizando APGC-MS/MS cumprem os requisitos definidos pela Comissão Europeia. Contudo, devido desempenho geral um pouco melhor, o GC-HRMS é o método preferido para efeitos de controle por monitoramento.

Palavras-chave: PCDD/Fs e PCBs, análises ambientais, perfil de distribuição, comparação GC-HRMS e GC-MS/MS.

**EVALUATION OF THE PRESENCE OF DIOXINS AND PCBs IN THE ENVIRONMENT
THROUGH CASE STUDIES AND THE FEASIBILITY OF THE USE OF GAS
CHROMATOGRAPHY COUPLED TO SEQUENTIAL MASS SPECTROMETRY IN THE
ANALYSIS OF THESE COMPOUNDS.**

ABSTRACT

The polychlorinated dibenzo-*p*-dioxin (PCDD), polychlorinated dibenzofurans (PCDF) and 'dioxin-like' PCBs (dl-PCBs) are polyhalogenated aromatic hydrocarbons. Due to their low potential for thermal and microbiological degradation, these compounds are persistent in the environment. The number of chlorine atoms and the position where they are attached to the aromatic ring determine the toxicological potential of these compounds to animals. The human and animal exposure to these congeners has been monitored by official programs regulated by the European Union for the analysis of dioxins and PCBs in environmental and foodstuff samples. Industrial processes and other human activities, as well as undesirable incidents, are the main sources of emissions of these compounds to the environment.

This work is divided in three main chapters. Hence, in Chapter 1 it is described the general aspects of dioxins and PCBs, with detailed information about these compounds, their toxicities and technical data regarding the analytical techniques performed herein. Chapter 2 presents the case study of migratory bird Northern Wheatear, in which gas chromatography coupled with high resolution mass spectrometry (GC-HRMS) is employed to analyze the toxic congeners of PCDD/Fs and dl-PCBs, as well the non-toxic NDL-PCBs. To investigate possible contamination in the bird routes, the following samples, collected during the bird reproductive cycle in the Netherlands, were analyzed: soil, eggs, embryos as well as insects and larvae of the bird food chain. The following levels were found in each sample: eggs (13.08 pg TEQ PCDD/Fs-dl-PCBs-WHO2005 g⁻¹; 'ritnaald' larvae (7.08 pg TEQ PCDD/Fs-dl-PCBs-WHO2005 g⁻¹; soil (collected close to the bird nests: 2.21 pg TEQ PCDD/Fs-dl-PCBs-WHO2005 g⁻¹). The comparison of the distribution profiles revealed strong evidence that some insects and larvae acquire congeners of PCDD/Fs and PCBs when in contact with

soil. Then, the female transfers the contamination to the eggs upon feeding on insects. In Chapter 3, the levels of PCDD/Fs and PCBs, as analyzed by GC-HRMS, in soil samples collected in the urban area of Belo Horizonte/MG are presented. The total TEQ concentration ranged from 0.43 to 4.54 ng TEQ kg⁻¹ dry matter (dm). The highest average level was 2.68 (± 1.63) ng TEQ kg⁻¹ dm. The low levels achieved for all samples suggest that the investigated areas are not affected by possible sources of dioxin emissions, even knowing that Belo Horizonte is surrounded by a number of them. In Chapter 4 the performance of APGC-MS/MS as an alternative technique to GC-HRMS for the analysis of dioxins, furans and PCBs is investigated. The results of more than 200 real samples are analyzed. Hence, selectivity was assessed by comparing the chromatograms from both approaches, i. e. GC-HRMS and APGC-MS/MS. Sensitivity was considerably better for APGC-MS/MS than GC-HRMS whereas similar linear dynamic ranges were achieved for both techniques. Finally, the ratios between ions were mostly within the ± 15% tolerance range. Shortly, the determination of dioxins and PCBs by APGC-MS/MS meets the requirements defined by the European Commission. However, due to a slightly superior overall performance, the GC-HRMS technique is still the preferred method for dioxins analysis to be used for control purposes.

Keywords: PCDD/Fs e PCBs, environmental analysis, distribution patterns, comparison GC-HRMS e GC-MS/MS.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Estimativa da exposição humana às dioxinas [6].....	14
Figura 2: Estruturas químicas de a) PCDDs; b) PCDFs; c) PCBs.	15
Figura 3: Fotografia de Viktor Yushchenko antes (A), 3 meses (B) e 3,5 anos (C) depois da contaminação por 2,3,7,8-TCDD [35].....	20
Figura 4: Principais efeitos das dioxinas no sistema reprodutivo humano feminino (a) e masculino (b) [31].	21
Figura 5: Efeitos principais das dioxinas na saúde humana [31].	22
Figura 6: Fluxograma esquemático de todas as etapas envolvidas na análise de dioxinas, furanos e PCBs por GC-HRMS.....	29
Figura 7: Fluxograma esquemático para o método SMEDES [52].	31
Figura 8: Fluxograma esquemático do preparo de amostra para o método de extração com líquido pressurizado utilizando ASE 350.	33
Figura 9: Modelo esquemático do mecanismo de gel permeação por GPC [54].	35
Figura 10: Módulo do equipamento PowerPrep mostrando as quatro colunas de purificação (Fonte: Igor C. Pussente).....	36
Figura 11: $\Sigma\text{TEQ}_{\text{WHO2005}}\text{-PCDD/Fs-dl-PCBs}$ em amostras de ovos, embriões, solos e insetos (besouro, gafanhoto, mosquitos, larvas ‘ritnaald’ e larvas ‘rups’). Eixo secundário: teor de gordura extraída.	47
Figura 12: $\Sigma\text{TEQ}_{\text{WHO2005}}\text{-PCDD/Fs}$ e $\Sigma\text{TEQ}_{\text{WHO2005}}\text{-dl-PCBs}$, em amostras de solos das regiões de Dun (Dun), Vogelduin (AWD) e Aekingerzand (AEK), e seus valores de desvio padrão (ANOVA, $P = 0,477$; 95%).	47
Figura 13: Perfil de distribuição dos 17 congêneres de PCDD/Fs para as amostras de solo da Holanda, ovos e embrião do chasco-cinzento, insetos e larvas da cadeia alimentar.	50
Figura 14: Perfil de distribuição dos 12 congêneres de dl-PCBs para as amostras de solo da Holanda, ovos e embrião do chasco-cinzento, insetos e larvas da cadeia alimentar.	51
Figura 15: Comparação do perfil de distribuição em amostras de solo e larvas ‘ritnaald’ para os congêneres de (A) dl-PCBs; (B) ndl-PCBs.....	53
Figura 16: Mapa do Estado de Minas Gerais e da cidade de Belo Horizonte [97].	58

Figura 17: Níveis de PCDD/Fs-TEQ, dl-PCBs-TEQ e ndl-PCBs das amostras individuais de solos coletados em Belo Horizonte/MG.....	63
Figura 18: Contribuição dos congêneres de MO-PCBs e ndl-PCBs em solos coletados na área DQ.....	65
Figura 19: Comparação da média dos resultados obtidos na área DQ e o somatório das misturas de Aroclor 1254, 1260 e 1262.	66
Figura 20: Diferença na área do pico em relação à massa dos congêneres de PCDDs..	75
Figura 21: Comparação entre APGC-MS/MS e GC-HRMS, diferença dos resultados de A: soma total de PCDD/Fs e PCBs em upperbound; B: total-PCDD/Fs (ub); C: total-PCBs (ub); e D: total-ndl-PCBs.....	82

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Valores de TEF estabelecidos em 1998 e reavaliados em 2005 pela WHO... 24	24
Tabela 2: Níveis de PCDD/Fs e dl-PCBs em amostras de solo, embriões e ovos do chasco-cinzento, insetos e larvas (besouro, gafanhoto, mosquitos, larvas ‘rups’ e ‘ritnaald’). (-) Não calculado. (*) níveis < LOD.	44
Tabela 3: Níveis de ndl-PCBs (ng g ⁻¹ produto) em amostras de solo, embriões e ovos do chasco-cinzento, insetos e larvas (besouro, gafanhoto, mosquitos, larvas ‘rups’ e ‘ritnaald’).	45
Tabela 4: Coeficiente de correlação de Pearson (ρ) entre os níveis de PCDD/Fs, dl-PCBs e ndl-PCBs para as amostras de solo, embrião e ovos do chasco-cinzento, insetos e larvas (besouros, gafanhotos, mosquitos, larvas ‘rups’ e larvas ‘ritnaald’). (*) Valor não foi possível calcular devido aos baixos LOD.	52
Tabela 5: Níveis de PCDD/Fs e dl-PCBs (ng kg ⁻¹ d.m.), e ndl-PCBs (μg kg ⁻¹ d.m.) de solos coletados em seis diferentes localidades em Belo Horizonte/MG, Brasil.	61
Tabela 6: Compilação das concentrações de PCDD/Fs em solos de diversos países. Concentração em ng TEQ kg ⁻¹ d.m. (a)I-TEQ; b)TEF-WHO1998; c)TEF-WHO2005).	68
Tabela 7: Comparação entre GC-HRMS e APGC-MS/MS em análises do material de referência interno (PCDD/Fs e dl-PCBs: ng kg ⁻¹ produto; ndl-PCBs: μg kg ⁻¹ produto (12% de umidade)).....	79

ÍNDICE DE SIGLAS

- ASE: Accelerated Solvent Extraction;
- APGC: Atmospheric Pressure Gas Chromatography;
- CI: Chemical Ionization;
- EI: Electron impact;
- DIOXNOP: Dioxins and non-orto PCBs;
- dl-PCB: dioxin-like PCB – PCBs sob a forma de dioxinas;
- ECSCF: European Commission Scientific Committee on Foods;
- ELP: Extração com líquido pressurizado;
- GC-HRMS: Gas chromatography/high-resolution mass spectrometry;
- GPC: Gel Permeation Chromatography;
- HpCDD: Heptachlorodibenzo-p-dioxin;
- HpCDF: Heptachlorodibenzo-p-furans;
- HxCDD: Hexachlorodibenzo-p-dioxin;
- HxCDF: Hexachlorodibenzo-p-furans;
- IARC: International Agency for Research on Cancer;
- JECFA/WHO: Joint Expert Committee on Food Additives of the World Health Organization;
- LD: Limite de detecção;
- LQ: Limite de quantificação;
- MOPIP: Mono-orto PCBs and Indicator-PCBs;
- MO-PCBs: mono-orto PCBs;
- ndl-PCBs: non dioxin like PCBs – PCBs não na forma de dioxinas;
- NO-PCBs: não-orto PCBs;
- OCDD: Octachlorodibenzodioxin;
- OCDF: Octachlorodibenzofurans;
- OMS: Organização Mundial da Saúde;
- PCB: Polychlorinated biphenyls;
- PCBs-MO: Polychlorinated biphenyls mono-orto;
- PCBs-NO: Polychlorinated biphenyls non-orto;
- PCDD: Polychlorinated dibenzo-p-dioxins;
- PCDF: Polychlorinated dibenzofurans;

- PeCDD: Pentachlorodibenzo-p-dioxin;
- PeCDF: Pentachlorodibenzo-p-furans;
- POP: Poluentes orgânicos persistentes;
- PTV: Programmed Temperature Vaporization;
- SPE: Solid phase extraction;
- TCDD: Tetrachlorodibenzodioxin;
- TCDF: Tetrachlorodibenzofurans;
- TEF: Toxic Equivalency Factor;
- TEQ: Toxic Equivalentents;
- USEPA: United States Environmental Protection Agency;
- WHO: World Health Organization

SUMÁRIO

RESUMO	III
ABSTRACT	V
ÍNDICE DE FIGURAS	VII
ÍNDICE DE TABELAS	VIII
ÍNDICE DE SIGLAS	IX
SUMÁRIO	XI
CAPÍTULO 1	13
1 DIOXINAS	13
1.1 Aspectos Gerais	13
1.2 Revisão Bibliográfica	15
1.2.1 Dioxinas, Furanos e PCBs	15
1.2.2 Fontes de produção e contaminação	16
1.2.3 Efeitos toxicológicos	19
1.2.4 Fatores de toxicidade	22
1.2.5 Legislação.....	25
CAPÍTULO 2	28
2 EXPERIMENTAL	28
2.1 Amostras	28
2.2 Preparo de Amostras	28
2.3 Padrões e reagentes	30
2.4 Extração	30
2.4.1 Protocolo SMEDES	30
2.4.2 ASE 350.....	32
2.5 Clean-up	32
2.5.1 GPC	33
2.5.2 PowerPrep™	35
2.6 Instrumental de análise	37
2.6.1 Cromatografia a Gás (GC)	37
2.6.2 HRMS (Espectrômetro de Massas de Alta Resolução).....	38
CAPÍTULO 3	39
3 PROJETO CHASCO-CINZENTO – HISTÓRIA E JUSTIFICATIVA	39
3.1 Objetivos	40
3.1.1 Objetivos específicos	40
3.2 Amostras coletadas - Chasco-cinzento	40
3.2.1 Solo	41
3.2.2 Insetos e Larvas.....	41
3.2.3 Embriões e Ovos	42
3.3 Resultados e Discussão	42

3.3.1	Aspectos Gerais.....	42
3.3.2	Perfil de distribuição e Correlações	48
3.4	Conclusão.....	54
CAPÍTULO 4.....		55
4	INTRODUÇÃO	55
4.1	Materiais e métodos.....	57
4.1.1	Amostragem	57
4.1.2	Análises.....	58
4.2	Resultados e Discussão	59
4.2.1	Concentração de PCDDs e PCDFs em solo	59
4.2.2	Concentração de PCBs em solo	62
4.2.3	Fontes de emissão em potencial.....	62
4.2.4	Comparação com outros países e diretrizes para solos.....	66
4.2.5	Resultados de dioxinas no Brasil.....	69
4.3	Conclusão.....	69
CAPÍTULO 5.....		70
5	INTRODUÇÃO	70
5.1	Materiais e Métodos.....	72
5.1.1	Preparo de Amostras	72
5.1.2	PCDD/Fs e PCBs – Solventes, padrões e material de referência	72
5.1.3	Instrumental de análise	73
5.1.4	Métodos e condições do cromatógrafo a gás	73
5.1.5	Métodos e condições do espectrômetro de massas.....	74
5.2	Resultados e discussão	74
5.2.1	Sensibilidade	74
5.2.2	Linearidade e Faixa Linear.....	76
5.2.3	APGC-MS/MS – Desempenho em amostras de referência.	77
5.2.4	APGC-MS/MS – Avaliação de desempenho em amostras reais	80
5.2.5	Seletividade	83
5.3	Conclusão.....	84
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86
7	ANEXO I – FIGURAS	99
8	ANEXO II – TABELAS	112
9	ANEXO II – CÁLCULOS	119

CAPÍTULO 1

1 DIOXINAS

1.1 Aspectos Gerais

As dioxinas pertencem a uma classe de hidrocarbonetos aromáticos polialogenados cujas principais estruturas incluem os dibenzodioxinas-policlorados (PCDDs), os dibenzofuranos-policlorados (PCDFs) e os policlorados bifenilas (dl-PCBs). Esses compostos são poluentes orgânicos persistentes (POP) devido ao baixo potencial de degradação química e microbiológica. As dioxinas são subprodutos indesejáveis de atividades industriais e processos de combustão, e, uma vez lançadas no meio ambiente, podem se espalhar por grandes distâncias carregadas por correntes de ar e/ou marinhas, representando um tipo de contaminante onipresente no meio ambiente global [1].

Seres humanos e animais expostos a este grupo de contaminantes, estão sujeitos a efeitos adversos. Destacam-se tecidos moles, sarcomas, linfomas, lesões na pele (cloracne), câncer de estômago, anormalidades bioquímicas no fígado, elevados níveis de lipídio no sangue, lesão fetal, efeitos sobre os sistemas imunológicos e neurológicos [2]. Além disso, efeitos carcinogênicos, genéticos e alteração no ciclo reprodutivo de algumas espécies foram observados em estudos com animais [3, 4].

A exposição humana à contaminação por PCDD/Fs e PCBs é possível através de várias rotas:

- Inalação de ar e admissão de partículas do ar;
- Ingestão de alimentos e água;
- Adsorção dérmica.

Em 1990, um grupo de trabalho da Organização Mundial da Saúde (WHO, em inglês, *World Health Organization*) concluiu que 90% da exposição diária a dioxinas, a partir do *background*, resulta da ingestão dos alimentos, especialmente alimentos de origem animal, responsáveis pela ingestão diária de 2 pg TEQ kg⁻¹ peso corpóreo (TEQ, *Toxic Equivalence*). Outros gêneros alimentícios, especialmente os não-gordurosos, são de menor importância em termos de consumo de PCDD/Fs e PCBs, ou por serem de origem vegetal ou baixo potencial de bioacumulação de compostos lipofílicos [5].

A Figura 1 mostra uma estimativa das possíveis formas de exposição humana às dioxinas.

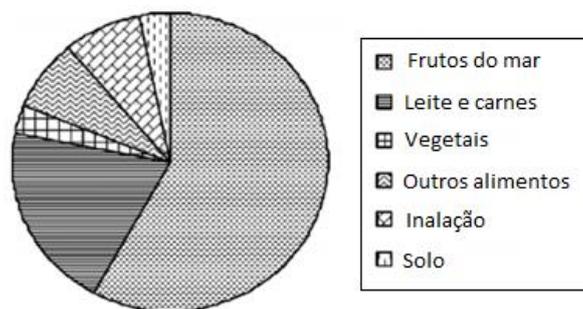


Figura 1: Estimativa da exposição humana às dioxinas [6].

Devido a muitas medidas para reduzir as emissões de PCDD/Fs no ambiente, foi observada redução na contaminação de alimentos por dioxinas. Como consequência, a ingestão diária através dos alimentos também diminuiu. Por exemplo, na Alemanha, em 1991, o consumo médio era de 127,3 pg-TEQ por dia, enquanto que, em 2003 a ingestão para um adulto médio alemão era estimada em 69,6 pg-TEQ por dia. Uma redução expressiva também foi observada em peixes. Em 1991, peixes contribuíam para cerca de 30% da ingestão diária (mesma percentagem para os produtos lácteos e carne), já em 2003 apenas 10% da ingestão diária era devido a essas amostras [5].

Atualmente muitos dados estão disponíveis para as concentrações de PCDD/Fs e PCBs em solos, sedimentos e ar. Biomonitorios, como a vegetação, o leite de vaca, e ovos de algumas espécies de aves, foram aplicados com sucesso para identificar ou monitorar concentrações em ambientes na vizinhança de potenciais fontes pontuais [7]. Devido à preocupação pública sobre dioxinas e furanos, muitos estudos buscam identificar *hotspots* potenciais de contaminação.

Ao avaliar as concentrações de PCDD/Fs e PCBs no meio ambiente, deve-se considerar que algumas matrizes são sensíveis à contaminação de curto prazo, por exemplo, o ar ou a vegetação de curta duração, enquanto outras matrizes, tais como sedimentos e solos, não ocorre acumulação com o tempo. Alguns fatores são importantes para a interpretação dos resultados, por exemplo, no inverno as concentrações de PCDD/Fs no ar podem ser mais elevadas por um fator de 10 vezes em TEQ, em relação ao verão, tempo de exposição (algumas horas ou semanas), localização (area urbana ou rural) e até o tipo de amostragem [7].

O solo é um depósito natural dos compostos orgânicos persistentes e lipofílicos, tais como PCDD/Fs e PCBs, que são adsorvidos ao carbono orgânico do solo e

permanecem relativamente imóveis. Desta forma, o solo torna-se uma matriz ‘acumuladora’, devido ao longo tempo de meia-vida dos congêneres [7].

1.2 Revisão Bibliográfica

1.2.1 Dioxinas, Furanos e PCBs

Dibenzodioxinas policloradas (PCDD, em inglês *polychlorinated dibenzo-p-dioxins*), mais comumente chamadas de dioxinas, consistem em dois anéis aromáticos ligados por dois átomos de oxigênio, podendo conter entre 4 e 8 átomos de cloro ligados aos anéis, gerando mais de 75 compostos ou congêneres. São considerados tóxicos os congêneres que apresentam átomos de cloro ligados nas posições 2, 3, 7 e 8. No meio ambiente, as dioxinas são encontradas como uma mistura de compostos ou congêneres, além de outras substâncias que apresentam estrutura semelhante, mas com diferentes níveis de toxicidade. São os dibenzofuranos policlorados (PCDF, em inglês *polychlorinated dibenzofurans*) e os bifenilos policlorados (PCB, em inglês *polychlorinated biphenyls*) [8]. A Figura 2 mostra a estrutura geral para PCDDs, PCDFs e PCBs.

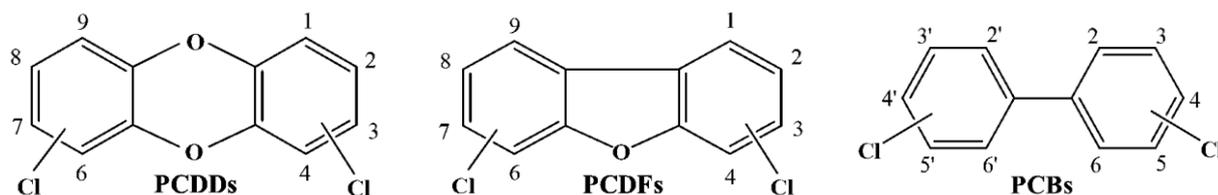


Figura 2: Estruturas químicas de a) PCDDs; b) PCDFs; c) PCBs.

As estruturas químicas dos congêneres estudados neste projeto encontram-se no Anexo I: PCDDs (Figura A. 1); PCDFs (Figura A. 2); dl-PCBs (Figura A. 3); ndl-PCBs (Figura A. 4).

Os PCDD/Fs e PCBs são poluentes orgânicos persistentes (POP) e onipresentes no meio ambiente global. Alguns destes compostos hidrofóbicos e lipossolúveis são altamente resistentes ao metabolismo de espécies vertebradas, incluindo os seres humanos. Como resultado destas propriedades, ocorre biomagnificação e elevadas concentrações podem ocorrer frequentemente em predadores no topo da cadeia alimentar [9].

O tempo de meia-vida do congêneres 2,3,7,8-TCDD (2,3,7,8-Tetracloro-dibenzo-dioxina), considerado o mais tóxico pela Organização Mundial da Saúde (WHO, em inglês World Health Organization), em roedores é de 2-4 semanas [10]. Em seres humanos, o tempo de meia-vida estimado é de 7,2 anos; para os outros congêneres a faixa varia entre 3 e 19,6 anos [11].

1.2.2 Fontes de produção e contaminação

As dioxinas e furanos são subprodutos indesejáveis da queima de matéria orgânica ou processos industriais, ambos na presença de cloro [12].

Os PCBs, diferentemente das dioxinas, foram produzidos intencionalmente durante décadas até 1985, quando foram proibidos o uso e a comercialização após comprovação de sua toxicidade e efeitos biocumulativos. Basicamente, o óleo de PCBs era utilizado como fluido isolante em equipamentos elétricos e hidráulicos ou aditivos de pesticidas. Embora tenham sido banidos na década de 70, ainda é possível encontrar o óleo de PCBs nos equipamentos antigos abandonados ou mesmo no reuso e comercialização ilegal [13].

Devido ao fato de se estender aos mais diferentes locais no meio ambiente, é possível dizer que as dioxinas possuem múltiplas fontes de emissão. A liberação destes congêneres para o meio ambiente possui diferentes rotas e concentrações, dependentes da fonte de produção e emissão.

As rotas de formação das dioxinas e furanos podem ser divididas em duas categorias [14, 15]:

- Processos térmicos: em processos de combustão podem ser formadas pela ligação dos elementos carbono, hidrogênio, oxigênio e cloro, mecanismo conhecido como síntese “*de novo*”, através de precursores, reações de ciclização de hidrocarbonetos ou reações de oxidação de grupos aromáticos. A faixa de temperatura favorável para a formação das dioxinas e furanos é entre 200 e 450 °C, com pico de formação próximo a 300 °C.
- Processos químicos industriais: Em processos industriais de produtos químicos, a formação é favorecida em temperaturas maiores que 150 °C, condições alcalinas, presença de catalisadores metálicos e radiação UV ou através de substâncias que produzem radicais livres.

Segundo a USEPA [16, 17], as principais fontes de emissão de PCDD/Fs compreendem:

- a) Incineração de lixo;
- b) Produção de polpa de papel;
- c) Fabricação de produtos químicos halogenados;
- d) Indústria do PVC;
- e) Produção de cimento;
- f) Processos metalúrgicos;
- g) Crematórios;
- h) Combustão de combustíveis sólidos e líquidos;
- i) Erupções vulcânicas;
- j) Fontes de reserva (solos, processos bioquímicos, fotolíticos, queimadas de florestas e acidentes ambientais).

A presença de dioxinas e furanos após o processo de combustão se deve a três fatores principais [18]:

- Podem estar presentes no material orgânico incinerado e não serem destruídas de modo completo no processo de combustão;
- Precursores clorados, tais como fenóis clorados e clorobenzenos, estariam presentes na fonte;
- Processo de síntese *de novo*, que envolve a combinação de outras substâncias químicas não relacionadas entre si.

Elevados níveis de dioxinas e seus precursores já foram relatados em estudos com incineradores de lixo municipal nos últimos anos. Abad *et al.* (2001) [19] reportou valores em torno de 50 ng TEQ kg⁻¹ de lixo para PCDDs. Neste caso, o modelo do incinerador de lixo, a temperatura da zona de pós-combustão e o tipo de dispositivo de controle da poluição do ar usado para remover os contaminantes do fluxo de gás tornam a combustão controlada, permitindo menor liberação das dioxinas e furanos para o ambiente [11, 16, 17].

Entretanto, incinerações não-controladas, mesmo que em pequena escala, podem contribuir na liberação destes compostos. Um estudo feito por Lemieux *et al.* (2000) avaliou a emissão de dioxinas e furanos decorrentes da queima de lixo doméstico não-controlada em residências dos EUA. Os resultados indicaram que este tipo de queima

libera mais dioxinas e furanos do que incineradores de lixo municipais, devido à combustão incompleta e a composição heterogênea do lixo contendo plásticos, metais, madeira, papéis e matéria orgânica [20].

Outros tipos de lixo quando incinerados também são geradores de dioxinas. Entra nesta lista o lixo hospitalar, por conter parte de órgãos humanos, ataduras, tubos de sangue, tubos de ensaio, agulhas, seringas, cultura de células, tecidos e outros materiais plásticos. A incineração é o meio mais utilizado para o tratamento de resíduos hospitalares em todos os países [21, 22].

A prática de incineração dos subprodutos indesejáveis de processos químicos industriais começou recentemente, como forma de eliminação do lixo. Por exemplo, as indústrias de cimento substituíram os antigos combustíveis comuns por este tipo de lixo para alimentar os fornos a temperaturas entre 1100 e 1500 °C. Dependendo do tipo de indústria da qual provém, este lixo pode ser explosivo, oxidante, altamente inflamável, corrosivo, infeccioso, mutagênico, irritante, tóxico ou carcinogênico. Essas características influenciam na formação das dioxinas [23-25].

A queima da madeira também já foi relatada como fonte de emissão de dioxinas. Um estudo de Lavric *et al.* (2004) encontrou concentração de 945 g TEQ/ano para a queima de lenha, estando de acordo com o Inventário de Emissão da União Europeia [26, 27].

As indústrias de fabricação de polpa e celulose são grandes fontes de poluição ambiental, contaminando rios e lagos próximos às indústrias. As fases para a produção da polpa compreendem: deslignificação, lavagem, branqueamento e extração. Na etapa de branqueamento são utilizados cloro gasoso, hipoclorito, dióxido de cloro, oxigênio, peróxidos e ácido peracético [18, 28].

Das instalações industriais de papel e celulose pode ocorrer a liberação de PCDD/Fs da seguinte forma:

- Ar: através da produção de vapor pela queima da lignina, madeira, cascas ou licor do cozimento.
- Água: branqueamento da polpa em instalações onde é utilizado cloro.
- Produto: o grau de contaminação nos produtos depende da tecnologia utilizada para o branqueamento da polpa.

Relata-se que resíduos gerados a partir de uma fábrica de celulose da China, produz concentrações de dioxinas da ordem de 300 pg TEQ/litro de polpa produzida [29].

Além das possíveis fontes de emissão de dioxinas e furanos citadas acima, os ‘reservatórios’ devem ser consideradas. Devido sua natureza hidrofóbica e persistente no meio ambiente, as dioxinas se acumulam no solo, sedimentos, aterros sanitários, vegetação e matéria orgânica. São então chamados de ‘reservatório’ pela capacidade de redistribuição e circulação destes compostos no meio ambiente.

1.2.3 Efeitos toxicológicos

Segundo a Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC, em inglês, *International Agency for Research on Cancer*) [30], as dioxinas são reconhecidas como substâncias altamente tóxicas aos animais e seres humanos. O congêneres 2,3,7,8-TCDD, após avaliação com dados epidemiológicos em humanos, foi classificado no grupo 3 como “carcinogênico humano conhecido”. No entanto, não afeta o material genético e não há um nível de exposição abaixo do qual o risco de câncer seja negligenciável [30, 31].

Entretanto, há uma discordância entre os comitês europeu e americano quanto à linearidade da correlação entre o limite de exposição e a manifestação de processos carcinogênicos. Para a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (U.S.EPA, em inglês, *United States Environmental Protection Agency*), há linearidade de correlação e, por conseguinte, inexistência de um limite a partir do qual se possa extrapolar um risco potencial de manifestação do câncer. O Comitê Científico da Alimentação Humana da União Europeia e o Comitê de Especialistas em Aditivos Alimentares da WHO, concluíram que na exposição às dioxinas, o câncer é um fenômeno extremo, e este efeito não estaria ligado às ações mutagênicas do DNA, mas antes à imunossupressão [31].

A exposição humana inadvertida ocorre de forma direta (sistema respiratório e contato com a pele) e indireta (solo e alimentos). Atualmente, estudos indicam que cerca de 90% da exposição humana às dioxinas dá-se por meio de ingestão de alimentos, considerada a principal via de contaminação. Diante de uma exposição ocasional a elevadas concentrações, o organismo que absorve estes congêneres nocivos

desencadeia os sintomas rapidamente caracterizando a toxicidade aguda, podendo levar à morte [32, 33].

Um caso bem conhecido deste efeito tóxico ocorreu em 2004, na Ucrânia, quando o então candidato à presidência, Viktor Andriyovych Yushchenko, foi envenenado com o congênere 2,3,7,8-TCDD. Amostras de pele e sangue foram coletadas e analisadas durante os três anos seguintes por um laboratório da Alemanha e dois laboratórios localizados na Holanda. A concentração inicial contida no sangue de Yushchenko foi de 66.000 pg TEQ g⁻¹ de gordura, mais de duas mil vezes o valor normal de uma população sem exposição. A Figura 3 mostra os efeitos da “cloracne” no rosto de Viktor Andriyovych Yushchenko antes e depois da contaminação [34, 35].



Figura 3: Fotografia de Viktor Yushchenko antes (A), 3 meses (B) e 3,5 anos (C) depois da contaminação por 2,3,7,8-TCDD [35].

A exposição prolongada por dioxinas, pode acarretar debilidade do sistema imunológico e alterações dos sistemas nervoso, endócrino, hormonal e reprodutivo. Estes sistemas são os mais sensíveis à ação tóxica dos congêneres substituídos, 2,3,7,8-TCDD e 2,3,7,8-PCDD, os quais apresentaram o mesmo fator de toxicidade. Em crianças, a dose que pode causar efeitos nocivos é até 100 vezes menor do que nos adultos, comprometendo o desenvolvimento físico e mental [30]. A Figura 4 apresenta os principais efeitos tóxicos das dioxinas nos sistemas reprodutivo feminino e masculino de adultos [31].

Um fenômeno descrito após os acidentes de Seveso (Itália, 1976), Yusho (Japão, 1968) e Yucheng (Taiwan, 1979), em que a população foi exposta a níveis altos de dioxinas e PCBs, foi a alteração na relação entre taxas de nascimentos de indivíduos do sexo masculino e feminino, com claro aumento da descendência feminina. No primeiro caso, a taxa normal de natalidade era de 0,51, ou seja, 106/100 entre homens e

mulheres, no período de 1977 a 1996. Após o acidente a taxa verificada foi de 0,31 [36-40].

Foram também estudados 71 homens, os quais tinham cerca de seis anos na época do acidente de Seveso (Itália, 1976). Ao fim de aproximadamente trinta anos da exposição, apresentaram diminuição do número e da mobilidade dos espermatozoides [37].

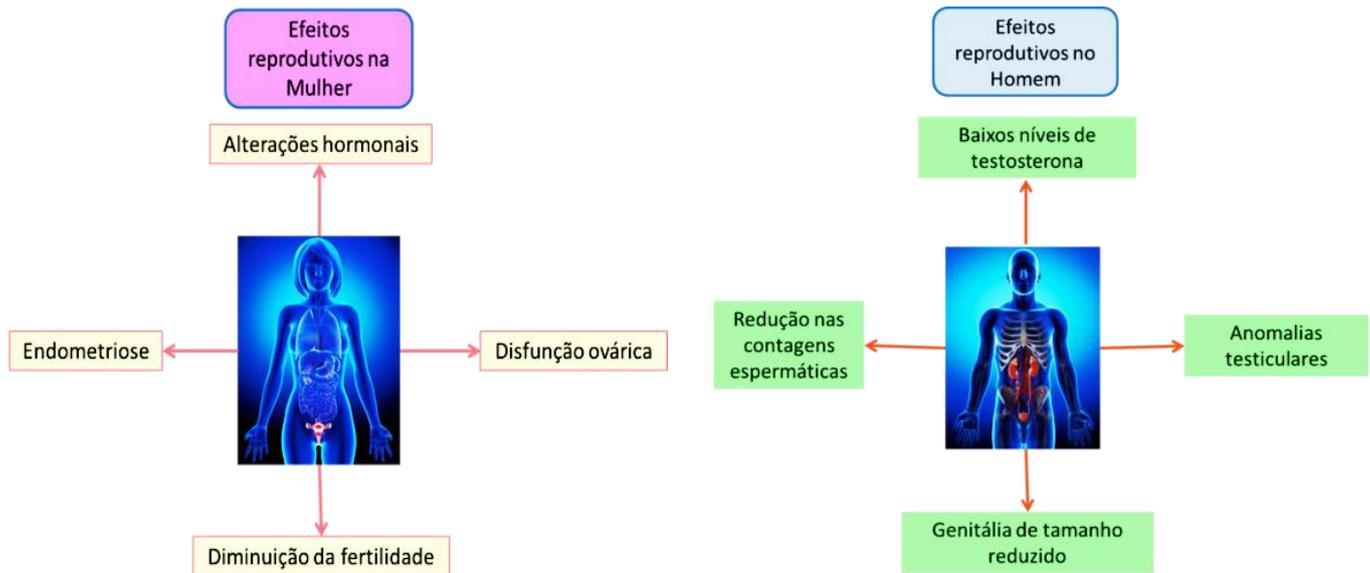


Figura 4: Principais efeitos das dioxinas no sistema reprodutivo humano feminino (a) e masculino (b) [31].

A diferenciação genética pode acarretar diferentes respostas das células às dioxinas para indivíduos de uma mesma espécie [31, 41]. A dose letal do congênere 2,3,7,8-TCDD varia mais do que 5000 vezes, entre uma cobaia mais sensível (porquinho-da-índia) e uma cobaia menos sensível (hamster). Em todas as espécies de mamíferos até agora testadas, as doses letais do congênere mais tóxico, 2,3,7,8-TCDD, resultaram em óbito avançado, precedido de perda de peso corporal excessiva (debilitação) [36]. A Figura 5 apresenta outros possíveis efeitos das dioxinas à saúde humana.

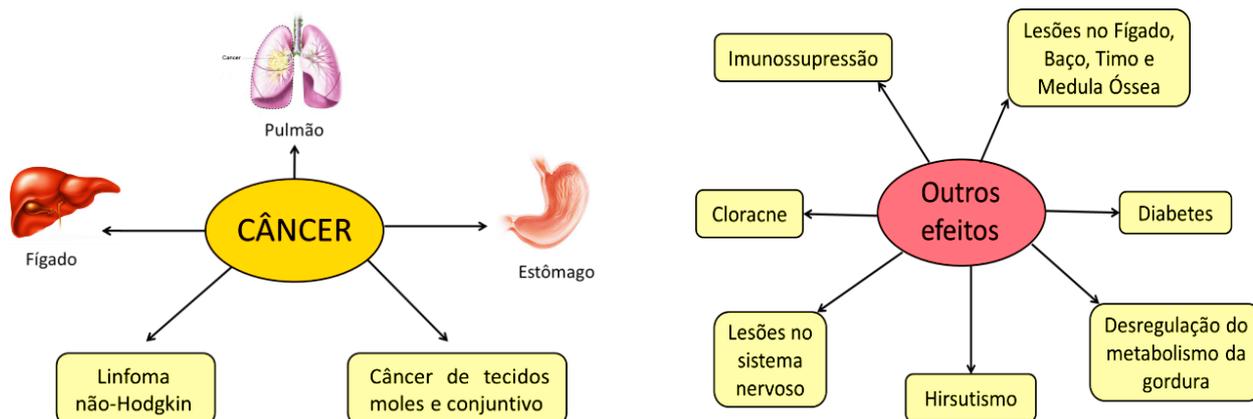


Figura 5: Efeitos principais das dioxinas na saúde humana [31].

Um aumento da taxa de mortalidade por câncer foi observado em indivíduos sujeitos a elevada exposição em determinadas indústrias na Alemanha, Holanda e EUA [36]. Os grupos de trabalhadores industriais estudados estavam expostos aos mesmos fatores de risco e todos apresentaram cloracne, principal efeito da contaminação por dioxinas. No grupo dos EUA, a concentração média do congêner 2,3,7,8-TCDD no sangue era de 2.000 ng kg^{-1} (valor máximo de $32.000 \text{ ng kg}^{-1}$), enquanto que no grupo de trabalhadores afetados da Holanda, a média das concentrações foi da ordem de 1.434 ng kg^{-1} (valores entre $301 - 3.683 \text{ ng kg}^{-1}$). No grupo de trabalhadores estudados da Alemanha que foram expostos ao acidente da BASF, foi detectado um valor médio de 1.008 ng kg^{-1} e, para os trabalhadores da Boehringer, a concentração média foi da ordem de 2.252 ng kg^{-1} [36].

Tais resultados encontrados nestes grupos de indivíduos são equiparáveis com estudos de carcinogenicidade feitos em ratos de laboratório. Em ratos expostos diariamente à 2,3,7,8-TCDD na concentração de $100,0 \text{ ng kg}^{-1}$ de peso vivo, foram observados carcinomas hepatocelulares e carcinomas das células escamosas do pulmão. As concentrações do congêner 2,3,7,8-TCDD encontradas no sangue desses ratos variaram entre 5.000 a $10.000 \text{ ng kg}^{-1}$ de peso corpóreo. Estes estudos revelam que existe paralelismo na resposta carcinogênica à exposição da 2,3,7,8-TCDD em humanos e em ratos [36].

1.2.4 Fatores de toxicidade

Surgiu então a necessidade de estabelecer e padronizar mundialmente os valores de potencial de toxicidade de todos os congêneres de PCDDs, PCDFs e dl-PCBs,

relativos ao congênere mais potente, 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina (2,3,7,8-TCDD). Esta conversão é baseada na concepção de que todos os congêneres considerados tóxicos apresentam semelhante efeito qualitativo porque se ligam ao mesmo receptor celular, mas com intensidades tóxicas diferentes. Os PCBs indicadores, também conhecidos como “PCBs marcadores” e pouco tóxicos, porém sua presença é um indicador de que os congêneres tóxicos de PCDD/Fs e PCBs podem estar em uma determinada amostra.

Utilizando-se o efeito potencial relativo (REP, em inglês *Relative Effect Potency*), é possível estimar o fator de toxicidade de um congênere (TEF, em inglês *Toxic Equivalency Factor*), relativo à toxicidade do 2,3,7,8-TCDD, considerada a dioxina mais tóxica, e que assume o valor de TEF igual a 1 [42].

Desde o início de 1990, a World Health Organization (WHO) tem promovido encontros de especialistas em contaminantes e segurança alimentar, com o objetivo de redefinir e organizar os valores de TEF. O documento revisado em 2005, quando houve a última alteração dos valores citados. Encontra-se na Tabela 1 os valores estabelecidos em 1998 e atualizados em 2005 a última revisão [9, 43].

Logo, a toxicidade equivalente (*TEQ*, em inglês, *Total Equivalent*) consiste na soma dos produtos entre a concentração de cada congênere multiplicado pelo seu respectivo TEF. Seu valor é uma estimativa do total da atividade tóxica equivalente ao congênere 2,3,7,8-TCDD, para a mistura dos congêneres [9].

O cálculo da toxicidade total é determinado pela expressão matemática:

$$\text{Toxicidade Equivalente (TEQ)} = \sum(C \times \text{TEF})$$

Onde, C = Concentração individual de cada congênere; TEF = Fator de toxicidade equivalente.

Tabela 1: Valores de TEF estabelecidos em 1998 e reavaliados em 2005 pela WHO.

Congêneres	TEF	
	WHO 1998	WHO 2005 ^a
PCDDs		
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
PCDFs		
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
NO-PCBs		
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
MO-PCBs		
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

^a Os valores em negrito sofreram alteração,

1.2.5 Legislação

As dioxinas emitidas para a atmosfera podem se depositar no solo, nas plantas ou na água, e serem ingeridas pelos animais do meio (bovinos, suínos, aves e peixes) se acumulando na gordura corporal e, desta forma, entrando na cadeia alimentar. Para diminuir a exposição humana aos congêneres de PCDD/Fs e dl-PCBs, deve-se reduzir seus níveis em alimentos, uma vez que o homem ocupa o topo da cadeia alimentar e adquire a maior parte da contaminação via oral [16-18].

Nas últimas duas décadas, a comunidade internacional apelou para ações globais urgentes a fim de reduzir e/ou eliminar a emissão de dioxinas, furanos e PCBs para o meio ambiente. À semelhança de outros poluentes orgânicos persistentes, as dioxinas, os furanos e os PCBs propagam-se através das fronteiras internacionais e constituem uma ameaça para o ambiente e para a saúde humana em escala mundial.

Esta preocupação generalizada reflete-se na Convenção de Estocolmo sobre poluentes orgânicos persistentes (POPs), bem como no protocolo de 1998 relativo aos POPs, no âmbito da Convenção sobre a Poluição Atmosférica Transfronteiriça a Longa Distância da Comissão Econômica das Nações Unidas para a Europa [44].

Em 24 de outubro de 2001, a união europeia através do Comitê Econômico e Social, que estabeleceu uma estratégia comunitária em matéria de PCDD/Fs e PCBs, dividida em duas partes: uma parte inclui ações para reduzir a presença desses congêneres no ambiente; a outra, ações para reduzir a presença destes compostos na alimentação animal e humana [12].

Para que a União Europeia pudesse programar na íntegra as obrigações decorrentes dos dois instrumentos internacionais foi adotado, em 2004, o Regulamento (CE) n.º 850/2004 relativo a poluentes orgânicos persistentes [45]. Este documento exige que os Estados-Membros da União Europeia estabeleçam inventários nacionais de liberação destes subprodutos indesejáveis e que identifiquem as medidas para combater sua propagação.

A estratégia para reduzir a presença de dioxinas e PCBs nos alimentos previa a tomada de uma série de medidas legislativas relativas aos alimentos para consumo humano e animal e se baseava em três principais vetores:

– Estabelecimento de níveis máximos praticáveis para a alimentação humana e animal;

– Estabelecimento de níveis de ação funcionando como mecanismo de “alerta rápido” de índices de dioxinas nos alimentos superiores aos desejáveis;

– Estabelecimento de níveis-alvo, no tempo, para que a exposição de uma grande parte da população europeia recue para os limites recomendados pelos comitês científicos.

Com a publicação da Recomendação da Comissão 2004/705/CE, de 11 de outubro de 2004, estabeleceu-se o programa relativo ao monitoramento dos níveis de base de PCDDs, PCDFs e dl-PCBs nos gêneros alimentícios, tendo determinado para cada estado-membro, a quantidade mínima de amostras a se analisar anualmente, devendo essa quantidade ser revista todos os anos em função dos resultados e da experiência adquirida.

O Regulamento (CE) n° 1881/2006 da Comissão, de 19 de dezembro de 2006, fixa os teores máximos de contaminantes presentes em gêneros alimentícios, incluindo os PCDD/Fs, dl-PCBs e seus somatórios em TEQ [46].

O Regulamento (CE) n° 1259/2011 da Comissão de, 2 de dezembro de 2011, altera o Regulamento (CE) n° 1881/2006 no artigo 7°, no que se refere os teores máximos para as dioxinas, dl-PCBs e PCBs não semelhantes a dioxinas nos gêneros alimentícios, passando a haver dois teores máximos, um resultante do somatório dos PCDDs e PCDFs, expresso em equivalente tóxico (PCDD/F-TEQ-OMS) com base nos TEF-OMS (fatores de toxicidade equivalentes 2005 da OMS), e o teor máximo para o somatório dos PCDD/Fs e dl-PCBs ($\Sigma(\text{PCDD} + \text{PCDF} + \text{PCBs})$) expresso em equivalente tóxico (PCDD/F-dl-PCB-TEQ-OMS), com base nos TEF-OMS (fatores de toxicidade equivalentes 2005 da OMS). Para aves são permitidos 3,0 pg TEQ/g de gordura, ovos de galinha 5,0 pg TEQ/g de gordura e óleos e gorduras vegetais 1,25 pg TEQ/g de gordura [47].

No Brasil, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) é o órgão nacional responsável pela gestão das políticas públicas de estímulo à agropecuária, pelo fomento do agronegócio e pela regulação e normatização de serviços vinculados ao setor.

O Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC) tem como função básica regulamentar o controle e a vigilância. As ações do PNCRC estão direcionadas para se conhecer e evitar a violação dos níveis de segurança ou dos limites máximos de resíduos (LMR) de substâncias autorizadas. Aplica-se também à ocorrência

de quaisquer níveis de resíduos de compostos químicos de uso proibido no país, com o objetivo de promover a garantia de qualidade do sistema de produção de alimentos de origem animal ao longo das cadeias produtivas.

O PNCRC foi instituído pela Portaria Ministerial nº 51, de 06 de maio de 1986 e adequado pela Portaria Ministerial nº 527, de 15 de agosto de 1995. As diretrizes, programas, planos de trabalho e ações correspondentes constam no Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em Produtos de Origem Animal (PNCRC/Animal), instituído pela Instrução Normativa SDA N.º 42, de 20 de dezembro de 1999.

CAPÍTULO 2

2 EXPERIMENTAL

2.1 Amostras

O tratamento das amostras foi realizado seguindo métodos previamente desenvolvidos e validados [48] ou métodos padrão [49] ou com base em critérios da União Europeia através dos Regulamentos No. 252/2012 [50] e 152/2009 [47] para o controle oficial de generos alimentícios para humanos e animal [51].

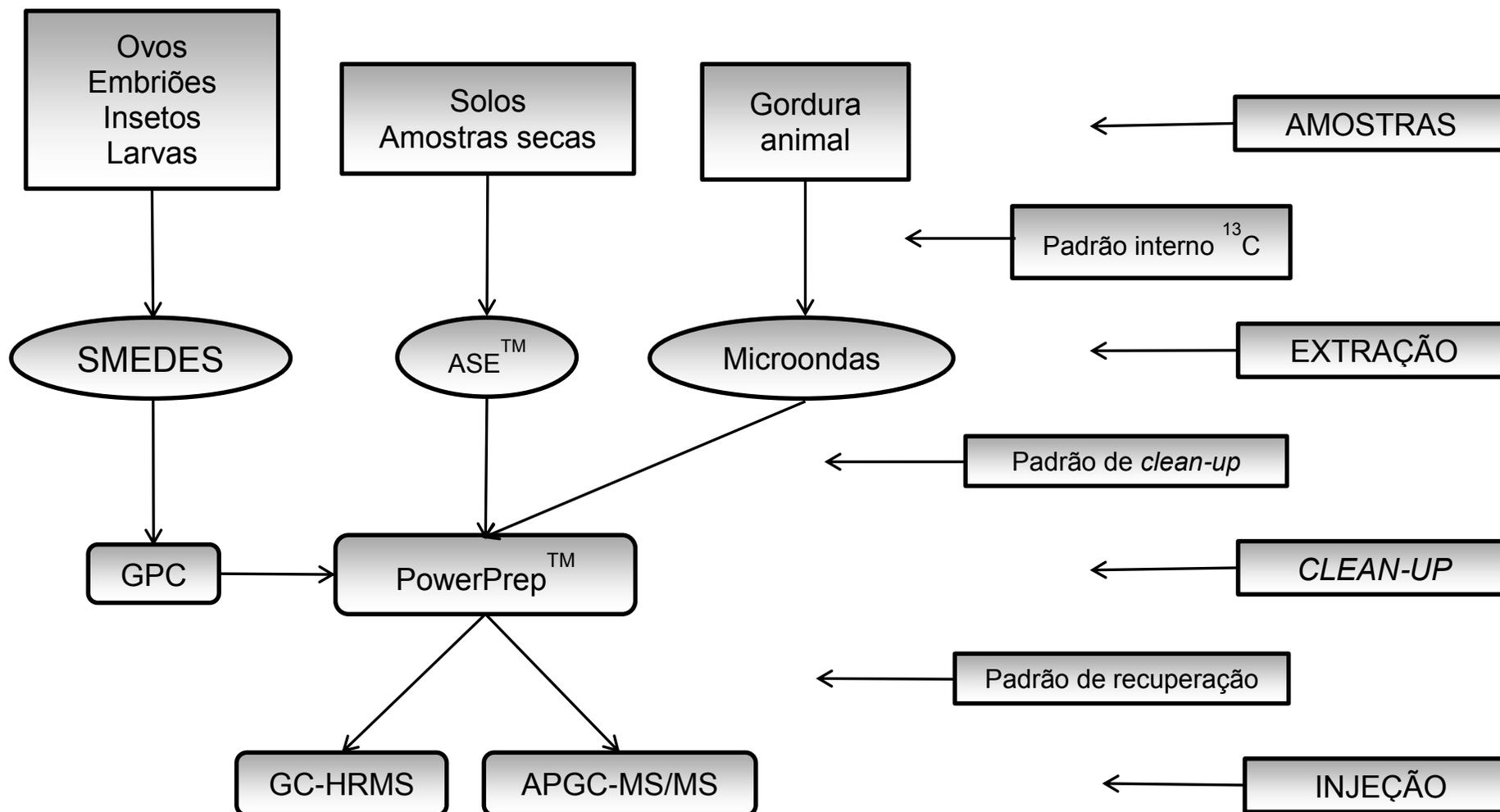
Desta forma, no tópico a seguir será descrito o procedimento de análise comum a todas as amostras, enquanto que as particularidades das amostras coletadas em cada projeto, serão discutidas em seus respectivos capitulos.

2.2 Preparo de Amostras

As amostras analisadas foram previamente fortificadas com padrões internos marcados (^{13}C), seguido pelo método de extração manual ou automatizado. O extrato passou por duas etapas de *clean-up* (GPC e *PowerPrep*) antes de ser concentrado para injeção no equipamento GC-HRMS e APGC-MS/MS. Foram utilizados injetores *splitless* e o sistema PTV (*Programmed Temperature Vaporizer*). A quantificação foi feita por diluição isotópica.

O fluxograma da Figura 6 apresenta todas as etapas envolvidas durante a determinação de dioxinas, furanos e PCBs nas amostras gerais, até a injeção no sistema GC-HRMS ou APGC-MS/MS.

Figura 6: Fluxograma esquemático de todas as etapas envolvidas na análise de dioxinas, furanos e PCBs por GC-HRMS.



2.3 Padrões e reagentes

As misturas de padrões nativos (^{12}C) e marcados (^{13}C), ED-906-B-5, ED-980, EF-909-B-5, EF-982, ED-998, EF-999, ED-911, ED-907, EC-4187, EC-4188, EC-4058, EC-4986, EC-4987, e EC-5179 foram fornecidas pela Cambridge Isotope Laboratories (Tewksbury, MA, USA).

O material de referência interno, óleo de girassol (299520), utilizado como amostra-controle de rotina, foi fortificado no laboratório RIKILT com 0,92 pg TEQ-PCDD/Fs g^{-1} ; 0,79 pg TEQ-dl-PCBs g^{-1} e 16 ng g^{-1} para a soma dos 6 congêneres de ndl-PCBs.

Os tempos de retenção do sistema cromatográfico para os congêneres nativos (^{12}C) e marcados (^{13}C) estão apresentados na Tabela A. 1. Na Tabela A. 2 estão as informações referentes aos reagentes utilizados em todas as análises. Na Tabela A. 3 encontra-se descrito como as amostras-controle foram preparadas para análise.

2.4 Extração

Dois métodos de extração adequados para as amostras estudadas foram utilizados, protocolo SMEDES (através do Ultraturrax) e Extração por Líquido Pressurizado (utilizando o equipamento ASE 350[®]). Antes das extrações, foram adicionados os padrões internos marcados ^{13}C para dioxinas (PCDDs), furanos (PCDFs), dl-PCBs (não-orto e mono-orto) e ndl-PCBs. A descrição de todas as soluções padrão de PCDD/Fs e PCBs encontra-se no ANEXO II – CÁLCULOS.

2.4.1 Protocolo SMEDES

O método SMEDES foi desenvolvido por Foppe Smedes para extração de gordura das amostras sem a utilização de solvente orgânico clorado [52]. As dioxinas com características lipo solúveis e bioacumulativas, por sua vez, são extraídas juntamente com a gordura. Para amostras que não contém gordura, como solo ou grama, recomenda-se utilizar a extração com líquido pressurizado. A Figura 7 apresenta o fluxograma com todas as etapas do método SMEDES.

São adicionados dois padrões internos marcados ^{13}C :

- 500 μL de ^{13}C -DIOXNOP-2 contendo a mistura de ^{13}C -PCDD/Fs e ^{13}C -NO-PCBs, de concentração 0,100 pg μL^{-1} em tolueno.

- 500 μL de ^{13}C -MOPIP-2 contendo a mistura de ^{13}C -MO-PCBs e ^{13}C -ndl-PCBs, de concentração 2,000 $\text{pg } \mu\text{L}^{-1}$ em iso-octano.

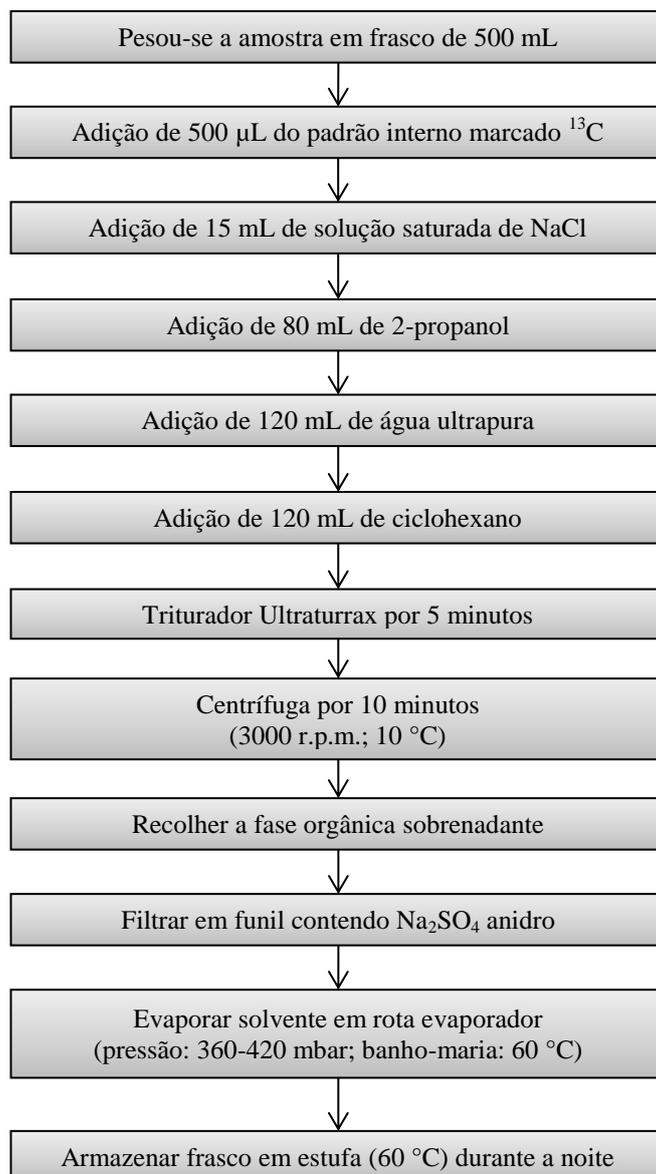


Figura 7: Fluxograma esquemático para o método SMEDES [52].

As etapas de adição de 120,0 mL de ciclohexano, 5 minutos de ultraturrax, centrifugação com recolhimento do sobrenadante e adição no funil de Na_2SO_4 anidro, foram repetidas três vezes mantendo-se a fase aquosa no frasco. Após evaporação do solvente no evaporador rotatório, os extratos permaneceram na estufa (60 °C) durante a noite para evaporação total do solvente. Para o cálculo do teor de gordura para cada amostra, todos os frascos coletores foram previamente pesados antes da extração e após a evaporação do solvente na estufa (Figura A. 5).

2.4.2 ASE 350

Patenteado pela empresa americana Thermo Fisher Dionex (Sunnyvale, EUA), o equipamento ASE 350 (*Accelerated Solvent Extraction*) foi utilizado para a extração com líquido pressurizado (ELP), de amostras que não contem gordura (ex. solo e grama). Na Figura A. 6, estão as figuras ilustrativas de todas as etapas descritas no fluxograma da Figura 8, referentes ao método de extração por líquido pressurizado.

As amostras depois de homogeneizadas foram transferidas quantitativamente do béquer para as células do ASE com solvente tolueno e levadas ao equipamento. O instrumento inicia o aquecimento do forno até 100 °C, enquanto a célula contendo a amostra é carregada para dentro do forno. É injetado solvente (Tolueno/Etanol 1:1) na célula até que a pressão interna atinja 1500 psi permanecendo estático por 15 minutos e três repetições, com purga de 240 segundos e lavagem a 90% de volume.

O extrato final foi transferido quantitativamente com solvente tolueno para o funil contendo Na₂SO₄ anidro. Após evaporação do solvente no evaporador rotatório, os extratos permaneceram na estufa (60 °C) durante a noite para evaporação total do solvente.

2.5 Clean-up

Amostras ambientais e de alimentos (humano ou animal) constantemente necessitam de etapas de purificação (*clean-up*) após a extração, para remoção de interferentes da matriz que possam comprometer a identificação e a determinação quantitativa dos congêneres PCDD/Fs e PCBs.

Foram utilizados dois procedimentos de *clean-up* para as amostras deste estudo, GPC (*Gel Permeation Chromatography*) e o sistema automatizado de colunas cromatográficas PowerPrep™ (Fluid Management Systems, Waltham, MA, USA), ambos regulamentados em documento oficial do Instituto RIKILT [53].

O sistema GPC foi utilizado apenas para as amostras do projeto chasco-cinzeno, a fim de garantir a remoção dos interferentes de matrizes pouco conhecidas para análises de dioxinas.

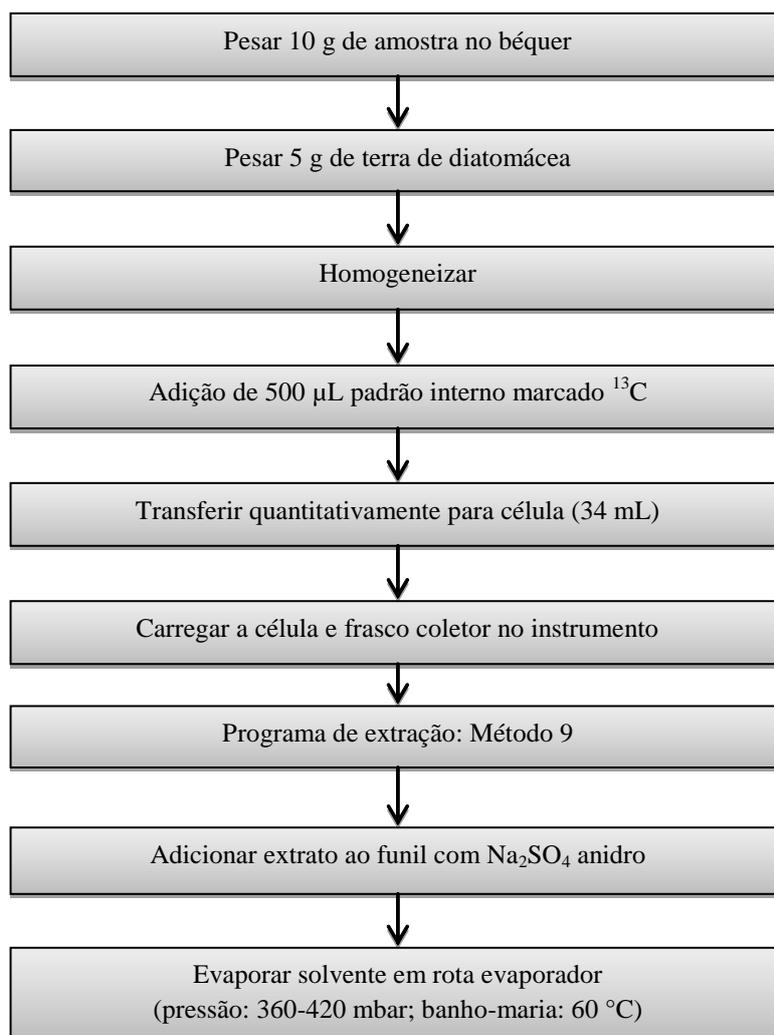


Figura 8: Fluxograma esquemático do preparo de amostra para o método de extração com líquido pressurizado utilizando ASE 350.

2.5.1 GPC

A etapa do GPC (*Gel Permeation Chromatography*) ocorre após evaporação de todo solvente do extrato obtido pelos métodos SMEDES ou ASE. Por esta técnica, é possível separar as moléculas dos congêneres de interesse (PCDD/Fs, dl-PCBs e ndl-PCBs) que possuem massa molecular entre 200 e 500 g mol⁻¹, de moléculas maiores como gordura, óleo e polímeros.

O GPS (Figura A. 7) consiste em uma bomba de HPLC (Gilson, Model 305), um *autosampler* (Gilson, Model 231) equipado para aspirar e injetar 12,5 mL da solução-amostra e um coletor de fração (Gilson, Model 202) adaptado para coletar frações de até 300 mL.

A permeação em gel é o modo de separação que ocorre com os grânulos de Bio-Beads S-X3. Compostos maiores do que os limites de exclusão molecular passam através da coluna sem impedimentos, enquanto que os compostos pequenos, dentro do intervalo de restrição peso molecular, serão retidos na coluna. Os pequenos compostos permeiam pelos poros das esferas Bio-Beads S-X3 e, assim, demoram mais tempo para atravessar a coluna. A Figura 9 apresenta o esquema funcional da purificação por GPC.

Após filtração em Na_2SO_4 anidro e posterior evaporação do solvente, o resíduo do extrato da amostra presente no frasco coletor é transferido quantitativamente para uma proveta de 25 mL utilizando a mistura de ciclohexano/acetato de etila (1:1) até completar o volume de 15,0 mL, onde é homogeneizado e, em seguida, armazenado em frasco com septo apropriado para a injeção no GPC.

A solução-amostra é aspirada pela bomba do GPC e eluída através da coluna com a mistura de solvente ciclohexano/acetato de etila (1:1), até que sejam coletados 200 mL de solução-amostra. Foi utilizada uma coluna modelo Spectrum (60 cm x 2,5 cm) e empacotada com Biobeads S-X3 (composição: grânulos de copolímero de estireno divinilbenzeno, 3% de reticulação, 200-400 Mesh).

O extrato coletado é transferido para tubos de vidro e levado para o equipamento *turbovap* para evaporação do solvente com fluxo de N_2 e banho-maria a 40 °C com volume final de 0,5 mL. A amostra concentrada é transferida quantitativamente (solvente hexano) para proveta até completar 25 mL, adicionado padrão de *clean-up* CS-1 (50 μL $^{37}\text{Cl}_4$ -2,3,7,8-TCDD em tolueno) e homogeneizada para a próxima etapa de purificação.

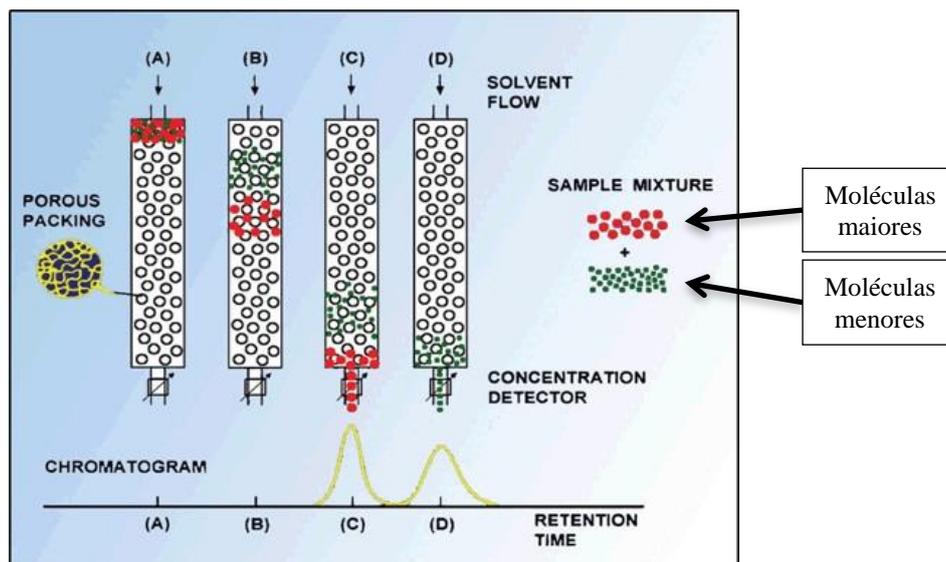


Figura 9: Modelo esquemático do mecanismo de gel permeação por GPC [54].

2.5.2 PowerPrep™

A técnica de purificação automatizada chamada PowerPrep™ (Fluid Management Systems, Waltham, MA, USA) (Figura A. 8) consiste na sequência de colunas cromatográficas (Figura 10), por onde o extrato é eluído por combinação de solventes. Todo o processo de transferência do extrato para o interior do sistema, bem como a eluição dos solventes, se dá por mecanismo automatizado de bombas coordenadas através de um *software* com programação definida.

Foram utilizadas quatro colunas produzidas pelo próprio fabricante, coluna de sílica ácida, coluna sílica ácida/sílica neutra (50% de cada), coluna de alumina básica e coluna de carvão (carvão/celite 1:1).

Para a eluição do extrato, o instrumento utiliza dois solventes (hexano e tolueno) e duas misturas de solventes (hexano/diclorometano (1:1 v/v) e acetato de etila/tolueno (1:1 v/v), em combinação com as colunas cromatográficas descritas. Após o término, as colunas são descartadas e o sistema passa por processo de limpeza com solventes, em todas as bombas e conexões, para a próxima amostra.

Dentre as 24 etapas da programação do PowerPrep pelo método para dioxinas, no passo 14 a amostra é aspirada a 5 mL min^{-1} e eluída pelas colunas de sílica ácida e sílica ácida/neutra com solvente hexano. No passo 17 ocorre a coleta da fração A contendo mono-orto PCBs (MO-PCBs) e PCBs não na forma de dioxinas (ndl-PCBs) em solvente hexano/diclorometano (1:1); no passo 23 ocorre a coleta da fração B contendo PCDD/Fs e NO-PCBs em solvente tolueno.

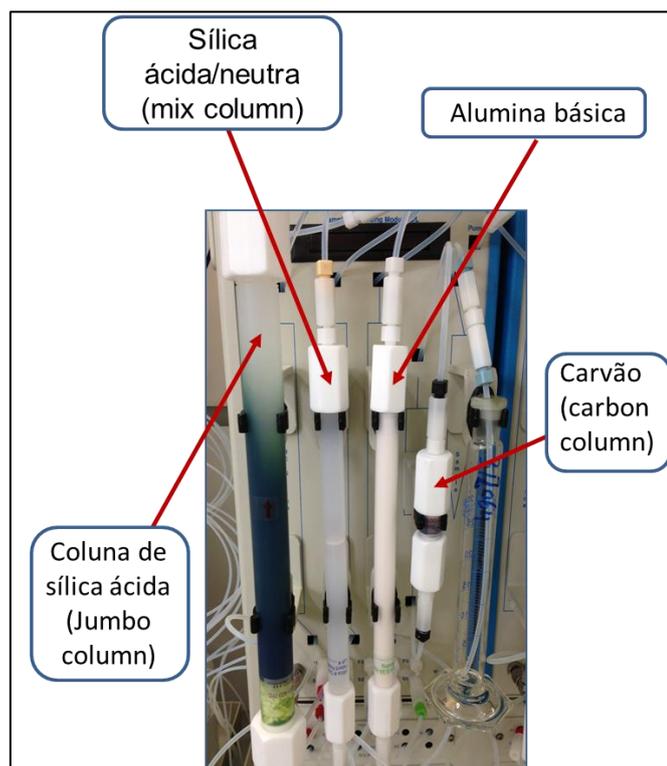


Figura 10: Módulo do equipamento PowerPrep mostrando as quatro colunas de purificação (Fonte: Igor C. Pussente).

Estas frações são coletadas diretamente nos tubos apropriados com volume final de 0,5 mL e levadas para o turbovap para concentração por evaporação do solvente com fluxo de N₂ e banho-maria a 40 °C. Após evaporação até o volume final (0,5 mL), são adicionados os padrões de recuperação respectivos às frações A e B.

Fração A	100 µL TCDD-RS-VI (iso-octano)	25 pg µL ⁻¹ de ¹³ C-1,2,3,4-TCDD
Fração B	100 µL DIOX-RS-I (tolueno)	1 pg µL ⁻¹ de ¹³ C-1,2,3,4-TCDD 1 pg µL ⁻¹ de ¹³ C-2,3,4,6,7,8-HxCDF

Depois da adição dos padrões, os tubos são lavados com os solventes respectivos a cada padrão, homogeneizados no vortex e seguem novamente para o turbovap para concentração final. São transferidos 400 µL da solução-amostra para o frasco adequado, rotulado, vedado e armazenado em geladeira a -5 °C aguardando a injeção no equipamento GC-HRMS.

2.6 Instrumental de análise

O presente estudo é dividido em três projetos, no Capítulo 3 foi desenvolvido o estudo de caso do chasco-cinzeno e a influência da contaminação por dioxinas e seus congêneres na reprodução; no Capítulo 4, a análise de PCDD/Fs e PCBs em amostras de solo na cidade de Belo Horizonte/MG utilizando as técnicas GC-HRMS; no Capítulo 5, o desenvolvimento de novo método de análise de PCDD/Fs e PCBs utilizando a técnica APGC-MS/MS comparada com o atual GC-HRMS.

Neste tópico serão descritas as condições e métodos utilizados no cromatógrafo a gás comum em ambas as técnicas, e as informações mais relevantes do espectrômetro de massas de alta resolução (HRMS). No Capítulo 5 será descrito com mais detalhes o sistema APGC-MS/MS para efeito comparativo.

2.6.1 Cromatografia a Gás (GC)

Para permitir melhor comparação das técnicas de detecção GC-HRMS e APGC-MS/MS na análise de PCDD/Fs e PCBs, o método disposto no cromatógrafo a gás (método de injeção, coluna capilar e programas de temperatura) foi igual em ambos os instrumentos, porém a técnica APGC-MS/MS será mais detalhada no Capítulo 5. Utilizou-se a coluna capilar de sílica fundida DB-5MS (60 m x 0,25 mm x 0,25 μm) de composição 5% fenil-metil polisiloxano da Agilent J&W (Folson, EUA) e gás hélio (pureza 6,0) como gás transportador a fluxo constante de 1,2 mL min^{-1} .

Os dois instrumentos (GC-HRMS e APGC-MS/MS) foram equipados com o cromatógrafo a gás Agilent 6890 (Santa Clara, EUA), um amostrador automático PAL da CTC (Zwingen, Suíça), e diferem apenas no injetor. Para o instrumento GC-HRMS, foi utilizado um injetor CIS-3 PTV (*Programmed Temperature Vaporization*) da Gerstel (Mülheim an der Ruhr, Alemanha) com CO_2 para resfriamento criogênico. Já para o instrumento APGC, utilizou-se um injetor CIS-4 PTV da Gerstel (Mülheim an der Ruhr, Alemanha) com resfriamento UPC (*Universal Peltier Cooling*) da Gerstel (Mülheim an der Ruhr, Alemanha).

Para PCDD/Fs e NO-PBCs, 100 μL de extrato foram injetados em *liner* de vidro (Gerstel, Mülheim an der Ruhr, Alemanha) no modo de ventilação de solvente com velocidade de 0,95 mL s^{-1} , a 70 °C de temperatura, e vent-pressão de 0 kPa, resultando em uma pressão final de ~15 kPa, necessária para alcançar o fluxo de 100 mL min^{-1} com tempo de ventilação de 2,2 min no injetor PTV. Após o tempo inicial de 2,25 min,

a temperatura do PTV aumentou para 280 °C (720 °C min⁻¹) e mantida durante toda a corrida cromatográfica. A temperatura inicial do forno foi de 110 °C e manteve-se por 3 min, em seguida houve aquecimento a 20 °C min⁻¹ até 200 °C, depois aquecimento a 4 °C min⁻¹ foi aplicada até 280 °C mantendo-se por 7,5 min. Por fim, aquecimento a 10 °C min⁻¹ até 320 °C mantendo-se durante 8 min, totalizando 47 minutos.

Para os MO-PCBs e ndl-PCBs, 2 µL foram injetados no modo *splitless* a 280 °C. A temperatura inicial do forno foi de 110 °C e manteve-se por 3 min, logo após aqueceu a 20 °C min⁻¹ até 200 °C, e em seguida, aquecimento a 4 °C min⁻¹ foi aplicada até 300 °C mantendo-se por 10 min, totalizando 42,5 minutos.

2.6.2 HRMS (Espectrômetro de Massas de Alta Resolução)

O sistema GC-HRMS é baseado no método EPA 1613 [55], calibrado na resolução 10000 a 10% da altura do pico, previamente antes de cada sequência.

Para todas as análises de PCDD/Fs e PCBs discutidas neste estudo, foi utilizado um espectrometro de massas de alta resolução HRMS Autospec da Waters (Manchester, UK). As configurações de origem foram otimizados na instalação, fixando em 0,75 Da a resolução dos quadropolos, 2 µA a corrente de corona com uma voltagem do cone de 70 V e uma temperatura da fonte de 150 °C. O fluxo de gás de cone foi de 225 L h⁻¹, 220 L h⁻¹ para o fluxo de gás auxiliar, 0,12 mL min⁻¹ para o fluxo de gás de colisão e o fluxo de gás nebulizador ajustado em 4 bar de pressão.

Os dados foram processados e quantificados usando o *software* Masslynx TargetlynxTM (Waters, Manchester, UK). O limite de quantificação (LQ) foi calculado como múltiplo do valor quadrático médio do sinal/ruído (S/N) medidos a partir da base do pico cromatográfico. Os fatores utilizados foram, 10 (PCDD/Fs), 20 (dl-PCBs) e, devido à contribuição em branco, 50 (PCB 118), 100 (PCB 77) e 300 (ndl-PCBs).

CAPÍTULO 3

DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE CONTAMINAÇÃO POR DIOXINAS DA AVE MIGRATÓRIA CHASCO-CINZENTO: CORRELAÇÕES COM A CADEIA ALIMENTAR E O HABITAT.

3 PROJETO CHASCO-CINZENTO – HISTÓRIA E JUSTIFICATIVA

O chasco-cinzento (*Northern Wheatear*, em inglês) é uma ave insetívora e o único membro do gênero *Oenanthe* que atravessa a rota *circumboreal*: do leste do Canadá através da Eurásia para o Alasca ocidental e, a partir do nível do mar na tundra ártica até as encostas das montanhas turcas, a mais de 4000 m de altitude [56]. A maioria dos indivíduos da espécie passam o inverno da África, o que significa que aves que nidificam no Alasca tem de voar 14.500 km e voltar novamente. Dependendo da latitude, podem ocorrer uma ou duas ninhadas por ano, cada uma com cerca de 5 ovos [57].

A população do chasco-cinzento diminuiu 63% desde 1990 [58]; no entanto, a população global não está ameaçada até o presente [59]. Na Holanda, o chasco-cinzento caiu de 1900-2500 casais reprodutores (1980) para 260-290 casais reprodutores em 2012 [60], mesmo habitando em reservas naturais, sem a interferência direta da expansão de cidades, rodovias, áreas industriais ou pelas mudanças na gestão agrícola, como já comprovado para outras espécies [61].

Para uma inspeção mais detalhada, foram coletados 9 ovos não-fecundados sem danos estruturais e 3 embriões que não atingiram a fase adulta, nas áreas de Vogelduin e Aekingerzand, ao norte da Holanda.

Os ovos apresentaram a gema dura, diferentemente do que se vê em ovos normais, onde a gema escorre líquida ao se perfurar a membrana que a retém. Nos embriões observou-se o desenvolvimento da membrana amniótica além dos seus limites normais: o âmnio havia tornado-se mais viscoso, perdeu a sua transparência e cresceu pelas na cavidade amniótica (Figura A. 10).

Tais anomalias podem surgir, quer devido a doenças genéticas ou devido a presença de fatores que erroneamente estimulam a transcrição do DNA. As dioxinas e PCBs são

conhecidos por características que imitam os hormônios e interferem nos receptores hormonais e na transcrição do DNA [62-64].

Com base nos indícios observados anteriormente, somados aos dados das últimas duas décadas, que vão muito além deste estudo, decidiu-se por avaliar os níveis de contaminação de PCDD/Fs e PCBs em amostras correlacionadas com a sua nidificação e reprodução em território holandês: solo, embriões, ovos não-fecundados e insetos de sua cadeia alimentar.

3.1 Objetivos

Aplicar métodos desenvolvidos e validados no instituto RIKILT, no tratamento de amostras de alimentos (humana e animal) e ambientais para análise dos congêneres tóxicos de PCDD/Fs e dl-PCBs, e ndl-PCBs, em amostras relacionadas à ave migratória chasco-cinzento.

3.1.1 Objetivos específicos

- Utilizar a técnica GC-HRMS (Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas de Alta Resolução) para análise quantitativa de 7 PCDDs, 10 PCDFs, 12 dl-PCBs e 6 ndl-PCBs em:
 - Ovos e embriões do chasco-cinzento coletados na Holanda e Suécia, respectivamente.
 - Insetos (besouros, gafanhotos, mosquitos, larvas ‘rups’ e larvas ‘ritnaald’) que compõem parte da cadeia alimentar do chasco-cinzento.
 - Solo de diferentes áreas de preservação da Holanda, onde há maior índice de nidificação.
 - Identificar uma possível via de contaminação da ave chasco-cinzento para os congêneres mais tóxicos de PCDD/Fs, dl-PCBs e ndl-PCBs.
 - Correlacionar os perfis dos congêneres de PCDD/Fs e dl-PCBs entre as amostras estudadas em possíveis vias de contaminação do chasco-cinzento.

3.2 Amostras coletadas - Chasco-cinzento

Para o estudo de avaliação da bioacumulação de dioxinas na cadeia alimentar do chasco-cinzento foram analisadas amostras de ovos e embriões, que tiveram falhas durante a formação (não fecundaram ou morreram antes da fase adulta), além de amostras de solo, insetos e larvas, que compõem o cenário ambiental onde o chasco-cinzento vive na Holanda durante sua estadia de reprodução. Todas as amostras foram coletadas pela equipe responsável da Universidade de Nijmegen (Holanda). Todas as amostras permaneceram refrigeradas a -20

°C até o momento da análise. Na Figura A. 11 encontram-se os registros fotográficos das amostras analisadas.

3.2.1 Solo

Localizadas na costa oeste da Holanda, se encontram grandes formações em dunas com vegetação rasteira e escassa. O chasco-cinzento possui o hábito de construir seus ninhos em tocas abandonadas de outros animais ou troncos de árvores caídos e este ambiente de dunas torna-se favorável para sua nidificação e reprodução.

Foram selecionadas três regiões do oeste da Holanda para amostragem de solo no presente estudo, Vogelduin (AWD), Aekingerzand (AEK) e Dun (Dun).

Vogelduin, pertencente ao Noord-Hollands Dune Reserve, possui 5300 ha de dunas na costa e parte da área é utilizada para a produção de água potável que abastece as províncias do Norte da Holanda. A segunda região, Aekingerzand, faz parte do Parque Nacional Drents-Friese Wold, com 6000 ha de dunas e fica a 120 km para o continente. Ambas pertencem à lista de reservas naturais do Natura2000, com mais de 160 parques (1,1 milhões de hectares totais, 69% constituído por água). Este é um órgão responsável pela preservação e gestão das áreas, com o objetivo de reverter o declínio da biodiversidade. Ambas são catalogadas como áreas de grande incidência de ninhos do chasco-cinzento e cruzam a rota migratória da ave durante seu ciclo [60].

Durante o programa de monitoramento detalhado da população da ave na Holanda entre 2008 e 2013, percebeu-se uma queda média de 20% (11-27%) no número de ovos que fecundaram com sucesso na região de Vogelduin, e 14% (9-18%) em Aekingerzand [60].

Para efeito de comparação, amostras da área Dun foram coletadas. Essa área é próxima às dunas anteriormente mencionadas, porém não possui ninhos do chasco-cinzento.

De forma padronizada, em cada região foram coletadas 3 amostras de solo, em quatro subamostras retiradas de uma área de 2x2 m² e 10 cm de profundidade. As amostras seguiram para o laboratório onde pedras, musgos e outros detritos foram retirados manualmente e em seguida colocadas em estufa para secagem a 70 °C por 48 h. Essas amostras foram então analisadas por extração líquido pressurizado utilizando-se o equipamento ASE 350.

3.2.2 Insetos e Larvas

Entre os insetos e larvas que compõem a dieta do chasco-cinzento, foram coletados apenas os mais consumidos, principalmente no período de nidificação e nutrição dos filhotes:

larvas de Lepidoptera (*Cerapteryx graminis*, *Mythimna sp.*, *Agrotis sp.*, *Issoria Lathonia*) aqui chamadas de larvas ‘rups’, larvas ‘ritnaald’ (família Elateridae), besouros (*Phyllopertha horticola*), gafanhotos (Acrididae) e mosquitos (Família Diptera, *Philonicus albiceps*). Estes respondem por aproximadamente 73% da dieta da fêmea e do embrião, cálculos da equipe responsável pela coleta, da Universidade de Nijmegen.

Para os grupos citados, pelo menos 3 amostras contendo no mínimo 10 indivíduos da mesma família, foram coletadas nas regiões próximas aos ninhos. Tais amostras foram analisadas em *pool* pelo protocolo SMEDES.

3.2.3 Embriões e Ovos

Foram coletados para este estudo 10 embriões do chasco-cinzento que não atingiram a fase adulta, em ninhos localizados na Suécia. Na Holanda foram coletadas 31 amostras de ovos que não fecundaram e ainda estavam intactos. Desta forma foi possível garantir a existência de nenhuma relação entre os ovos e os embriões coletados.

Sem pré-tratamento, ovos e embriões foram analisados aplicando-se o protocolo SMEDES, sem remoção de parte alguma e de forma individual.

3.3 Resultados e Discussão

3.3.1 Aspectos Gerais

A Tabela 2 contém os dados adquiridos neste estudo, totalizando 90 amostras analisadas das matrizes previamente descritas. São apresentadas as médias das massas com seus valores de mínimo e máximo entre parênteses, e a média dos teores de gordura extraída (não há extração de gordura para amostras de solo e mosquitos). Foram analisadas no mínimo 3 amostras de cada matriz, com exceção das larvas ‘rups’ (2 amostras), após a perda de uma amostra durante a extração.

A média dos níveis de PCDD/Fs e dl-PCBs são dadas em pg g^{-1} produto para os congêneres individuais, junto dos valores de mínimo e máximo entre parênteses.

As somas das concentrações equivalentes dos congêneres são dadas em TEQ-_{WHO2005}-PCDD/Fs, TEQ-_{WHO2005}-dl-PCBs, e por fim o somatório total equivalente TEQ-_{WHO2005}-PCDD/Fs-dl-PCBs. Todos Σ TEQ foram calculados utilizando os valores de TEF_{WHO2005} como referência. Embora a Tabela 2 apresente os Σ TEQ em *lowerbound (lb)* e *upperbound (ub)*, neste estudo serão discutidos apenas os valores de *upperbound (up)*.

A média dos níveis individuais para os congêneres de ndl-PCBs (ng g^{-1} produto) e o somatório total, são apresentados na Tabela 3, com seus respectivos valores de mínimo e máximo entre parênteses.

Entre os insetos e larvas deste estudo, os menores valores médios encontrados para o Σ TEQ-PCDD/Fs-dl-PCBs_(ub) foram para gafanhoto (0,29), larvas 'rups' (0,49) e mosquitos (0,62) $\text{pg TEQ-PCDD/Fs-dl-PCBs g}^{-1}$ produto.

Em seguida, os besouros da espécie *Agriotes mancus*, que derivam das larvas da família dos Elaterídeos, possuem valor médio de 1,74 $\text{pg TEQ-PCDD/Fs-dl-PCBs}_{(ub)} \text{ g}^{-1}$ produto (Tabela 2).

Destacam-se as amostras de larvas 'ritnaald', conhecidas no Brasil como 'larva-aramé', com os maiores níveis médios entre os invertebrados, 7,08 $\text{pg TEQ-PCDD/Fs-dl-PCBs}_{(ub)} \text{ g}^{-1}$ produto, 6,93% de teor de gordura (Tabela 2) e 8,97 ng g^{-1} produto para ndl-PCBs (Tabela 3). Baixos valores para os ndl-PCBs também foram encontrados para gafanhotos (0,20 ng g^{-1} produto), larvas 'rups' (0,49 ng g^{-1} produto) e mosquitos (0,56 ng g^{-1} produto) (Tabela 3).

Dentre o grupo dos invertebrados deste projeto, somente as larvas 'ritnaald' (família dos Elaterídeos) possuem hábitos de vida subterrâneos (aproximadamente 10 cm da superfície), durante seu desenvolvimento holometabólico, passando pelas fases de ovo, larva, pupa e adulta. É na fase larval que se acumula energia na forma de gordura para o inverno e as fases subsequentes. São estes os principais fatores que justificam níveis altos bioacumulados nas amostras de larvas 'ritnaald'. Estas respondem por $13,8 \pm 4,6\%$ da dieta da fêmea durante a postura dos ovos.

Os embriões (n=10) coletados na Suécia, foram analisados de forma integral e individual, triturados por completo até a formação de uma pasta homogênea. A massa dos embriões variou entre 2,582g e 15,235g, e o teor médio de gordura extraída de 3,489%. Foram encontrados 1,23 $\text{pg TEQ-PCDD/Fs-dl-PCBs}_{(ub)} \text{ g}^{-1}$ produto, valor menor do que o encontrado no besouro e larvas 'ritnaald' (Tabela 2).

Tabela 2: Níveis de PCDD/Fs e dl-PCBs em amostras de solo, embriões e ovos do chasco-cinzento, insetos e larvas (besouro, gafanhoto, mosquitos, larvas ‘rups’ e ‘ritnaald’). (-) Não calculado. (*) níveis < LOD.

Amostras	Solos (n=9)	Embrião (n=10)	Ovos (n=31)	Besouro (n=21)	Ritnaald (n=8)	Rups (n=2)	Gafanhoto (n=3)	Mosquito (n=3)
Massa (g)	10,278 (10,046 - 10,584)	8,038 (2,582 - 15,235)	1,309 (0,687 - 2,539)	2,054 (0,951 - 4,052)	0,966 (0,625 - 1,217)	1,362 (1,354 - 1,37)	3,036 (2,423 - 3,412)	0,982 (0,811 - 1,158)
% Lipídio	-	3,49	6,13	4,28	6,93	5,50	1,02	-
PCDDs/PCDFs	WHO2005-TEF	pg g ⁻¹ produto	pg g ⁻¹ produto	pg g ⁻¹ produto	pg g ⁻¹ produto	pg g ⁻¹ produto	pg g ⁻¹ produto	pg g ⁻¹ produto
2,3,7,8-TCDF	0,1	0,82 (0,26 - 1,27)	0,17 (0,04 - 0,49)	1,15 (0,10 - 11,3)	0,84 (0,33 - 1,80)	2,07 (0,97 - 3,34)	*	0,12 (0,1 - 0,14)
1,2,3,7,8-PeCDF	0,03	0,83 (0,24 - 1,37)	0,13 (0,02 - 0,40)	1,25 (0,11 - 15,9)	0,66 (0,23 - 1,16)	1,94 (0,96 - 3,32)	*	0,09 (0,07 - 0,12)
2,3,4,7,8-PeCDF	0,3	0,13 (0,37 - 1,85)	0,62 (0,28 - 1,17)	6,15 (1,10 - 20,3)	0,63 (0,10 - 1,84)	2,97 (1,47 - 5,10)	*	0,10 (0,1 - 0,1)
1,2,3,4,7,8-HxCDF	0,1	0,52 (0,46 - 2,32)	0,33 (0,08 - 0,65)	2,33 (0,46 - 5,51)	0,47 (0,07 - 1,46)	1,07 (0,50 - 2,40)	*	0,07 (0,07 - 0,07)
1,2,3,6,7,8-HxCDF	0,1	0,23 (0,43 - 1,82)	0,21 (0,07 - 0,40)	2,33 (0,54 - 8,12)	0,41 (0,08 - 1,19)	1,78 (0,98 - 3,03)	*	0,08 (0,08 - 0,08)
2,3,4,6,7,8-HxCDF	0,1	0,60 (0,67 - 2,24)	0,21 (0,07 - 0,46)	2,45 (0,25 - 9,29)	0,60 (0,09 - 1,60)	2,44 (1,50 - 3,67)	*	0,12 (0,12 - 0,12)
1,2,3,7,8,9-HxCDF	0,1	0,02 (0,00 - 0,00)	0,02 (0,02 - 0,02)	0,13 (0,04 - 0,25)	0,05 (0,03 - 0,09)	0,06 (0,06 - 0,06)	*	0,08 (0,08 - 0,08)
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0,01	1,2 (3,00 - 15,7)	0,42 (0,08 - 1,30)	2,28 (0,40 - 8,77)	2,51 (0,27 - 5,65)	0,90 (0,38 - 1,83)	*	0,13 (0,1 - 0,14)
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	0,01	0,75 (0,28 - 1,03)	0,07 (0,01 - 0,14)	0,14 (0,03 - 0,35)	0,14 (0,01 - 0,31)	0,08 (0,06 - 0,10)	*	0,09 (0,05 - 0,13)
OCDF	0,0003	2,9 (2,32 - 19,1)	0,12 (0,02 - 0,34)	0,32 (0,12 - 0,91)	1,58 (0,16 - 4,40)	0,22 (0,13 - 0,30)	*	0,14 (0,14 - 0,14)
2,3,7,8-TCDD	1,0	0,11 (0,04 - 0,22)	0,08 (0,05 - 0,16)	0,75 (0,37 - 2,91)	0,10 (0,04 - 0,20)	0,26 (0,13 - 0,42)	*	* (0,00 - 0,00)
1,2,3,7,8-PeCDD	1,0	0,37 (0,18 - 0,48)	0,30 (0,14 - 0,57)	2,92 (0,95 - 8,37)	0,32 (0,11 - 0,74)	1,24 (0,65 - 2,24)	*	* (0,00 - 0,00)
1,2,3,4,7,8-HxCDD	0,1	0,43 (0,22 - 0,55)	0,21 (0,08 - 0,44)	2,59 (0,64 - 7,46)	0,41 (0,12 - 0,86)	1,38 (0,86 - 1,90)	*	* (0,00 - 0,00)
1,2,3,6,7,8-HxCDD	0,1	0,88 (0,41 - 1,14)	0,89 (0,24 - 1,95)	7,08 (2,02 - 32,4)	0,73 (0,23 - 1,68)	3,12 (1,71 - 4,55)	*	* (0,00 - 0,00)
1,2,3,7,8,9-HxCDD	0,1	0,77 (0,39 - 0,93)	0,13 (0,04 - 0,25)	1,63 (0,16 - 6,04)	0,27 (0,06 - 0,66)	1,47 (0,81 - 2,17)	*	* (0,00 - 0,00)
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	0,01	0,1 (4,23 - 23,7)	0,76 (0,13 - 2,57)	6,99 (1,97 - 17,9)	3,50 (0,92 - 7,42)	15,7 (8,95 - 21,3)	*	0,21 (0,16 - 0,27)
OCDD	0,0003	7,3 (12,7 - 116)	1,28 (0,29 - 4,73)	4,77 (1,71 - 11,4)	8,45 (1,32 - 22,4)	28,0 (14,7 - 36,9)	*	0,63 (0,56 - 0,73)
ΣWHO2005-PCDD/F-TEQ (lb)	1,81 (0,70 - 2,44)	0,79 (0,33 - 1,43)	7,58 (2,28 - 26,0)	1,03 (0,39 - 1,91)	3,95 (2,12 - 6,63)	0,02 (0,00 - 0,04)	0,00 (0,00 - 0,00)	0,04 (0,01 - 0,09)
ΣWHO2005-PCDD/F-TEQ (ub)	1,82 (0,70 - 2,44)	0,79 (0,34 - 1,45)	7,62 (2,29 - 26,0)	1,07 (0,45 - 1,91)	3,96 (2,12 - 6,64)	0,40 (0,39 - 0,42)	0,26 (0,22 - 0,29)	0,48 (0,21 - 1,00)
dl-PCB								
PCB 81	0,0003	0,44 (0,23 - 0,73)	0,14 (0,05 - 0,35)	1,86 (0,17 - 11,9)	0,70 (0,12 - 1,79)	1,51 (0,67 - 2,80)	0,31 (0,31 - 0,31)	0,66 (0,58 - 0,71)
PCB 77	0,0001	8,10 (4,00 - 12,0)	2,53 (0,45 - 13,2)	15,9 (2,06 - 279)	13,9 (0,63 - 48,1)	26,2 (16,9 - 37,3)	4,32 (3,73 - 4,90)	10,54 (2,62 - 3,62)
PCB 126	0,1	3,58 (1,08 - 5,11)	2,40 (0,15 - 14,5)	40,1 (2,06 - 310)	5,91 (1,49 - 17,8)	28,4 (13,2 - 46,0)	0,70 (0,64 - 0,77)	1,17 (0,26 - 0,33)
PCB 169	0,03	0,72 (0,22 - 1,13)	5,70 (2,33 - 12,4)	40,3 (13,6 - 200)	1,78 (0,56 - 5,49)	7,65 (3,40 - 10,4)	0,30 (0,27 - 0,34)	0,45 (0,12 - 0,20)
PCB 123	0,00003	2,77 (1,50 - 3,83)	5,21 (2,69 - 9,26)	74,1 (20,9 - 199)	14,1 (4,81 - 27,4)	15,8 (7,58 - 31,3)	*	* (0,00 - 0,00)
PCB 118	0,00003	122 (32,7 - 244)	310 (98,6 - 1010)	3421 (812 - 10400)	407 (74,8 - 1030)	671 (362 - 1060)	45,7 (39,0 - 52,5)	70,2 (61,9 - 82,3)
PCB 114	0,00003	1,80 (1,35 - 2,19)	9,28 (5,52 - 24,7)	66,5 (18,4 - 218)	13,4 (13,4 - 13,4)	*	*	* (0,00 - 0,00)
PCB 105	0,00003	44,6 (11,0 - 83,7)	32,5 (5,07 - 125)	897 (57,4 - 3420)	190 (58,2 - 428)	180 (88,8 - 355)	15,2 (12,2 - 18,1)	23,7 (8,18 - 8,18)
PCB 167	0,00003	24,2 (4,41 - 64,5)	81,1 (12,5 - 263)	1031 (175 - 7290)	127 (24,9 - 379)	276 (127 - 396)	4,70 (4,70 - 4,70)	7,08 (6,06 - 8,10)
PCB 156	0,00003	38,7 (7,02 - 109)	228 (68,4 - 831)	1506 (472 - 7260)	89,5 (6,78 - 624)	285 (127 - 459)	8,92 (8,71 - 9,13)	8,18 (8,18 - 8,18)
PCB 157	0,00003	8,28 (1,10 - 18,6)	35,1 (12,8 - 111)	309 (101 - 1120)	36,0 (8,94 - 133)	73,5 (32,6 - 118)	*	* (0,00 - 0,00)
PCB 189	0,00003	6,81 (1,08 - 21,3)	63,5 (24,3 - 202)	493 (174 - 2740)	14,6 (3,16 - 60,5)	57,5 (27,7 - 84,8)	*	* (0,00 - 0,00)
ΣWHO2005-dl-PCB-TEQ (lb)	0,39 (0,12 - 0,56)	0,43 (0,09 - 1,66)	5,46 (0,86 - 38,1)	0,67 (0,17 - 2,00)	3,12 (1,45 - 4,99)	0,08 (0,07 - 0,09)	0,03 (0,03 - 0,04)	0,13 (0,11 - 0,17)
ΣWHO2005-dl-PCB-TEQ (ub)	0,39 (0,12 - 0,56)	0,43 (0,09 - 1,66)	5,46 (0,86 - 38,1)	0,67 (0,17 - 2,00)	3,12 (1,45 - 4,99)	0,08 (0,07 - 0,09)	0,04 (0,03 - 0,04)	0,14 (0,11 - 0,17)
ΣWHO2005-PCDD/F-dl-PCB-TEQ (lb)	2,20 (0,82 - 3,00)	1,22 (0,42 - 2,74)	13,0 (4,55 - 64,0)	1,71 (0,64 - 3,77)	7,07 (3,57 - 11,6)	0,10 (0,08 - 0,13)	0,03 (0,03 - 0,04)	0,17 (0,13 - 0,25)
ΣWHO2005-PCDD/F-dl-PCB-TEQ (ub)	2,21 (0,82 - 3,00)	1,23 (0,43 - 2,74)	13,1 (4,55 - 64,0)	1,74 (0,64 - 3,77)	7,08 (3,58 - 11,6)	0,49 (0,46 - 0,51)	0,29 (0,26 - 0,32)	0,62 (0,32 - 1,13)

Tabela 3: Níveis de ndl-PCBs (ng g⁻¹ produto) em amostras de solo, embriões e ovos do chasco-cinzento, insetos e larvas (besouro, gafanhoto, mosquitos, larvas ‘rups’ e ‘ritnaald’).

Amostras	Solos (n=12)	Embrião (n=10)	Ovos (n=31)	Besouro (n=21)	Ritnaald (n=8)	Rups (n=2)	Gafanhoto (n=3)	Mosquito (n=3)
Massa (g)	10,278 10,046 - 10,584)	8,038 (2,582 - 15,235)	1,309 (0,687 - 2,539)	2,054 (0,951 - 4,052)	0,966 (0,625 - 1,217)	1,362 (1,354 - 1,37)	3,036 (2,423 - 3,412)	0,982 (0,811 - 1,158)
% Lipídio	-	3,49	6,13	4,27	6,93	5,50	1,02	-
ndl-PCBs								
PCB 028	0,75 (0,02 - 1,73)	0,04 (0,02 - 0,06)	0,17 (0,02 - 0,57)	0,04 (0,01 - 0,17)	0,07 (0,03 - 0,12)	0,06 (0,06 - 0,06)	0,03 (0,02 - 0,05)	0,07 (0,05 - 0,09)
PCB 052	0,18 (0,02 - 0,43)	0,02 (0,01 - 0,05)	0,09 (0,01 - 0,31)	0,05 (0,01 - 0,13)	0,04 (0,03 - 0,08)	0,05 (0,04 - 0,05)	0,02 (0,02 - 0,03)	0,05 (0,05 - 0,06)
PCB 101	0,21 (0,08 - 0,40)	0,06 (0,02 - 0,15)	0,39 (0,03 - 1,48)	0,43 (0,02 - 1,12)	0,08 (0,03 - 0,14)	0,06 (0,05 - 0,07)	0,03 (0,02 - 0,03)	0,07 (0,06 - 0,08)
PCB 153	0,49 (0,12 - 1,40)	3,61 (1,40 - 11,0)	24,0 (9,44 - 69,2)	3,20 (0,58 - 12,6)	5,79 (3,08 - 9,15)	0,15 (0,13 - 0,18)	0,06 (0,05 - 0,07)	0,18 (0,17 - 0,22)
PCB 138	0,40 (0,08 - 1,11)	1,30 (0,09 - 4,51)	9,36 (3,26 - 30,0)	2,35 (0,57 - 5,66)	1,03 (0,55 - 2,69)	0,10 (0,08 - 0,12)	0,04 (0,03 - 0,05)	0,12 (0,10 - 0,15)
PCB 180	0,27 (0,05 - 0,88)	2,64 (1,19 - 7,49)	14,5 (4,60 - 46,5)	0,77 (0,16 - 3,08)	1,97 (1,04 - 2,93)	0,06 (0,05 - 0,07)	0,02 (0,02 - 0,02)	0,06 (0,05 - 0,07)
Σndl-PCBs (lb)	2,31	7,66	48,6	6,83	8,97	0,49	0,20	0,56
Σndl-PCBs (ub)	2,31	7,66	48,6	6,83	8,97	0,49	0,20	0,56

Os ovos (n=31) coletados na Holanda em reservas naturais, também foram analisados de forma integral, sem a remoção da casca. Com massa entre 0,687g e 2,539g, o teor de gordura extraída média foi 6,129%, menor do que o encontrado em larvas ‘ritnaald’ (6,933%). Porém, obteve o maior somatório, 13,08 pg TEQ-PCDD/Fs-dl-PCBs_(ub) g⁻¹ produto (faixa 4,55 - 64,05), com 58% de contribuição de PCDD/Fs (Tabela 2).

Destaca-se nos ovos o congêneres 1,2,3,7,8-PeCDD com média de 2,92 pg g⁻¹ produto e o 2,3,7,8-TCDD com média de 0,75 pg g⁻¹ produto, ambos com valor de TEF igual a 1, logo, estes congêneres contribuem com 28% do TEQ-PCDD/Fs-dl-PCBs_(ub) (Tabela 2).

Para se comparar os resultados de ovos do chasco-cinzento com outros estudos, calculou-se o somatório TEQ em relação à porcentagem de gordura extraída. Obtivemos 124,38 pg TEQ-PCDD/Fs-dl-PCBs_(ub) g⁻¹ gordura, valor similar ao encontrado em ovos da ave de rapina açor [65] e falcões peregrinos [66], aves classificadas no topo da cadeia alimentar.

A fêmea do chasco-cinzento necessita de uma reserva mínima de nutrientes retirada de sua alimentação diária para a postura dos ovos [67]. Em estudos prévios do instituto Sovon, da Holanda, estimou-se que uma fêmea precisa de aproximadamente 200 larvas ‘ritnaald’ para suprir sua necessidade energética por dia [60].

Os níveis de dioxinas e PCBs encontrados em um único ovo equivalem ao consumo de 100 larvas ‘ritnaald’, aproximadamente. Estes cálculos sugerem que as concentrações de dioxinas observadas nos ovos de chasco-cinzento da população do norte da Holanda tem origem local, e não são trazidos de outras áreas ao longo do seu período migratório.

A concentração de PCDD/Fs e PCBs encontrada nos ovos (13,08 pg TEQ-PCDD/Fs-dl-PCBs_(ub) g⁻¹ produto) foi aproximadamente 10 vezes maior do que nos embriões (1,23 pg TEQ-PCDD/Fs-dl-PCBs_(ub) g⁻¹ produto) (Tabela 2).

Ainda pouco se sabe sobre o metabolismo da dioxina e seus congêneres no organismo de aves selvagens. Estudos com galinhas criadas livremente mostraram que, após exposição controlada a dioxinas, 5 - 30% é excretado através dos ovos, 7 - 54% se deposita na gordura do corpo e <1% é encontrado no fígado [68]. Muitos pesquisadores consideram a média padrão de 25% de excreção de dioxinas nos ovos.

Ikeda *et al.* (2004) sugere que as dioxinas ingeridas por galinhas são armazenadas no tecido adiposo em primeiro lugar e, em seguida, transferidas para os ovos a uma taxa constante durante um longo período. Uma vez absorvidas, as dioxinas são incorporadas em lipoproteínas de baixa densidade, que desempenham um papel fundamental na formação das gemas [69].

A média para dioxinas e PCBs em solos foi 1,82 pg TEQ-PCDD/Fs_(ub) g⁻¹ produto e 0,39 pg TEQ-dl-PCBs_(ub) g⁻¹ produto (Tabela 2) respectivamente, e 2,31 ng g⁻¹ produto para ndl-PCBs (Tabela 3).

A Figura 11 representa graficamente os níveis de $\Sigma\text{TEQ}_{\text{WHO2005}}$ para PCDD/Fs e PCBs apresentados na Tabela 2, para cada grupo de amostra estudada, acrescido de seus respectivos desvios padrão expressos na barra de erro.

O gráfico também contém no eixo secundário, o teor de gordura médio extraída para embrião, ovos, besouro, larvas `ritnaald`, larvas `rups` e gafanhoto. Não foi possível calcular o teor de gordura dos mosquitos e para solos esta variável não é calculada.

Em estudos anteriores foi relatado que galinhas botadeiras criadas livremente estão mais expostas e sujeitas à contaminação por dioxinas, comparadas às galinhas de granja. O consumo de larvas e insetos, e particularmente a ingestão de solo, são as causas mais relevantes para os níveis elevados de dioxinas em ovos já descritos [70].

Dados os níveis para PCDD/Fs e dl-PCBs mostrados na Figura 11, é possível sugerir que o solo seja a principal fonte de contaminação para o chasco-cinzento, de forma direta ao ingerirem pequenas porções do solo enquanto se alimentam, ou indireta através dos insetos de que se alimentam. Os níveis de contribuição em TEQ de PCDD/Fs e dl-PCBs para as amostras de solo referentes às três áreas estudadas são mostrados na Figura 12 para efeito de comparação.

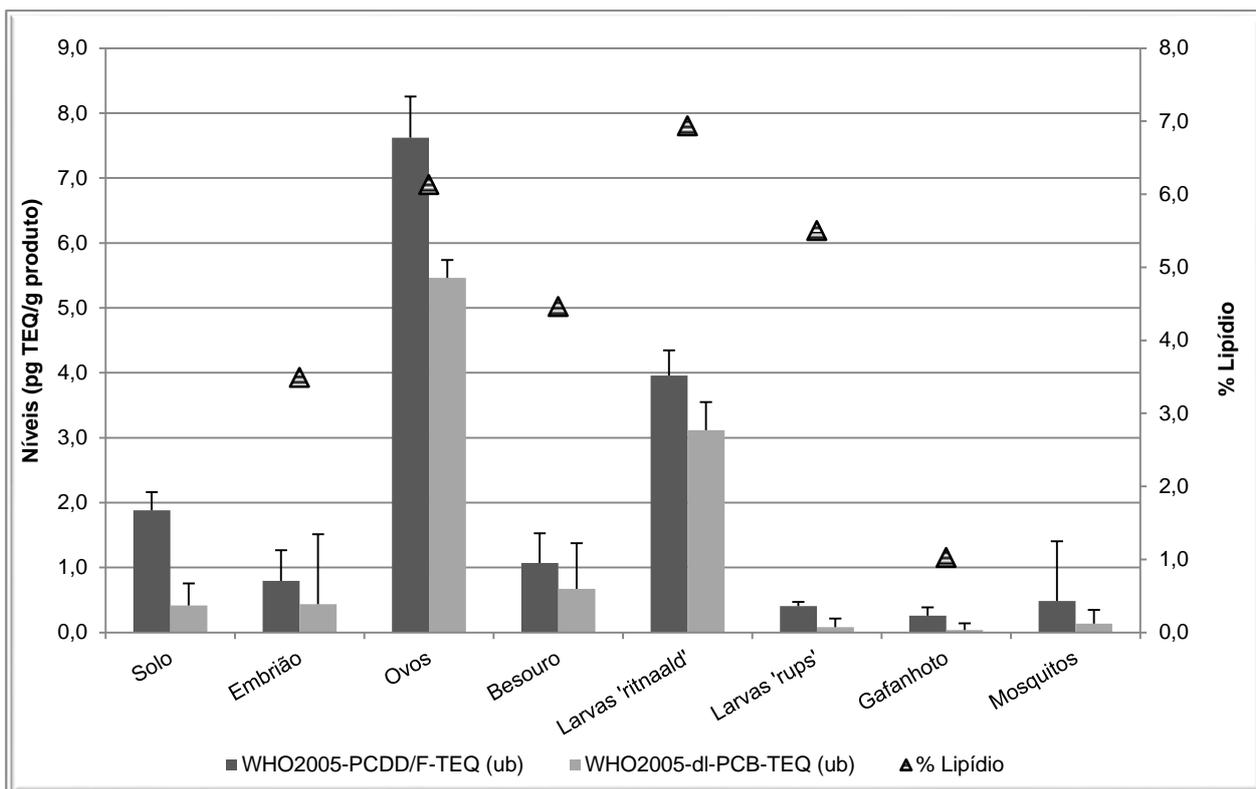


Figura 11: $\Sigma\text{TEQ}_{\text{WHO2005-PCDD/Fs-dl-PCBs}}$ em amostras de ovos, embriões, solos e insetos (besouro, gafanhoto, mosquitos, larvas ‘ritnaald’ e larvas ‘rups’). Eixo secundário: teor de gordura extraída.

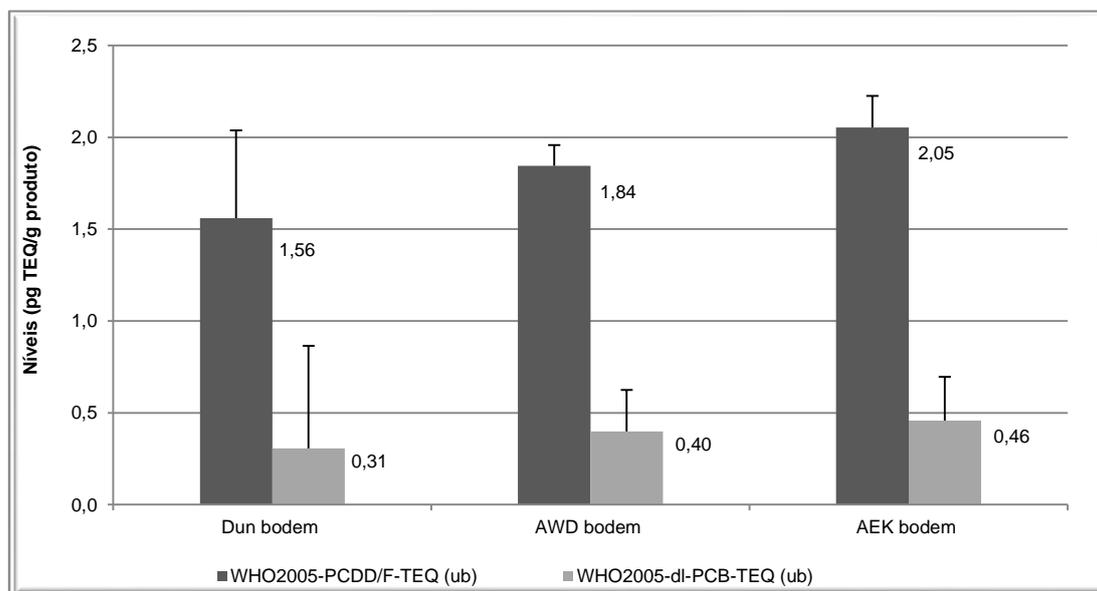


Figura 12: $\Sigma\text{TEQ}_{\text{WHO2005-PCDD/Fs}}$ e $\Sigma\text{TEQ}_{\text{WHO2005-dl-PCBs}}$, em amostras de solos das regiões de Dun (Dun), Vogelduin (AWD) e Aekingerzand (AEK), e seus valores de desvio padrão (ANOVA, $P = 0,477$; 95%).

O somatório de PCDD/Fs e PCBs para as três áreas Dun, AWD e AEK foram respectivamente 1,87; 2,24 e 2,51 pg TEQ-PCDD/Fs-dl-PCBs g⁻¹ produto. Contudo não há diferença significativa entre as três regiões ($P>0.05$) (Figura 12).

Os valores encontrados para PCDD/Fs e dl-PCBs nos solos deste estudo estão abaixo dos limites descritos pelas diretrizes de países como Holanda e Suécia (10 pg TEQ-PCDD/Fs-dl-PCBs g⁻¹ produto) [71, 72], ou Canadá (4 pg TEQ-PCDD/Fs-dl-PCBs g⁻¹ produto) [73], quando se trata de solos para a prática de cultura agrícola.

Em 1994, Van den Berg *et al.* [74] registrou para solos ($n = 32$) da Holanda níveis que variaram entre 1,5 – 16,4 pg TEQ-PCDD/Fs-dl-PCBs g⁻¹ produto. A média geral encontrada nas dunas onde vive o chasco-cinzento foi de 2,21 pg TEQ-PCDD/F-dl-PCBs g⁻¹ produto.

O valor encontrado neste estudo para solos coletados em dunas de reservas naturais é próximo ao encontrado em áreas urbanas de países como Alemanha e Austria (Tabela 6). Isto indica que aves como o chasco-cinzento, que predominantemente vivem em áreas verdes de preservação, e que por lá se alimentam de insetos, estão expostos a níveis de dioxinas comparáveis a centros urbanos.

3.3.2 Perfil de distribuição e Correlações

O perfil de distribuição dos congêneres de dioxinas, para cada grupo de amostra estudada (solo, ovos, embrião, besouros, larvas ‘ritnaald’, larvas ‘rups’, gafanhotos e mosquitos) está expresso nos gráficos da Figura 13 para PCDD/Fs e na Figura 14 para dl-PCBs, em termos de contribuição total do TEQ.

Os congêneres de PCDD/Fs e dl-PCBs são onipresentes no meio ambiente [1]. Por se tratarem de mais de 200 isômeros entre as classes de PCDD/Fs e dl-PCBs, estes compostos se distribuem na natureza em menor ou maior intensidade, a depender do tipo de cada fonte contaminante. Amostras diferentes que possuam semelhante perfil de distribuição para os congêneres tóxicos destacados sugerem a mesma fonte de contaminação [75].

Nota-se claramente uma relação entre o perfil de distribuição das amostras de ovos com embrião e solo com besouros para PCDD/Fs (Figura 13). Amostras de gafanhotos e larvas ‘rups’ possuem níveis muito baixos, menores do que o limite de detecção, e por esta razão não foi possível apresentar os resultados no gráfico. Os congêneres 1,2,3,4,6,7,8-HpCDD e OCDD estão presentes em todas amostras, exceto na larvas ‘rups’ onde o OCDD não foi detectado.

Nos gráficos da Figura 14, apresentam-se os perfis de distribuição dos congêneres de dl-PCBs dos grupos de amostras deste estudo. Em razão de terem sido produzidos industrialmente até meados dos anos 80, os PCBs são mais facilmente encontrados espalhados no meio ambiente [12].

O dl-PCB mais abundante dentre todas as amostras foi o PCB 118. Para amostras de larvas 'ritnaald', embrião e ovos, tem-se a ordem PCB 118 > 156 > 167 > 105. Nas amostras de solo, besouros, larvas 'rups' e mosquitos, segue a ordem PCB 118 > 105 > 167 > 156. Semelhante distribuição foi encontrada também em solos da Eslováquia [76].

Indo mais além da comparação entre os gráficos, podemos calcular estatisticamente a relação que existe entre os congêneres encontrados nas amostras. O coeficiente de correlação de Pearson (ρ) avalia qual a relação entre duas variáveis, embora tal correlação não implique causalidade. É calculado dividindo-se a covariância de duas variáveis pelo produto de seus desvios padrão. Os resultados podem variar de -1 a +1, onde -1 indica correlação negativa (se uma variável aumenta, a outra diminui), 0 as duas variáveis não dependem linearmente uma da outra, e +1 correlação positiva.

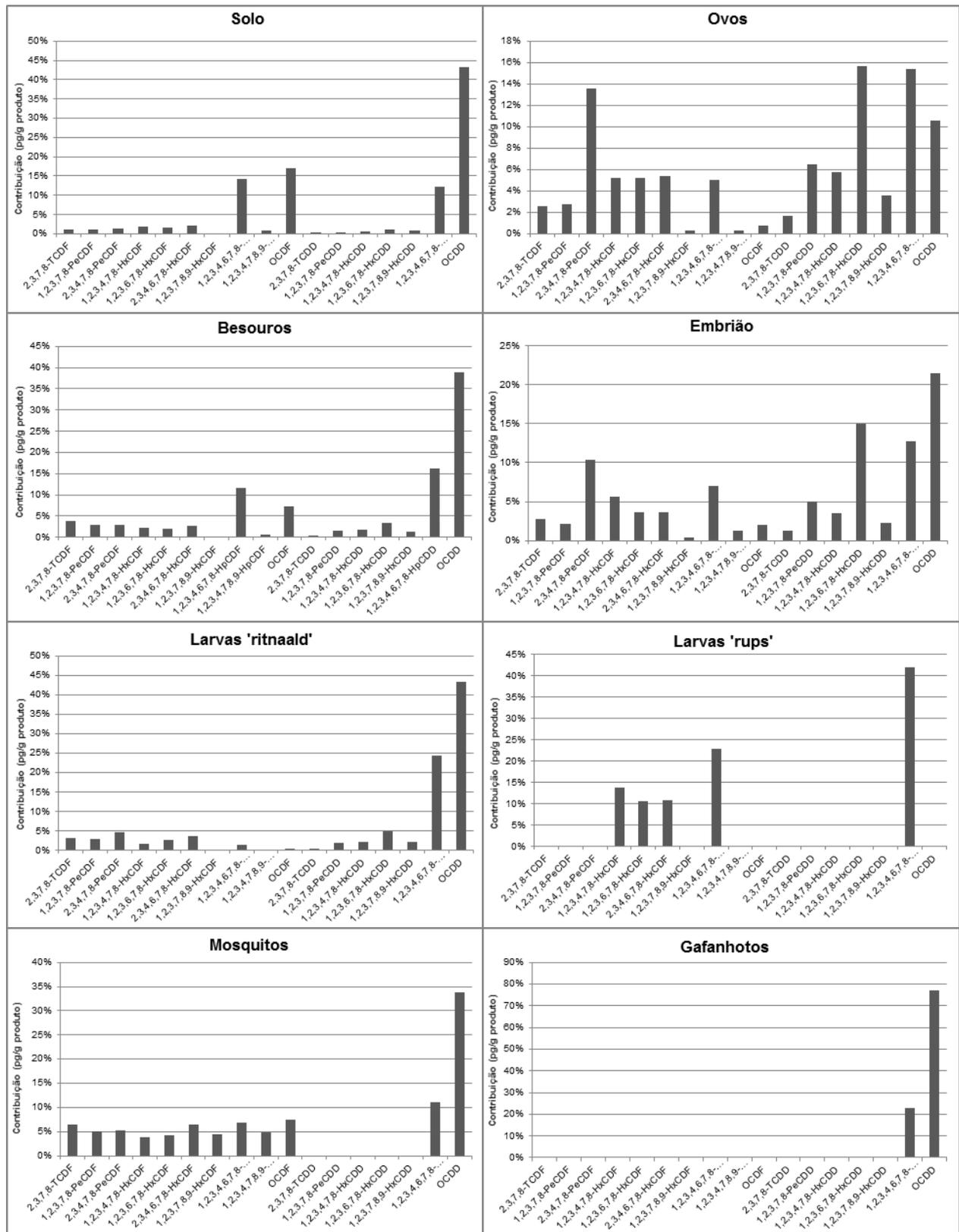


Figura 13: Perfil de distribuição dos 17 congêneres de PCDD/Fs para as amostras de solo da Holanda, ovos e embrião do chasco-cinzeno, insetos e larvas da cadeia alimentar.

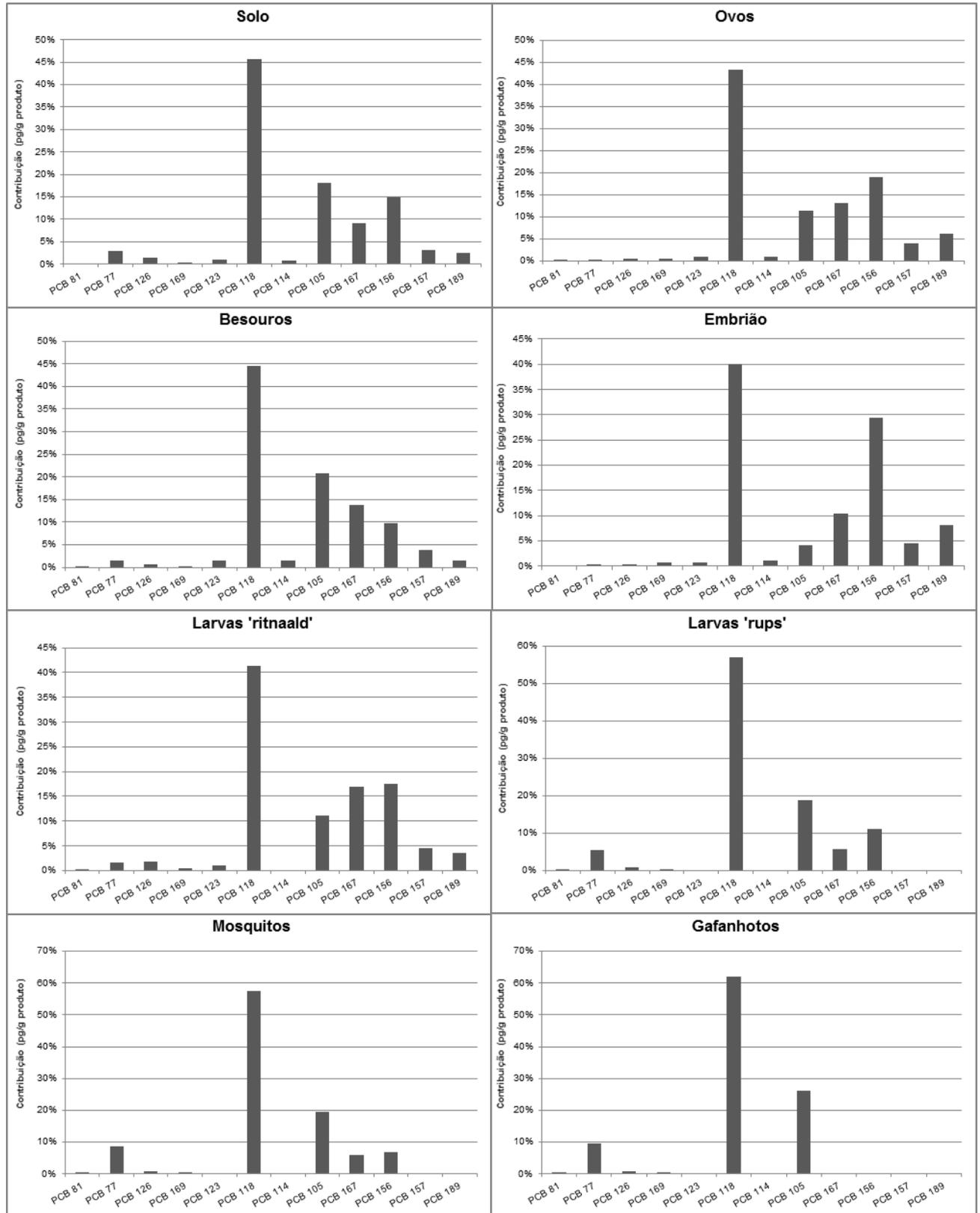


Figura 14: Perfil de distribuição dos 12 congêneres de dl-PCBs para as amostras de solo da Holanda, ovos e embrião do chasco-cinzento, insetos e larvas da cadeia alimentar.

A Tabela 4 apresenta os coeficientes de correlação, divididos em duas tabelas; a primeira refere-se aos PCDD/Fs, a segunda para PCBs (que incluem dl-PCBs e ndl-PCBs), para todas as amostras estudadas. O critério de intensidade entre as correlações foi dividido em: fraca ($\rho < 0,50$), moderada ($0,50 \leq \rho < 0,70$), forte ($0,70 \leq \rho < 0,90$) e muito forte ($\rho \geq 0,90$).

As correlações entre variáveis da mesma amostra (ex: solo x solo) é igual a 1,00 e, portanto, são representadas por “X”. Amostras de gafanhoto possuem a maior parte dos congêneres de PCDD/Fs abaixo do LOD, logo todas as correlações obtiveram valor unitário e foram desconsideradas (1,00). Da mesma forma, as larvas ‘rups’, que possuem apenas 5 congêneres detectados, não serão discutidas.

Tabela 4: Coeficiente de correlação de Pearson (ρ) entre os níveis de PCDD/Fs, dl-PCBs e ndl-PCBs para as amostras de solo, embrião e ovos do chasco-cinzento, insetos e larvas (besouros, gafanhotos, mosquitos, larvas ‘rups’ e larvas ‘ritnaald’). (*) Valor não foi possível calcular devido aos baixos LOD.

	$\rho \geq 0,90$
	$0,70 \leq \rho < 0,90$
	$0,50 \leq \rho < 0,70$
	$\rho < 0,50$

<i>PCDD/F</i>	<i>Solos</i>	<i>Embrião</i>	<i>Ovos</i>	<i>Besouro</i>	<i>Ritnaald'</i>	<i>Rups'</i>	<i>Gafanhotos</i>	<i>Mosquitos</i>
Solos	x							
Embrião	0,69	x						
Ovos	0,24	0,84	x					
Besouro	0,97	0,79	0,40	x				
Ritnaald'	0,85	0,83	0,54	0,94	x			
Rups'	0,82	0,99	0,92	0,95	0,89	x		
Gafanhotos	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	*	x	
Mosquitos	0,95	0,85	0,42	0,97	0,94	0,91	1,00	x

<i>PCBs</i>	<i>Solos</i>	<i>Embrião</i>	<i>Ovos</i>	<i>Besouro</i>	<i>Ritnaald'</i>	<i>Rups'</i>	<i>Gafanhotos</i>	<i>Mosquitos</i>
Solos	x							
Embrião	0,51	x						
Ovos	0,52	0,99	x					
Besouro	0,56	0,85	0,90	x				
Ritnaald'	0,48	0,94	0,96	0,87	x			
Rups'	0,78	0,79	0,82	0,89	0,80	x		
Gafanhotos	0,82	0,70	0,74	0,83	0,74	0,99	x	
Mosquitos	0,76	0,75	0,80	0,90	0,79	0,99	0,99	x

Dados para PCDD/Fs mostram correlação muito forte entre solo x besouro (0,97), e solo x mosquitos (0,95), e forte entre solo e larvas ‘ritnaald’ (0,85). Estes são valores coerentes pois besouros e mosquitos vivem no solo a maior parte do tempo de vida.

Amostras de ovos tem fraca correlação com solo (0,24) e invertebrados, para PCDD/Fs, e forte correlação com o embrião (0,84), mesmo sendo de países diferentes. Entretanto, as correlações do embrião com todos os invertebrados são fortes, enquanto que com o solo, moderada (0,69).

Isto indica que os altos níveis de PCDD/Fs encontrados nos ovos são metabolizados durante a geração do embrião, acarretando as deformidades e anomalias descritas. O embrião ao nascer, por sua vez, adquire tais congêneres através dos insetos e larvas ingeridos desde os primeiros dias, justificando as fortes correlações obtidas com os invertebrados. Por fim, podemos sugerir que os indivíduos do chasco-cinzento adquirem os congêneres de PCDD/Fs por via direta dos insetos e larvas que consomem, e via indireta quando estes invertebrados adquirem a contaminação do solo.

Sabe-se que os PCBs são encontrados no meio ambiente nos diferentes níveis da cadeia alimentar, como uma mistura de compostos provenientes da mesma fonte [77]. Assim, dl-PCBs e ndl-PCBs foram correlacionados e combinados em uma única tabela de PCBs e os resultados expressos na segunda parte da Tabela 4.

Comparando-se o perfil de distribuição de dl-PCBs e ndl-PCBs separadamente para ambas amostras, obtêm-se os graficos da Figura 15. Surpreendentemente, todas as correlações moderadas e fracas envolveram as amostras de solo, tais como solo e embrião (0,51), solo e ovos (0,52), solo e besouro (0,56) e a menor correlação para os PCBs totais, solo e larvas 'ritnaald' (0,48). Deste modo, fez-se necessário o detalhamento das comparações entre solo e larvas 'ritnaald' (Figura 15).

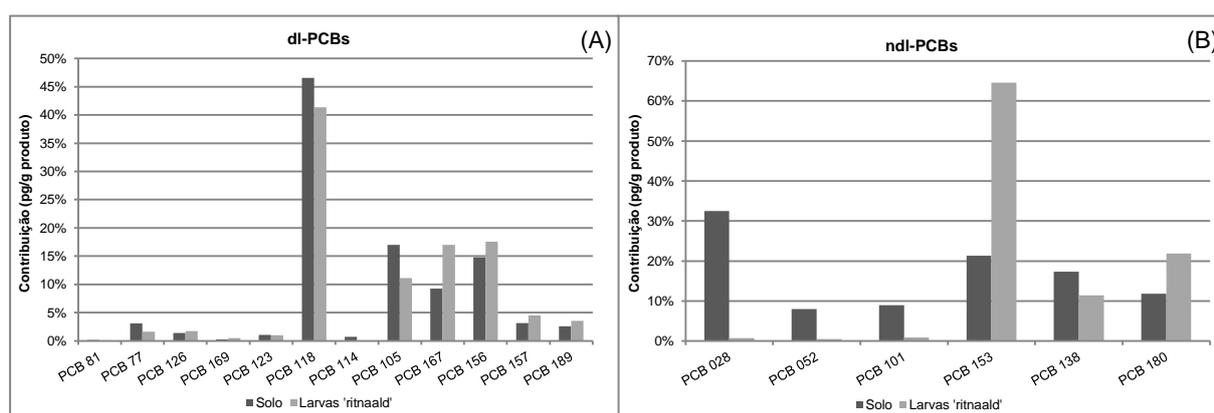


Figura 15: Comparação do perfil de distribuição em amostras de solo e larvas 'ritnaald' para os congêneres de (A) dl-PCBs; (B) ndl-PCBs.

Observa-se que há semelhança entre os perfis de distribuição de ambas as amostras para dl-PCBs, porém diferem claramente quando são comparados os níveis de ndl-PCBs (Figura 15). O coeficiente de Pearson calculado entre as amostras de solo e larvas 'ritnaald' expressa correlação muito forte para dl-PCBs (0,97) e fraca para ndl-PCBs (0,18). Com estes dados somente, não se pode afirmar sobre as possíveis fontes de contaminação em ambas as amostras para PCBs totais, requerendo um estudo mais detalhado para tal.

3.4 Conclusão

Amostras de solos das regiões de Dun, Vogelduin e Aekingerzand, situadas em áreas de preservação natural da Holanda e que abrigam a maior concentração de ninhos do chasco-cinzento, possuem níveis de dioxinas e PCBs semelhantes aos encontrados em centros urbanos de países como Alemanha e Áustria, porém abaixo dos limites máximos permitidos para solos destinados à cultura agrícola

Observou-se que os níveis encontrados nos solos neste estudo são semelhantes aos relatados duas décadas atrás, indicando que há uma contaminação residual remanescente.

Entre as amostras de solo e os invertebrados mais consumidos pelo chasco-cinzento, existem semelhanças no perfil de distribuição para PCDD/Fs (Figura 13), confirmados pelas fortes correlações descritas na Tabela 4. Presume-se que a contaminação por PCDD/Fs adquirida pelos invertebrados advém do solo, obtendo maiores níveis aqueles insetos (ou larvas) que vivem diretamente em contato com o mesmo. Não se pode afirmar o mesmo para os PCBs totais com base somente nos dados aqui apresentados. Uma vez que o chasco-cinzento se alimenta destes invertebrados, absorve esta contaminação no organismo, refletindo nos efeitos adversos anteriormente citados.

Da quantidade total de dioxinas e PCBs adquiridos via oral pelo chasco-cinzento adulto, aproximadamente 25% é excretada para os ovos. As amostras de ovos obtiveram os maiores níveis de TEQ-PCDD/Fs-dl-PCBs entre todas as amostras deste estudo.

Estes não são os únicos contaminantes que podem causar as anomalias descritas e a baixa taxa de reprodução do chasco-cinzento. Entretanto este estudo mostra que elevados níveis para estes congêneres são encontrados no meio onde vivem e na sua cadeia alimentar.

CAPÍTULO 4

PCDD/Fs E PCBs EM AMOSTRAS DE SOLO DE BELO HORIZONTE, MINAS GERAIS, BRASIL.

4 INTRODUÇÃO

Dioxinas são um grupo de contaminantes ambientais que estão presentes em quase todos os compartimentos ambientais [78, 79]. Eles têm sido motivo de preocupação para os governantes de muitos países e da *World Health Organization* (WHO), uma vez que são tóxicos em níveis residuais e extremamente estáveis [9]. Após a emissão para a atmosfera, os PCDD/Fs tendem a se agregar ao particulado sólido, seguido pela deposição atmosférica até atingirem solos e sedimentos. Portanto, solos e sedimentos são considerados como 'reservatórios' de PCDD/Fs, de onde podem ser gradualmente liberados ou transferidos para outros meios no ambiente [80].

Para os PCDD/Fs, acredita-se que processos de combustão (por exemplo, incineradores de resíduos, processos termo-industriais e queima doméstica de lixo) seja a fonte mais significativa de poluição ambiental [81, 82]. Outras fontes potenciais são processos industriais que envolvem plantas químicas e petroquímica, produção de ferro e aço, fornos de cimento, fundições de cobre secundário, indústrias de papel e celulose, que também contribuem para a emissão no meio ambiente [83, 84].

Congêneres de PCBs, em geral, são mais onipresentes do que os PCDD/Fs devido à sua aplicação comercial durante várias décadas do século passado [85]. A maioria das PCBs foram produzidos comercialmente nos Estados Unidos como misturas-padrão que ostentavam a marca Aroclor [86]. Diferentes misturas Aroclor foram usadas em momentos diferentes e para diferentes aplicações (por exemplo, fluidos de transferência de calor, lubrificantes hidráulicos, retardadores de chama, plastificantes, e fluidos dielétricos em componentes eletrônicos, tais como capacitores e transformadores). Na fabricação de equipamentos elétricos nos EUA, as misturas de Aroclor denominadas por 1260 e 1254 foram as principais utilizadas antes de 1950. Mais tarde, durante os anos 1950 e 1960, Aroclor 1242 foi a mistura principal utilizada até ser proibido em 1971 e substituído por Aroclor 1016 [87]. Embora a

contaminação ambiental por PCBs é principalmente um resultado de vários produtos, uma contaminação local pode ser rastreada até uma indústria ou aplicação específica [88].

As emissões de dioxinas geralmente não contêm uma mistura homogênea de congêneres, já que os níveis individuais dependem principalmente do processo de combustão, dos materiais usados no processo, produtos envolvidos e das taxas de transferência ambientais e biológicas. Os níveis totais medidos podem variar significativamente, dependendo da estação sazonal, como descritos anteriormente [80, 89].

Em vários locais do mundo, o solo foi investigado quanto à presença de dioxinas. As maiores concentrações, próximas a 100 ng I-TEQ kg⁻¹ de matéria seca (em inglês é utilizado a sigla d.m. = *dry matter*), foram encontradas na Finlândia em locais contaminados com conservantes de madeira. Na Holanda, em particular, a maioria das amostras de solo foram coletados na vizinhança de incineradores de resíduos sólidos urbanos, onde concentrações de até 252 ng I-TEQ kg⁻¹ d.m. foram detectadas [80]. Nos EUA, as dioxinas são encontradas em solos superficiais em todo Estado de Washington, incluindo amostras de áreas selvagens remotas. Os níveis em TEQ de dioxinas nos solos variaram entre 0,033 e 19 ng I-TEQ kg⁻¹ d.m., com um valor médio de 1,2 ng I-TEQ kg⁻¹ d.m. [90]. A Alemanha possui um banco de dados de contaminação registrada compilando resultados de mais de 2500 amostras de solo. A média de concentração de PCDD/Fs em solo alemão é de 3 ng I-TEQ kg⁻¹ d.m. nos centros urbanos, 2 ng I-TEQ kg⁻¹ d.m. na orla urbana e 1 ng I-TEQ kg⁻¹ d.m. em áreas rurais [91]. Diversos países estabeleceram diretrizes relativas aos limites máximos de concentração de dioxinas no solo, com foco no controle da emissão de dioxinas em chaminés, com o objetivo de reduzir a exposição e proteger a saúde humana. A Suécia considera 10 ng I-TEQ kg⁻¹ d.m. o limite máximo para o solo em área residencial, enquanto a Alemanha e a Holanda estabeleceram 1000 ng I-TEQ kg⁻¹ d.m. [80].

O Brasil ainda não tem limites máximos de dioxinas estabelecidos para solos. São escassos os dados sobre a exposição humana a dioxinas, bem como níveis encontrados no meio ambiente ou a identificação de possíveis fontes de formação e emissão não-intencional.

Em 1998, Grossi *et al* [92] relataram os níveis de PCDD/Fs e PCBs encontrados em plantas de compostagem localizadas em aterros sanitários municipais em dez estados brasileiros. Tal estudo revelou níveis de PCDD/Fs entre 11 e 150 ng I-TEQ kg⁻¹, dl-PCB de 77 a 1690 µg kg⁻¹, e ndl-PCB a partir de 14 a 338 µg kg⁻¹.

Em termos de incidentes de contaminação ambiental, Braga *et al.* (2002) [93] relataram elevados níveis de PCDD/Fs em uma planta industrial de hexaclorociclohexano

(HCH) desativada no Rio de Janeiro/RJ. Para remediar a contaminação de HCH que foram deixados a céu aberto após desativação da planta, a área foi tratada com cal (CaO). A amostra de solo coletada na área circundante apresentar concentração de PCDD/Fs de 13.900 ng I-TEQ kg⁻¹.

A UNEP, *United Nations Environment Programme*, divulgou em 2000 dados sobre as concentrações de PCDD/Fs em solos de algumas cidades brasileiras. Os níveis relatados variaram entre 0,03 e 900 ng I-TEQ kg⁻¹. Em uma área de lazer não especificada foi obtido os menores valores (0,03-1,8 ng I-TEQ kg⁻¹), e em Duque de Caxias as concentrações mais elevadas, 13-900 ng I-TEQ kg⁻¹. Ambas as regiões estão localizadas no estado do Rio de Janeiro [94].

Belo Horizonte é a capital do Estado de Minas Gerais, localizada no sudeste do Brasil, com 331 km² e com uma população estimada de aproximadamente 2,5 milhões na área urbana. Incluindo municípios vizinhos, a população da área metropolitana alcança 5,7 milhões de habitantes. A região tornou-se atraente para os setores industriais após a criação do distrito industrial em 1941. Construção, alta tecnologia e outras indústrias tornaram-na uma das áreas economicamente mais dinâmicas no Brasil [95]. Devido sua localização geográfica que reduz o custo de transporte de matérias-primas e fluxo de produtos, indústrias importantes de diferentes setores, como mineração, automóveis, produtos siderúrgicos, têxteis, cosméticos, alimentos, produtos químicos, produtos farmacêuticos, mobiliário e refinaria de petróleo instalaram suas plantas no distrito industrial [96].

O objetivo deste estudo é fornecer uma investigação inicial sobre os níveis de 17 congêneres de PCDD/Fs, 12 dl-PCBs e 6 ndl-PCBs em solos coletados na área urbana de Belo Horizonte/MG, Brasil. Informações adicionais sobre as áreas de amostragem foram utilizadas para avaliar diferenças entre os grupos e perfis de distribuição dos compostos estudados. Dados deste presente estudo foram comparados com níveis obtidos em solos de outras regiões do Brasil e de diversos outros países.

4.1 Materiais e métodos

4.1.1 Amostragem

Três amostras individuais foram retirados de seis localidades da área urbana de Belo Horizonte/MG, rua prof. baêta viana (BV), rua castelo setúbal (CS), rua prendice coelho (PC), praça dom silvério (PS), rua boreal (AL) e uma amostra em área não-residencial coletada no

departamento de química (DQ) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). A distribuição espacial dos pontos amostrados é mostrada na Figura 16.

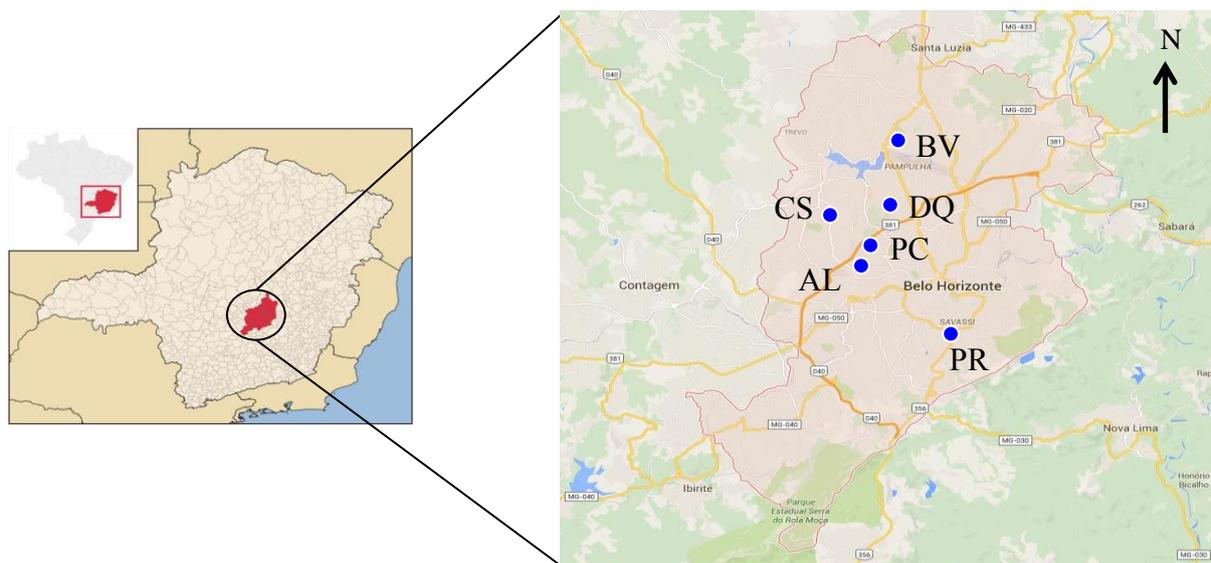


Figura 16: Mapa do Estado de Minas Gerais e da cidade de Belo Horizonte [97].

As amostras foram coletadas a partir da camada superior do solo (5 cm) e armazenadas em frascos de vidro à temperatura ambiente. As análises foram efetuadas no laboratório RIKILT – Institute of Food Safety, em Wageningen UR, na Holanda.

4.1.2 Análises

As amostras foram analisadas para os PCDD/Fs e PCBs por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa de alta resolução (CG/HRMS) por métodos de rotina empregados no laboratório RIKILT [98, 99]. Todos os padrões foram adquiridos da Cambridge Isotope Laboratories (Tewksbury, MA, EUA) e estão listadas na Tabela A. 1. Todos os solventes utilizados foram obtidos a partir da empresa Actu-All Chemicals (Randmeer, The Netherlands) de grau PEC (Tabela A. 2).

Depois da secagem na estufa a 60 °C por 72h, as amostras foram homogeneizadas para posterior extração por solvente acelerada (ASE, Thermo Fisher Dionex, Sunnyvale, EUA). Foram pesados 5 g de solo homogeneizado e fortificados com padrões marcados com ^{13}C (50 pg de PCDD/Fs e NO-PCBs; e 1000 pg de MO-PCBs e ndl-PCBs). Adicionou-se 5 g de terra de diatomáceas, homogeneizada, e a mistura foi transferida para a célula de aço inoxidável do ASE, onde foi extraída 3 vezes de 15 mL com tolueno:etanol (9:1, v/v) a 100 °C de temperatura e 1500 psi de pressão. O extrato foi então eluído por um funil contendo

Na₂SO₄ anidro para remoção total de água e o solvente evaporado no evaporador rotatório. A etapa de *clean-up* para remoção de interferentes da matriz foi realizada em um sistema automatizado de colunas cromatográficas PowerPrep™ (FMS Inc., Waltham, MA, EUA) equipado com uma coluna de sílica ácida, uma coluna de sílica neutra, uma coluna de alumina básica e uma coluna de carvão/celite ativado, adquiridas com o próprio fabricante.

As duas frações obtidas foram analisadas por GC/HRMS Agilent HP6890+GC acoplado a um espectrômetro de massas HRMS (Autospec, Ultima system, Waters, Manchester, UK) para PCDD/Fs e não-orto dl-PCBs e mono-orto dl-PCBs e ndl-PCBs. Para os PCDD/Fs e não-orto dl-PCBs, 100 µL foram injetados num vaporizador de temperatura programada (Gerstel, Mulheim an der Ruhr, Alemanha) no modo de ventilação de solvente, enquanto 2 µL foram injetados no modo splitless para o mono-orto dl-PCBs e ndl-PCBs. A separação dos congêneres ocorreu em coluna capilar de sílica fundida DB-5MS (60 m x 0,25 mm x 0,25 µm) da Agilent J & W (Folsom, EUA), utilizando hélio como gás transportador (pureza 6,0, fluxo 1,2 mL min⁻¹). O programa de temperatura do cromatógrafo está descrito no item 2.6.1 Os limites de quantificação (LQ) listados na Tabela A. 4 foram baseados na relação sinal/ruído (S/N) e foram de aproximadamente 0,02 ng kg⁻¹ d.m. para PCDD/Fs, 0,05 ng kg⁻¹ d.m. para os NO-PCB, 5,00 ng kg⁻¹ d.m. para os MO-PCB e 0,05 ng kg⁻¹ d.m. os ndl-PCBs. Tais LQs foram corrigidos pela recuperação dos padrões e a massa de amostragem, para cada composto. Os resultados em TEQ foram calculadas utilizando os Fatores de Toxicidade Equivalente (TEF) definidos pela WHO em 2005 (Tabela 1).[9].

4.2 Resultados e Discussão

4.2.1 Concentração de PCDDs e PCDFs em solo

Os resultados dos congêneres individuais das dezoito amostras coletadas em Belo Horizonte/MG estão relatadas na Tabela 5. Os níveis totais de TEQ observados variaram de 0,43 a 4,54 ng TEQ kg⁻¹ d.m. com resultado médio de 1,56 (± 1,03) ng TEQ kg⁻¹ d.m. Os maiores níveis de TEQ foram registrados na área PR, seguido pelas áreas PC, DQ, AL, CS e BV. A contribuição dos congêneres de PCDDs no TEQ total, variou de 42 a 90%, enquanto para os PCDFs a contribuição foi de 10-58%. A amostra PR apresentou a maior contribuição de PCDD com média de 82%, enquanto a menor contribuição de PCDDs foi encontrada na área CS (51%).

O padrão de contribuições dos congêneres consistiu principalmente de OCDD (intervalo de 61 - 95%), HpCDD (4 - 19%), OCDF (0,3 - 12%) e PCDFs (0,2 - 10%). Claramente OCDD foi o congêneres mais abundante em todas as amostras de solo. A concentração relativamente alta de OCDD mostra boa concordância com o que já foi encontrado em outros estudos para solos. Por exemplo, Brzuzy e Hites encontraram altas contribuições de OCDD em amostras de solo do estado da Virginia (91% de PCDD/Fs) [81] e Indiana (96% de PCDD/Fs) [100], ambos nos Estados Unidos. Na África do Sul foi descrita a contribuição de 84% de PCDD/Fs [101].

Tabela 5: Níveis de PCDD/Fs e dl-PCBs (ng kg⁻¹ d.m.), e ndl-PCBs (µg kg⁻¹ d.m.) de solos coletados em seis diferentes localidades em Belo Horizonte/MG, Brasil.

Amostra Produto	DQ-1 solo	DQ-2 Solo	DQ-3 solo	CS-1 solo	CS-2 solo	CS-3 solo	PC-1 solo	PC-2 solo	PC-3 solo	PR-1 solo	PR-2 solo	PR-3 solo	BV-1 solo	BV-2 solo	BV-3 solo	AL-1 solo	AL-2 solo	AL-3 solo
PCDD/Fs																		
2,3,7,8-TCDF	0.42	0.46	0.43	0.34	0.32	0.27	0.53	0.18	0.27	0.46	0.29	0.35	0.14	0.16	0.14	0.2	0.27	0.32
1,2,3,7,8-PeCDF	0.28	0.31	0.31	0.34	0.26	0.21	0.59	0.14	0.22	0.37	0.29	0.35	0.16	0.22	0.21	0.24	0.32	0.37
2,3,4,7,8-PeCDF	0.35	0.61	0.36	0.4	0.27	0.28	0.94	0.19	0.27	0.33	0.21	0.31	0.13	0.19	0.15	0.19	0.26	0.27
1,2,3,4,7,8-HxCDF	0.32	2.07	0.33	0.4	0.32	0.32	1.11	0.21	0.35	0.45	0.31	0.45	0.18	0.26	0.16	0.23	0.3	0.31
1,2,3,6,7,8-HxCDF	0.29	1.26	0.32	0.41	0.31	0.3	0.93	0.2	0.29	0.41	0.32	0.49	0.17	0.22	0.16	0.25	0.32	0.33
2,3,4,6,7,8-HxCDF	0.39	1.96	0.39	0.5	0.36	0.21	1.32	0.27	0.41	0.5	0.44	0.7	0.23	0.28	0.17	0.33	0.35	0.44
1,2,3,7,8,9-HxCDF	<0.16	<0.8	<0.14	<0.27	<0.2	<0.12	<0.29	<0.07	<0.12	0.39	0.53	0.55	0.21	0.37	0.4	0.46	0.52	0.58
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	1.75	21.1	1.58	3	2.29	1.81	6.46	1.86	2.31	5.19	6.11	7.43	1.59	1.3	0.79	3.08	3.88	4.51
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	0.13	2.62	0.13	0.25	0.2	0.18	0.6	0.16	0.21	0.37	0.41	0.61	0.14	0.11	0.07	0.21	0.3	0.29
OCDF	1.63	28.9	1.54	5.91	4.95	2.42	6.79	3.93	5.57	17.8	25.6	25.8	2.21	1.5	0.77	11.7	19.5	17.7
2,3,7,8-TCDD	0.04	0.04	0.04	0.04	<0.03	<0.06	0.05	0.02	<0.03	0.05	0.04	0.06	<0.02	<0.03	<0.04	<0.04	<0.04	0.03
1,2,3,7,8-PeCDD	0.14	0.16	0.13	0.15	0.1	0.09	0.26	0.09	0.13	0.19	0.18	0.36	0.07	0.09	0.06	0.12	0.13	0.18
1,2,3,4,7,8-HxCDD	0.13	0.34	0.12	0.13	0.1	0.09	0.43	0.17	0.15	0.23	0.25	0.76	0.1	0.07	0.05	0.13	0.13	0.2
1,2,3,6,7,8-HxCDD	0.52	1.02	0.39	0.39	0.31	0.23	1.52	0.64	0.62	1	1.3	2.76	0.4	0.33	0.25	1	0.76	1.73
1,2,3,7,8,9-HxCDD	0.4	0.57	0.28	0.35	0.3	0.16	0.88	0.35	0.37	1.03	1.66	2.59	0.32	0.32	0.29	0.87	1.08	1.37
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	16.9	30.2	10.6	7.73	6.08	6.89	92.8	70.6	38.8	44.6	76.4	181	21.6	11.8	5.09	69.9	26.8	104
OCDD	83.9	144	61.1	54.2	43.7	46.3	584	1260	328	402	779	3860	201	97.6	46.5	334	238	419
WHO₂₀₀₅-PCDD/F-TEQ (lb)	0.75	1.75	0.65	0.7	0.49	0.44	2.46	1.48	0.97	1.43	1.87	4.44	0.58	0.51	0.34	1.37	0.98	2.04
WHO₂₀₀₅-PCDD/F-TEQ (ub)	0.76	1.83	0.67	0.73	0.54	0.51	2.49	1.49	1.02	1.43	1.87	4.44	0.6	0.54	0.38	1.41	1.02	2.04
dl-PCB's																		
PCB 81	1.28	1.8	1.25	0.8	0.76	0.28	0.94	0.38	0.36	0.25	0.19	0.19	0.11	0.12	0.11	0.15	0.15	0.21
PCB 77	32.2	44.7	29.2	16.9	14.9	5.3	16.8	11.6	10.1	4.07	3.81	3.58	1.9	1.77	1.84	2.51	2.83	3.47
PCB 126	7.61	8.43	5.25	1.53	1.26	0.83	2.83	3.13	2.78	0.94	0.82	0.9	0.4	0.39	0.4	0.54	0.61	0.69
PCB 169	0.94	1.14	0.69	0.21	0.17	0.16	0.44	0.23	0.27	0.2	0.18	0.17	0.09	0.1	0.08	0.13	0.17	0.16
PCB 123	<9.03	<17.9	<6.61	<4.96	<5.31	<5.03	<5.53	<3.63	<4.32	<3.16	<2.82	<5.95	<3.04	<3.81	<2.96	<3.41	<3.3	<3.96
PCB 118	269	798	202	145	153	53.2	124	153	106	32.1	36.4	30.8	14.1	14.9	18.2	25.8	26.8	23
PCB 114	<8.13	16.5	<5.24	<4.55	<4.61	<4.52	<5.12	<3.54	<4.13	<2.82	<2.76	<6.43	<3.53	<3.72	<2.82	<3.28	<3.14	<3.83
PCB 105	112	260	77.2	68.9	73.5	28.4	70.4	81	57.8	16.6	17.9	16.2	6.69	8.72	8.65	12.6	12.7	13
PCB 167	59.9	114	52.9	11.1	12.8	7.43	15.9	16.3	13.3	4.74	4.46	4.59	2.43	<3.19	<3.04	2.5	3.03	<2.86
PCB 156	111	191	96.5	25.1	26.7	15.8	32.3	35.5	28.2	10.9	10.3	10.5	5.03	5.74	6.65	7.38	7.36	5
PCB 157	18.6	31.8	14	6.58	7.45	5.36	8.9	9.28	7.4	<3.46	<4.57	<4.49	<2.83	<3.32	<3.25	<2.6	<2.95	<3.13
PCB 189	20.3	28.5	22.4	2.22	2.24	1.96	<3.41	2.42	2.08	<1.74	<2.55	<2.9	<3.36	<1.28	<1.58	<1.32	<1.64	<1.76
WHO₂₀₀₅-dl-PCB-TEQ (lb)	0.81	0.93	0.56	0.17	0.14	0.09	0.31	0.33	0.29	0.1	0.09	0.1	0.04	0.04	0.04	0.06	0.07	0.08
WHO₂₀₀₅-dl-PCB-TEQ (ub)	0.81	0.93	0.56	0.17	0.14	0.09	0.31	0.33	0.29	0.1	0.09	0.1	0.04	0.04	0.04	0.06	0.07	0.08
WHO₂₀₀₅-PCDD/F-dl-PCB-TEQ (lb)	1.56	2.68	1.21	0.87	0.63	0.53	2.77	1.81	1.27	1.53	1.96	4.54	0.62	0.56	0.38	1.43	1.05	2.12
WHO₂₀₀₅-PCDD/F-dl-PCB-TEQ (ub)	1.57	2.76	1.23	0.9	0.68	0.6	2.8	1.82	1.31	1.53	1.96	4.54	0.64	0.59	0.43	1.47	1.09	2.12
ndl-PCB's																		
PCB 028	0.05	0.13	0.06	0.14	0.19	<0.05	0.11	<0.03	0.03	<0.04	<0.03	<0.03	<0.03	<0.04	<0.03	<0.03	<0.04	INTERF
PCB 052	0.04	0.31	<0.05	0.11	0.14	<0.07	<0.04	0.03	<0.04	<0.03	<0.05	<0.03	<0.04	<0.03	<0.03	<0.06	<0.03	<0.06
PCB 101	0.39	1.1	0.38	0.14	0.16	<0.08	<0.07	0.12	0.07	<0.07	<0.04	<0.05	<0.04	<0.07	<0.04	<0.05	<0.05	<0.06
PCB 153	1.11	2.73	1.07	0.14	0.15	0.08	0.19	0.2	0.16	0.06	0.08	0.08	0.03	0.03	0.05	0.04	0.05	<0.04
PCB 138	0.94	1.88	0.89	0.18	0.19	0.11	0.22	0.25	0.21	0.06	0.07	0.07	<0.05	<0.05	0.04	<0.04	0.05	<0.05
PCB 180	0.78	1.33	0.92	0.07	0.08	0.07	0.11	0.09	0.09	0.05	0.05	0.05	<0.06	<0.02	0.03	0.02	0.03	<0.03
Total ndl-PCBs (lb)	3.31	7.48	3.31	0.78	0.9	0.26	0.63	0.69	0.56	0.17	0.2	0.2	0.03	0.03	0.12	0.07	0.12	0
Total ndl-PCBs (ub)	3.31	7.48	3.36	0.78	0.9	0.46	0.74	0.72	0.6	0.31	0.32	0.31	0.25	0.24	0.22	0.25	0.24	1.33

Hites (1990) [102] em um estudo comparando a distribuição de PCDD/Fs no solo e em fontes de combustão, observou que os congêneres menos clorados (isto é, penta- e tetra-CDD) emitidos para o ambiente, são encontrados em maior quantidade na fase vapor. Uma vez que a massa de ar se move para longe a partir das fonte de emissão, as dioxinas são diluídas com o ar mais limpo e apenas uma pequena parte dos congêneres tetra- e penta- (<40%) são depositadas no solo, de preferência, perto da fonte de emissão. Ainda de acordo com Hites (1990) [102], os congêneres mais clorados, (isto é, hexa-octa-CDD), têm maior tendência a se agregarem ao particulado sólido e serem removidos do ar por deposição atmosférica.

Alguns anos mais tarde, Wagrowski e Hites (2000) [84] sugeriram que a predominância de PCDFs na distribuição em TEQ pode indicar proximidade entre a fonte poluente e o local contaminado, sendo classificados como “fonte. Por outro lado, os perfis com os PCDDs predominantes em relação ao TEQ, são classificados como "dreno", sugerindo que a área de estudo é distante de uma possível fonte de emissão. Além disso, Domingo *et al.* (2001) [103] mostrou que os congêneres mais clorados sofrem menos com o processo de lixiviação do solo, em relação aos menos clorados. Assim, os padrões de PCDD/Fs obtidos nas amostras de solo urbano de Belo Horizonte/MG são consistentes com os padrões descritos em diferentes países.

4.2.2 Concentração de PCBs em solo

O intervalo de valores de dl-PCBs obtido neste estudo foi 0,04 - 0,93 ng TEQ kg⁻¹ d.m. e para ndl-PCBs, 0,22 - 7,48 ng g⁻¹ d.m., descritos na Tabela 5. A contribuição de dl-PCBs no TEQ total variou de 2 a 52%, onde apenas na amostra DQ-1 o nível de dl-PCBs foi predominante em relação aos PCDD/Fs.

4.2.3 Fontes de emissão em potencial

Na Figura 17 são representados todos os valores de PCDD/Fs-TEQ, dl-PCBs-TEQ e ndl-PCBs por amostra coletada.

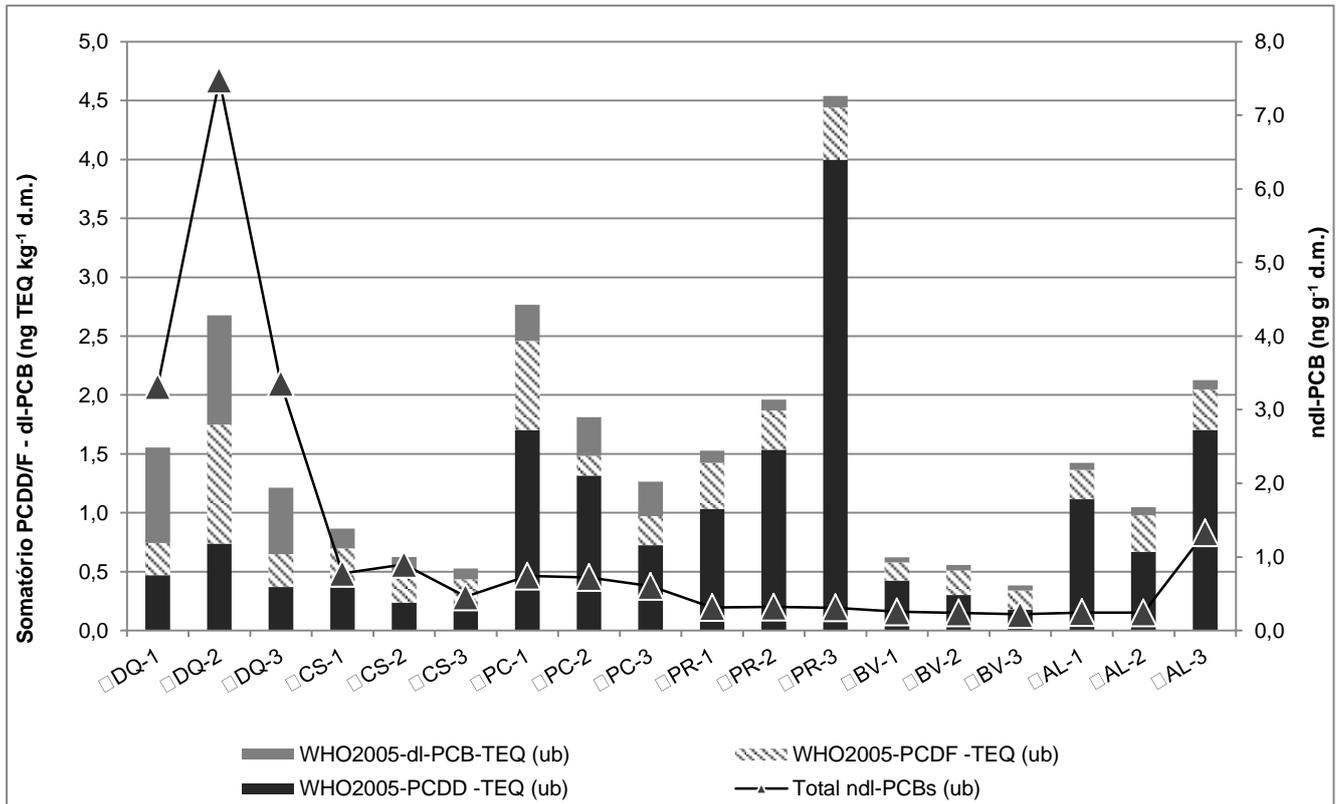


Figura 17: Níveis de PCDD/Fs-TEQ, dl-PCBs-TEQ e ndl-PCBs das amostras individuais de solos coletados em Belo Horizonte/MG.

BV foi considerada a área mais limpa em matéria de PCDD/Fs e PCBs, com níveis médios de $0,55 \text{ ng TEQ kg}^{-1} \text{ d.m.}$ ($\pm 0,11$) e para ndl-PCBs $0,24 \text{ g kg}^{-1} \text{ d.m.}$ ($\pm 0,02$), seguida da área CS com $0,72 \text{ ng TEQ kg}^{-1} \text{ d.m.}$ ($\pm 0,15$). Ambas as áreas poderiam ser influenciadas pelos fornos de cimento localizados na cidade de Pedro Leopoldo, 25 km ao norte de BV e CS. Os fornos de cimento em geral são conhecidos por emitir PCDD/Fs, embora as estimativas dos valores e padrões dessas emissões possam variar [104]. Geralmente, o transporte e deposição de PCDD/Fs dependerá dos fenômenos atmosféricos e a distância entre a fonte e local analisado [102]. Os baixos níveis observados sugerem que as áreas BV e CS não são afetados significativamente pelos fornos de cimento. No entanto, um estudo complementar é necessário para avaliar o impacto ambiental desses fornos em termos de níveis de PCDD/Fs liberados para a atmosfera.

Em contraste, os níveis mais elevados foram encontrados em amostras do sul de Belo Horizonte, na área PR, particularmente mais próxima do centro da cidade. Neste

local, camadas superiores do solo foram amostrados de jardins individuais com cerca de 2 m² cada, situados a menos de 5 metros de distância um do outro, em uma pequena praça pública. Níveis encontrados em PR-1, PR-2 e PR-3 foram 1,53, 1,96 e 4,54 ng TEQ kg⁻¹ d.m., respectivamente, com os PCDDs contribuindo 73 - 90%, em relação ao TEQ-PCDD/Fs. Belo Horizonte é uma cidade metropolitana com alta densidade populacional e rodeado de atividades industriais e de mineração. Uma dessas áreas, o distrito industrial, está situado na cidade de Contagem (cerca de 10 km a oeste de PR, AL e áreas PC), potencial fonte de emissão de PCDD/Fs. Nenhuma das áreas mais próximas a esse distrito obteve concentrações elevadas. Como mencionado antes, o comportamento destes compostos emitidos para a atmosfera sofre influência dos fenômenos naturais. Além disso, o distrito industrial deve ser estudado em detalhe para avaliar se existe qualquer fonte de emissão de PCDD/Fs acima dos limites internacionais permitidos.

Em relação aos ndl-PCBs, os níveis mais elevados estavam na área DQ, com perfil de distribuição diferente das outras amostras. O valor médio foi de 4,72 µg kg⁻¹ d.m. (± 2,39). Os congêneres mais clorados como PCB 153, 138 e 180, contribuíram com 72% para a soma de mono-orto e ndl-PCBs (Figura 18). Frame *et al.* (1996) [105] apresentaram a distribuição dos congêneres de PCBs detalhada em misturas de Aroclor. Os PCBs mais clorados, tais como PCB 153, 138 e 180 foram obtidos principalmente a partir de Aroclor 1260 e 1262. Estes dados tiveram perfil semelhante ao obtido nas amostras DQ.

Dos 209 congêneres diferentes de PCBs, cerca de 140 a 150 são observados nas misturas comerciais de PCBs para equipamentos elétricos. A mistura técnica mais conhecida carrega o nome da marca Aroclor, produzida até 1980 pela companhia Monsanto Corporation, St. Louis, MO, Estados Unidos. Entretanto, como nunca foram produzidas no Brasil, todas as misturas comerciais de PCBs aqui utilizadas foram importadas dos Estados Unidos [13, 87].

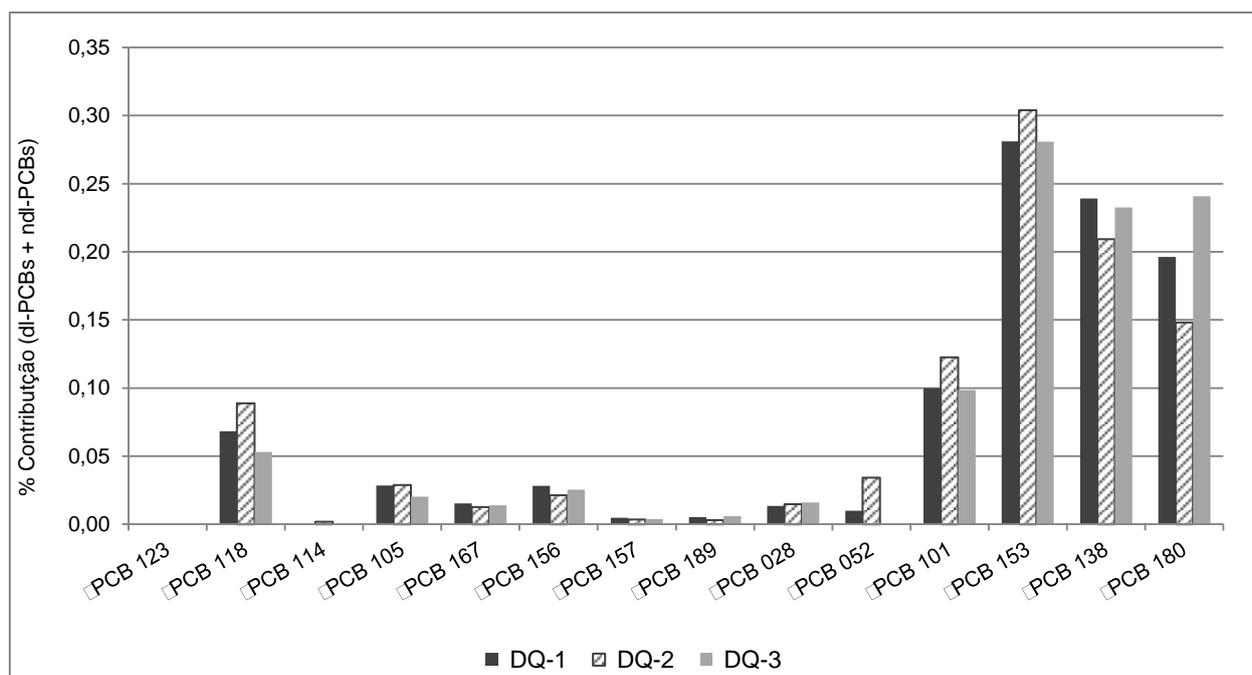


Figura 18: Contribuição dos congêneres de MO-PCBs e ndl-PCBs em solos coletados na área DQ.

Para avaliar a possível fonte de contaminação no local DQ, o perfil de distribuição dos MO-PCBs e ndl-PCBs encontrados nas três amostras coletadas (DQ-1, DQ-2 e DQ-3), foram comparados com os padrões individuais previamente obtidos no RIKILT para cada mistura de Aroclor (1016, 1221, 1232, 1242, 1248, 1254, 1260 e 1262). Além disso, foi calculado o coeficiente de correlação de Pearson (ρ) nos dados de PCBs entre as misturas de Aroclor e as amostras DQ. A maior correlação positiva com solo foi obtido com a mistura Aroclor 1260 ($\rho = 0,91$), seguido de 1262 ($\rho = 0,78$), e 1254 ($\rho = 0,44$).

A Figura 19 representa graficamente a comparação da média dos resultados de DQ e a soma das misturas de Aroclor 1254, 1260 e 1262, multiplicada por um fator de 65 para melhor caracterização de comparação. Estas correlações positivas sugerem que PCBs encontradas na área de DQ pode ser afetada principalmente por misturas Aroclor 1254, 1260 e 1262. A razão para tal contaminação pode ser perto da área recolhida. Como mencionado anteriormente, tais misturas técnicas ainda são utilizadas como fluidos dielétricos em componentes eletrônicos, a exemplo dos capacitores e transformadores [86]. A área de amostragem DQ está localizada a cerca de 70 metros de distância do Laboratório de Alta Tensão Extra, onde se trabalha com transformadores de

alta voltagem, onde ainda se usam misturas Aroclor. Neste caso podemos sugerir que essas sejam as fontes de contaminação dos ndl-PCBs na região coletada. Mais estudos são necessários para avaliar o alcance desses resíduos na área e os riscos para a saúde humana quando de trata da exposição a poluentes orgânicos persistentes, como os PCBs.

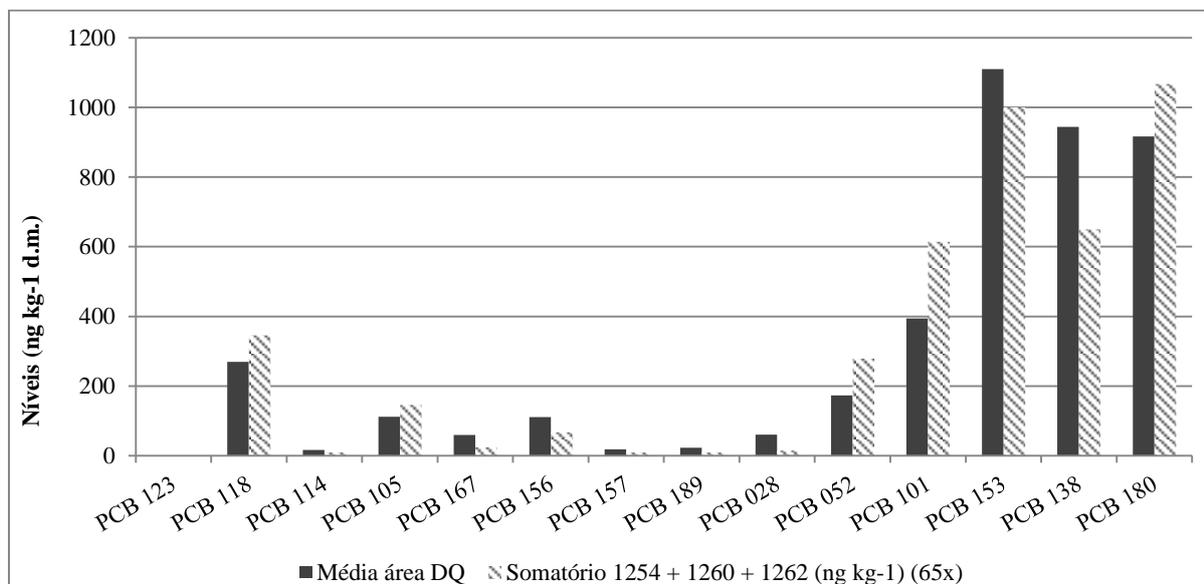


Figura 19: Comparação da média dos resultados obtidos na área DQ e o somatório das misturas de Aroclor 1254, 1260 e 1262.

4.2.4 Comparação com outros países e diretrizes para solos.

É possível encontrar na literatura outros estudos de contaminação de PCDD/Fs e PCBs em solos de regiões diversificadas, relatados por diferentes países.

Comparando-se com o presente estudo, resultados semelhantes para TEQ-PCDD/F-dl-PCBs foram encontrados. Na África do Sul foram relatados níveis entre 0,12 - 16 ng TEQ kg⁻¹ d.m. em solos amostrados na vizinhança de possíveis fontes industriais de emissão (produtor metais ferrosos). Os autores observaram que a maior parte das concentrações estavam abaixo de 6,3 ng TEQ kg⁻¹ d.m. e apenas uma área excedeu esse valor [101]. Em um distrito oriental da China, foram relatados níveis de PCDD/Fs e dl-PCBs em solos da ordem de 0,017 - 5,04 ng TEQ kg⁻¹ d.m., com valor médio de 0,967 (± 1,361) [106]. Em 2012 foram registradas concentrações de 0,30 a 15

ng TEQ kg⁻¹ d.m, na Eslováquia, quando solos foram investigados próximos a incineradores e plantas de processos metalúrgicos [76].

A União Europeia (UE), através do Diretório Geral do Meio Ambiente, produziu em 1999 uma compilação de dados relativos à saúde humana e exposição a dioxinas, entre países membros da UE. A Tabela 6 exhibe os níveis de PCDD/Fs e dl-PCBs relatados em alguns países da Europa, Ásia, África e Américas, em diferentes tipos de solos, urbano, rural ou indefinida [76, 80, 91, 94, 101, 106-123]. A Holanda reportou valores entre 2,2 - 10 ng TEQ kg⁻¹ d.m. e a Espanha, 0,1 - 8,4 ng TEQ kg⁻¹ d.m. para o solo rural. Níveis mais elevados foram registrados na Alemanha, 0,1 - 42 ng TEQ kg⁻¹ d.m. e Reino Unido, 0,78 - 87 ng TEQ kg⁻¹ d.m. em diferentes tipos de solos.

As diretrizes de qualidade de países como Alemanha [80], Canadá [122] e Estados Unidos [124] foram usadas para efeito de comparação com os resultados obtidos em Belo Horizonte/MG. O Canadá possui o menor limite permitido, 4 ng TEQ kg⁻¹ dm para solos agrícolas, residenciais, parque recreativos e terras para fins comerciais, enquanto Alemanha e Estados Unidos determinam níveis da ordem de 5 e 10 ng TEQ kg⁻¹ d.m., respectivamente [122]. Nesse contexto, a amostra PR-3 cujo valor encontrado é 4,54 ng TEQ kg⁻¹ d.m., foi a única amostra a ultrapassar o valor permitido, segundo a diretriz canadense.

Tabela 6: Compilação das concentrações de PCDD/Fs em solos de diversos países.
Concentração em ng TEQ kg⁻¹ d.m. (aI-TEQ; bTEF-WHO1998; cTEF-WHO2005).

Países	Tipo solo	PCDD/Fs-TEQ	dl-PCBs-TEQ	Total-TEQ
Áustria ⁵³	floresta	0,01 – 64 ^a		
	pastagem	1,6 – 14 ^a		
Bélgica ⁴¹	geral	2,7 – 8,9 ^a		
	rural	2,1 – 2,7 ^a		
Finlândia ⁴²	geral	9,1 – 90 ^a		
Alemanha ¹⁶	geral	0,1 – 42 ^a		
	floresta	10 – 30 ^a		
	pastagem	0,004 – 30 ^a		
	terra arável	0,03 – 25 ^a		
Grécia ⁴³	rural	1,0 ^a		
	geral	2 – 45 ^a		
Irlanda	geral	0,15 – 8,6 ^a		
	floresta	4,8 ^a		
	pastagem	0,8 – 13 ^a		
Itália ⁴⁴	geral	0,057 – 0,12 ^a		
	pastagem	0,1 – 43 ^a		
	terra arável	1,9 – 3,1 ^a		
Luxemburgo ⁴⁵	geral	1,8 – 20 ^a		
	floresta	6,0 ^a		
	rural	1,4 ^a		
Holanda ⁴⁶	geral	2 – 55 ^a		
	rural	2,2 – 17 ^a		
Rússia ³⁶	inabitado			0,022-0,1 ^a
	industrial			> 40 ^a
Eslováquia ³⁴	industrial	0,28 – 15,9 ^b	0,069 – 6,5 ^b	
Espanha ⁴⁷	urbano	0,63 – 24,2 ^a		
	rural	0,08 – 8,40 ^a		
Suécia ⁶	rural	0,11 – 11,446 ^a		
Inglaterra ⁴⁸	geral	0,78 – 87 ^a		
	rural	0,78 – 20 ^a		
Brasil ¹⁹	urbano	0,03 - 900 ^a		
Chile ⁴⁹	urbano	0,22 – 2,2 ^a		
EUA ³⁵	urbano	0,13 - 19 ^a		
	aberto	0,04 – 4,6 ^a		
	floresta	0,033 – 5,2 ^a		
Canadá ⁵⁰	urbano	0 - 99 ^a		
	rural	0 - 57 ^a		
China ³³	geral			0,017 – 5,04 ^c
Japão ³⁹	geral	7,9-424 ^a		
África do Sul ²⁷	industrial e rural	0,08 – 11,1 ^c	0,04 – 4,4 ^c	
Coreia ⁴⁰	industrial e urban			4,0 – 8,0 ^a
Austrália ⁵¹	industrial	0,12 - 11 ^b	0,015 – 1,8 ^b	
	urbano	0,11 - 42 ^b	0,0058 – 1,6 ^b	
	agricultura	0,027 – 4,2 ^b	0,0037 – 0,089 ^b	
Nova Zelândia ³⁸	aberto	0,037 – 5,1 ^b	0,0012 – 0,079 ^b	
	floresta e grama	0,17 – 1,99 ^a		
	agricultura	0,17 – 0,90 ^a	0,065 – 1,33 ^a	
	urbano	0,26 – 6,67 ^a		

4.2.5 Resultados de dioxinas no Brasil

Um dos principais estudos que relatam os níveis de PCDD/Fs em solos no Brasil, foi reportado pela UNEP em 1999 e são apresentados na Tabela A. 5 [94]. Neste relatório, os níveis de algumas cidades como Araraquara/SP (0,1 - 1,2 ng I-TEQ kg⁻¹ dm), Cantagalo/RJ (0,6 - 2,5 ng I-TEQ kg⁻¹ d.m.) , Manaus/AM (0,05 - 0,4 ng I-TEQ kg⁻¹ d.m.) e uma área de lazer no Rio de Janeiro (0,03 - 1,8 ng I-TEQ kg⁻¹ d.m.) são comparáveis ao montante obtido em solos de Belo Horizonte/MG (0,38 - 4,44 ng TEQ kg⁻¹ d.m.).

Por outro lado, os níveis referentes aos solos da capital mineira foram menores do que cidades como Cubatão/SP (11 – 341 ng I-TEQ kg⁻¹ d.m.), Formiga/MG (1,4 – 654 ng I-TEQ kg⁻¹ d.m.), Duque de Caxias/RJ (13 – 900 ng I-TEQ kg⁻¹ d.m.) e em uma área industrial não especificada do Rio de Janeiro/RJ (1,1 – 654 ng I-TEQ kg⁻¹ d.m.) [94].

Atualmente, o maior nível já registrado ocorreu na cidade de Duque de Caxias/RJ, em uma antiga fábrica de pesticidas desativada, localizada na região conhecida como Cidade dos Meninos. As amostras de solo coletadas continham níveis de 13.900 ng I-TEQ kg⁻¹ ($\pm 0,9\%$) de PCDD/Fs, enquanto em áreas vizinhas à fábrica, os valores ficaram entre 0,19 e 2,08 ng I-TEQ kg⁻¹. Octa e hepta-clorados foram os congêneres de PCDD/Fs com maior contribuição TEQ encontrados na área afetada pelos pesticidas [93].

4.3 Conclusão

Os níveis de PCDD/Fs e dl-PCBs em solos de Belo Horizonte/MG variaram de 0,43 a 4,54 ng TEQ kg⁻¹ d.m. Esta gama é comparável àquelas encontradas em outras cidades brasileiras como Manaus/AM, Araraquara/SP e Rio de Janeiro/RJ, porém menor do que os níveis descritos em Cubatão/SP, Formiga/MG e Duque de Caxias/RJ. Apesar do caráter metropolitano de Belo Horizonte/MG, com alta densidade populacional e intensa atividade industrial, os níveis encontrados nas seis regiões estudadas são inferiores aos descritos por outros países.

Os dados aqui relatados para Belo Horizonte/MG ainda não podem ser associados com plena garantia de certeza a possíveis fontes de emissão de PCDD/Fs e PCBs. Novos estudos mais detalhados são necessários para investigar as reais fontes que liberam esses contaminantes para o ambiente. Assim é possível estimar o alcance

desses poluentes partindo da fonte, bem como o grau de exposição humana na área urbana de Belo Horizonte/MG.

As concentrações de ndl-PCBs obtidos para o solo na área de DQ foram superiores a outros locais em Belo Horizonte/MG. Foram observadas correlações positivas entre o perfil de distribuição dos ndl-PCBs e a misturas técnica Aroclor 1260, 1262 e 1254. Há suspeita de que transformadores elétricos situados a poucos metros do local de amostragem seja a provável fontes de contaminação desses congêneres.

Os resultados apresentados neste estudo podem ser usados para avaliar a extensão da contaminação de PCDD/Fs e PCBs e contribuir para identificação das principais fontes de emissão e as regiões mais afetadas no Brasil.

CAPÍTULO 5

O DESEMPENHO DE APGC MS-MS EM COMPARAÇÃO COM GC-HRMS PARA A ANÁLISE DE DIOXINAS POLICLORADAS E PCBs EM AMOSTRAS DE ALIMENTOS E ALIMENTOS PARA ANIMAIS.

5 INTRODUÇÃO

Durante décadas, a análise de dioxinas (PCDDs e PCDFs) e PCBs (NO-PCBs, MO-PCBs e ndl-PCBs) em matrizes de alimentos (humana e animal) e amostras ambientais, foi realizada usando cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas de alta resolução (GC-HRMS), numa resolução de 10.000. Este equipamento é considerado pré-requisito na verificação de contaminantes em alimentos, segundo a legislação dos Estados Unidos e da União Europeia. Contudo, nos últimos anos, a espectrometria de massas de baixa resolução (LRMS) vem ganhando espaço para este tipo de análises de conformidade de alimentos [55, 125, 126].

Anteriormente, o uso da técnica GC-MS/MS para análises de PCDD/Fs e PCBs restringia-se a amostras ambientais, uma vez que a sensibilidade instrumental dos espectrômetros de baixa resolução não alcançava a faixa de trabalho do equipamento GC-HRMS. O avanço tecnológico e as adaptações metodológicas tornaram útil a aplicação do equipamento GC-MS/MS para análises destes congêneres em alimentos,

porém ainda sem atender os baixos níveis de contaminação das amostras de alimentos [127-130]

Mais recentemente, a cromatografia gasosa com ionização química a pressão atmosférica, um tipo de ionização suave, foi desenvolvida [130-133] e aperfeiçoada para obter maior sensibilidade [134-136].

A técnica APGC, após os analitos saírem do GC, encontram uma nuvem de plasma formada por uma descarga de corona com fluxo de entrada de nitrogênio sob condições atmosféricas. Estes compostos sofrem ionização por transferência de carga primária e/ou secundária [137, 138]. A ionização suave gera rendimentos de íons moleculares muito mais elevados em comparação com a ionização por impacto de elétrons (EI), esta última causando substancial fragmentação na fonte.

Ao se combinar APGC com MS/MS e aplicar para análises de PCDD/Fs e PCBs, surge a oportunidade de uma análise mais sensível e seletiva, por uma técnica diferente do GC-HRMS, dentro da faixa de níveis aceitável para alimentação humana e animal, com identificação e quantificação inequívocas.

Estudos recentes demonstraram o potencial da técnica APGC-MS/MS para a detecção seletiva e sensível de dioxinas e furanos, porém sem abranger ainda os PCBs [137, 138], mas pouco ainda se sabe sobre o desempenho total da nova metodologia.

Neste capítulo tem-se como objetivo, investigar a aplicabilidade da técnica APGC-MS/MS na detecção e quantificação de PCDD/Fs e PCBs em amostras diversificadas de alimentos (para humanos e animais). Foram testados os parâmetros de sensibilidade, seletividade e faixa dinâmica, em conformidade com a regulamentação da União Europeia [125].

A técnica também foi testada em mais de 200 amostras de alimentos, para os compostos citados, em variadas concentrações, e os resultados comparados com os do equipamento GC-HRMS do laboratório RIKILT. Foram realizados testes de intercomparação com materiais de referência certificado (SRM1947 – tecido de peixe) e material de referência interno (299520 – óleo de girassol), que foram enviados ao Centro de Pesquisa e Tecnologia Analítica (CART), laboratório de referência nacional da Bélgica, situado na Universidade de Liège, também equipado com o instrumento APGC-MS/MS.

5.1 Materiais e Métodos

5.1.1 Preparo de Amostras

As amostras analisadas para PCDD/Fs e PCBs foram preparadas utilizando métodos rotineiros empregados no laboratório RIKILT, já descritos previamente no item Capítulo 2 onde foram detalhados os procedimentos de extração e *clean-up*.

Um grande número de amostras, branco e as amostras de controle (n>200), que incluem produtos alimentícios para humanos, alimentos para animais e amostras ambientais, foram analisadas para se investigar o desempenho do APGC-MS/MS, em comparação com GC-HRMS. Em sua grande maioria, as amostras eram oriundas dos programas de monitoramento nacional do governo holandês para produtos agrícolas primários, produtos de pesca e alimentos, além de amostras de solo.

Em amostras de gordura animal, utiliza-se o aquecimento em micro-ondas para extrair a gordura contendo as dioxinas. Em amostras de peixe magro foi utilizado o método SMEDES [52] descrito no item 2.4.1. Para amostras de solo e outros tipos de alimentos seco, foi utilizada a extração acelerada por solvente (ASE, Thermo Fisher Dionex, Sunnyvale, EUA), detalhada no item 2.4.2.

O procedimento de *clean-up* foi igual para todas as amostras, utilizando o sistema automatizado de colunas PowerPrep™ (FMS Inc., Waltham, MA, EUA), descrito no item 2.5.2.

Da etapa de purificação, todas as amostras resultaram em duas frações, fração A contendo MO-PCBs e ndl-PCBs em 500 µL de iso-octano e a fração B contendo PCDD/Fs e NO-PCBs em 500 µL de tolueno.

5.1.2 PCDD/Fs e PCBs – Solventes, padrões e material de referência

Os padrões de PCDD/Fs e PCBs foram adquiridos da Cambridge Isotope Laboratories (Tewksbury, MA, EUA) (Tabela A. 1). Todos os solventes utilizados foram obtidos a partir da Actu-All Chemicals (Randmeer, Holanda) e foram de grau PEC (Tabela A. 2).

O material de referência certificado SRM1947 (tecido de peixe), obtido da NIST (Gaithersburg, EUA), e o material de referência interno 29950 (óleo de girassol) foram usados para controle de qualidade de rotina. O óleo de girassol é fortificado com 0,92 pg TEQ-PCDD/Fs g⁻¹ de produto, 0,79 pg TEQ-dl-PCBs g⁻¹ de produto e 16 ng g⁻¹ de

produto para a soma ndl-PCBs. Amostras do ensaio de proficiência de 2015 para dioxinas e PCBs foram recebidas do Laboratório de Referência da União Europeia (EU-RL) (Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt, Freiburg, Alemanha).

5.1.3 Instrumental de análise

As amostras foram primeiramente analisadas no instrumento GC-HRMS Autospec da Waters (Manchester, UK) equipado com um cromatógrafo a gás Agilent 6890 (Santa Clara, EUA), um amostrador automático PAL Combi da CTC (Zwingen, Suíça) e um injetor com vaporização de temperatura programada (PTV) CIS-3 da Gerstel (Mülheim an der Ruhr, Alemanha) com resfriamento criogênico de CO₂.

O sistema APGC-MS/MS contou com um espectrômetro de massas Xevo TQ-S da Waters (Manchester, UK) equipado com um cromatógrafo a gás Agilent 6890 (Santa Clara, EUA), um amostrador automático PAL Combi da CTC (Zwingen, Suíça) e um PTV CIS-4 com resfriamento UPC (*Universal Peltier Cooling*) da Gerstel (Mülheim an der Ruhr, Alemanha).

Algumas amostras em particular contendo interferentes também foram analisadas por um GC-EI-MS/MS (Agilent (Varian), Santa Clara, EUA) e um GC-orbitrap (Thermo Scientific, Waltham Massachusetts, EUA), apenas para MO-PCBs e ndl-PCBs.

5.1.4 Métodos e condições do cromatógrafo a gás

A fim de garantir que ambas as técnicas de detecção fossem comparadas no presente estudo, os métodos de GC, que englobam método de injeção e programa de temperatura da coluna, foram mantidos os mesmos para o GC-HRMS e o APGC-MS/MS. Colunas capilares iguais de sílica fundida DB-5MS (60 m x 0,25 mm x 0,25 µm) da Agilent J&W (Folsom, EUA) foram utilizadas, e gás hélio (pureza 6,0) como gás transportador a fluxo constante de 1,2 mL min⁻¹.

No instrumento APGC-MS/MS, a temperatura de interface foi fixada em 350 °C, adequada para obter boa separação entre os congêneres estudados quando injetadas soluções-padrão. Porém, nas análises de amostras reais houve formação de cauda nos picos cromatográficos de compostos com faixa de ebulição mais elevada, implicando em elevados limites de quantificação. A temperatura da interface foi então aumentada para 375 °C.

5.1.5 Métodos e condições do espectrômetro de massas

O método GC-HRMS é baseado no método EPA 1613 [55], usa uma resolução de 10000 a 10% da altura do pico e é calibrado antes de cada sequência (ítem 2.6.2). O método APGC-MS/MS operou em modo de monitoramento múltiplo de reação (MRM). Os íons moleculares selecionados foram os mesmos para o teste, sendo alterado apenas o OCDF para o APGC-MS/MS cujo sinal-ruído foi elevado nesta faixa. As massas ajustadas para os congêneres de PCDD/Fs e NO-PCBs encontram-se descritas na Tabela A. 8, e para os MO-PCBs e ndl-PCBs na Tabela A. 9.

De acordo com o método EPA 1613 [55], a escolha dos fragmentos de íons é baseada na abundância teórica calculada a partir da abundância isotópica natural.

5.2 Resultados e discussão

5.2.1 Sensibilidade

A sensibilidade do instrumento e o sinal/ruído são parâmetros essenciais em análises de PCDD/Fs e PCBs no controle de alimentos, e, portanto, foram alvo inicial deste projeto.

Nos primeiros testes foram usadas massas nominais (sem casas decimais) dos íons estabelecidos durante as transições de massa, para aquisição pelo método de múltiplas reações (MRM) do APGC-MS/MS. Percebeu-se que a diferença entre a massa nominal e a massa exata dos compostos, poderia afetar o sinal de modo significativo, causando a perda de íons, especialmente para os congêneres mais clorados de PCDD/Fs e PCBs. Esta diferença é chamada de defeito de massa. A resolução do sistema MS/MS foi então ajustada para 0,75 Da minimizando a perda de íons devido ao defeito de massa.

Com o ajuste das massas exatas com duas casas decimais, foram injetadas soluções-padrão de PCDDs (TCDD – OCDD, 20 pg na coluna) para avaliar a sensibilidade da nova técnica.

A Figura 20 mostra o resultado do teste que avaliou a sensibilidade da técnica, pré-requisito para estas análises. Para o TCDD observou-se um aumento de 5% na área do pico, enquanto que para a dioxina mais clorada, OCDD, houve um aumento de 87%. Os PCBs não foram testados, mas espera-se comportamento semelhante.

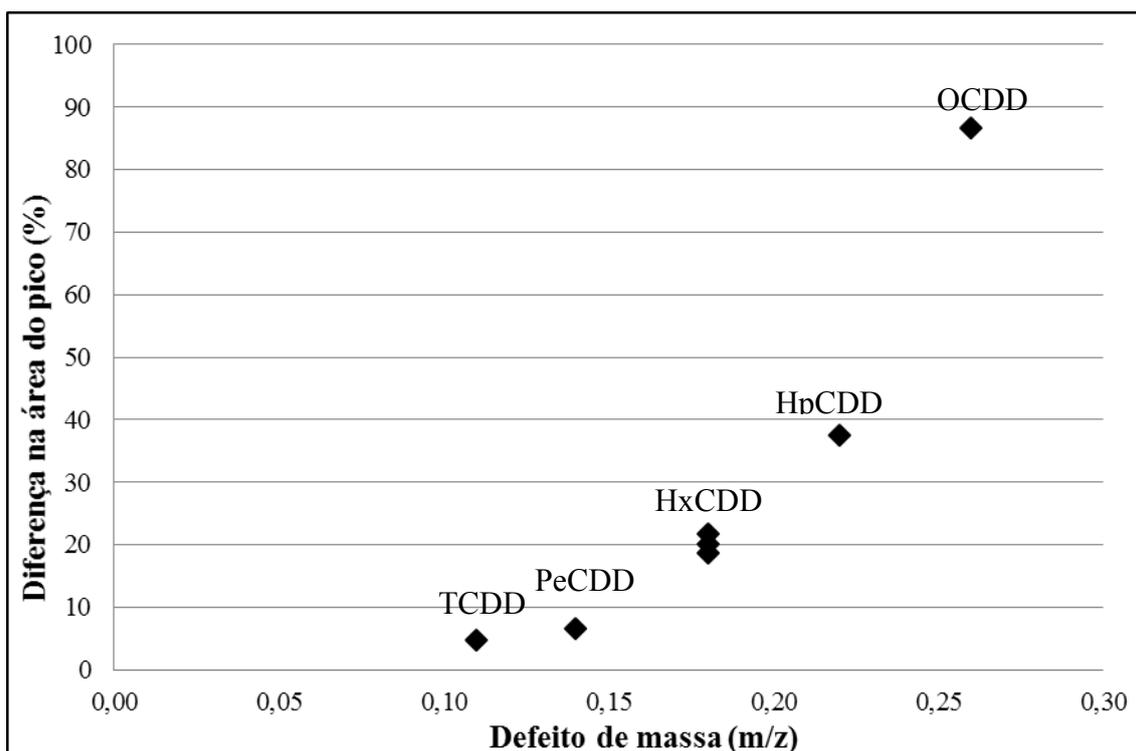


Figura 20: Diferença na área do pico em relação à massa dos congêneres de PCDDs.

A sensibilidade dos congêneres de PCDD/Fs e NO-PCBs foi determinada sob condições reprodutíveis por análise de 8 lotes diferentes de solução-padrão com injeção de 200 fg na coluna. Para os MO-PCBs e ndl-PCBs foram injetados 40 fg na coluna. Foi calculado o valor quadrático médio do sinal-ruído (S/N) dos congêneres para avaliar a sensibilidade das técnicas empregadas.

No APGC-MS/MS, os PCDD/Fs e NO-PCBs obtiveram média de S/N de 390 e 826, respectivamente. Já o GC-HRMS resultou em 124 para os PCDD/Fs e 150 para os NO-PCBs.

Para os congêneres de MO-PCBs e ndl-PCBs, os experimentos obtiveram média de S/N de 753 no APGC-MS/MS, demonstrando elevada sensibilidade a esses íons, na proporção de 11 S/N fg⁻¹, contra 4 S/N fg⁻¹ obtidos para os NO-PCBs. Retirando-se os valores extremos obtidos para os PCB 189, PCB 153 e PCB 180, a diferença torna-se um pouco menor, 8 S/N fg⁻¹.

Para o GC-HRMS, os MO-PCBs e ndl-PCBs tiveram grande variação do S/N (RSD = 47%), e também foi observada significativa variância no APGC-MS/MS, especialmente para os congêneres PCB 189, PCB 153 e PCB 180 (Tabela A. 10).

De modo geral, a técnica APGC-MS/MS foi mais sensível de 2 a 10 vezes para os PCDD/Fs e NO-PCBs, e 4 a 25 vezes mais sensível para os MO-PCBs e ndl-PCBs, em relação à técnica GC-HRMS.

Foi testada a estabilidade da resposta e do fator de resposta (RF) na técnica nova, e comparada com o GC-HRMS. Os valores de resposta e a média do desvio padrão relativo da repetibilidade (RSD_r) estão expressos na Tabela A. 11, e o fator de resposta seguido do RSD_r na Tabela A. 12.

A média do RSD_r para os MO-PCBs e ndl-PCBs foi de 5,5% para o APGC-MS/MS e 8,6% para o GC-HRMS para a resposta, a um nível de 40 fg na coluna. A média do RSD_r para o RF foi de 3,3% para o APGC-MS/MS e 5,0% para o GC-HRMS. Além disso, não foram observadas grandes diferenças entre os compostos.

Quando se trata da reprodutibilidade, a média do desvio padrão relativo (RSD_R) do S/N para os PCDD/Fs é menor no GC-HRMS (28%) do que no APGC-MS/MS (65%). Para os NO-PCBs 42% no GC-HRMS e 26% no APGC-MS/MS.

Em análises de rotina, a grande variação na razão S/N é indesejável, uma vez que este é usado para determinar os limites de quantificação (LQ) nas amostras. Esta variação do S/N observada também nos cromatogramas do APGC-MS/MS foi causada pela configuração padrão quanto à contagem de íons, usada para reduzir o sinal de fundo. A contagem de íons determina se os íons detectados são registrados como resposta ou com valor de zero. Como no GC-HRMS o sinal de fundo é estável, nenhum limite para o número de íons é aplicado.

Para o APGC-MS/MS, se fez necessário otimizar e ajustar o limite da contagem de íons para 3, mantendo-se um baixo sinal de fundo. Com este valor, a razão S/N foi de 429 (\pm 39%), ainda significativamente mais elevada do que no GC-HRMS. Porém o LQ permaneceu abaixo daquele registrado para GC-HRMS, devido à maior sensibilidade do APGC-MS/MS.

5.2.2 Linearidade e Faixa Linear

O coeficiente de determinação (R^2) foi calculado para avaliar a linearidade do APGC-MS/MS. Para os congêneres de PCDD/Fs, nove pontos de soluções-padrão foram injetadas no instrumento (0,2 - 20 pg na coluna) e os resultados obtidos foram de $0,9992 < R^2 < 0,9999$ para os compostos afins. A faixa de estudo dos dl-PCBs e ndl-

PCBs foi de 0,2 - 200 pg na coluna, e resultou em um coeficiente de $0,9993 < R^2 < 0,9999$.

Com os dados de resposta, observou-se que para os MO-PCBs e ndl-PCBs ocorreu saturação no detector no nível acima de 100 pg na coluna (Tabela A. 11). Nova injeção foi feita na faixa de 0,2 - 100 pg na coluna e o coeficiente de determinação obtido foi $> 0,9993$. Os coeficientes de determinação calculados para o APGC-MS/MS não diferem do observado para o GC-HRMS de modo geral.

5.2.3 APGC-MS/MS – Desempenho em amostras de referência.

O laboratório RIKILT dispõe de materiais de referência certificados para testes de e avaliação dos procedimentos, que são analisados rotineiramente para manutenção do desempenho desejado. Tais amostras foram utilizadas para avaliar o desempenho do APGC-MS/MS em relação ao GC-HRMS.

Entre os materiais disponíveis, está o material de referência interno, produzido pelo próprio RIKILT e testado em estudos interlaboratoriais. Trata-se do material 299520, óleo de girassol, cujas concentrações foram descritas no item 5.1.2. Encontra-se também o material de referência certificado SRM 1947 (tecido de peixe). Além disso, em 2015 foram recebidas pelo RIKILT amostras do ensaio de proficiência designadas pelo Laboratório de Referência da União Europeia (EU-RL).

Durante as análises de rotina de alimentos por GC-HRMS são incluídas semanalmente, em algumas baterias, amostras de óleo de girassol fortificadas ligeiramente acima do limite máximo aceito pela União Europeia para óleos vegetais (1,25 pg total-TEQ g⁻¹ óleo) [47]. Estas amostras também foram analisadas por APGC-MS/MS, respeitando-se as mesmas sequências, a fim de se testar a reprodutibilidade da nova técnica. A média dos resultados obtidos em ambos os instrumentos e os valores do teste t-student e teste-F estão expressos na Tabela 7.

O teste t-student ($\alpha = 0,025$) foi utilizado para avaliar a significância da média das concentrações obtidas por ambas as técnicas. As variâncias de ambos os métodos foram comparados pelo teste F ($\alpha = 0,05$) para todos os congêneres individuais e para os somatórios de TEQ total.

Na Tabela 7 estão destacados os valores referentes aos congêneres que não passaram nos testes t-student e teste-F, quando calculados de forma individual (35 compostos) e os 4 parâmetros de soma (TEQ e soma de ndl-PCBs). Pode-se afirmar que

95% dos resultados foram aprovados no teste-t e 54% aprovados no teste-F, demonstrando que, para estas amostras, as técnicas aqui estudadas são comparáveis.

Destacam-se os congêneres de PCB 105 e PCB 138, que não passaram no teste t-student, onde a média dos resultados do APGC-MS/MS e do GC-HRMS diferiram em 3,4% para o PCB 105 e 7,6% para o PCB 138.

Os desvios no teste-F para os congêneres individuais de PCDD/Fs e para a soma total TEQ-PCDD/Fs são sistematicamente mais elevados. O valor de precisão intermediária relativa (7,5%), elevado quando comparado com o GC-HRMS (3%), ainda atende ao limite máximo permitido pela União Europeia, que é de 15% [125].

As amostras de ração animal obtidas do Laboratório de Referência da União Europeia (EU-RL) para o ensaio de proficiência em 2015 foram analisadas em uma única batelada por ambas as técnicas. Os desvios calculados para o APGC-MS/MS ficaram abaixo de 10%, exceto para os congêneres PCB 138 e PCB 153, que sofreram maiores desvios.

Na comparação dos resultados do material de referência certificado SRM1947 (tecido de peixe), os dados obtidos foram semelhantes entre o APGC-MS/MS e o GC-HRMS, novamente diferindo apenas para os PCB 138 e PCB 153. Tal diferença foi confirmada pelo Laboratório CART, na Universidade de Liège, Bélgica.

De modo geral, a técnica APGC-MS/MS demonstrou desempenho razoável diante do GC-HRMS para análises de amostras de referência, para além da subestimação do PCB 138 e em menor escala, do PCB 153. A precisão dos dados é um pouco superior comparada aos dados gerados pelo GC-HRMS.

Tabela 7: Comparação entre GC-HRMS e APGC-MS/MS em análises do material de referência interno (PCDD/Fs e dl-PCBs: ng kg⁻¹ produto; ndl-PCBs: µg kg⁻¹ produto (12% de umidade)).

	APGC		HRMS		n	t-test		F-test	
	Média	SD	Média	SD		t	t limit	F	F limit
WHO2005 - PCDD/F-dl-PCBs-TEQ(ub)	1,88	0,15	1,79	0,04	11		1,81	3,42	2,98
PCDD/Fs									
WHO2005 - PCDD/F-TEQ (ub)	1,03	0,08	0,98	0,03	10	1,85	2,20	5,53	3,02
2,3,7,8-TCDF	0,32	0,02	0,32	0,02	10	0,12	2,09	2,02	3,02
1,2,3,7,8-PeCDF	0,32	0,02	0,32	0,01	10	0,37	2,09	2,28	3,02
2,3,4,7,8-PeCDF	0,33	0,02	0,32	0,01	10	1,04	2,16	3,35	3,02
1,2,3,4,7,8-HxCDF	0,33	0,03	0,32	0,01	10	0,87	2,23	12,4	3,02
1,2,3,6,7,8-HxCDF	0,31	0,02	0,32	0,01	10	0,13	2,16	3,65	3,02
2,3,4,6,7,8-HxCDF	0,30	0,03	0,32	0,02	9	1,58	2,20	3,49	3,02
1,2,3,7,8,9-HxCDF	0,31	0,02	0,31	0,02	10	0,17	2,09	1,80	3,02
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0,41	0,11	0,36	0,02	10	1,38	2,26	22,5	3,02
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	0,30	0,02	0,32	0,02	10	1,91	2,09	1,29	3,02
OCDF	0,33	0,03	0,32	0,02	9	0,60	2,10	1,58	3,02
2,3,7,8-TCDD	0,36	0,09	0,31	0,02	10	1,93	2,26	24,5	3,02
1,2,3,7,8-PeCDD	0,30	0,02	0,31	0,01	10	0,91	2,09	2,93	3,02
1,2,3,4,7,8-HxCDD	0,29	0,03	0,29	0,01	10	0,04	2,18	4,91	3,02
1,2,3,6,7,8-HxCDD	0,32	0,04	0,32	0,02	10	0,12	2,20	6,10	3,02
1,2,3,7,8,9-HxCDD	0,30	0,02	0,30	0,02	10	0,98	2,09	1,54	3,02
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	0,40	0,12	0,36	0,03	10	0,98	2,23	13,6	3,02
OCDD	0,84	0,53	0,59	0,10	10	1,47	2,26	29,1	3,02
dl-PCBs									
WHO2005 - dl-PCB-TEQ (ub)	0,81	0,03	0,81	0,02	11	0,12	2,09	2,36	2,98
PCB 81	5,71	0,22	5,80	0,13	11	1,16	2,09	2,92	2,98
PCB 77	7,29	0,42	7,28	0,45	11	0,04	2,09	1,14	2,98
PCB 126	6,24	0,24	6,20	0,16	11	0,46	2,09	2,25	2,98
PCB 169	5,36	0,17	5,45	0,16	11	1,36	2,10	1,25	2,98
PCB 123	80,2	3,53	79,7	2,04	11	0,40	2,09	2,99	2,98
PCB 118	79,6	4,84	78,7	3,87	11	0,46	2,09	1,56	2,98
PCB 114	83,9	4,42	81,8	2,18	11	1,38	2,18	4,10	2,98
PCB 105	81,1	3,76	77,7	2,27	11	2,60	2,09	2,75	2,98
PCB 167	74,6	1,92	72,9	1,98	11	1,91	2,10	1,06	2,98
PCB 156	79,3	2,06	78,0	4,38	11	0,89	2,09	4,51	2,98
PCB 157	71,7	1,34	70,7	2,02	11	1,28	2,11	2,26	2,98
PCB 189	76,8	1,72	76,2	2,40	11	0,66	2,09	1,94	2,98
ndl-PCB									
Total ndl-PCB (ub)	16,1	0,45	16,6	0,80	11	1,46	2,12	3,14	2,98
PCB 28	2,94	0,11	2,95	0,11	11	0,15	2,09	1,09	2,98
PCB 52	2,43	0,08	2,46	0,13	11	0,59	2,09	2,83	2,98
PCB 101	2,50	0,12	2,44	0,17	11	0,95	2,09	1,78	2,98
PCB 153	2,38	0,07	2,52	0,20	11	2,17	2,18	8,62	2,98
PCB 138	2,90	0,15	3,14	0,18	11	3,28	2,09	1,45	2,98
PCB 180	2,99	0,08	3,05	0,15	11	1,25	2,13	3,39	2,98

5.2.4 APGC-MS/MS – Avaliação de desempenho em amostras reais

Rotineiramente o laboratório RIKILT analisa dezenas de amostras nas mais variadas matrizes e níveis de contaminação por PCDD/Fs e PCBs. Amostras reais em matrizes de alimentos (gordura animal, leite, ovos, fígado, óleos vegetais, peixe e fígado de peixe), alimentos para animais (ingredientes de ração animal, farinha de peixe e ração mineral) e amostras ambientais (argila, solo e águas residuais) são enviadas ao instituto diariamente.

A faixa de concentração nessas amostras pode variar de níveis abaixo do limite de quantificação (<0,05 ppt total-TEQ-PCDD/Fs-dl-PCBs e 0,1 ppb ndl-PCBs) até valores muito acima dos permitidos pela União Europeia para alimentação humana e animal (>100 ppt total-TEQ-PCDD/Fs-dl-PCBs e >500 ppb ndl-PCBs).

Este cenário permitiu que a versatilidade da técnica APGC-MS/MS fosse avaliada em uma ampla variedade de produtos e níveis, similar ao que ocorre corriqueiramente para o GC-HRMS.

Um grande número de amostras reais (n>200) foi analisada pela nova técnica para os testes de seletividade e robustez, respeitando os mesmos critérios estabelecidos para o GC-HRMS. Mantendo-se a igualdade das condições para efeito comparativo, os extratos de todas as amostras selecionadas que foram analisados no GC-HRMS, também seguiam para análise no APGC-MS/MS.

Devido ao enorme volume de dados obtidos para os congêneres individuais e parâmetros de soma, os resultados comparativos são apresentados na Figura 21 em forma de gráficos que expressam as variações, positivas e negativas, do APGC-MS/MS em relação ao GC-HRMS.

As diferenças foram calculadas do seguinte modo: [(resultados do APGC-MS/MS – resultados do GC-HRMS)/resultados do GC-HRMS]. Devido à variedade de matrizes estudadas, todas as unidades foram expressas em partes por trilhão (ppt) para simplificar a discussão.

Os resultados dos congêneres individuais e parâmetros de soma para PCDD/Fs e dl-PCBs obtidos no APGC-MS/MS foram próximos aos valores do GC-HRMS. As diferenças são na sua maioria abaixo de 20%, valor que se eleva com a diminuição das concentrações quantificadas. Os cálculos foram feitos sobre os valores de *upperbound*.

Observou-se que os resultados para os congêneres de ndl-PCBs do APGC-MS/MS são sistematicamente menores em relação aos valores do GC-HRMS, especialmente para os PCB 138 e PCB 153, como já descrito anteriormente.

Amostras de fígado de peixe com níveis elevados de contaminação, foram enviadas para o laboratório CART a fim de avaliar se a tendência relatada ocorria apenas no instituto RIKILT ou devido a ionização branda do instrumento APGC-MS/MS.

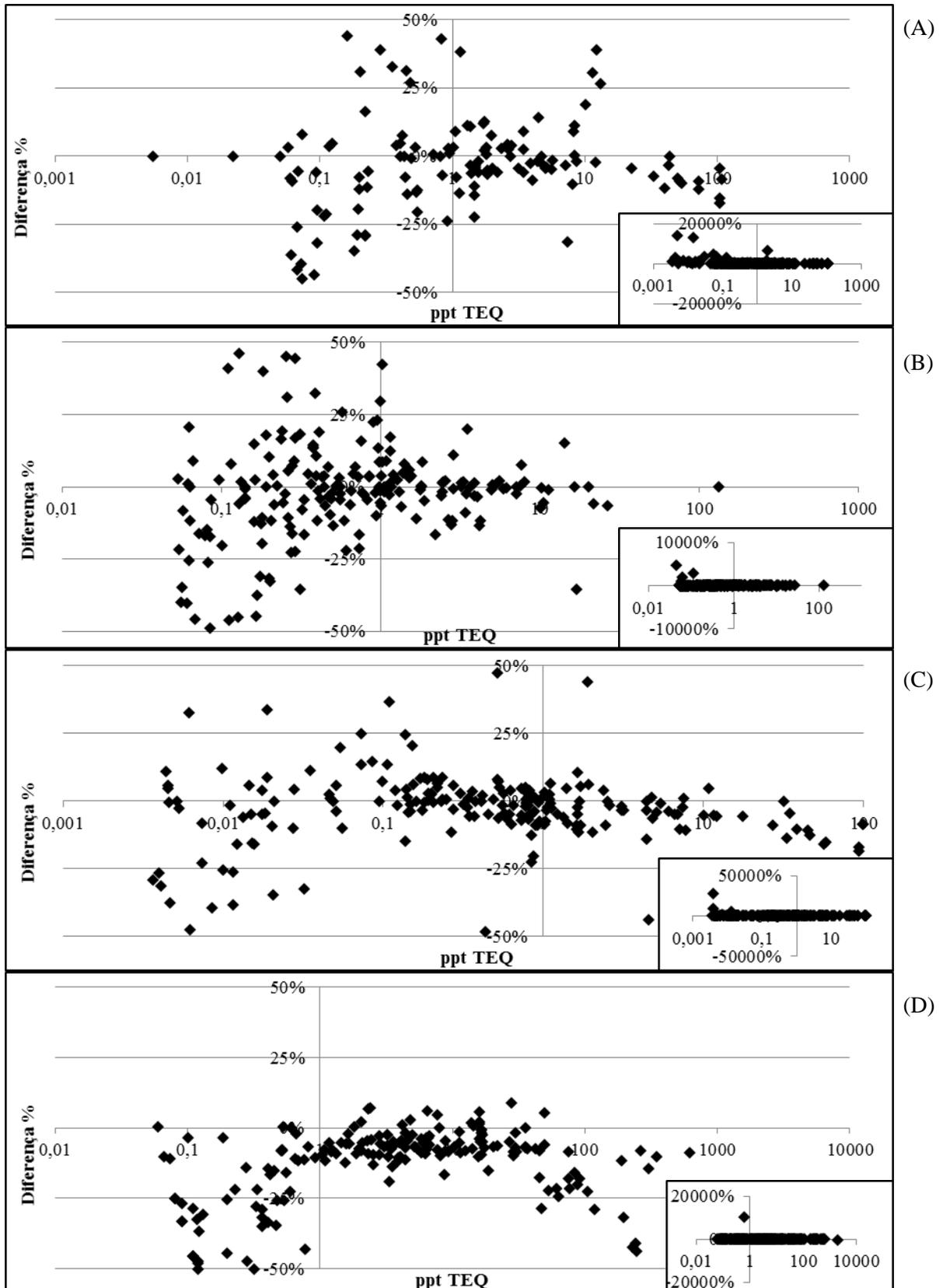
Os resultados enviados pelo CART, após análise em outro equipamento APGC-MS/MS, foram semelhantes aos encontrados pelo RIKILT, incluindo a subestimação para o PCB 138, sob condições iguais de análises em ambos os laboratórios. Isto sugere que existe uma subestimação sistemática para estes valores, de causas ainda desconhecidas até o presente momento.

O fato que chamou a atenção foi o comportamento da dioxina mais tóxica, 2,3,7,8-TCDD. Enquanto para o GC-HRMS, em algumas amostras, o nível estava abaixo do limite de quantificação (LQ), para o APGC-MS/MS este congêneres foi detectado e quantificado acima do LQ.

Percebeu-se que havia um *background* relativo ao TCDD durante as análises por GC-HRMS, quando foram adicionadas quantidades relativamente mais elevadas do padrão de *clean-up* (^{37}Cl -2,3,7,8-TCDD). Tal *background* não foi quantificado quando houve menor adição de ^{37}Cl -2,3,7,8-TCDD. A análise de soluções de padrões internos em solventes não explicou a resposta obtida para a 2,3,7,8-TCDD, uma vez que não foi detectado o *background* em solvente. Uma hipótese levantada é que houve contaminação acidental em determinadas amostras, provocada por algum artefato utilizado durante o tratamento das mesmas.

Embora identificado, este *background* existente é muito baixo e não afeta a quantificação de níveis próximos aos limites máximos permitidos. Porém, é importante salientar que tal sinal de fundo é indesejável e pode resultar em desarmonia quando níveis totais de dioxina são comparados entre APGC-MS/MS e GC-HRMS.

Figura 21: Comparação entre APGC-MS/MS e GC-HRMS, diferença dos resultados de A: soma total de PCDD/Fs e PCBs em upperbound; B: total-PCDD/Fs (ub); C: total-PCBs (ub); e D: total-ndl-PCBs.



5.2.5 Seletividade

Como descrito anteriormente, a presença indesejável de interferentes em análises de PCDD/Fs e PCBs pode levar a erros de quantificação caso não sejam identificados. Para isto avaliou-se a seletividade da técnica APGC-MS/MS comparando-se os cromatogramas obtidos das mesmas amostras para ambas as técnicas.

Em algumas amostras de peixe, incluindo o material de referência certificado SRM1947, foram identificados alguns interferentes no cromatograma do padrão interno marcado ^{13}C para os PCBs (Figura A. 12). Não foram observados interferentes para os PCBs nativos. Embora possam prejudicar a quantificação dos congêneres, esses interferentes foram facilmente identificados pelos analistas e não afetaram os resultados.

Os mesmos extratos de amostras foram analisados num equipamento alternativo (GC-EI-MS/MS) e no equipamento APGC-MS/MS do laboratório CART, e todos os cromatogramas apresentaram a interferência identificada. Concluiu-se então que a falta de seletividade parece não ser dependente do instrumento em si, mas da metodologia MS/MS propriamente.

De forma geral, a presença de interferentes nos cromatogramas pode afetar a razão entre os íons moleculares (nativos e marcados) nas duas técnicas testadas, APGC-MS/MS e GC-EI-MS/MS, ocasionando o descumprimento da legislação quanto aos métodos confirmatórios [125]. As hipóteses mais prováveis levantadas pelos pesquisadores que participaram do projeto é que a resolução cromatográfica precisa ser ao menos similar em ambas as técnicas (GC-HRMS e APGC-MS/MS) ou que a etapa de *clean-up* seja mais eficiente.

Interferentes também foram identificados em níveis de traços para outros congêneres, principalmente em gordura animal (Figura A. 13 e Figura A. 14), desta vez afetando significativamente os valores de quantificação em *upperbound*. Para leite de vaca, o congênere 2,3,4,7,8-PeCDF teve sua concentração elevada de 0,45 pg g^{-1} para 1,93 pg g^{-1} . Levando-se em consideração que o fator de toxicidade equivalente (TEF) [9] para este congênere é igual a 0,3, quando se calculou o valor total TEQ houve um aumento de 18%, valor significativo quando se compara com o limite máximo permitido pela União Europeia para leite, 5,5 pg TEQ g^{-1} gordura [47].

Diferentemente dos congêneres citados acima, o interfereferente encontrado no íons do 1,2,3,7,8-PeCDD não afetou sua quantificação, uma vez que o sinal foi separado do analito de interesse.

Comparando-se com a seletividade do GC-HRMS, em apenas uma amostra o desempenho do APGC-MS/MS foi melhor do que a técnica padrão. Nas amostras de água residual contendo resíduos de plástico e óleo, interferentes foram observados nos padrões internos ^{13}C nas análises por APGC-MS/MS, mas não foram encontrados para os padrões nativos (Figura A. 14).

Por fim, pode-se concluir que a seletividade testada do APGC-MS/MS sob as mesmas condições do GC-HRMS é vulnerável aos interferentes, especialmente em algumas amostras de leite, ovos e gordura animal (bovina, suína, caprina ou ovina), onde não foi possível separar totalmente os interferentes dos compostos alvo.

Notou-se que em alguns tipos de amostra, como as de águas residuais, obteve-se cromatogramas mais limpos no APGC-MS/MS, confirmando que ambas as técnicas possuem seletividades diferentes. Isto confirma que novas pesquisas são necessárias para identificar esses compostos interferentes a fim de melhorar a seletividade da técnica APGC-MS/MS e minimizar seus efeitos nos resultados de quantificação.

5.3 Conclusão

Este estudo demonstrou que a técnica APGC-MS/MS cumpre com os critérios estabelecidos pela União Europeia, através do Regulamento 589/2014 [125], em termos de exatidão e desvio padrão relativos, sendo então considerada uma boa alternativa para análises de rotina de PCDD/Fs e PCBs.

Notou-se significativa melhora na fonte de ionização APCG para o MS/MS, para a análise de PCDD/Fs e PCBs em amostras de alimentos e ambientais, capaz de detectar quantidades menores do que o GC-HRMS tem alcançado rotineiramente. Em amostras de referência, o APGC-MS/MS obteve, de modo geral, melhor sensibilidade do que o GC-HRMS.

Contudo, ainda é preciso cautela quando se trata da utilização generalizada do APGC-MS/MS como técnica padrão. Isto porque foram observados mais interferentes nos cromatogramas que potencialmente podem comprometer resultados quantitativos. Em certos tipos de amostras, as interferências encontradas podem afetar severamente o limite de quantificação, especialmente a subestimação dos PCB 138 e PCB 153, que resulta em valores sistematicamente menores quanto ao parâmetro de soma total dos ndl-PCBs.

Além disso, o sinal de fundo na janela de funções do 2,3,7,8-TCDD nas análises por APGC-MS/MS pode contribuir significativamente para níveis menores. Particularmente nas análises de tendência, isto pode resultar em pequenas diferenças entre os dados gerados pelo APGC-MS/MS e o GC-HRMS.

Embora o APGC-MS/MS seja uma alternativa potencial frente ao GC-HRMS, as várias divergências citadas anteriormente requerem que mais estudos sejam realizados antes de um uso generalizado.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Gies, A., et al., *Risk assessment of dioxins and dioxin-like PCBs in food – Comments by the German Federal Environmental Agency*. Chemosphere, 2007. **67**(9): p. S344-S349.
2. Mitrou, P.I., G. Dimitriadis, and S.A. Raptis, *Toxic effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and related compounds*. European Journal of Internal Medicine, 2001. **12**(5): p. 406-411.
3. Cole, P., et al., *Dioxin and cancer: a critical review*. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 2003. **38**(3): p. 378-388.
4. Huff, J., G. Lucier, and A. Tritscher, *Carcinogenicity of Tcdd - Experimental, Mechanistic, and Epidemiologic Evidence*. Annual Review of Pharmacology and Toxicology, 1994. **34**: p. 343-372.
5. *Assessment of dietary intake of dioxins and related PCBs by the population of EU Member States.*, R.o.t.f.s.c. European Commission, Task 3.2.5., Editor. 7 June 2000.
6. Kishimoto, A., et al., *Cost effectiveness of reducing dioxin emissions from municipal solid waste incinerators in Japan*. Environmental Science & Technology, 2001. **35**(14): p. 2861-2866.
7. D.Buckley-Golder, P.C., M.Davies,K.King,A.Petersen, J.Watterson, M.Woodfield, Fiedler H,A.Hanberg, *EC (1999) Compilation of EU Dioxin Exposure and Health Data*. October 1999, Report produced for European Commission DG Environment and UK Department of the Environment Transport and the Regions (DETR).
8. Schecter, A., et al., *Dioxins: An overview*. Environmental Research, 2006. **101**(3): p. 419-428.
9. 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*. Toxicological Sciences, 2006. **93**(2): p. 223-241.
10. Pirkle, J.L., et al., *Estimates of the Half-Life of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-Para-Dioxin in Vietnam Veterans of Operation Ranch Hand*. Journal of Toxicology and Environmental Health, 1989. **27**(2): p. 165-171.

11. U.S. EPA. *Exposure and Human Health Reassessment of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-P-Dioxin (TCDD) and Related Compounds National Academy Sciences (External Review Draft) (2004)*. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, D.C., EPA/600/P-00/001Cb.
12. (COM (2001) 593)– *Comunicação da Comissão ao Conselho, ao Parlamento Europeu e ao Comitê Econômico e Social Europeu sobre a aplicação prática da estratégia comunitária em matéria de dioxinas, furanos e policlorobifenilos. Segundo relatório intercalar {SEC(2007) 955}*.
13. UNEP, *PCB Transformers and Capacitors From Management to Reclassification and Disposal.*, U. chemicals, Editor. May 2002.
14. Altarawneh, M., et al., *Mechanisms for formation, chlorination, dechlorination and destruction of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans (PCDD/Fs)*. Progress in Energy and Combustion Science, 2009. **35**(3): p. 245-274.
15. Vorkamp, K., *An overlooked environmental issue? A review of the inadvertent formation of PCB-11 and other PCB congeners and their occurrence in consumer products and in the environment*. (1879-1026 (Electronic)).
16. USEPA - *The inventory of sources of dioxin in the United States*, EPA/600/P-98/002Aa, April 1998.
17. USEPA - *United States Environmental Protection Agency, Locating and Estimating Air Emissions from Sources of Dioxins and Furans*. EPA-454/R-97-003. May. 1997a.
18. USEPA - *Pulp and Paper NESHAP A Plain English Description*. EPA-456R-98-008, November, 1998.
19. Abad, E., et al., *Dioxin Abatement Strategies and Mass Balance at a Municipal Waste Management Plant*. Environmental Science & Technology, 2001. **36**(1): p. 92-99.
20. Lemieux, P.M., et al., *Emissions of Polychlorinated Dibenzop-dioxins and Polychlorinated Dibenzofurans from the Open Burning of Household Waste in Barrels*. Environmental Science & Technology, 2000. **34**(3): p. 377-384.
21. Stanmore, B.R. and C. Clunies-Ross, *An Empirical Model for the De Novo Formation of PCDD/F in Medical Waste Incinerators*. Environmental Science & Technology, 2000. **34**(21): p. 4538-4544.

22. Kulkarni, P.S., J.G. Crespo, and C.A.M. Afonso, *Dioxins sources and current remediation technologies — A review*. Environment International, 2008. **34**(1): p. 139-153.
23. Abad, E., et al., *Polychlorinated dibenzo-p-dioxin/polychlorinated dibenzofuran releases into the atmosphere from the use of secondary fuels in cement kilns during clinker formation*. (0013-936X (Print)).
24. Bakoglu, M., A. Karademir, and S. Ayberk, *An Evaluation of the Occupational Health Risks to Workers in a Hazardous Waste Incinerator*. Journal of Occupational Health, 2004. **46**(2): p. 156-164.
25. McKay, G., *Dioxin characterisation, formation and minimisation during municipal solid waste (MSW) incineration: review*. Chemical Engineering Journal, 2002. **86**(3): p. 343-368.
26. Lavric, E.D., A.A. Konnov, and J.D. Ruyck, *Dioxin levels in wood combustion—a review*. Biomass and Bioenergy, 2004. **26**(2): p. 115-145.
27. Quaß, U., M.W. Fermann, and G. Bröker, *Steps towards a European dioxin emission inventory*. Chemosphere, 2000. **40**(9–11): p. 1125-1129.
28. *UNEP - Standardized Toolkit for Identification and Quantification of Dioxin and Furan Releases. December, 2005*.
29. Zheng, M.-H., et al., *Polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans in paper making from a pulp mill in China*. Chemosphere, 2001. **44**(6): p. 1335-1337.
30. McGregor, D.B., et al., *An IARC evaluation of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and polychlorinated dibenzofurans as risk factors in human carcinogenesis*. Environmental Health Perspectives, 1998. **106**: p. 755-760.
31. Otles, S. and H. Yildiz, *Dioxin in food and human health*. Electron. J. Environ. Agric. Food Chem.-EJEAFChe, 2003. **2**(5).
32. Nakagawa, R., et al., *Maternal body burden of organochlorine pesticides and dioxins*. Journal of Aoac International, 1999. **82**(3): p. 716-724.
33. Liem, A.K.D., P. Furst, and C. Rappe, *Exposure of populations to dioxins and related compounds*. Food Additives and Contaminants, 2000. **17**(4): p. 241-259.
34. Schuhmacher, M., et al., *Dioxin and dibenzofuran concentrations in blood of a general population from Tarragona, Spain*. Chemosphere, 1999. **38**(5): p. 1123-1133.

35. Sorg, O., et al., *2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) poisoning in Victor Yushchenko: identification and measurement of TCDD metabolites*. *Lancet*, 2009. **374**(9696): p. 1179-1185.
36. Buchert, A., et al., *Dioxin contamination in food - Bayreuth, Germany, from September 28 to October 1, 2000*. *Environmental Science and Pollution Research*, 2001. **8**(2): p. 84-88.
37. Mocarelli, P., et al., *Paternal concentrations of dioxin and sex ratio of offspring*. *The Lancet*, 2000. **355**(9218): p. 1858-1863.
38. Okubo, Y., et al., *Altered sex ratio of offspring in chemical industry workers*. *Journal of Occupational Health*, 2000. **42**(3): p. 147-148.
39. James, W.H., *Offspring sex ratio as a potential monitor of reproductive disorders in communities near hazardous chemical sites*. *Reproductive Toxicology*, 1997. **11**(6): p. 893-894.
40. Yoshimura, T., H. Kaneko S Fau - Hayabuchi, and H. Hayabuchi, *Sex ratio in offspring of those affected by dioxin and dioxin-like compounds: the Yusho, Seveso, and Yucheng incidents*. (1351-0711 (Print)).
41. Vanden Heuvel, J.P. and G. Lucier, *Environmental toxicology of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and polychlorinated dibenzofurans*. (0091-6765 (Print)).
42. *European Commission, (2000b). Opinion of the Scientific Committee on Food (SCF) on the Risk Assessment of Dioxins and Dioxins-like PCBs in Food. pp 141.*
43. Van den Berg, M., et al., *Toxic equivalency factors (TEFs) for PCBs, PCDDs, PCDFs for humans and wildlife*. (0091-6765 (Print)).
44. *Comissão das Comunidades Europeias, (2007). Comunicação da Comissão ao Conselho, ao Parlamento Europeu e ao Comité Económico e Social Europeu (SEC(2007)955), sobre a aplicação prática da estratégia comunitária em matéria de dioxinas, furanos e policlorobifenilos (COM (2001) 593) – segundo relatório intercalar. pp 7.*
45. *Regulation (CE) n° 850/2004 of The European Parliament and of The Council of 29 April 2004 on persistent organic pollutants and amendin Directive 79/117/EEC.*

46. *Comissão das Comunidades Europeias, (2006c). Regulamento (CE) n.º 1881/2006, da Comissão, de 19 de Dezembro de 2006, que fixa os teores máximos de certos contaminantes presentes nos géneros alimentícios. J. Of. da União Europeia: L 364. 5-24.*
47. *Comissão das Comunidades Europeias (2011) Regulamento (CE) n.º 1259/2011 DA COMISSÃO de 2 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. J. Of. da União Europeia: L 320, 18-23.*
48. Abad, E., et al., *Evaluation of a new automated cleanup system for the analysis of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans in environmental samples.* Journal of Chromatography A, 2000. **893**(2): p. 383-391.
49. *EPA Method 1613 (Revision B), Tetra- through Octa-Chlorinated Dioxins and Furans by Isotopic Dilution HRGC-HRMS, in 1613, U.S.E.P.A. (USEPA), Editor. Sept. 1994 Washington, DC.*
50. *Comissão das Comunidades Europeias, (2012). Regulamento (CE) n.º 252/2012, da Comissão, de 21 de Março de 2012, que estabelece métodos de amostragem e análise para o controle 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. J. Of. da União Europeia: L 84, 1-22.*
51. *EN 16215:2012 European Standard EN 16215, European Committee for Standardization. April 2012.*
52. Smedes, F., *Determination of total lipid using non-chlorinated solvents.* Analyst, 1999. **124**(11): p. 1711-1718.
53. *Technique dioxin analysis - Purification of samples.* 2005; Available from: <http://www.wageningenur.nl/nl/Expertises-Dienstverlening/Onderzoeksinstituten/rikilt/Onderzoek/Stoffen-meten-en-opsporen/Contaminanten/Dioxine-analyses/Technique-dioxin-analysis.htm>.
54. *Gel permeation chromatography.* Available from: <http://www.mtpgroup.nl/amm-laboratory-course.aspx>.

55. EPA Method 1613 (Revision B), *Tetra- through Octa-Chlorinated Dioxins and Furans by Isotopic Dilution HRGC-HRMS*, in 1613, U.S.E.P.A. (USEPA), Editor. Sept. 1994: Washington, DC.
56. Glutz von Blotzheim UN, B.K., *Handbuch der Vögel Mitteleuropas*. AULA-Verlag, Wiesbaden ed. 1988.
57. Bairlein, F., et al., *Cross-hemisphere migration of a 25 g songbird*. *Biology Letters*, 2012. **8**(4): p. 505-507.
58. PECBMS, *Trends of common birds in Europa*. 2013: Prague.
59. *Birdlife 2013*. 2013; Available from: <http://www.birdlife.org/>.
60. Arjan Boele, J.v.B., Fred Hustings, Kees Koffijberg, Jan-Willem Vergeer, Calijn Plate, *Broedvogels in Nederland in 2012*. 2014: Sovon Vogelonderzoek Nederland, Nijmegen.
61. Donal, P.F., R.E. Gree, and M.F. Heath, *Agricultural intensification and the collapse of Europe's farmland bird populations*. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society*, 2001. **268**(1462): p. 25-29.
62. Ciana, P., et al., *In vivo imaging of transcriptionally active estrogen receptors*. 2003. **9**(1): p. 82-86.
63. Ohtake, F., et al., *Dioxin receptor is a ligand-dependent E3 ubiquitin ligase*. 2007. **446**(7135): p. 562-566.
64. Ohtake, F., et al., *Modulation of oestrogen receptor signalling by association with the activated dioxin receptor*. 2003. **423**(6939): p. 545-550.
65. Wiesmüller, T., et al., *PCDDs/PCDFs, PCBs, and Organochlorine Pesticides in Eggs of Eurasian Sparrowhawks (Accipiter nisus), Hobbies (Falco subbuteo), and Northern Goshawks (Accipiter gentilis) Collected in the Area of Berlin-Brandenburg, Germany*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 2002. **42**(4): p. 486-496.
66. Malisch, R. and F. Baum, *PCDD/Fs, Dioxin-like PCBs and marker PCBs in eggs of peregrine falcons from Germany*. *Chemosphere*, 2007. **67**(9): p. S1-S15.
67. Perrins, C.M., *Eggs, egg formation and the timing of breeding*. *Ibis*, 1996. **138**(1): p. 2-15.
68. Stephens, R.D., M.X. Petreas, and D.G. Hayward, *Biotransfer and bioaccumulation of dioxins and furans from soil: chickens as a model for foraging animals*. *Science of The Total Environment*, 1995. **175**(3): p. 253-273.

69. Ikeda, M., S. Matsushita, J. Yamashita, M. Ikeya, T. Iwasawa & T. Tomita, *The transfer of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin into eggs and chicks following exposure to hens*. Organohalogen Compounds, 2004. **66**: p. 3305-3309.
70. De Vries, M., R.P. Kwakkel, and A. Kijlstra, *Dioxins in organic eggs: a review*. Njas-Wageningen Journal of Life Sciences, 2006. **54**(2): p. 207-221.
71. *Health and environmental guidelines for selected timber treatment chemicals.*, N.Z.M.f.t.E.a.t.m.o. Health, Editor. June 1997.
72. BMU (Federal Ministry for the Environment, N.C.a.N.S., *Federal soil protection and contaminated sites ordinance (BvodSchV)*. 1999, 12: Germany. p. 6.
73. *Canadian Environmental Quality Guidelines*, C.C.o.M.o.t.E. (CCME), Editor. 2003: Canada.
74. Van den Berg R, H.R., Groenemeijer GS, Gast LFL, Liem AKD, *Achtergrondgehalten van dioxinen in de Nederlandse bodem*. Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieuhygiëne,. Bilthoven, 1994: p. p 75.
75. Hoogenboom, R., et al., *The German bakery waste incident; use of a combined approach of screening and confirmation for dioxins in feed and food*. Talanta, 2004. **63**(5): p. 1249-1253.
76. Dömötöróvá, M., et al., *PCDDs, PCDFs, dioxin-like PCBs and indicator PCBs in soil from five selected areas in Slovakia*. Chemosphere, 2012. **89**(4): p. 480-485.
77. Megson, D., et al., *Elucidating the structural properties that influence the persistence of PCBs in humans using the National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) dataset*. Science of The Total Environment, 2013. **461–462**: p. 99-107.
78. Organisation, W.-W.H., *Dioxins and their effects on human health*.
79. *Stockholm Convention on POPs*. [cited 2015; Available from: <http://chm.pops.int/Convention/tabid/54/language/en-US/Default.aspx - convtext>.
80. D. Buckley-Golder, P.C., M. Davies, K. King, A. Petersen, J. Watterson, M. Woodfield, Fiedler H, A. Hanberg, *EC (1999) Compilation of EU Dioxin Exposure and Health Data. Report produced for European Commission DG Environment and UK Department of the Environment Transport and the Regions (DETR)*. 1999.

81. Brzuzny, L.P. and R.A. Hites, *Global Mass Balance for Polychlorinated Dibenzo-p-dioxins and Dibenzofurans*. Environmental Science & Technology, 1996. **30**(6): p. 1797-1804.
82. Fiedler, H., *Sources of PCDD/PCDF and impact on the environment*. Chemosphere, 1996. **32**(1): p. 55-64.
83. Tuppurainen, K., et al., *Perspectives on the Formation of Polychlorinated Dibenzo-p-dioxins and Dibenzofurans during Municipal Solid Waste (MSW) Incineration and Other Combustion Processes*. Accounts of Chemical Research, 2003. **36**(9): p. 652-658.
84. Wagrowski, D.M. and R.A. Hites, *Insights into the Global Distribution of Polychlorinated Dibenzo-p-dioxins and Dibenzofurans*. Environmental Science & Technology, 2000. **34**(14): p. 2952-2958.
85. Giesy, J.P. and K. Kannan, *Dioxin-Like and Non-Dioxin-Like Toxic Effects of Polychlorinated Biphenyls (PCBs): Implications For Risk Assessment*. Critical Reviews in Toxicology, 1998. **28**(6): p. 511-569.
86. Rushneck, D.R., et al., *Concentrations of dioxin-like PCB congeners in unweathered Aroclors by HRGC/HRMS using EPA Method 1668A*. Chemosphere, 2004. **54**(1): p. 79-87.
87. UNEP, *Guidelines for the identification of PCBs and materials containing PCBs*. , U. Chemicals, Editor. August 1999.
88. Wania, F. and D. MacKay, *Peer Reviewed: Tracking the Distribution of Persistent Organic Pollutants*. Environmental Science & Technology, 1996. **30**(9): p. 390A-396A.
89. Fiedler, H., *Dioxins and furans (PCDD/PCDF)*, in *Persistent Organic Pollutants*. 2003, Springer. p. 123-201.
90. Rogowski, D., S. Golding, D. Bowhay, and S. Singleton, *Final Report: Screening Survey for Metals and Dioxins in Fertilizer Products and Soils in Washington State*. 1999. p. 177.
91. Fiedler H, R.M., Knetsch G, Basler A, *The German Dioxin Database: PCDD/PCDF Concentrations in the Environment – Spatial and Temporal Trends*. Organohalogen Compounds, 2002. **57**: p. 37-40.
92. Grossi, G., J. Lichtig, and P. Krauss, *PCDD/F, PCB and PAH content of Brazilian compost*. Chemosphere, 1998. **37**(9-12): p. 2153-60.

93. Braga, A.M.C.B., et al., *PCDD/F-contamination in a hexachlorocyclohexane waste site in Rio de Janeiro, Brazil*. *Chemosphere*, 2002. **46**(9–10): p. 1329-1333.
94. Krauss, T., *UNEP - United Nations Environment Programme. Chemicals Proceedings Unep Chemicals Workshop on The Management Of Polychlorinated Biphenyls (Pcbs) And Dioxins/Furans*. 2000: Montevideo, Uruguay.
95. Estatística, I.-I.B.d.G.e., *Estimativas da População dos Municípios Brasileiros*. 2014.
96. Silva, A.B.d.O.e. and J.D. Alves, *Análise regional da competitividade da indústria mineira utilizando os microdados da PIA, 1996-2006*. *Nova Economia*, 2010. **20**: p. 219-252.
97. *Mapa Cloaborativo da região Metropolitana de Belo Horizonte*. [cited 2016 04/03]; Available from: <http://www.rmbh.org.br/pt-br/mapa-colaborativo>.
98. Tuinstra, L.G.M.T., et al., *The Dutch PCB/dioxin study Development of a method for the determination of dioxins, planar and other PCBs in human milk*. *Chemosphere*, 1994. **29**(9–11): p. 1859-1875.
99. Leeuwen, S.P.J., et al., *Polychlorinated dibenzo-p-dioxins, dibenzofurans and biphenyls in fish from the Netherlands: concentrations, profiles and comparison with DR CALUX® bioassay results*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2007. **389**(1): p. 321-333.
100. Brzuzny, L.P. and R.A. Hites, *Estimating the Atmospheric Deposition of Polychlorinated Dibenzo-p-dioxins and Dibenzofurans from Soils*. *Environmental Science & Technology*, 1995. **29**(8): p. 2090-2098.
101. Nieuwoudt, C., et al., *Dioxin-like chemicals in soil and sediment from residential and industrial areas in central South Africa*. *Chemosphere*, 2009. **76**(6): p. 774-783.
102. Hites, R.A., *Environmental behavior of chlorinated dioxins and furans*. *Accounts of Chemical Research*, 1990. **23**(6): p. 194-201.
103. Domingo, J.L., S. Granero, and M. Schuhmacher, *Congener profiles of PCDD/Fs in soil and vegetation samples collected near to a municipal waste incinerator*. *Chemosphere*, 2001. **43**(4–7): p. 517-524.

104. Ames, M., et al., *Polychlorinated dibenzo(p)dioxin and furan (PCDD/F) congener profiles in cement kiln emissions and impacts*. Science of The Total Environment, 2012. **419**: p. 37-43.
105. Frame, G.M., J.W. Cochran, and S.S. Bøwadt, *Complete PCB congener distributions for 17 aroclor mixtures determined by 3 HRGC systems optimized for comprehensive, quantitative, congener-specific analysis*. Journal of High Resolution Chromatography, 1996. **19**(12): p. 657-668.
106. Liu, J. and W. Liu, *Distribution of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans (PCDDs/Fs) and dioxin-like polychlorinated biphenyls (dioxin-like PCBs) in the soil in a typical area of eastern China*. Journal of Hazardous Materials, 2009. **163**(2-3): p. 959-966.
107. Rogowski, D.L. and W. Yake, *Typical dioxin concentrations in agriculture soils of Washington state and potential sources*. Environ Sci Technol, 2005. **39**(14): p. 5170-6.
108. Mamontov, A.A., et al., *Tracing the Sources of PCDD/Fs and PCBs to Lake Baikal*. Environmental Science & Technology, 2000. **34**(5): p. 741-747.
109. Eljarrat, E., J. Caixach, and J. Rivera, *Effects of Sewage Sludges Contaminated with Polychlorinated Dibenzo-p-dioxins, Dibenzofurans, and Biphenyls on Agricultural Soils*. Environmental Science & Technology, 1997. **31**(10): p. 2765-2771.
110. Buckland SJ, E.K., Salter RT, Scobier SE, *Ambient concentrations of PCDDs, PCDFs and PCBs in New Zealand soils*. Organohalogen Compounds, 1998. **39**: p. 101-104.
111. T, N., et al., *Complex Pollution in Soil by Dioxin Analogues and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Saitama Prefecture*. Organohalogen Compounds, 1999. **43**: p. 221-225.
112. S-J, K., et al., *Polychlorinated Dibenzo-p-Dioxins and Polychlorinated Dibenzofurans in Soil Samples from Urban and Industrial Areas of Korea.*, in *Poster presented at Dioxin 2001, 21st International Symposium on Halogenated Environmental organic Pollutants and POPs*. 2001: Gyeongju, Korea.
113. Fré, R.D. and M. Wevers, *Measurements of Dioxins in deposition and in cows milk in Belgium*. Organohalogen Compounds, 1998. **38**: p. 113-116.

114. Assmuth, T.W. and T. Vartiainen, *Analysis of toxicological risks from local contamination by PCDDs and PCDFs: Importance of isomer distributions and toxic equivalents*. Chemosphere, 1995. **31**(3): p. 2853-2861.
115. Martens, D., et al., *Chemical impact of uncontrolled solid waste combustion to the vicinity of the kouroupitos ravine, Crete, Greece*. Chemosphere, 1998. **36**(14): p. 2855-2866.
116. Berlincioni M., G.C., F. Ferri, N. Iacovella, C. La Rocca, M. Lolini, A. Megli, M. Pupp, L. Rizzi, L. Turrio-Baldassari, and A. di Domenico, *Priority Organic Microcontaminants in Selected Environmental and Food Matrices*. Fresenius Envir. Bull., 1995. **4**: p. 169-174.
117. Llobet J.M., D.J.L., Schuhmacher M., Granero S., Meneses M., Hans A.M. de Kok *Soil monitoring in the vicinity of an old municipal solid waste incinerator: PCDD/F Concentrations*, in *Dioxin'98 Stockholm 1998*: Sweden.
118. Matthijssen, A.J.C.M., Van den Berg, R., Derks, H.J.G.M., Van Jaarsveld, J.A., De Jong, A.P.J.M., Slob, W., Theelen, R.M.C., and Sein, A.A., *Evaluatie van de relaties van dioxine-emissiemetingen aan de OLAF-Leeuwarden met gehalten in grond en melk in de omgeving*. 1991, RIVM Bilthoven.
119. Schuhmacher, M., et al., *Assessment of baseline levels of PCDD/F in soils in the neighbourhood of a new hazardous waste incinerator in Catalonia, Spain*. Chemosphere, 1997. **35**(9): p. 1947-58.
120. Creaser, C.S., et al., *Survey of background levels of PCDDs & PCDFs in UK soils*. Chemosphere, 1989. **18**(1-6): p. 767-776.
121. Takazawa, Y., et al., *Current levels of dioxins in surface soils from Santiago, Chile*. Bull Environ Contam Toxicol, 2004. **73**(3): p. 543-50.
122. *Canadian soil quality guidelines for the protection of environmental and human health. Dioxins and Furans.*, C.C.o.M.o.t.E. (CCME), Editor. 2002: Canada.
123. J Müller, R.M., K Goudkamp, M Shaw, M Mortimer, D Haynes, D Burniston, R Symons and M Moore, *Dioxins in soil in Australia*. 2004.
124. Registry, A.f.T.S.D., *Toxicological Profile for Chlorinated Dibenzo-p-Dioxins (update)*. A.f.T.S.a.D. Registry, Editor. 1998: Atlanta, GA, USA.
125. EU, *Commission Regulation no 589*. 2014.
126. L'Homme, B., et al., *Validation of a gas chromatography-triple quadrupole mass spectrometry method for confirmatory analysis of dioxins and dioxin-like*

- polychlorobiphenyls in feed following new EU Regulation 709/2014*. (1873-3778 (Electronic)).
127. Palmiotto, M., et al., *Chapter 19 - A GC/MS-MS Versus GC/HRMS Dioxin Analysis Comparison. Some Critical Considerations for Low-Level Environmental Samples*, in *Comprehensive Analytical Chemistry*. 2013, Elsevier. p. 455-469.
 128. García-Bermejo, Á., et al., *Triple quadrupole tandem mass spectrometry: A real alternative to high resolution magnetic sector instrument for the analysis of polychlorinated dibenzo-p-dioxins, furans and dioxin-like polychlorinated biphenyls*. *Analytica Chimica Acta*, 2015. **889**: p. 156-165.
 129. Fraisse, D., M.F. Gonnord, and M. Becchi, *High resolution chromatography/tandem mass spectrometry. Analysis of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and furans*. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 1989. **3**(3): p. 79-84.
 130. Horning, E.C., et al., *Development and use of analytical systems based on mass spectrometry*. *Clin Chem*, 1977. **23**(1): p. 13-21.
 131. Horning, E.C., et al., *New picogram detection system based on a mass spectrometer with an external ionization source at atmospheric pressure*. *Analytical Chemistry*, 1973. **45**(6): p. 936-943.
 132. Mitchum, R.K., G.F. Moler, and W.A. Korfmacher, *Combined capillary gas chromatography/atmospheric pressure negative chemical ionization/mass spectrometry for the determination of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in tissue*. *Anal Chem*, 1980. **52**(14): p. 2278-82.
 133. Siegel, M.W. and M.C. McKeown, *Ions and electrons in the electron capture detector*. *Journal of Chromatography A*, 1976. **122**: p. 397-413.
 134. McEwen, C.N. and R.G. McKay, *A Combination Atmospheric Pressure LC/MS:GC/MS Ion Source: Advantages of Dual AP-LC/MS:GC/MS Instrumentation*. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2005. **16**(11): p. 1730-1738.
 135. McEwen, C.N., *GC/MS on an LC/MS instrument using atmospheric pressure photoionization*. *International Journal of Mass Spectrometry*, 2007. **259**(1-3): p. 57-64.

136. Schiewek, R., et al., *Development of a multipurpose ion source for LC-MS and GC-API MS*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2008. **392**(1-2): p. 87-96.
137. van Bavel, B., et al., *Atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry (APGC/MS/MS) an alternative to high resolution mass spectrometry (HRGC/HRMS) for the determination of dioxins*. Analytical Chemistry, 2015.
138. Organtini, K.L., et al., *Comparison of Atmospheric Pressure Ionization Gas Chromatography-Triple Quadrupole Mass Spectrometry to Traditional High-Resolution Mass Spectrometry for the Identification and Quantification of Halogenated Dioxins and Furans*. Analytical Chemistry, 2015. **87**(15): p. 7902-7908.
139. *Regulamento (CE) n° 152/2009 de 27 de Janeiro de 2009 que estabelece os métodos de amostragem e análise para o controle oficial dos alimentos para animais*.

7 ANEXO I – FIGURAS

Figura A. 1: Formulas estruturais dos PCDDs.

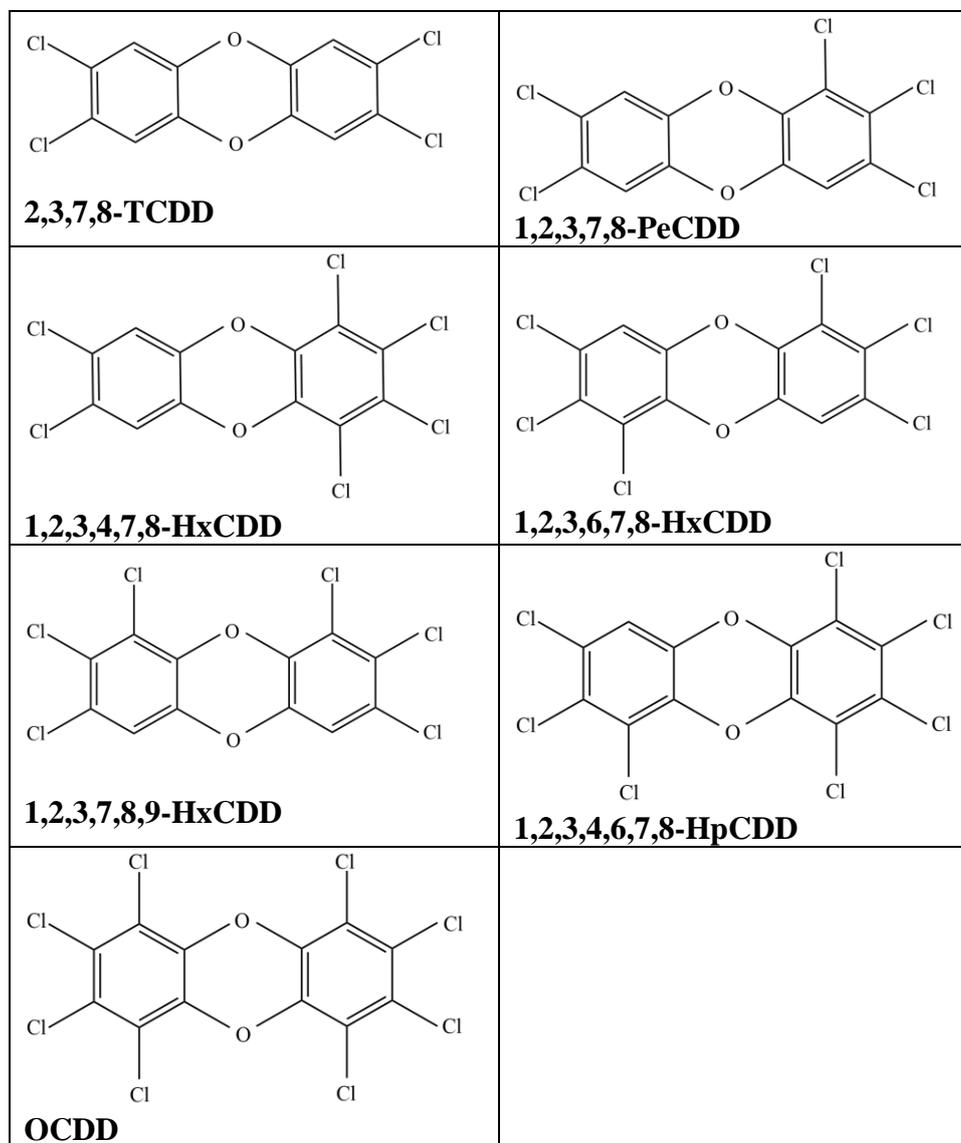


Figura A. 2: Fórmulas estruturais dos PCDFs.

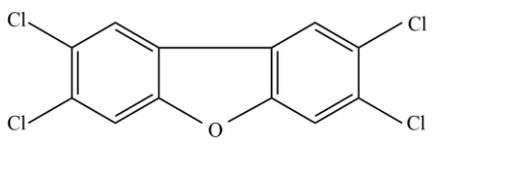
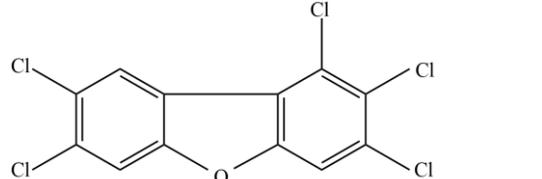
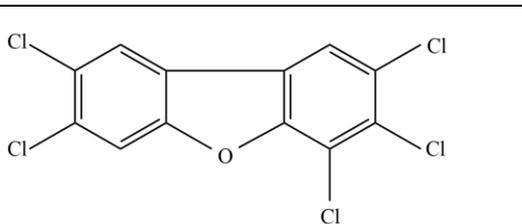
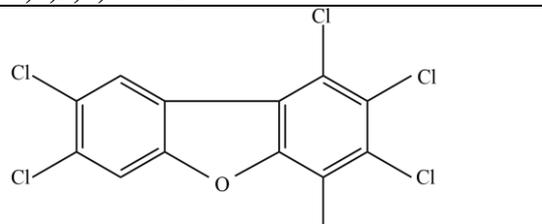
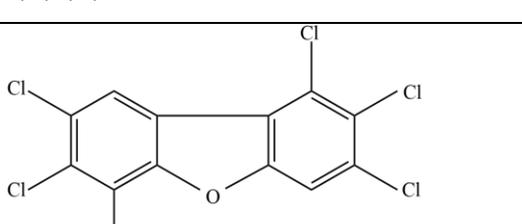
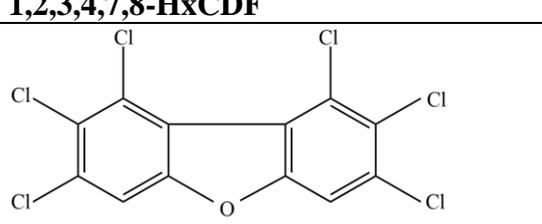
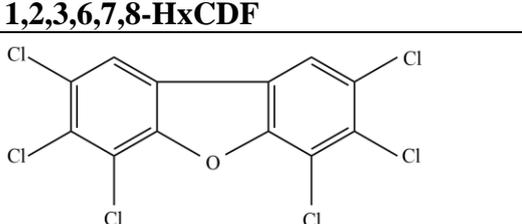
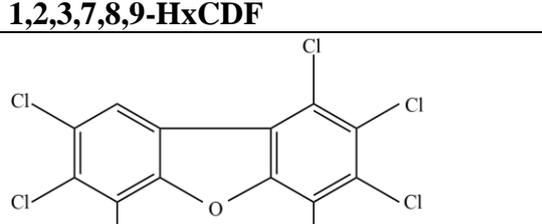
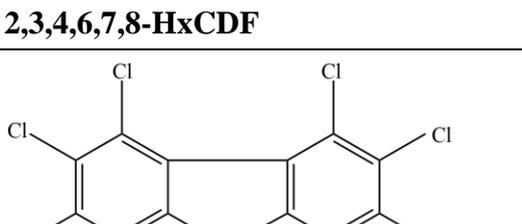
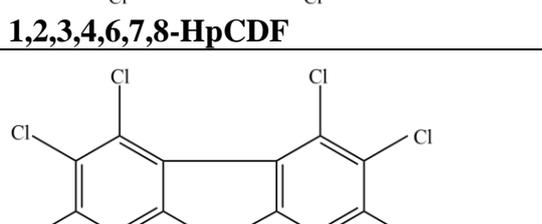
 <p>2,3,7,8-TCDF</p>	 <p>1,2,3,7,8-PeCDF</p>
 <p>2,3,4,7,8-PeCDF</p>	 <p>1,2,3,4,7,8-HxCDF</p>
 <p>1,2,3,6,7,8-HxCDF</p>	 <p>1,2,3,7,8,9-HxCDF</p>
 <p>2,3,4,6,7,8-HxCDF</p>	 <p>1,2,3,4,6,7,8-HpCDF</p>
 <p>1,2,3,4,7,8,9-HpCDF</p>	 <p>OCDF</p>

Figura A. 3: Fórmulas estruturais dos dl-PCBs

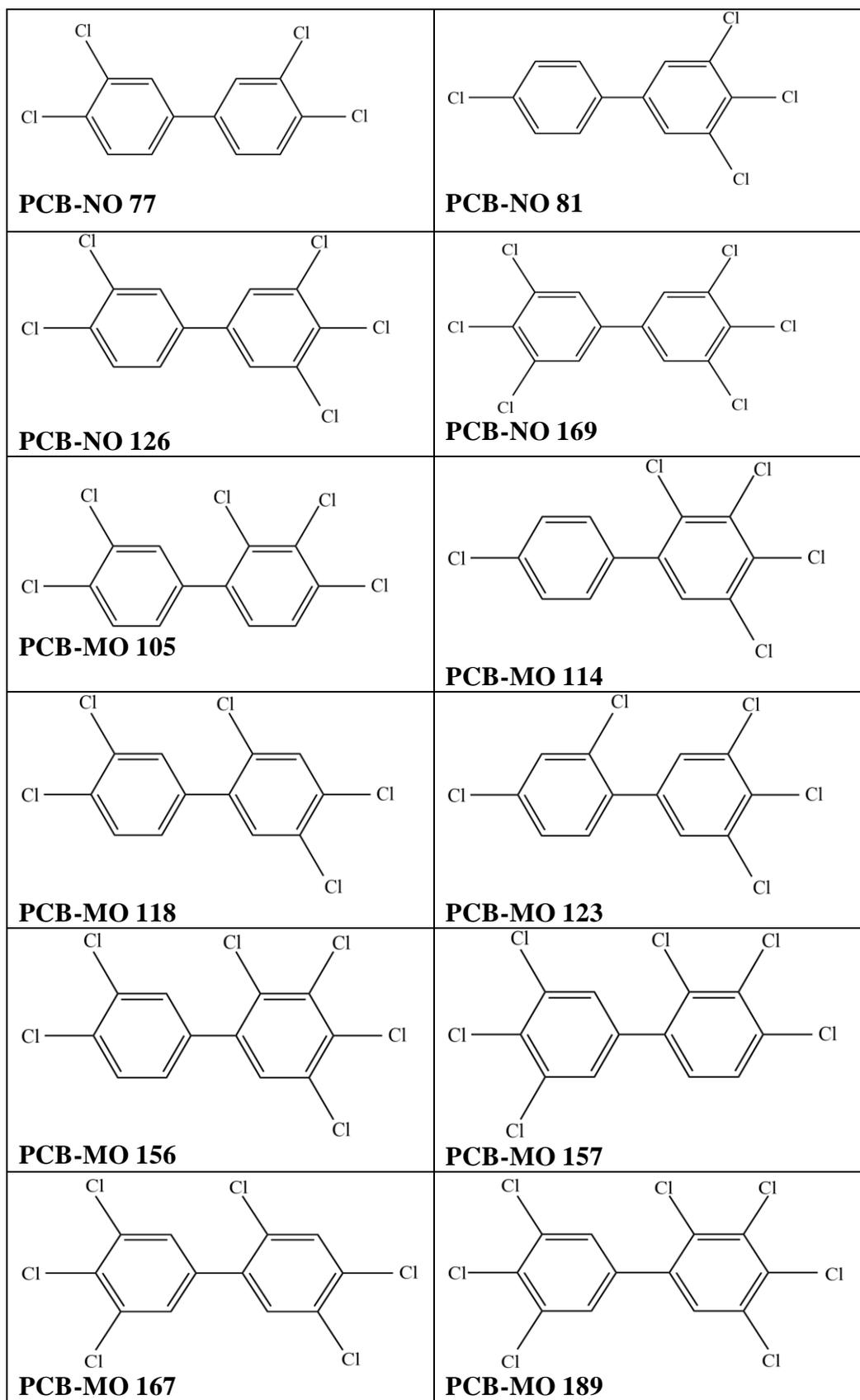


Figura A. 4: Fórmulas estruturais dos ndl-PCBs.

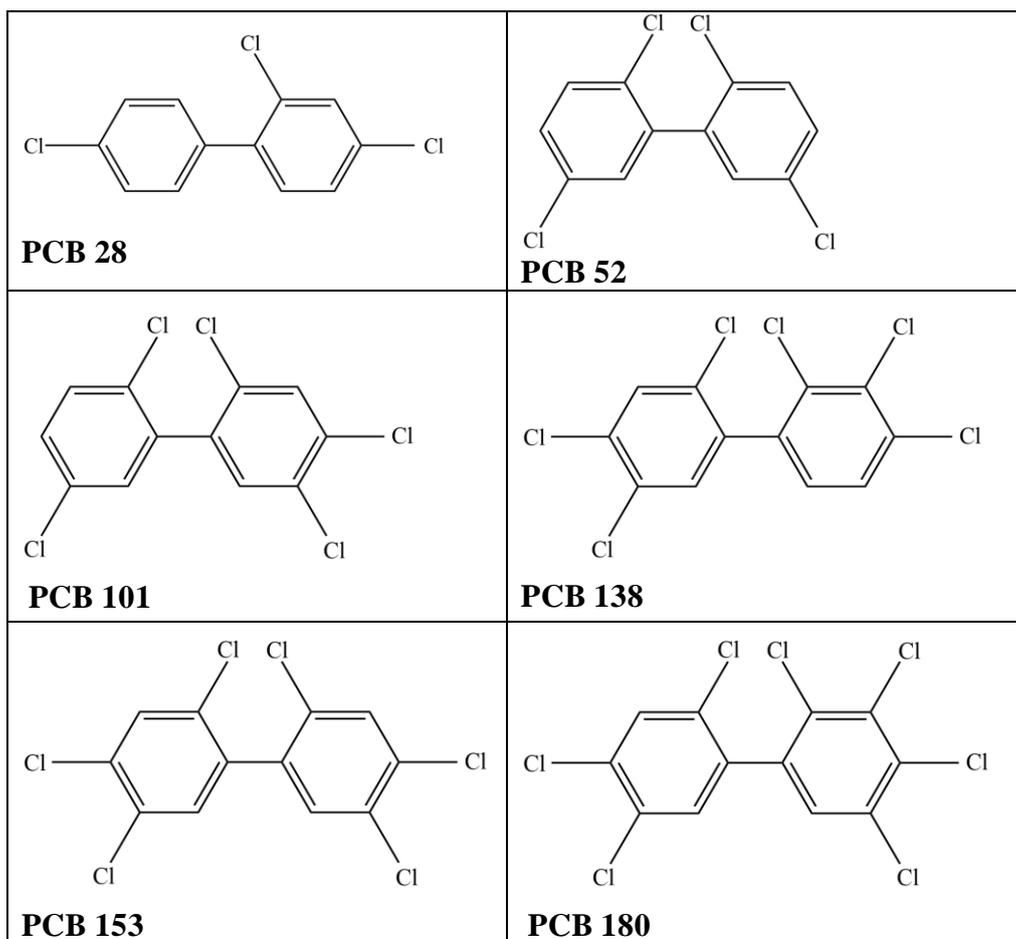


Figura A. 5: Figuras ilustrativas das etapas de extração seguindo o protocolo SMEDES
(Foto: Igor C. Pussente).

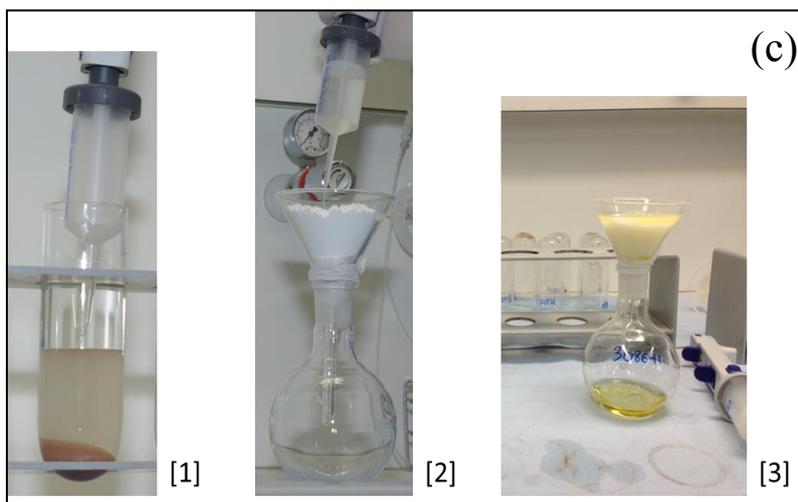
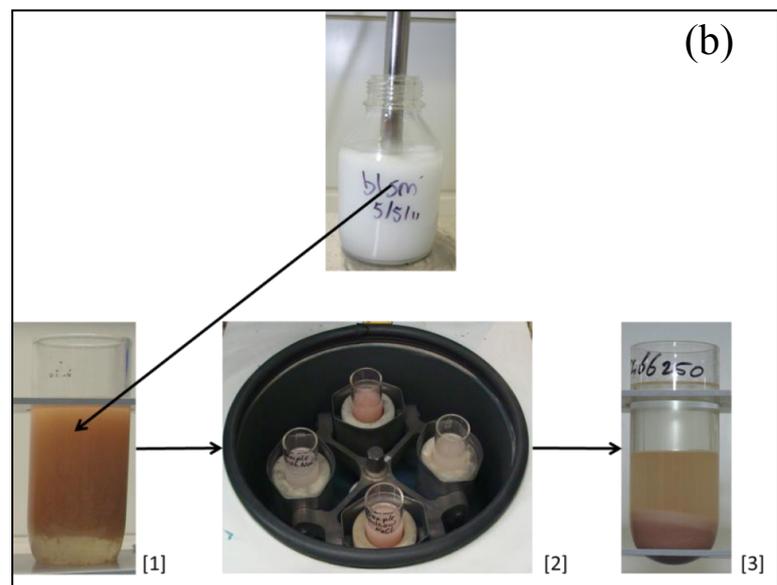
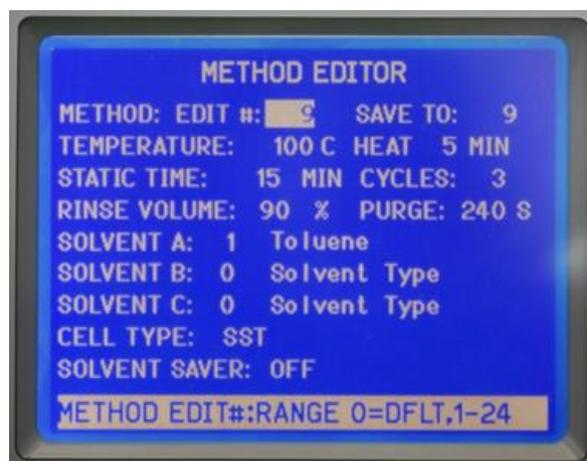


Figura A. 6: Figuras ilustrativas das etapas de extração utilizando o equipamento ASE 350 (Foto: Igor C. Pussente).



(a)(b)



(b)



(c)



(d)

Figura A. 7: Equipamento GPC utilizado na etapa de *clean-up* das amostras do projeto chasco-cinzento (Foto: Igor C. Pussente).



Figura A. 8: Equipamento PowerPrep utilizado na etapa de *clean-up* em todos os projetos.



Figura A. 9: Instrumentos GC-HRMS utilizados nas análises de PCDD/Fs e PCBs (Foto: Igor C. Pussente).



Figura A. 10: Ovo e embrião do chasco-cinzeo apresentando anomalias no desenvolvimento (Foto: Igor C. Pussente).

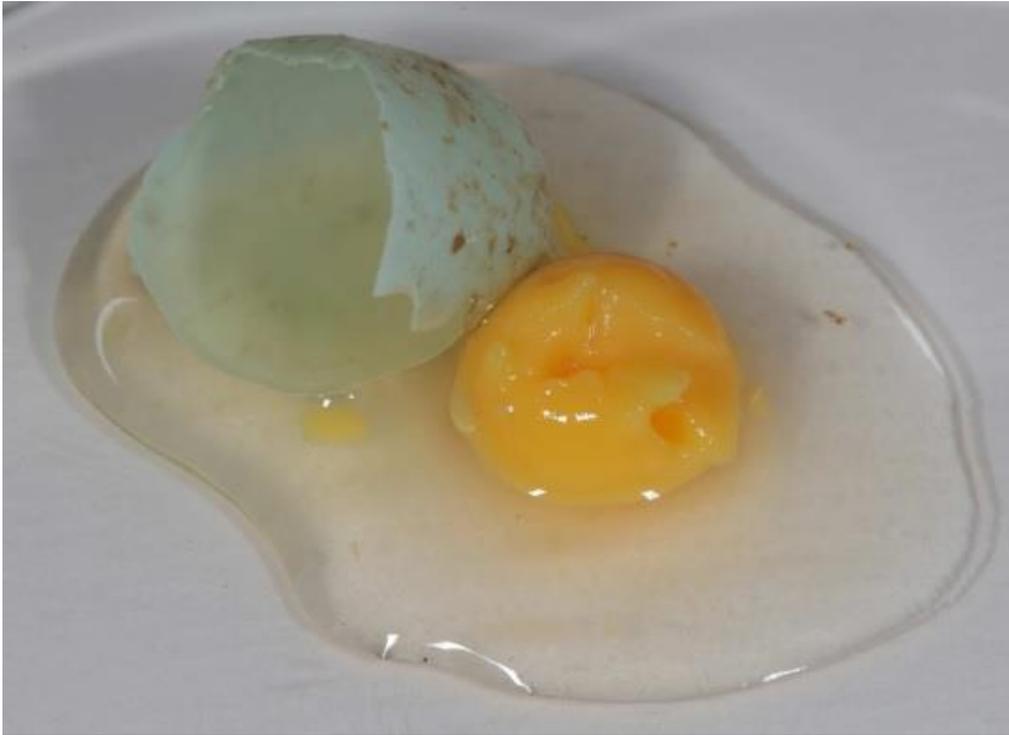


Figura A. 11: Amostras analisadas de insetos, larvas, embriões e ovos do projeto chasco-cinzeno (Foto: Igor C. Pussente).



Besouros



Gafanhotos



Larvas 'ritnaald'



Larvas 'rup'



Embriões



Ovos

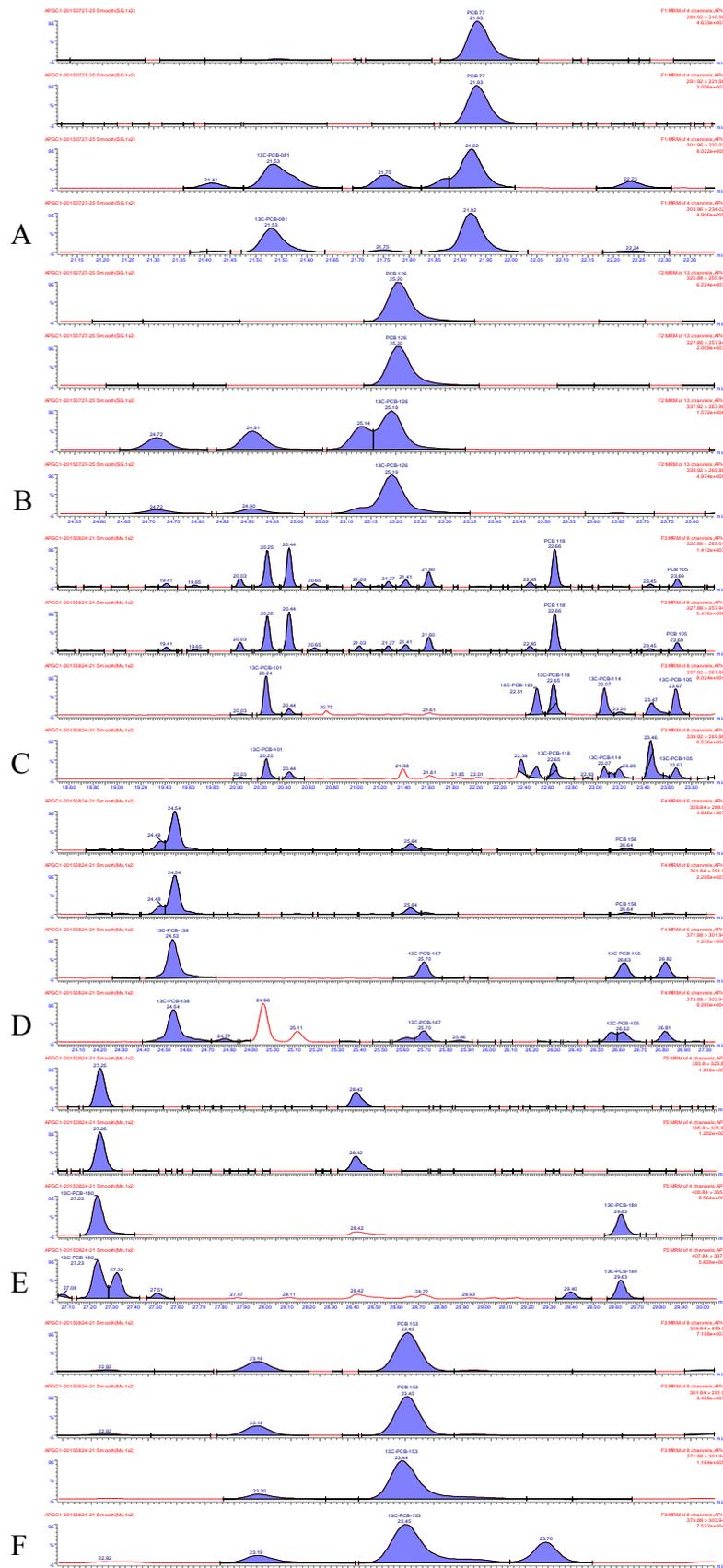


Figura A. 12:
 Cromatogramas das transições de ^{12}C -PCB e ^{13}C -PCB do padrão interno em diferentes tipos de amostras de peixe (SRM1947 e fígado de peixe).
 A: PCB 81 e 77;
 B: PCB 126;
 C: PCB 101, 123, 118, 114 e 105;
 D: PCB 138, 167, 156 e 157;
 E: PCB 180 e 189; e
 F: PCB 153.

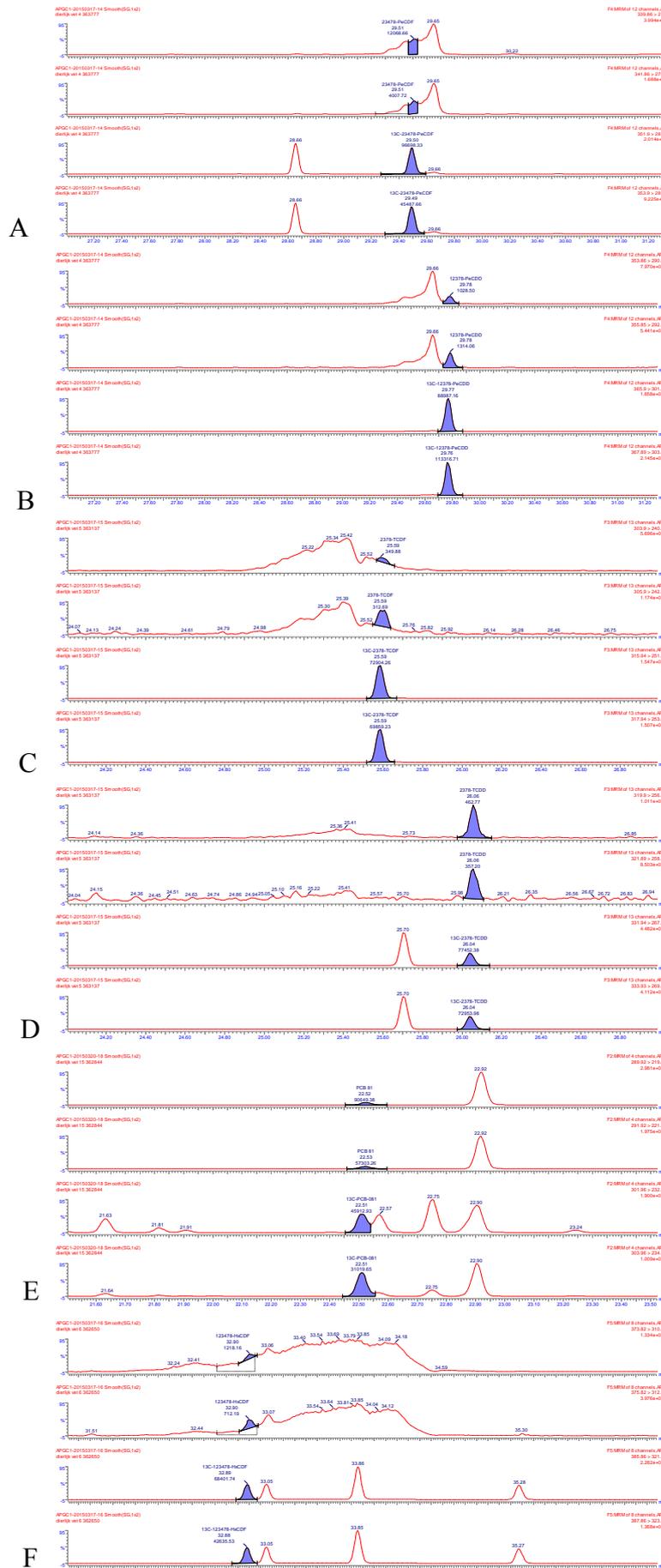


Figura A. 13: Cromatogramas dos interferentes observados no APGC-MS/MS e que não foram observados no GC-HRMS: A: 2,3,4,7,8-PeCDF em leite; B: 1,2,3,7,8-PeCDD em leite; C: 2,3,7,8-TCDF em gordura bovina; D: 2,3,7,8-TCDD em gordura bovina; E: PCB77 e PCB 81 em ovos; F: HxCDFs em gordura de cabra.

8 ANEXO II – TABELAS

Tabela A. 1: Informações dos congêneres nativos (^{12}C) e marcados (^{13}C) de PCDD/Fs e PCBs.

Compostos ^{13}C		Tempo de retenção	Compostos ^{12}C		Tempo de retenção
Código	^{13}C - PCDD/Fs		Código	PCDD/Fs	
EF-999	^{13}C -2,3,7,8-TCDF	22,02	EF-909B-5	2,3,7,8-TCDF	22,03
EF-999	^{13}C -1,2,3,7,8-PeCDF	24,94	EF-909B-5	1,2,3,7,8-PeCDF	24,95
EF-999	^{13}C -2,3,4,7,8-PeCDF	25,71	EF-909B-5	2,3,4,7,8-PeCDF	25,72
EF-999	^{13}C -1,2,3,4,7,8-HxCDF	28,36	EF-909B-5	1,2,3,4,7,8-HxCDF	28,37
EF-999	^{13}C -1,2,3,6,7,8-HxCDF	28,48	EF-909B-5	1,2,3,6,7,8-HxCDF	28,50
EF-999	^{13}C -1,2,3,7,8,9-HxCDF	28,48	EF-909B-5	2,3,4,6,7,8-HxCDF	29,11
EF-999	^{13}C -1,2,3,7,8,9-HxCDF	30,11	EF-909B-5	1,2,3,7,8,9-HxCDF	30,13
EF-999	^{13}C -1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	32,12	EF-909B-5	1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	32,14
EF-999	^{13}C -1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	34,71	EF-909B-5	1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	34,74
EF-999	^{13}C -OCDF	38,84	EF-982	OCDF	38,85
ED-998	^{13}C -2,3,7,8-TCDD	22,46	ED-906B-5	2,3,7,8-TCDD	22,47
ED-998	^{13}C -1,2,3,7,8-PeCDD	25,94	ED-906B-5	1,2,3,7,8-PeCDD	25,96
ED-998	^{13}C -1,2,3,4,7,8-HxCDD	29,25	ED-906B-5	1,2,3,4,7,8-HxCDD	29,26
ED-998	^{13}C -1,2,3,6,7,8-HxCDD	29,36	ED-906B-5	1,2,3,6,7,8-HxCDD	29,38
ED-998	^{13}C -1,2,3,7,8,9-HxCDD	29,69	ED-906B-5	1,2,3,7,8,9-HxCDD	29,70
ED-998	^{13}C -1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	33,82	ED-906B-5	1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	33,84
ED-998	^{13}C -OCDD	38,62	ED-980	OCDD	38,65
	^{13}C-dl-PCBs			dl-PCBs	
EC-4187	^{13}C -PCB81	19,13	EC-4986	PCB 81	19,14
EC-4187	^{13}C -PCB77	19,51	EC-4986	PCB 77	19,52
EC-4187	^{13}C -PCB126	22,68	EC-4986	PCB 126	22,69
EC-4187	^{13}C -PCB169	25,82	EC-4986	PCB 169	25,84
EC-4188	^{13}C -PCB123	21,56	EC-4987	PCB 123	21,58
EC-4188	^{13}C -PCB118	21,70	EC-4987	PCB 118	21,72
EC-4188	^{13}C -PCB114	22,12	EC-4987	PCB 114	22,13
EC-4188	^{13}C -PCB105	22,72	EC-4987	PCB 105	22,73
EC-4188	^{13}C -PCB167	24,74	EC-4987	PCB 167	24,75
EC-4188	^{13}C -PCB156	25,66	EC-4987	PCB 156	25,67
EC-4188	^{13}C -PCB157	25,85	EC-4987	PCB 157	25,86
EC-4188	^{13}C -PCB189	28,66	EC-4987	PCB 189	28,68
	ndl-PCBs			ndl-PCBs	
EC-4058	^{13}C -PCB028	15,38	EC-5179	PCB 28	15,39
EC-4058	^{13}C -PCB052	16,39	EC-5179	PCB 52	16,40
EC-4058	^{13}C -PCB101	19,33	EC-5179	PCB 101	19,35
EC-4058	^{13}C -PCB153	22,50	EC-5179	PCB 153	22,51
EC-4058	^{13}C -PCB138	23,58	EC-5179	PCB 138	23,59
EC-4058	^{13}C -PCB180	26,28	EC-5179	PCB 180	26,29
ED-911	Padrão de recuperação ^{13}C -1,2,3,4-TCDD				22,11
EF-999	Padrão de recuperação ^{13}C -2,3,4,6,7,8-HxCDF				29,10
ED-907	Padrão de <i>clean-up</i> $^{37}\text{Cl}_4$ -2,3,7,8-TCDD				22,47

Tabela A. 2: Reagentes utilizados nos procedimentos de extração e clean-up.

Reagente	Marca	Pureza
Hexano	Actu- All Chemicals b,v,	> 98%
Ciclohexano	Actu- All Chemicals b,v,	> 99%
Acetato de etila	Actu- All Chemicals b,v,	> 99%
2-propanol	Actu- All Chemicals b,v,	> 99%
Acetato de etila/ciclohexano (1:1)	Actu- All Chemicals b,v,	> 99%
Tolueno	Actu- All Chemicals b,v,	> 99,5%
Etanol	Sigma-Aldrich	> 98%
Água ultrapura	-	Obtida através de sistema Millipore (Milford, MA, USA)

Tabela A. 3: Descrição das amostras-controle.

Amostras-controle: método SMEDES

A. Branco reagente	Presença de todos os solventes e adição de padrão interno, exceto a presença da matriz.
B. Branco reagente + óleo de girassol	Aproximadamente 2,000 g de óleo de girassol, adição de padrão interno e todos os solventes, exceto a presença da matriz.
C. Branco reagente + óleo de girassol + adição de padrão nativo	Aproximadamente 2,000 g de óleo de girassol, adição de padrão nativo, adição de padrão interno e todos os solventes, exceto a presença da matriz.

Amostras-controle do método ASE

A, Branco reagente	8,000 g de terra de diatomáceas e adição de padrão interno, exceto a presença da matriz.
B, Branco reagente + óleo de girassol	Aproximadamente 2,000 g de óleo de girassol, 5,000 g de terra de diatomáceas e adição de padrão interno, exceto a presença da matriz.
C, Branco reagente + óleo de girassol + adição de padrão nativo	Aproximadamente 2,000 g de óleo de girassol, 5,000 g de terra de diatomáceas, adição de padrão nativo e adição de padrão interno, exceto a presença da matriz.

Tabela A. 4: Limites de quantificação (LQ) corrigidos pela recuperação e massa da amostra (pg/g).

Congêneres	LQ	Congêneres	LQ
2,3,7,8-TCDF	10	PCB81	20
1,2,3,7,8-PeCDF	10	PCB77	100
2,3,4,7,8-PeCDF	10	PCB126	20
1,2,3,4,7,8-HxCDF	10	PCB169	20
1,2,3,6,7,8-HxCDF	10	PCB123	20
2,3,4,6,7,8-HxCDF	10	PCB118	50
1,2,3,7,8,9-HxCDF	10	PCB114	20
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	10	PCB105	20
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	10	PCB167	20
OCDF	10	PCB156	20
2,3,7,8-TCDD	10	PCB157	20
1,2,3,7,8-PeCDD	10	PCB189	20
1,2,3,4,7,8-HxCDD	10	PCB28	300
1,2,3,6,7,8-HxCDD	10	PCB52	300
1,2,3,7,8,9-HxCDD	10	PCB101	300
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	10	PCB153	300
OCDD	10	PCB138	300
		PCB180	300

Tabela A. 5: Concentração de PCDD/Fs em solos de algumas cidades brasileiras.

Cidade - Estado	(ng I-TEQ kg⁻¹)
Cubatão - SP	11 - 341
Araraquara - SP	0,1 - 1,2
Cantagalo - RJ	0,6 - 2,5
Formiga - MG	1,4 - 654
Duque de Caxias - Rj	13 - 900
Industrial Áreas - RJ	1,1 - 654
Área Playground - RJ	0,03 - 1,8
Manaus - AM	0,05 - 0,4

Tabela A. 6: Método MS/MS para análises de PCDD/Fs e NO-PCBs.

Componente	Íon quantificação	Íon filho	Íon identificação	Íon filho	Tempo de espera	Colisão	Razão íon
	m/z	m/z	m/z	m/z	µs	eV	
TCB	289,92	219,98	291,92	221,98	60	40	1,534
¹³ C-TCB	301,96	232,02	303,96	234,02	60	40	1,534
TCDF	303,90	240,94	305,90	242,93	40	40	1,020
¹³ C-TCDF	315,94	251,97	317,94	253,97	40	40	1,020
TCDD	319,90	256,93	321,89	258,93	40	30	1,019
¹³ C-TCDD	331,94	267,97	333,93	269,97	40	30	1,019
³⁷ Cl-TCDD	327,88	262,92			40	30	
PeCB	325,88	255,94	327,88	257,94	40	40	3,063
¹³ C-PeCB	337,92	267,98	339,92	269,98	40	40	3,063
PeCDF	339,86	276,90	341,86	278,89	40	40	2,039
¹³ C-PeCDF	351,90	287,93	353,90	289,93	40	40	2,039
PeCDD	353,86	290,89	355,85	292,89	40	30	0,766
¹³ C-PeCDD	365,90	301,93	367,89	303,93	40	30	0,766
HxCB	359,84	289,90	361,84	291,90	40	40	2,045
¹³ C-HxCB	371,88	301,94	373,88	303,94	40	40	2,045
HxCDF	373,82	310,86	375,82	312,85	60	40	1,532
¹³ C-HxCDF	385,86	321,89	387,86	323,89	60	40	1,532
HxCDD	389,82	326,85	391,81	328,85	60	30	1,530
¹³ C-HxCDD	401,86	337,89	403,85	339,89	60	30	1,530
HpCDF	407,78	344,82	409,78	346,82	60	40	1,227
¹³ C-HpCDF	419,82	355,85	421,82	357,85	60	40	1,227
HpCDD	423,78	360,81	425,77	362,81	60	30	1,226
¹³ C-HpCDD	435,82	371,85	437,81	373,85	60	30	1,226
OCDF	441,74	378,78	443,74	380,78	60	40	1,023
¹³ C-OCDF	453,78	389,82	455,78	391,81	60	40	1,023
OCDD	457,74	394,77	459,73	396,77	60	30	1,022
¹³ C-OCDD	469,78	405,81	471,78	407,81	60	30	1,022

Tabela A. 7: Método MS/MS para análises de MO-PCBs e ndl-PCBs.

Componente	Íon quantificação	Íon filho	Íon identificação	Íon filho	Tempo de espera	Colisão	Razão íon
	m/z	m/z	m/z	m/z	µs	eV	
TriCB	255,96	186,02	257,96	188,02	30	40	3,061
¹³ C-TriCB	268,00	198,06	270,00	200,06	30	40	3,061
TCB	289,92	219,98	291,92	221,98	50	40	1,534
¹³ C-TCB	301,96	232,02	303,96	234,02	50	40	1,534
PeCB	325,88	255,94	327,88	257,94	40	40	3,063
¹³ C-TCB	337,92	267,98	339,92	269,98	40	40	3,063
HxCB	359,84	289,90	361,84	291,90	40	40	2,045
¹³ C-PeCD	371,88	301,94	373,88	303,94	40	40	2,045
¹³ C-1234T-CDD	331,94	267,97	333,93	269,97	50	40	1,019
HxCB	359,84	289,90	361,84	291,90	50	40	2,045
¹³ C-HxCB	371,88	301,94	373,88	303,94	50	40	2,045
HpCB	393,80	323,86	395,80	325,86	60	40	1,535
¹³ C-HpCB	405,84	335,90	407,84	337,90	60	40	1,535

Tabela A. 8: Média (\pm SD) da razão S/N para MO-PCBs e ndl-PCBs sob condições reprodutíveis (*ICT: limite de contagem de íons).

Instrumento	Autospec		APGC	
	1999	2014	ICT* 30	ICT* 3
Média	42 \pm 17	88 \pm 25	753 \pm 47	429 \pm 39
PCB 123	43 \pm 14	68 \pm 24	430 \pm 32	227 \pm 51
PCB 118	44 \pm 14	70 \pm 25	425 \pm 35	222 \pm 50
PCB 114	48 \pm 21	67 \pm 27	384 \pm 35	205 \pm 49
PCB 105	39 \pm 15	63 \pm 25	415 \pm 33	202 \pm 49
PCB 167	46 \pm 21	105 \pm 25	559 \pm 64	473 \pm 33
PCB 156	44 \pm 27	100 \pm 21	490 \pm 57	420 \pm 31
PCB 157	44 \pm 21	98 \pm 26	533 \pm 62	462 \pm 37
PCB 189	41 \pm 17	93 \pm 36	1248 \pm 57	633 \pm 37
PCB 28	28 \pm 16	32 \pm 5	257 \pm 34	234 \pm 31
PCB 52	48 \pm 15	104 \pm 28	444 \pm 47	299 \pm 37
PCB 101	41 \pm 21	74 \pm 23	480 \pm 31	272 \pm 50
PCB 153	46 \pm 14	159 \pm 27	2700 \pm 46	1061 \pm 23
PCB 138	44 \pm 16	94 \pm 16	496 \pm 61	388 \pm 33
PCB 180	36 \pm 12	99 \pm 36	1676 \pm 59	905 \pm 37

Tabela A. 9: Resposta dos instrumentos HRMS e APGC para os dl-PCBs e ndl-PCBs, com respectivos SD.

Instrumento	Média da resposta (Injeção: 40fg na coluna)			
	Autospec		APGC	
	1999	2014	ICT* 30	ICT* 3
Average	1820 ± 8,6	3692 ± 8,1	3163 ± 5,5	2776 ± 9,8
PCB 123	1855 ± 8,2	3308 ± 8,2	2900 ± 5,4	2459 ± 10,7
PCB 118	1936 ± 7,6	3616 ± 6,9	2839 ± 6,5	2408 ± 12,8
PCB 114	2073 ± 12	3495 ± 9,6	2622 ± 6,0	2210 ± 8,6
PCB 105	1746 ± 6,7	3545 ± 10,9	2774 ± 5,3	2343 ± 10,1
PCB 167	1847 ± 9,1	3658 ± 8,6	3096 ± 5,1	2822 ± 9,1
PCB 156	1712 ± 8,8	3691 ± 5,4	2881 ± 6,4	2618 ± 9,1
PCB 157	1825 ± 9,0	3762 ± 6,6	3096 ± 6,0	2790 ± 11,5
PCB 189	1627 ± 10,6	3107 ± 8,4	2711 ± 5,5	2562 ± 10,6
PCB 28	2562 ± 8,0	5980 ± 7,2	4048 ± 4,7	3381 ± 13,3
PCB 52	1756 ± 6,2	4148 ± 5,8	4538 ± 3,9	3897 ± 10,2
PCB 101	1546 ± 12,8	3497 ± 7,9	3004 ± 4,5	2566 ± 8,6
PCB 153	1883 ± 6,5	3679 ± 12,2	3463 ± 4,5	3103 ± 7,5
PCB 138	1669 ± 7,3	3233 ± 11,4	2858 ± 7,3	2318 ± 6,0
PCB 180	1444 ± 7,4	2965 ± 4,9	3453 ± 5,9	3394 ± 8,6

Tabela A. 10: Fator de resposta dos instrumentos HRMS e APGC para os dl-PCBs e ndl-PCBs, com respectivos SD.

Instrumento	Fator de resposta (RF) (Injeção: 40fg na coluna)			
	Autospec		APGC	
	1999	2014	ICT* 30	ICT* 3
Average	0,020 ± 5,0	-	0,020 ± 3,3	0,020 ± 3,7
PCB 123	0,021 ± 4,2	-	0,020 ± 3,9	0,020 ± 4,2
PCB 118	0,021 ± 4,5	-	0,020 ± 5,1	0,020 ± 4,9
PCB 114	0,020 ± 5,1	-	0,020 ± 3,0	0,020 ± 4,5
PCB 105	0,020 ± 6,6	-	0,020 ± 4,5	0,020 ± 3,2
PCB 167	0,020 ± 4,5	-	0,020 ± 3,1	0,020 ± 2,8
PCB 156	0,020 ± 6,3	-	0,020 ± 3,5	0,020 ± 2,9
PCB 157	0,019 ± 4,8	-	0,020 ± 2,9	0,020 ± 4,5
PCB 189	0,021 ± 4,2	-	0,020 ± 1,7	0,020 ± 3,7
PCB 28	0,019 ± 6,7	-	0,021 ± 3,6	0,020 ± 5,3
PCB 52	0,021 ± 6,1	-	0,021 ± 1,7	0,020 ± 2,4
PCB 101	0,021 ± 5,2	-	0,020 ± 3,9	0,020 ± 2,3
PCB 153	0,021 ± 4,6	-	0,021 ± 3,4	0,020 ± 4,2
PCB 138	0,021 ± 3,9	-	0,019 ± 3,4	0,020 ± 4,1
PCB 180	0,020 ± 3,6	-	0,021 ± 2,5	0,020 ± 2,8

Tabela A. 11: Linearidade para PCDD/Fs e PCBs no equipamento APGC-MS/MS.

PCDD/Fs - NO-PCBs MO-PCBs - ndl-PCBs Parâmetro	Fator de Resposta dos padrões individuais									R ²
	0,002	0,005	0,010	0,020	0,050	0,100	0,200	1,000	2,000	
	0,100	0,250	0,500	1,000	2,500	5,000	10,00	50,00	100,0	
	RF	RF	RF	RF	RF	RF	RF	RF	RF	
2,3,7,8-TCDF	0,02	0,06	0,11	0,22	0,59	1,2	2,4	-	-	0,9996
1,2,3,7,8-PeCDF	0,02	0,06	0,11	0,22	0,56	1,1	2,3	-	-	0,9999
2,3,4,7,8-PeCDF	0,03	0,06	0,11	0,23	0,60	1,2	2,4	-	-	0,9995
1,2,3,4,7,8-HxCDF	0,02	0,05	0,10	0,22	0,54	1,1	2,2	-	-	0,9999
1,2,3,6,7,8-HxCDF	0,02	0,06	0,11	0,22	0,56	1,1	2,3	-	-	0,9999
2,3,4,6,7,8-HxCDF	0,02	0,05	0,10	0,21	0,52	1,1	2,1	-	-	0,9992
1,2,3,7,8,9-HxCDF	0,02	0,05	0,10	0,20	0,51	1,0	2,1	-	-	0,9999
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0,02	0,05	0,10	0,20	0,52	1,0	2,1	-	-	0,9999
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	0,02	0,06	0,11	0,22	0,56	1,1	2,3	-	-	0,9999
OCDF	0,02	0,05	0,10	0,21	0,51	1,1	2,0	-	-	0,9994
2,3,7,8-TCDD	0,02	0,06	0,10	0,23	0,58	1,1	2,3	-	-	0,9998
1,2,3,7,8-PeCDD	0,02	0,05	0,10	0,21	0,54	1,1	2,2	-	-	0,9999
1,2,3,4,7,8-HxCDD	0,02	0,05	0,11	0,23	0,56	1,2	2,3	-	-	0,9998
1,2,3,6,7,8-HxCDD	0,02	0,05	0,10	0,20	0,51	1,1	2,1	-	-	0,9996
1,2,3,7,8,9-HxCDD	0,02	0,05	0,10	0,21	0,54	1,1	2,2	-	-	0,9999
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	0,02	0,05	0,10	0,20	0,54	1,1	2,2	-	-	0,9999
OCDD	0,02	0,05	0,11	0,22	0,55	1,1	2,1	-	-	0,9996
PCB 81	0,02	0,07	0,13	0,27	0,66	1,3	2,6	11	23	0,9998
PCB 77	0,02	0,07	0,12	0,26	0,63	1,2	2,4	10	20	0,9995
PCB 126	0,02	0,06	0,09	0,20	0,48	0,88	1,7	7,7	16	0,9994
PCB 169	0,02	0,06	0,11	0,26	0,55	1,1	2,2	10	20	0,9999
PCB 123	0,05	0,14	0,24	0,53	1,3	2,7	5,2	24	<u>37</u>	0,9995
PCB 118	0,06	0,14	0,26	0,54	1,4	2,7	5,4	24	<u>38</u>	0,9993
PCB 114	0,05	0,13	0,24	0,50	1,3	2,6	5,1	23	<u>39</u>	0,9996
PCB 105	0,05	0,13	0,24	0,50	1,3	2,6	5,1	23	<u>38</u>	0,9995
PCB 167	0,06	0,14	0,25	0,55	1,4	2,7	5,4	25	<u>42</u>	0,9996
PCB 156	0,06	0,15	0,26	0,56	1,4	2,8	5,5	26	<u>44</u>	0,9997
PCB 157	0,06	0,14	0,25	0,54	1,3	2,7	5,3	24	<u>41</u>	0,9995
PCB 189	0,06	0,14	0,26	0,53	1,3	2,7	5,4	25	<u>44</u>	0,9996
PCB 28	0,05	0,12	0,22	0,46	1,2	2,4	4,6	22	<u>24</u>	0,9997
PCB 52	0,05	0,12	0,21	0,45	1,1	2,2	4,3	20	<u>29</u>	0,9998
PCB 101	0,05	0,12	0,21	0,45	1,1	2,3	4,5	21	<u>32</u>	0,9996
PCB 153	0,05	0,13	0,22	0,50	1,2	2,5	4,8	23	<u>36</u>	0,9998
PCB 138	0,05	0,12	0,21	0,46	1,1	2,3	4,5	21	<u>33</u>	0,9997
PCB 180	0,05	0,12	0,22	0,46	1,2	2,3	4,5	21	<u>37</u>	0,9998

9 ANEXO II – CÁLCULOS

Antes do processamento dos dados, os tempos de retenção de todos os compostos de interesse são verificados e, se necessário, há a modificação do método de processamento. Após o processamento dos dados, cada resultado é verificado manualmente para a integração correta.

Para calibrar o espectrômetro de massas por diluição isotópica, são usadas duas curvas de calibração, referentes à fração A (volume de injeção: 2 μL no injetor *splitless* - Tabela A. 12) e a fração B (volume de injeção: 100 μL no injetor PTV - Tabela A. 13).

Tabela A. 12 Curva de calibração referente à fração A contendo PCBs-MO e PCBs indicadores, para injeção no modo *splitless* (volume 2 μL).

Pontos da curva de calibração	Volume de ^{12}C padrão nativo (μL)	Volume de ^{13}C padrão interno (μL)	Volume de padrão de recuperação (μL)	Vol. final (μL)	Concentração PCBs-MO e PCBs indicadores ($\text{pg}/\mu\text{L}$)
1	400 MOPIP-0,25	40 ^{13}C -MOPIP-1	50 TCDD-RS-III	1000	0,100
2	100 MOPIP-2,5	40 ^{13}C -MOPIP-1	50 TCDD-RS-III	1000	0,250
3	200 MOPIP-2,5	40 ^{13}C -MOPIP-1	50 TCDD-RS-III	1000	0,500
4	400 MOPIP-2,5	40 ^{13}C -MOPIP-1	50 TCDD-RS-III	1000	1,000
5	100 MOPIP-25	40 ^{13}C -MOPIP-1	50 TCDD-RS-III	1000	2,500
6	200 MOPIP-25	40 ^{13}C -MOPIP-1	50 TCDD-RS-III	1000	5,000
7	400 MOPIP-25	40 ^{13}C -MOPIP-1	50 TCDD-RS-III	1000	10,00
8	100 MOPIP-500	40 ^{13}C -MOPIP-1	50 TCDD-RS-III	1000	50,00
9	100 MOPIP-500	40 ^{13}C -MOPIP-1	50 TCDD-RS-III	1000	100,0

Todas os pontos da curva de calibração referentes à fração A para injeção de 2,0 μL no modo *splitless* possuem soluções contendo 2,0 $\text{pg}/\mu\text{L}$ de padrão interno ^{13}C marcado, 5,0 $\text{pg}/\mu\text{L}$ de padrão de recuperação ^{13}C -1,2,3,4-TCDD, e dos padrões nativos ^{12}C PCBs-MO e PCBs indicadores nas concentrações: 0,100; 0,250; 0,500; 1,000; 2,500; 5,000; 10,00; 50,00 e 100,0 $\text{pg}/\mu\text{L}$.

Tabela A. 13: Curva de calibração referente à fração B contendo PCDDs, PCDFs e PCBs-NO, para injeção no modo PTV de grande volume (100 µL).

Pontos da curva de calibração	Volume de ¹² C padrão nativo (µL)	Volume de ¹³ C padrão interno (µL)	Volume de padrão de recuperação (µL)	Volume de padrão de <i>clean-up</i> (µL)	Vol. final (mL)	Concentração PCDD/Fs (pg/µL)	Concentração NO-PCBs (pg/µL)
1	50 DIOXNOP-1	100 ¹³ C-DIOXNOP	100 DIOX-RS-100	100 CS-50	50	0,002	0,002
2	125 DIOXNOP-1	100 ¹³ C-DIOXNOP	100 DIOX-RS-100	100 CS-50	50	0,005	0,005
3	250 DIOXNOP-1	100 ¹³ C-DIOXNOP	100 DIOX-RS-100	100 CS-50	50	0,010	0,010
4	500 DIOXNOP-1	100 ¹³ C-DIOXNOP	100 DIOX-RS-100	100 CS-50	50	0,020	0,020
5	125 DIOXNOP	100 ¹³ C-DIOXNOP	100 DIOX-RS-100	100 CS-50	50	0,050	0,050
6	250 DIOXNOP	100 ¹³ C-DIOXNOP	100 DIOX-RS-100	100 CS-50	50	0,100	0,100
7	500 DIOXNOP	100 ¹³ C-DIOXNOP	100 DIOX-RS-100	100 CS-50	50	0,200	0,200
8	100 NOP-500	100 ¹³ C-DIOXNOP	100 DIOX-RS-100	100 CS-50	50	-	1,000
9	200 NOP-500	100 ¹³ C-DIOXNOP	100 DIOX-RS-100	100 CS-50	50	-	2,000

Todas os pontos da curva de calibração referentes à fração B para injeção de 100,0 µL no modo PTV possuem soluções contendo 0,100 pg/µL de padrão interno ¹³C marcado, 0,100 pg/µL de padrão de *clean-up* ³⁷Cl₄-2,3,7,8-TCDD e 0,200 pg/µL de padrão de recuperação ¹³C-1,2,3,4-TCDD e ¹³C-2,3,4,6,7,8-HxCDF, Os pontos de 1 a 7 da curva, contém 0,200; 0,500; 0,010; 0,020; 0,050; 0,100 e 0,200 pg/µL dos congêneres nativos de dioxinas e PCBs não-orto. Os pontos 8 e 9 da curva de calibração contém apenas PCBs não-orto nas concentrações 1,000 pg/µL e 2,000 pg/µL, respectivamente.

Cálculo do fator de resposta relativa (RRF) para os compostos nativos:

$$RRF_{(n)} = \frac{A_n \times Q_{PI}}{Q_n \times A_{PI}}$$

Onde,

A_n : resposta (m/z de um dos íons) dos compostos nativos,

Q_n : quantidade do composto nativo pg/µL,

A_{PI} : resposta (m/z de um dos íons) do padrão interno correspondente,

Q_{PI} : quantidade do padrão interno pg/ μ L.

Cálculo do fator de resposta relativa (RRF) para os padrões internos:

$$RRF_{(PI)} = \frac{A_{PI} \times Q_{PR}}{Q_{PI} \times A_{PR}}$$

Onde,

A_{PI} : resposta (m/z de um dos íons) do padrão interno correspondente,

Q_{PI} : quantidade do padrão interno pg/ μ L,

A_{PR} : resposta (m/z de um dos íons) do padrão de recuperação,

Q_{PR} : quantidade do padrão de recuperação pg/ μ L.

Consequentemente, a média do RRF de todos os pontos da curva de calibração para os nativos pode ser calculada como:

$$\overline{RRF}_{(n)} = \frac{1}{m} \times \sum_{i=1}^m RRF_i(n)$$

Onde,

m : número de padrões (níveis de concentração);

n : congênera nativo;

i : nível de calibração.

Pode-se calcular também a média do RRF para os compostos marcados ^{13}C ,

$$\overline{RRF}_{(l)} = \frac{1}{m} \times \sum_{i=1}^m RRF_i(l)$$

Onde,

m : número de padrões (níveis de concentração);

l : congênera marcado ^{13}C ;

i : nível de calibração.

O congênera nativo 2,3,4,6,7,8-HxCDF não possui um composto análogo marcado ^{13}C , portanto este é quantificado baseado no padrão interno ^{13}C -1,2,3,6,7,8-HxCDF.

A concentração do composto de interesse pode ser calculada por:

$$C_x = \frac{A_x \times Q_{PI}}{A_{PI} \times \overline{RRF}_{(n)}}$$

Onde,

C_x : quantidade do congênera de interesse em ng/Kg;

A_x : resposta (m/z de um dos íons) do congênera nativo presente no extrato da amostra;

A_{PI} : resposta (m/z de um dos íons) correspondente ao padrão interno marcado ^{13}C no extrato da amostra;

Q_{PI} : concentração do padrão interno adicionado ($\text{pg}/\mu\text{L}$);

$RRF_{(n)}$: fator de resposta relativo.

• TEQ: Toxicidade Equivalente

Uma vez calculada as concentrações das dioxinas, furanos e PCBs presente na amostra, é recalculado o TEQ multiplicando-se os valores de concentração encontrados para cada congêneres e seu respectivo TEF.

$$TEQ_{(pg/g)} = \sum_{i=1}^{29} (TEF)_i \times (\text{concentração})_i$$

Onde,

$TEQ_{(pg/g)}$: Toxicidade Equivalente;

TEF_i : valor de TEF correspondente a cada congêneres;

Concentração : concentração encontrada para o congêneres (pg/g),

Cálculo de recuperação do padrão interno ($R\%$):

$$R\% = \frac{A_{PI} \times Q_{PR}}{Q_{PI} \times A_{PR} \times RRF_{(m)}} \times 100$$

Onde,

A_{PI} : resposta (m/z de um dos íons) correspondente ao padrão interno marcado ^{13}C no extrato da amostra;

Q_{PI} : concentração do padrão interno adicionado ($\text{pg}/\mu\text{L}$);

A_{PR} : resposta (m/z de um dos íons) do padrão de recuperação da amostra,

Q_{PR} : quantidade do padrão de recuperação ($\text{pg}/\mu\text{L}$).

Observação: Para a fração A, usa-se como padrão de recuperação o congêneres marcado ^{13}C -1,2,3,4-TCDD, Para a fração B, os congêneres presentes nas funções 1, 2 e 3 utilizam o padrão de recuperação ^{13}C -1,2,3,4-TCDD, os congêneres presentes nas funções 4, 5 e 6 utilizam o padrão de recuperação ^{13}C -2,3,4,6,7,8-HxCDF.

I. *TUNNING* DO HRMS

Antes de cada sequência de injeção dos extratos das amostras, o equipamento passa por um processo de *tunning*, realizado através do ajuste das lentes por onde percorre o feixe de íons, de modo a equilibrar o perfil do pico monitorado e manter a resolução acima de 10000 (vale de 10 %). Para isto foi utilizado o gás PFK (*Perfluor-kerosene*) que, ao ser injetado diretamente no espectrômetro de massas, disponibiliza diferentes valores de massas, gerando picos de referência, onde uma razão m/z é selecionada para o monitoramento durante o *tunning*. Esta massa de monitoramento, chamada *lock mass*, pode ser escolhida arbitrariamente e programada no equipamento, desde que esteja entre o menor e maior valor de massas de todos os congêneres analisados. A razão m/z mais recomendada é 304,9824 [51].

Durante todo o processo, a resolução mínima do equipamento deve permanecer acima de 10000 e o desvio entre a razão exata m/z e o valor teórico de m/z para cada massa monitorada deve ser inferior a 5 ppm. Na Tabela A. 14 estão as faixas de razão m/z dos congêneres de dioxinas e dl-PCBs-NO, enquanto na Tabela A. 15 se encontram as razões m/z dos dl-PCBs-MO e os ndl-PCBs, divididos em funções, com os respectivos valores de *lock mass* (m/z) adequados provenientes do PFK.

Tabela A. 14: Faixa da razão m/z dos congêneres de PCDD/Fs e PCBs-NO e o valor de *lock mass* (m/z) respectivo a cada função.

Grupo funções ^a	de Faixa de m/z dos congêneres		<i>Lock mass</i> (m/z)
	Mínima	Máxima	
1	289,9224	303,9597	292,9825
2	303,9016	337,9207	316,9824
3	339,8597	371,8817	366,9792
4	373,8208	403,8529	380,9760
5	407,7818	437,8140	430,9729
6	441,7428	471,7750	454,9728

^aFunção: corresponde à faixa de massas que compreende um grupo de congêneres.

Tabela A. 15: Faixa da razão m/z dos congêneres de PCBs-MO e PCBs indicadores, e o valor de lock mass (m/z) respectivo a cada função.

Grupo de Funções	Faixa de m/z dos congêneres		Lock mass (m/z)
	Mínima	Máxima	
1	255,9613	269,9986	268,9824
2	289,9224	303,9597	292,9824
3	325,8804	373,8788	330,9792
4	331,9368	373,8788	342,9792
5	392,9760	407,8398	392,9760

II. VERIFICANDO AS CONFIGURAÇÕES DO INSTRUMENTO

Injeta-se 2 μL de solução padrão de concentração no nível médio da curva de calibração e verifica-se os formatos dos picos e os tempos de retenção de todos os congêneres da fração A e fração B.

III. VERIFICANDO A SEPARAÇÃO NO SISTEMA GC

- Separação entre dioxinas/furanos e PCBs-NO.

Em uma coluna não-polar, a altura do vale para a separação dos compostos de ^{13}C -1,2,3,4,7,8-HxCDF e ^{13}C -1,2,3,6,7,8-HxCDF deve ser $\leq 25\%$, Estas são exigências do método EPA 1613 [49] e o regulamento (CE) n° 152/2009 da União Europeia [139].

- Separação entre PCBs-MO e PCBs indicadores.

Em uma coluna não-polar, a altura do vale para a separação dos compostos ^{13}C -PCB-123 e ^{13}C -PCB-118, ^{13}C -PCB-156 e ^{13}C -PCB-157 deve ser $\leq 25\%$, Estas são exigências apenas para as dioxinas do método EPA 1613 [49].