

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E
TECNOLOGIA DOS ALIMENTOS**

**RESÍDUOS DE POLUENTES ORGÂNICOS
PERSISTENTES EM MEL DE ABELHAS:
REPERCUSSÕES DA CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL**

TESE DE DOUTORADO

Susana Mohr

Santa Maria, RS, Brasil

2013

**RESÍDUOS DE POLUENTES ORGÂNICOS
PERSISTENTES EM MEL DE ABELHAS:
REPERCUSSÕES DA CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL**

Susana Mohr

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, Área de Concentração em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciência e Tecnologia dos Alimentos.**

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ijoni Hilda Costabeber

Santa Maria, RS, Brasil

2013

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Mohr, Susana
Resíduos de Poluentes Orgânicos Persistentes em mel de abelhas: repercussões da contaminação ambiental / Susana Mohr.-2013.
135 p.; 30cm

Orientadora: Ijoni Hilda Costabeber
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, RS, 2013

1. Segurança Alimentar 2. PCBs 3. PCDDs 4. BFRs 5. Praguicidas Organoclorados I. Costabeber, Ijoni Hilda II. Título.

© 2013

Todos os direitos autorais reservados a Susana Mohr. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.

Endereço: Rua Rodrigues Portugal, 2516, Bairro São Miguel, Uruguaiiana, RS. CEP: 97502-830. Fone: (55) 34123415; Fax (55) 34119650; Email: susana@viamicro.com.br

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos**

**A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Tese de Doutorado**

**RESÍDUOS DE POLUENTES ORGÂNICOS
PERSISTENTES EM MEL DE ABELHAS:
REPERCUSSÕES DA CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL**

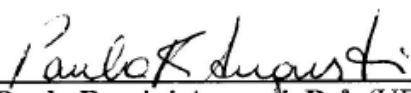
elaborada por
Susana Mohr

como requisito parcial para obtenção do grau de
Doutor em Ciência e Tecnologia dos Alimentos

COMISSÃO EXAMINADORA:



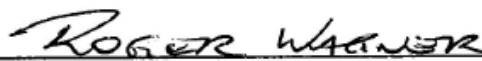
Ijoni Hilda Costabeber, Dr.^a. (UFSM)
(Presidente/Orientadora)



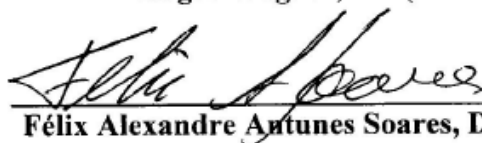
Paula Rossini Augusti, Dr.^a. (UFRGS)



Fábio Ferreira Gonçalves, Dr. (FURG)



Roger Wagner, Dr. (UFSM)



Félix Alexandre Antunes Soares, Dr. (UFSM)

Santa Maria, 28 de novembro de 2013.

Dedicatória

Dedico este trabalho à minha família:

*Aos meus pais, Renato e Helena,
pelo amor incondicional em todos os dias da minha vida;*

*Aos meus irmãos, Ricardo e Renato Jr.,
pelo apoio constante e força nos momentos em que mais precisei;*

*Às minhas cunhadas, Sabrina e Cristiane,
pelo incentivo e amizade;*

*À minha sobrinha, Ana Carolina,
por fazer com que meus dias se tornem mais alegres.*

Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), que através de recursos financeiros obtidos a partir do Edital CNPq/MAPA/SDA N° 064/2008 (Processo N° 578343/2008-8) tornaram possível a execução deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão das bolsas de doutorado e doutorado sanduíche (Processo BEX 9899/11-1).

Ao Núcleo de Análises e Pesquisas Orgânicas (NAPO-UFSM), por permitir a utilização de suas dependências e equipamentos, sem custo algum, para a realização das análises cromatográficas de PCBs e praguicidas organoclorados. Aos professores Nilo Zanatta, Helio Gauze Bonacorso e Marcos Antonio Pinto Martins, o meu mais sincero obrigado!

Ao *Instituto de Química Orgánica General*, vinculado ao *Consejo Superior de Investigaciones Científicas* (IQOG-CSIC), por receber-me de braços abertos para a realização do estágio de doutorado sanduíche na cidade de Madrid, Espanha.

À Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, pela oportunidade. À coordenação do PPGCTA, através das professoras Tatiana Emanuelli, Luisa Helena Rycheki Hecktheuer e Neidi Garcia Penna, e à secretária Lia Cidade, pelas orientações e ajudas nas questões burocráticas.

À minha orientadora, professora Ijoni Costabeber, pela oportunidade, confiança e ensinamentos transmitidos desde os tempos do mestrado.

Aos professores da banca de defesa da tese: Paula Rossini Augusti, Fábio Ferreira Gonçalves, Félix Alexandre Antunes Soares e Roger Wagner. Muito obrigada por aceitarem o convite para avaliar este trabalho, por todas as correções e sugestões realizadas.

Aos meus queridos colegas, hoje amigos, que tornaram esta caminhada mais amena. A cada encontro, e-mail, telefonema ou mensagem eu renovava minhas forças para seguir adiante! Muito obrigada Thiago Guilherme Schwanz, Joseane de Oliveira Mozzaquatro, Giane Magrini Pigatto e Vanusa Granella! Cada um de vocês sabe que tem grande parte neste trabalho!

À querida professora María José González, minha coorientadora durante o doutorado sanduíche, que aceitou receber-me em seu grupo de pesquisa mesmo sem me conhecer, com o único antecedente de que era brasileira e queria analisar os POPs *en las mieles*. *Mariché*, no

tengo palabras para agradecer todo lo que has hecho por mí, muchas gracias por acogerme en tu grupo de investigación, por la oportunidad, los enseñamientos, tu ayuda con la escritura de la tesis y por el apoyo cuando más necesité!

A todos os colegas e investigadores do IQOG-CSIC, pelos momentos de alegria, descontração e conversas durante os cafés, almoços e confraternizações. Não poderia deixar de fazer um agradecimento especial ao Ángel García-Bermejo, à Laura Herrero e à Belén Gómara, por todo o aprendizado e ajuda nos procedimentos de laboratório e na utilização do nosso querido *triple*. *¡Muchas gracias, chicos!*

À Ana Paula Carlucci, minha querida amiga e *compañera de piso* em Madrid, muito obrigada por tornar melhores os longos meses que passamos longe da família e de nosso país. Agradeço também às amigas Nara Ramos e Caterina Groposo Pavão pela amizade iniciada “no velho mundo” e que com certeza seguirá sendo cultivada aqui em nossos pagos.

Aos queridos amigos Diego Carrilho, Laura Gurgel e Zaida Carvalho, que de perto ou de longe sempre estão torcendo por mim, muito obrigada de coração!

A todas as pessoas que contribuíram com este trabalho, doando amostras de mel, em especial à Associação dos Apicultores de Santa Maria (APISMAR), ao professor Silvio Lengler e à professora Elisabete Dockhorn.

E finalmente, à minha família, a quem dedico este trabalho.

O meu mais sincero muito obrigado à todos!

“Se as abelhas desaparecerem da face da terra, a humanidade terá apenas mais quatro anos de existência. Sem abelhas não há polinização, não há reprodução da flora, sem flora não há animais, sem animais não haverá raça humana.”

(Albert Einstein)

RESUMO

Tese de Doutorado
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos
Universidade Federal de Santa Maria

RESÍDUOS DE POLUENTES ORGÂNICOS PERSISTENTES EM MEL DE ABELHAS: REPERCUSSÕES DA CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL

AUTORA: SUSANA MOHR

ORIENTADORA: IJONI HILDA COSTABEBER

Local e Data da Defesa: Santa Maria, 28 de novembro de 2013.

Os Poluentes Orgânicos Persistentes (POPs) são compostos químicos sintéticos que estão amplamente distribuídos no meio ambiente, acumulam-se nos tecidos lipídicos dos seres vivos, são encontrados em altas concentrações na cadeia alimentar e apresentam efeitos tóxicos aos seres humanos e animais. No presente trabalho, os POPs foram determinados em mel de abelhas de diferentes regiões geográficas, buscando avaliar a qualidade e segurança do mel como alimento, bem como a contaminação ambiental das regiões estudadas. Os praguicidas organoclorados foram analisados em 186 amostras da região Sul do Brasil, com concentrações que variaram entre $<LQ$ e 92 ng g^{-1} . Os praguicidas Endosulfan alfa e Endosulfan sulfato foram os mais frequentes, com média de $1,84$ e $1,68 \text{ ng g}^{-1}$, respectivamente. As amostras provenientes de Santa Catarina apresentaram concentrações maiores de Aldrin quando comparadas às provenientes do Rio Grande do Sul e Paraná, enquanto que observou-se uma redução na concentração de Endrin nas amostras coletadas no ano de 2011, quando comparadas com as coletadas em 2010. Com relação à segurança alimentar, 18% das amostras superaram o limite máximo de resíduos permitido pela legislação para os compostos Aldrin, *p,p'*-DDT, Endosulfan alfa, Endrin e Heptacloro, o que pode representar risco à saúde do consumidor. Os PCBs indicadores foram analisados em 137 amostras provenientes dos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná e São Paulo. Os congêneres 28 e 52 foram os mais frequentes, com média de $1,18$ e $0,74 \text{ ng g}^{-1}$, respectivamente. As amostras provenientes do estado de São Paulo apresentaram os níveis mais elevados ($\sum PCBs 7,52 \text{ ng g}^{-1}$), seguidas das amostras do Paraná ($\sum PCBs 5,4 \text{ ng g}^{-1}$), Santa Catarina ($\sum PCBs 2,59 \text{ ng g}^{-1}$) e Rio Grande do Sul ($\sum PCBs 1,24 \text{ ng g}^{-1}$), com diferença significativa para os PCBs 28 e 52. Não houve diferença entre as concentrações das amostras coletadas nos anos de 2009, 2010 e 2011. DL-PCBs, PCDDs e PCDFs foram analisados em 16 amostras provenientes de quatro estados brasileiros (RS, SC, PR e SP). As concentrações de DL-PCBs variaram entre $24,3$ e 260 pg g^{-1} , enquanto que as de PCDD/Fs, entre $<LD$ e $5,4 \text{ pg g}^{-1}$. Os valores de TEQ ficaram entre $0,002$ e $0,343 \text{ pg WHO-TEQ g}^{-1}$. Nenhuma diferença significativa foi encontrada entre as concentrações das amostras provenientes dos quatro estados. Retardantes de chama bromados (PBDEs, BTBPE e DBDPE) foram analisados em 35 amostras provenientes do Brasil, Espanha, Portugal, Marrocos e Eslovênia, com concentrações que variaram entre $<LD$ e $24,7 \text{ pg g}^{-1}$. As amostras provenientes do Brasil apresentaram a maior concentração média ($5,19 \text{ pg g}^{-1}$), seguidas das provenientes do Marrocos ($4,4 \text{ pg g}^{-1}$), Portugal ($2,24 \text{ pg g}^{-1}$), Espanha ($1,77 \text{ pg g}^{-1}$) e Eslovênia ($0,93 \text{ pg g}^{-1}$). O PBDE 47 foi o mais frequente, tendo sido detectado em 91% das amostras analisadas, seguido do PBDE 99, em 63%. Estes compostos foram os que mais contribuíram na concentração total de BFRs nas amostras provenientes da Europa, enquanto que os novos retardantes de chama, BTBPE e DBDPE, tiveram maior contribuição nas amostras do Brasil e Marrocos. Com relação à segurança alimentar, não há limite máximo estabelecido para PCBs, PCDDs, PCDFs e BFRs em mel de abelhas. Embora os níveis detectados destes compostos tenham sido baixos quando comparados a outros alimentos de origem animal, as amostras de mel de abelhas analisadas apresentaram contaminações importantes, demonstrando que as regiões estudadas contêm fontes de contaminação ambiental a serem investigadas.

Palavras-chave: Segurança Alimentar. PCBs. PCDDs. BFRs. Praguicidas Organoclorados.

ABSTRACT

Doctoral Thesis
Post-Graduation Program in Food Science and Technology
Federal University of Santa Maria

PERSISTENT ORGANIC POLLUTANTS RESIDUES IN HONEY: REPERCUSSIONS OF THE ENVIRONMENTAL CONTAMINATION

AUTHOR: SUSANA MOHR

ADVISER: IJONI HILDA COSTABEBER

Place and Date of Defense: Santa Maria, November 28th, 2013.

Persistent Organic Pollutants (POPs) are chemical substances that are widely distributed throughout the environment, accumulate in the fatty tissue of living organisms, are found at higher concentrations in the food chain and are toxic to both humans and wildlife. In the present work, POPs were determined in honey samples from different geographic regions, evaluating both the quality and safety of honey as food, and the environmental contamination of the studied regions. Organochlorine pesticides were analysed in 186 samples from the South region of Brazil, with concentrations between <LOQ and 92 ng g⁻¹. Pesticides Endosulfan alpha and Endosulfan sulfate were the most frequent, with mean of 1.84 and 1.68 ng g⁻¹, respectively. Samples from Santa Catarina State had higher Aldrin concentrations when compared to those from Rio Grande do Sul and Paraná States, while there was a reduction in the Endrin concentration in the samples collected in 2011, when compared with those collected in 2010. With regard to food security, 18% of the samples exceeded the maximum residue limits allowed by law for compounds Aldrin, *p,p'*-DDT, Endosulfan alpha, Endrin, and Heptachlor, which may pose a risk to consumer health. Indicator PCBs were analysed in 137 samples from Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, and São Paulo States. PCBs 28 and 52 were the most frequent, with means of 1.18 and 0.74 ng g⁻¹, respectively. Samples from São Paulo State exhibited the highest levels (Σ PCBs 7.52 ng g⁻¹), followed by samples from Paraná (Σ PCBs 5.4 ng g⁻¹), Santa Catarina (Σ PCBs 2.59 ng g⁻¹), and Rio Grande do Sul (Σ PCBs 1.24 ng g⁻¹), with significant difference for PCBs 28 and 52. There was no difference between the concentrations of samples collected in the years 2009, 2010, and 2011. DL-PCBs, PCDDs and PCDFs were analysed in 16 samples from four Brazilian States (RS, SC, PR and SP). DL-PCB concentrations ranged between 24.3 and 260 pg g⁻¹, while PCDD/Fs, between <LOD and 5.4 pg g⁻¹. TEQ values were between 0.002 and 0.343 pg WHO-TEQ g⁻¹. No significant difference was found among the concentration levels of the samples from the four States. Brominated flame retardants (PBDEs, BTBPE and DBDPE) were analysed in 35 honey samples from Brazil, Spain, Portugal, Morocco, and Slovenia, with concentrations ranged between <LOD and 24.7 pg g⁻¹. Brazilian honeys exhibited the highest mean concentration (5.19 pg g⁻¹), followed by Moroccan (4.4 pg g⁻¹), Portuguese (2.24 pg g⁻¹), Spanish (1.77 pg g⁻¹), and Slovenian (0.93 pg g⁻¹) samples. PBDE 47 was the most frequent, being detected in 91% of samples, and followed by PBDE 99, in 63%. These compounds were the main contributors in the BFR total concentration in samples from Europe, while the novel flame retardants, BTBPE and DBDPE, had greater contribution in samples from Brazil and Morocco. With regard to food security, there is no limit established by law for PCBs, PCDDs, PCDFs, and BFRs in honey. Although the levels detected were quite low when compared to other foods of animal origin, the honey samples analysed showed significant contamination, demonstrating that the studied regions contain sources of environmental contamination to be investigated.

Keywords: Food Security. PCBs. PCDDs. BFRs. Organochlorine Pesticides.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|---|----|
| Figura 1 – Estrutura molecular dos bifenilos policlorados (PCBs)..... | 23 |
| Figura 2 – Estrutura molecular dos dibenzofuranos policlorados (PCDFs)..... | 25 |
| Figura 3 – Estrutura molecular das dibenzo- <i>p</i> -dioxinas policloradas (PCDDs) | 25 |
| Figura 4 – Estrutura molecular dos éteres de polibromodifenil (PBDEs)..... | 28 |
| Figura 5 – Estrutura molecular do DDT e formação dos seus metabólitos (DDD e DDE)..... | 31 |
| Figura 6 – Estrutura molecular do HCH e seu isômero gama (Lindano)..... | 31 |
| Figura 7 – Estrutura molecular dos compostos Aldrin, Dieldrin e Endrin | 32 |
| Figura 8 – Estrutura molecular do Endosulfan..... | 33 |
| Figura 9 – Esquema representativo do método de dispersão da matriz em fase sólida..... | 38 |
| Figura 10 – Fluxograma representativo do método QuEChERS original..... | 39 |
| Figura 11 – Esquema de funcionamento de um detector MS-Q..... | 40 |
| Figura 12 – Esquema de funcionamento de um detector MS/MS-QqQ..... | 42 |
| Figura 13 – Exemplo de funcionamento de um detector MS/MS-QqQ no modo MRM..... | 42 |

MANUSCRITO 1

| | |
|---|----|
| Figura 1 – Fluxograma representativo do método de extração utilizado (QuEChERS modificado)..... | 61 |
| Figura 2 – Perfil da concentração total (2A) e concentração individual (2B) dos praguicidas organoclorados em mel de abelhas da região Sul do Brasil de acordo com o estado de origem | 62 |
| Figura 3 – Perfil da concentração total (3A) e concentração individual (3B) dos praguicidas organoclorados em mel de abelhas da região Sul do Brasil de acordo com o ano de colheita..... | 63 |

MANUSCRITO 2

| | |
|--|----|
| Figure 1 – PCB concentrations in honey samples from Brazil according to the harvest year . | 80 |
|--|----|

MANUSCRITO 3

| | |
|---|-----|
| Figure 1 – Mean of WHO-TEQ values for PCDD/Fs and DL-PCBs in honey samples from Brazil according to the State of origin | 100 |
|---|-----|

ARTIGO 1

| | |
|--|-----|
| Figure 1 – Profiles of contribution (in %) of each compound detected in more than 10% of the samples to the total BFR concentrations in each studied country | 105 |
|--|-----|

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 – Poluentes Orgânicos Persistentes (POPs) atualmente incluídos no Convênio de Estocolmo | 21 |
| Tabela 2 – Fatores de Equivalência Tóxica (WHO-TEF) para PCDDs, PCDFs e DL-PCBs.. | 27 |
| Tabela 3 – Composição comercial dos éteres de polibromodifenil..... | 29 |
| Tabela 4 – Composição média do mel de abelhas (em g/100g) | 35 |

MANUSCRITO 1

| | |
|---|----|
| Tabela 1 – Concentração de praguicidas organoclorados (ng g^{-1}) em mel de abelhas da região Sul do Brasil..... | 59 |
| Tabela 2 – Concentração de praguicidas organoclorados em mel de abelhas de diferentes países..... | 60 |

MANUSCRITO 2

| | |
|--|----|
| Table 1 – PCB residues (ng g^{-1} f.w.) in honey samples from Brazil..... | 78 |
| Table 2 – PCB residues (ng g^{-1} f.w.) in honey samples from Brazil according to the State of origin..... | 79 |

MANUSCRITO 3

| | |
|--|----|
| Table 1a – Chromatographic segments, retention times, MRM transitions and CID voltages selected for native DL-PCBs..... | 96 |
| Table 1b – Chromatographic segments, retention times, MRM transitions and CID voltages selected for native PCDDs and PCDFs..... | 97 |
| Table 2 – Concentrations of DL-PCBs, PCDDs and PCDFs (pg g^{-1} f.w.) in honey samples from Brazil | 98 |
| Table 3 – Concentrations of DL-PCBs, PCDDs and PCDFs (expressed in pg of WHO-TEQ g^{-1} f.w.) in honey samples from Brazil, in the Lower Bound Determination Level (ND=0)..... | 99 |

ARTIGO 1

| | |
|--|-----|
| Table 1 – BFR mean concentrations, standard deviations (SD), ranges and number of positive ($>\text{LOD}$) samples found in honeys (expressed in pg g^{-1} f.w.) from Brazil, Spain, Portugal, Slovenia and Morocco | 104 |
| Table 2 – Mean (SD) of BFR concentrations, with frequencies higher than 10%, expressed in pg g^{-1} f.w., in honey samples from different countries | 105 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA – Análise de variância

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATSDR – *Agency for Toxic Substances and Disease Registry*

BDE – Éter de bromodifenil (*Brominated diphenyl ether*)

BFR – Retardante de chama bromado (*Brominated flame retardant*)

BTBPE – *1,2-bis(2,4,6-tribromophenoxy)ethane*

CCD – Desordem do colapso das colônias (*Colony Collapse Disorder*)

CID – *Collision-induced dissociation*

D-SPE – Extração em fase sólida dispersiva (*Dispersive solid phase extraction*)

DBDPE – Decabromodifeniletano (*Decabromodiphenylethane*)

DDD – Diclorodifenildicloroetano

DDE – Diclorodifenildicloroetileno

DDT – Diclorodifeniltricloroetano

DL-PCB – Bifenilo policlorado semelhante às dioxinas (*Dioxin-like polychlorinated biphenyl*)

DP – Desvio padrão

EC – Comissão Europeia (*European Commission*)

ECD – Detector de captura de elétrons (*Electron capture detection*)

EDR – Taxa de eficiência de destruição e remoção

EFSA – *European Food Safety Authority*

EI – Impacto de elétrons (*Electron impact*)

EU – União Europeia (*European Union*)

eV – Elétron Volt

fw – Peso fresco (*fresh weight*)

g – Grama

GC – Cromatografia a gás (*Gas chromatography*)

HCH – Hexaclorociclohexano

HRMS – Espectrometria de massas de alta resolução (*High resolution mass spectrometry*)

IARC – *International Agency for Research on Cancer*

IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis

IUPAC – *International Union of Pure and Applied Chemistry*

L – Litro

LLE – Extração líquido-líquido (*Liquid-liquid extraction*)
LOD ou LD – Limite de detecção (*Limit of detection*)
LOQ ou LQ – Limite de quantificação (*Limit of quantification*)
m – Metro
MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
 μg – Micrograma
mg – Miligrama
min – Minuto
 μL – Microlitro
mL – Mililitro
 μm – Micrometro
mm – Milímetro
MRM – Monitoramento de reações múltiplas (*Multiple reaction monitoring*)
MS – Espectrometria de massas (*Mass spectrometry*)
MS/MS – Espectrometria de massas sequencial ou *tandem*
MSPD – Dispersão da matriz em fase sólida (*Matrix solid phase dispersion*)
mTorr – Militorr
NBFRs – Novos retardantes de chama bromados (*Novel brominated flame retardants*)
ng – Nanograma
PBDE – Éter de Polibromodifenil (*Polybrominated diphenil ether*)
PCB – Bifenilo Policlorado (*Polychlorinated biphenyl*)
PCDD – Dibenzo-*p*-dioxina policlorada (*Polychlorinated dibenzo-*p*-dioxin*)
PCDF – Dibenzofurano policlorado (*Polychlorinated dibenzofuran*)
pg – Picograma
POP – Poluente Orgânico Persistente (*Persistent Organic Pollutant*)
PR – Paraná
PSA – Amina primária secundária (*Primary secondary amine*)
PVT – *Programmed Temperature Vaporization Injector*
Q – Quadrupolo
QqQ – Triplo quadrupolo
QuEChERS – *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*
rpm – Rotações por minuto
RS – Rio Grande do Sul
RSD – Desvio padrão relativo (*Relative standard deviation*)

SC – Santa Catarina

SD – Desvio padrão (*Standard Deviation*)

seg – Segundo

SP – São Paulo

SPE – Extração em fase sólida (*Solid phase extraction*)

SPME – Microextração em fase sólida (*Solid phase micro extraction*)

TDI – Ingestão diária tolerável (*Tolerable daily intake*)

TEF – Fator de equivalência tóxica (*Toxic equivalent factor*)

TEQ – Total de equivalente tóxico (*Toxic equivalent quantities*)

ToF – Detector de tempo de voo (*Time of flight*)

WHO/OMS – Organização Mundial da Saúde (*World Health Organization*)

°C – Grau Celsius

% - Porcentagem

Σ - Somatório

SUMÁRIO

| | |
|--|------------|
| 1 INTRODUÇÃO | 17 |
| 2 OBJETIVOS | 19 |
| 2.1 Objetivo geral..... | 19 |
| 2.2 Objetivos específicos..... | 19 |
| 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 20 |
| 3.1 Poluentes Orgânicos Persistentes | 20 |
| 3.1.1 Bifenilos policlorados..... | 22 |
| 3.1.2 Dibenzo- <i>p</i> -dioxinas e dibenzofuranos policlorados | 24 |
| 3.1.3 Éteres de polibromodifenil | 28 |
| 3.1.4 Praguicidas organoclorados..... | 29 |
| 3.2 Mel de abelhas | 34 |
| 3.3 Métodos analíticos para determinação de poluentes orgânicos persistentes em alimentos | 36 |
| 4 ARTIGOS CIENTÍFICOS | 43 |
| 4.1 MANUSCRITO 1 – Mel de abelhas como bioindicador da contaminação ambiental por praguicidas organoclorados: ocorrência na região Sul do Brasil | 43 |
| Resumo | 45 |
| Introdução..... | 46 |
| Material e métodos | 48 |
| Resultados e discussão | 51 |
| Conclusões..... | 54 |
| Referências | 55 |
| 4.2 MANUSCRITO 2 – Determination of polychlorinated biphenyls (PCBs) levels in honey samples from Brazil | 64 |
| Abstract..... | 66 |
| Introduction | 67 |
| Material and methods | 68 |
| Results and discussion..... | 71 |
| Conclusions | 73 |
| References | 74 |
| 4.3 MANUSCRITO 3 – Determination of dioxin-like polychlorinated biphenyls (DL-PCBs), polychlorinated dibenzo-<i>p</i>-dioxins (PCDDs) and dibenzofurans (PCDFs) in commercial honey from Brazil by GC-MS/MS-QqQ | 81 |
| Abstract..... | 83 |
| Introduction | 84 |
| Experimental..... | 85 |
| Results and discussion..... | 89 |
| Conclusions | 91 |
| References | 92 |
| 4.4 ARTIGO 1 – Levels of brominated flame retardants (BFRs) in honey samples from different geographic regions | 101 |
| Abstract..... | 102 |
| Introduction | 102 |
| Experimental..... | 103 |
| Results and discussion..... | 104 |
| Conclusions | 105 |

| | |
|---------------------------|------------|
| References | 105 |
| 5 DISCUSSÃO | 107 |
| 6 CONCLUSÕES | 110 |
| REFERÊNCIAS | 111 |
| ANEXOS | 127 |

1 INTRODUÇÃO

O interesse no estudo da contaminação ambiental por compostos químicos, bem como os seus efeitos e consequências na saúde dos seres humanos, surgiram no decorrer do século passado e vem crescendo muito nas últimas décadas. Grande parte desta contaminação deve-se ao crescente desenvolvimento industrial, bem como ao aumento na produção de alimentos, os quais proporcionaram ao homem uma qualidade de vida jamais alcançada. Porém, juntamente com os benefícios destas atividades, vieram o aumento da exposição a substâncias nunca antes presentes no ambiente, e, como consequência de seu uso indiscriminado, a ampla contaminação do meio ambiente e da cadeia alimentar.

Nos últimos anos, mais de 10 milhões de substâncias foram sintetizadas pelo homem, alterando a capacidade do meio ambiente de absorvê-las e reintroduzi-las ao seu ciclo de renovação. A partir de então, nota-se um aumento crescente na escala de exploração dos recursos naturais e de geração de resíduos em quantidades muito maiores do que a capacidade de renovação da natureza, causando perdas na biodiversidade, alterações climáticas, águas contaminadas, processos de desertificação, entre outros (BARBIERI, 2007). Neste contexto, encontram-se os Poluentes Orgânicos Persistentes (POPs), os quais estão entre os compostos mais investigados no mundo. Esta classe de poluentes foi estabelecida em 2001, pelo Convênio de Estocolmo, com o objetivo de proteger a saúde humana e o meio ambiente de compostos químicos que permanecem intactos por longos períodos, estão amplamente distribuídos geograficamente, acumulam-se nos tecidos lipídicos dos seres humanos e animais, além de apresentarem efeitos adversos para a saúde humana e ao meio ambiente (UNEP, 2001). Entre os principais representantes dos POPs com ações previstas para sua redução, restrição e/ou eliminação, encontram-se os bifenilos policlorados (PCBs), os praguicidas organoclorados, as dioxinas e os furanos, os quais já foram detectados nos lugares mais remotos do globo terrestre. A contaminação da cadeia alimentar através da biomagnificação destes compostos, aliada à posterior ingestão de alimentos contaminados com baixas concentrações, são as principais causas da exposição humana aos POPs (ROSS, 2004). Neste sentido, pesquisas com o objetivo de avaliar a contaminação dos alimentos tornam-se extremamente necessárias para que se possa avaliar o grau de exposição dos seres humanos, e por consequência, a contaminação ambiental.

As abelhas melíferas (*Apis mellifera*) executam a tarefa vital de polinização das culturas agrícolas, além de serem importantes para a produção comercial do mel e de produtos apícolas. Alguns estudos tem utilizado o mel de abelhas como bioindicador da contaminação ambiental em áreas industriais e rurais, devido ao fato das abelhas viajarem por longas distâncias para coletar néctar, pólen e água, ficando expostas a uma grande variedade de poluentes (BALAYIANNIS & BALAYIANNIS, 2008; RISSATO et al., 2007; YAVUZ et al., 2010). O monitoramento de resíduos no mel auxilia na avaliação do potencial de risco destes produtos à saúde do consumidor, bem como fornece informações sobre a utilização de produtos químicos nos campos de colheita e lugares próximos às colmeias.

Diante do exposto, e com a finalidade de atender as recomendações da Organização Mundial da Saúde quanto à promoção de ações que visem o controle, diminuição e eliminação dos POPs de diferentes compartimentos ambientais (BRASIL, 2003), o presente trabalho foi desenvolvido.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Determinar resíduos de Poluentes Orgânicos Persistentes em amostras de mel de abelhas (*Apis mellifera*) coletadas em diferentes regiões geográficas, a fim de avaliar a qualidade e segurança alimentar do mel como alimento, bem como possíveis focos de contaminação ambiental por estes compostos nas regiões estudadas.

2.2 Objetivos Específicos

- Determinar os níveis de praguicidas organoclorados em amostras de mel de abelhas coletadas na região Sul do Brasil, avaliando a segurança do mel como alimento, bem como utilizar o mel de abelhas como bioindicador da contaminação ambiental por estes compostos através da relação dos resíduos detectados com o ano de colheita e o estado de origem;

- Determinar os níveis dos sete PCBs indicadores em amostras de mel de abelhas coletadas nos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná e São Paulo, relacionando os resíduos detectados com o ano de colheita e o estado de origem;

- Determinar os níveis de PCBs semelhantes às dioxinas (DL-PCBs), dioxinas (PCDDs) e furanos (PCDFs) em amostras comerciais de mel de abelhas do Brasil, bem como o total de equivalente tóxico (TEQ) através dos fatores de equivalência tóxica (TEF) estabelecidos pela Organização Mundial da Saúde;

- Determinar os níveis de retardantes de chama bromados (BFRs) em amostras comerciais de mel de abelhas de diferentes regiões geográficas, relacionando os resíduos detectados com o país de origem.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Poluentes Orgânicos Persistentes

Os Poluentes Orgânicos Persistentes (POPs) são um grupo de substâncias tóxicas liberadas no meio ambiente através de uma grande variedade de atividades antropogênicas. Suas propriedades físicas e químicas, derivadas de sua conformação estrutural, fazem com que, uma vez presentes no meio ambiente, apresentem as seguintes características:

- ✓ Permaneçam intactos por longos períodos de tempo, inclusive anos;
- ✓ Encontrem-se amplamente distribuídos no meio ambiente como resultado de processos naturais envolvendo o solo, água e ar;
- ✓ Acumulem-se nos tecidos gordurosos dos seres vivos, sendo encontrados em altas concentrações na cadeia alimentar;
- ✓ Apresentem propriedades tóxicas aos animais e seres humanos.

Diante da necessidade de regular a produção e utilização destes compostos, o Conselho de Administração do Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente (UNEP: *United Nations Environmental Programme*) publicou um acordo em 2001, através do Convênio de Estocolmo, com o objetivo de promover a redução ou completa eliminação dos POPs (UNEP, 2001). Inicialmente, doze compostos foram reconhecidos e classificados em três categorias, de acordo com sua origem: praguicidas, produtos químicos industriais e subprodutos de produção não intencional. Após oito anos de trabalho, realizando revisões do tratado inicial e fiscalizando o seu cumprimento, o comitê regulador do Convênio de Estocolmo propôs a inclusão de mais nove compostos à lista dos 12 POPs iniciais, durante a quarta Conferência realizada em Gênova, no ano de 2009 (UNEP, 2009). Finalmente, em abril de 2011, durante a realização da quinta Conferência em Gênova, o último POP da atual lista em vigor foi incluído, o praguicida Endosulfan (UNEP, 2011). Segundo o Convênio, os compostos estão classificados em três anexos:

- Anexo A: Produtos sujeitos à eliminação (produção, utilização, importação e exportação proibidas);
- Anexo B: Produtos sujeitos à restrição;
- Anexo C: Subprodutos de produção não intencional.

Na Tabela 1 apresenta-se a lista atualizada dos 22 POPs incluídos no Convênio de Estocolmo.

Tabela 1 – Poluentes Orgânicos Persistentes (POPs) atualmente incluídos no Convênio de Estocolmo.

| | Poluentes Orgânicos Persistentes | Anexo |
|-------|---|-------|
| 2 | Ácido perfluorooctano sulfônico (PFOS), seus sais e perfluorooctano sulfonil fluoreto (PFOS-F) | B |
| 1 | Aldrin | A |
| 1 3 | Alfa hexaclorociclohexano (α -HCH) | A |
| 1 3 | Beta hexaclorociclohexano (β -HCH) | A |
| 2 3 | Bifenilos policlorados (PCBs) | A e C |
| 1 | Clordano | A |
| 1 | Clordecona | A |
| 3 | Dibenzo- <i>p</i> -dioxinas policloradas (PCDDs) | C |
| 3 | Dibenzofuranos policlorados (PCDFs) | C |
| 1 | DDT | B |
| 1 | Dieldrin | A |
| 1 | Endosulfan técnico e seus isômeros | A |
| 1 | Endrin | A |
| 2 | Éteres de tetrabromodifenil e pentabromodifenil (éter de pentabromodifenil de qualidade comercial: Penta-BDE) | A |
| 2 | Éteres de hexabromodifenil e heptabromodifenil (éter de octabromodifenil de qualidade comercial: Octa-BDE) | A |
| 1 | Heptacloro | A |
| 2 | Hexabromobifenil | A |
| 1 2 3 | Hexaclorobenzeno (HCB) | A e C |
| 1 | Lindano (γ -HCH) | A |
| 1 | Mirex | A |
| 1 2 3 | Pentaclorobenzeno (PeCB) | A e C |
| 1 | Toxafeno | A |

1 Praguicida; 2 Produto químico industrial; 3 Subproduto de produção não intencional.

Nas seções seguintes encontram-se as características mais relevantes dos compostos que serão estudados no presente trabalho: bifenilos policlorados (PCBs), dibenzo-*p*-dioxinas e dibenzofuranos policlorados (PCDD/Fs), éteres de polibromodifenil (PBDEs) e praguicidas organoclorados.

3.1.1 Bifenilos policlorados¹

Os bifenilos policlorados (PCBs: *polychlorinated biphenyls*), compostos organoclorados sintéticos, foram descobertos há mais de cem anos. Amplamente utilizados pela indústria, principalmente como fluidos dielétricos em capacitores e transformadores, conservantes em pesticidas, tintas e revestimentos, óleos e lubrificantes hidráulicos (OMAYE, 2004; ERICKSON & KALEY II, 2011), foram inicialmente detectados no meio ambiente no final dos anos 60. Logo após, foram identificados como contaminantes em quase todos os componentes do ecossistema global, incluindo o ar, água, solo, plantas, animais, seres humanos e alimentos, resultando em inúmeros efeitos tóxicos e biológicos. O descarte inapropriado destes equipamentos, bem como a incineração do lixo industrial e municipal, são as principais causas da contaminação ambiental por estes compostos (WHO, 1993). Os PCBs são comprovadamente causadores de problemas reprodutivos, imunológicos e de danos ao fígado (SAFE et al., 1985), motivos que levaram a sua proibição nos Estados Unidos, em 1977, e no Brasil, em 1981. Em nosso país, porém, foram proibidas a fabricação, comercialização e utilização em novos equipamentos, sendo permitido até os dias de hoje o seu uso em equipamentos antigos que já estavam em funcionamento (BRASIL, 1981).

As moléculas dos PCBs podem apresentar diversas substituições possíveis em relação à quantidade de átomos de cloro, variando de 1 a 10 átomos (Figura 1), podendo ser obtidas até 209 estruturas diferentes, denominadas de congêneres (PEREIRA, 2004; ERICKSON & KALEY II, 2011). Os anéis de benzeno podem girar em torno da ligação que os une, resultando em duas conformações espaciais: planar ou coplanar. A conformação planar apresenta átomos de cloro na posição *orto* (2,2') na molécula do PCB, enquanto que na conformação coplanar não existem átomos de cloro nesta posição (PENTEADO & VAZ, 2001).

¹ Parte deste item foi publicado como Artigo Científico de revisão bibliográfica, conforme consta no Anexo A.

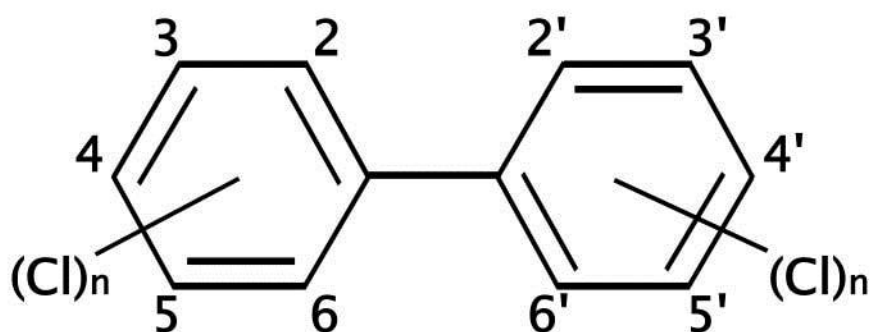


Figura 1 - Estrutura molecular dos bifenilos policlorados (PCBs).

O mecanismo e a cinética da biotransformação dos PCBs dependem de inúmeros fatores, incluindo a capacidade metabólica do organismo e a estrutura do congêneres de PCB (MARVOET et al., 2004). Aqueles congêneres que não contém átomos de cloro na posição *orto*, mas possuem átomos de cloro na posição *para* e tem no mínimo um par de cloros na posição *meta*, são considerados os mais tóxicos devido à alta afinidade com o receptor Ah (*aryl hydrocarbon*), tais como os PCBs 77, 81, 126 e 169. Os mecanismos de ação bioquímico e toxicológico destes compostos são semelhantes aos da 2,3,7,8-tetraclorodibenzeno-*p*-dioxina (TCDD) (SAFE et al., 1985; SILVA et al., 2007), e por este motivo, estes congêneres são chamados de PCBs semelhantes às dioxinas (*DL-PCBs: dioxin-like PCBs*). Porém, a maioria das misturas comerciais de PCBs está baseada nos sete PCBs indicadores (28, 52, 101, 118, 138, 153 e 180). O somatório de seis destes indicadores, com exceção do PCB 118, representa cerca de 50% do total da contaminação ambiental e dos alimentos por PCBs não semelhantes às dioxinas (*NDL-PCBs: non-dioxin like PCBs*) (EFSA, 2005; FERRANTE et al., 2011).

Os NDL-PCBs são reconhecidamente menos tóxicos que os congêneres DL-PCBs, embora sejam igualmente perigosos devido ao fato de serem comumente encontrados no sangue e tecidos de seres humanos, animais selvagens e peixes (FERRANTE et al., 2010), expostos através da cadeia alimentar em concentrações muito maiores do que os DL-PCBs (STORELLI & PERRONI, 2010). Está cada vez mais claro que a maioria dos PCBs que possuem átomos de cloro na posição *orto* (NDL-PCBs), os quais possuem pequena afinidade pelos receptores Ah e que se pensava ser biologicamente inativos, estão envolvidos em relevantes alterações, tais como neurotoxicidade, disrupção endócrina, e imunossupressão em pássaros, peixes e mamíferos (SELGRADE, 2007). A respeito dos efeitos dos NDL-PCBs no sistema imune, alguns estudos *in vivo* demonstraram supressão na produção de anticorpos e

da resposta imune durante a fagocitose, além de uma diminuição na resistência a infecções em seres humanos e animais expostos (LUEBKE et al., 2004; LEVIN et al., 2005; DALLAIRE et al., 2006; SELGRADE, 2007). As condições que levam à liberação e redistribuição destes compostos podem fornecer informações sobre seu perfil toxicológico, cinética e efeitos patológicos em seres humanos (KIM et al., 2011). Uma perda de peso moderada foi associada com o aumento na concentração de PCBs no plasma sanguíneo, sugerindo que a redução destes poluentes na massa de gordura corporal pode estar associada ao aumento da lipólise (HUE et al., 2006).

Ao nível de exposição atual, é pouco provável que os PCBs causem graves efeitos a curto prazo na saúde humana. Alguns estudos demonstram que a exposição direta a estes compostos pode causar problemas na pele, irritação no nariz e pulmões, mal estar gastrointestinal, alterações sanguíneas e no fígado, além de depressão e fadiga, principalmente em locais onde são mantidos ou consertados transformadores que ainda contém PCBs (ATSDR, 2000). Já os efeitos na saúde a longo prazo, porém, são inúmeros. Segundo a *International Agency for Research on Cancer* (IARC), os PCBs estão classificados no Grupo 2A (provavelmente carcinogênicos para seres humanos), com exceção do PCB 126, que pertence ao Grupo 1 (comprovadamente carcinogênico para seres humanos). Devido a esta classificação, diversos estudos tem sugerido que a exposição humana aos PCBs está associada ao aumento do risco de diversas enfermidades e alterações fisiológicas nos seres humanos, tais como câncer de mama (RECIO-VEGA et al., 2011), câncer do trato biliar (ADENUGBA et al., 2009), câncer de cólon (HOWSAM et al., 2004), câncer de fígado, de estômago, de intestino e de próstata (PRINCE et al., 2006), como fator de risco para a hipertensão arterial (EVERETT et al., 2008), ocorrência de endometriose e miomas em mulheres (HEILIER et al., 2005), abortos espontâneos e nascimentos prematuros (TSUKIMORI et al., 2008) e malformações congênitas em recém-nascidos (MOHR, 2010).

3.1.2 Dibenzo-*p*-dioxinas e dibenzofuranos policlorados

As dibenzo-*p*-dioxinas policloradas (PCDDs: *polychlorinated dibenzo-p-dioxins*) e os dibenzofuranos policlorados (PCDFs: *polychlorinated dibenzofurans*), comumente chamados de dioxinas e furanos, são duas classes de compostos aromáticos cuja estrutura básica contém dois anéis de benzeno, unidos entre si por um heterociclo. No caso dos PCDFs, este

heterociclo contém um átomo de oxigênio (Figura 2), enquanto que as PCDDs apresentam dois átomos (Figura 3). As posições livres nos anéis aromáticos podem ser ocupadas por átomos de cloro (de 1 a 8), resultando em 75 possíveis congêneres para as PCDDs e 135 para os PCDFs (WHO, 1987).

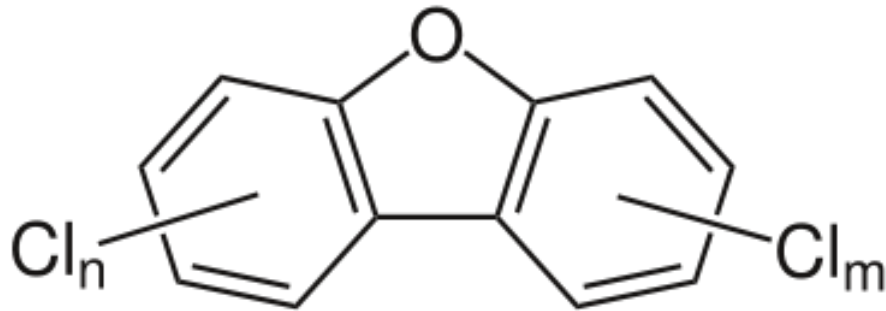


Figura 2 - Estrutura molecular dos dibenzofuranos policlorados (PCDFs).

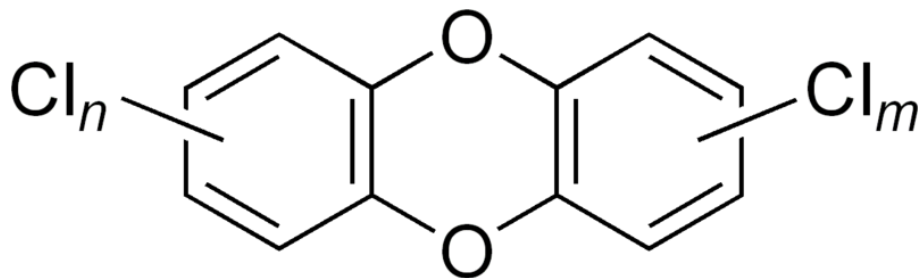


Figura 3 - Estrutura molecular das dibenzo-*p*-dioxinas policloradas (PCDDs).

O potencial toxicológico destes congêneres difere significativamente, dependendo do seu grau de cloração e da posição dos átomos de cloro em seus dois anéis aromáticos. Todos os 17 congêneres de PCDD/PCDFs com substituições nas posições 2, 3, 7 e 8, bem como os 12 PCBs semelhantes às dioxinas (DL-PCBs: *dioxin-like PCBs*) possuem um perfil toxicológico semelhante, os quais incluem toxicidade dérmica, carcinogenicidade, imunotoxicidade e toxicidade no sistema reprodutivo (SAFE, 1986). Estes compostos induzem a um perfil similar de efeitos biológicos e respostas tóxicas, mediados através do receptor Ah (*Aryl hydrocarbon*), os quais tem sido a base para estabelecer os fatores de equivalência tóxica (TEF: *toxic equivalency factors*) (Tabela 2), bem como os conceitos para a determinação do total de equivalente tóxico (TEQ: *total toxic equivalent*), estabelecidos pela Organização Mundial da Saúde (VAN DEN BERG et al., 1998; 2006).

As dioxinas são subprodutos indesejados de vários processos industriais, incluindo a produção de herbicidas, branqueamento de papel, produção de cloro, indústrias metalúrgicas, bem como a incineração de resíduos químicos e a queima de lixo municipal. Outras fontes antropogênicas secundárias incluem o esgoto de águas residuais e áreas industriais contaminadas (FIEDLER, 1996; RAPPE, 1994). Além da produção de dioxinas resultante de atividades humanas, estes compostos também podem ser encontrados em camadas muito antigas de argila, resultado de processos naturais. Porém, a quantidade de dioxinas formadas naturalmente é muito pequena quando comparada com a quantidade produzida por fontes antropogênicas (ABAD et al., 2002; FERRARIO, BYRNE & CLEVERLY, 2000).

Desde a década de 70, uma contínua discussão sobre a ocorrência, distribuição e formação das dioxinas tem sido relatada na literatura. Estes compostos são atualmente analisados em um grande número de diferentes matrizes e continuam a ser notícia devido a eventos de contaminação acidental de alimentos com níveis inaceitáveis (BERNARD et al., 1999; HAYWARD et al., 1999; LLERENA et al., 2003; MALISCH, 2000) e tentativas de envenenamento (ABRAHAN et al., 2001; RYAN, 2005).

A legislação brasileira, através do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), prevê limites máximos de resíduos para alimentos de origem animal na Instrução Normativa No. 17, de 29 de maio de 2013 (BRASIL, 2013). Estes limites estão expressos em TEQ, ou seja, o somatório dos fatores de equivalência tóxica (TEF) assinalados pela Organização Mundial da Saúde (OMS) para os 17 congêneres de PCDD/Fs, já apresentados anteriormente nesta seção (Tabela 2). Os alimentos com valores assinalados são a carne de frango (1,75 pg de TEQ g⁻¹ de gordura) e os peixes de captura e cultivo (3,5 pg de TEQ g⁻¹ de produto).

Tabela 2 – Fatores de equivalência tóxica (WHO-TEF) para PCDDs, PCDFs e DL-PCBs.

| Composto | WHO-TEF 1998 | WHO-TEF 2005 |
|---|--------------|--------------|
| <i>Dibenzo-p</i> -dioxinas policloradas | | |
| 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 |
| <i>Dibenzofuranos</i> policlorados | | |
| 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 |
| <i>Non-ortho</i> 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'-penta-CB (PCB 126) | 0,1 | 0,1 |
| 3,3',4,4',5,5'-hexaCB (PCB 169) | 0,01 | 0,03 |
| <i>Mono-ortho</i> 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 |

FONTE: VAN DEN BERG et al. (1998; 2006).

3.1.3 Éteres de polibromodifenil

Os éteres de polibromodifenil (PBDEs: *polybrominated diphenyl ethers*) são uma família de compostos bromados cuja estrutura química básica contém dois anéis aromáticos substituídos por átomos de bromo, unidos entre si por uma ligação C – O – C (Figura 4).

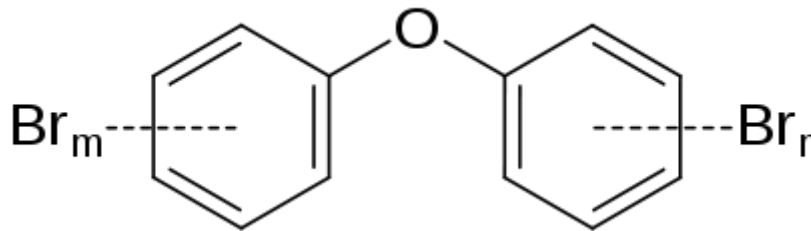


Figura 4 – Estrutura molecular dos éteres de polibromodifenil (PBDEs).

Sua estrutura é similar à dos PCBs, podendo apresentar até 209 possíveis congêneres, dependendo do número e posição dos átomos de bromo nos dois anéis aromáticos. Estes se subdividem em dez grupos (de mono- a deca-PBDEs), com nomenclatura similar à adotada para os PCBs (BALLSCHMITER & ZELL, 1980). Porém, seu peso molecular é muito maior, variando de 482 a 950, enquanto que o dos PCBs varia entre 188 e 493,7 (WHO 1994; 2003).

Os PBDEs começaram a ser introduzidos no mercado no final da década de 70. Porém, seu ápice comercial ocorreu somente no final dos anos 90, principalmente com expansão do setor eletrônico (ALAEI et al., 2003). Comercialmente, estes compostos são produzidos pela bromação do éter de difenil em certas condições, resultando em produtos contendo misturas de éteres de bromodifenil. Os três principais produtos comercializados são as formulações PentaBDE, OctaBDE e DecaBDE. Suas composições estão representadas na Tabela 3.

Tabela 3 – Composição comercial dos éteres de polibromodifenil.

| Produto | Composição | | | | | | | |
|----------|------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | TrBDE | TeBDE | PeBDE | HxBDE | HpBDE | OBDE | NBDE | DeBDE |
| DecaBDE | | | | | | | 0,3-3% | 97-98% |
| OctaBDE | | | | 10-12% | 43-44% | 31-35% | 9-11% | 0-1% |
| PentaBDE | 0-1% | 24-38% | 50-62% | 4-8% | | | | |

FONTE: Adaptado de WHO (1994).

Estas formulações foram amplamente utilizadas como aditivos retardantes de chama na fabricação de diversos produtos, tais como aparelhos de TV, computadores, telefones celulares, eletrodomésticos, tapeçaria, estofamentos, tecidos, materiais de construção, polímeros, plásticos, entre outros. Muitos destes produtos fazem parte de automóveis, ônibus e aviões, os quais possuem uma grande necessidade de proteção contra o fogo. Deste modo, a exposição humana aos retardantes de chama pode ocorrer em diversas situações da vida diária (FREDERIKSEN et al., 2009).

Dentre as três misturas comerciais, a mescla PentaBDE parece ser a que demonstra efeitos toxicológicos na menor concentração, os quais incluem neurotoxicidade e alterações das funções da tireoide (DARNERUD et al., 2001). Além disso, os PBDEs estão sob suspeita de serem disruptores endócrinos, influenciando deste modo o desenvolvimento e a reprodução (McDONALD, 2002). Entretanto, as informações a respeito do mecanismo de toxicidade destes compostos ainda são bastante limitadas (CHEN & HALE, 2010).

Baseado em estudos recentes, a exposição da população geral aos PBDEs ocorre principalmente por uma combinação entre a dieta, ingestão de poeira doméstica e inalação de ar contaminado (HARRAD et al., 2010; ROOSENS et al., 2009). A contribuição exata destas três fontes varia substancialmente conforme a composição específica do produto comercial, entre indivíduos e conforme a nacionalidade da população (COVACI et al., 2011; ROOSENS et al., 2009).

3.1.4 Praguicidas organoclorados

Os praguicidas são empregados desde a antiguidade e surgiram com a necessidade de proteção das colheitas contra os ataques dos insetos, que a cada ano comprometiam uma parcela maior da produção.

Com a evolução da ciência, surgiram os primeiros produtos sintéticos. A partir da década de 40, apareceria uma primeira classe de praguicidas reunindo características consideradas “fantásticas”, a dos organoclorados: em baixas doses, tinham uma ação rápida e longo efeito residual. O impacto inicial com o lançamento do primeiro composto da classe, o DDT (diclorodifeniltricloroetano), foi tão grande, que o seu descobridor, Paul Müller, recebeu o Prêmio Nobel de Química em 1948 (SUCEN, 2013).

Apesar de apresentarem diferentes estruturas químicas, os praguicidas organoclorados possuem em comum as mesmas características de persistência, estabilidade e toxicidade dos demais POPs já apresentados nas seções anteriores. Do ponto de vista químico, são compostos de estruturas cíclicas, com peso molecular de variável (entre 290 e 545) e propriedades físico-químicas semelhantes.

O DDT (2,2-bis(*p*-clorofenil)-1,1,1-tricloroetano) foi considerado um dos praguicidas organoclorados mais importantes, atuando como inseticida e acaricida de contato e ingestão. Em virtude do seu baixo custo, foi considerado o inseticida mais barato já sintetizado até hoje. Milhões de toneladas foram aplicadas no mundo todo a partir de 1940, sendo que 80% somente na agricultura, com excelentes resultados econômicos. Foi amplamente utilizado durante a II Guerra Mundial para proteger as tropas e os civis contra a malária, o tifo e outras enfermidades transmitidas por insetos (MIDIO & MARTINS, 2000).

O DDT é insolúvel em água, semi-volátil e apresenta grande facilidade para liberar-se na atmosfera. É considerado um contaminante ubíquo, tendo sido detectado inclusive no Ártico (OEHME et al., 1995). Assim como os demais POPs, possui tendência a acumular-se nos tecidos gordurosos dos seres vivos, causando fenômenos de bioacumulação e biomagnificação.

Apesar de sua estabilidade, pode sofrer degradações transformando-se em seus metabólitos principais: o diclorodifenildicloroetileno, ou *p,p'*-DDE (2,2-bis(*p*-clorofenil)dicloroetileno), e o diclorodifenildicloroetano, ou *p,p'*-DDD (2,2-bis(*p*-clorofenil)-1,1-dicloroetano). A Figura 5 demonstra a estrutura molecular do DDT e o processo de formação de seus metabólitos.

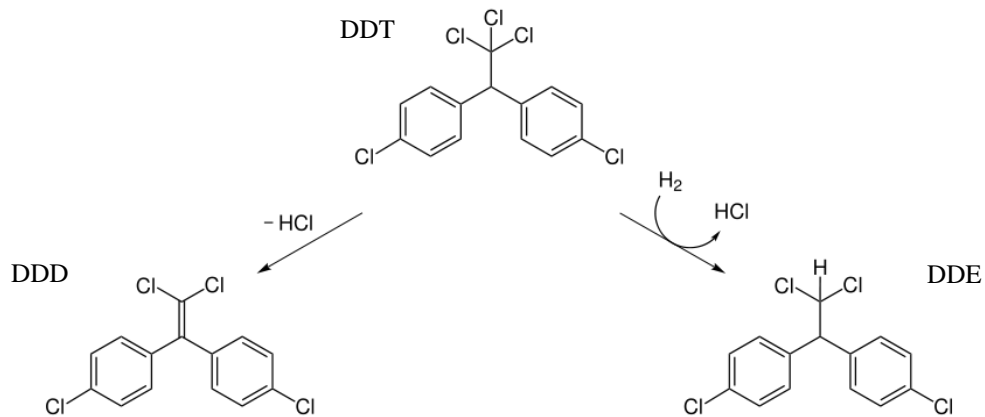


Figura 5 – Estrutura molecular do DDT e formação de seus metabólitos (DDE e DDD).

O Hexaclorociclohexano, popularmente conhecido como HCH ou BHC, possui o nome químico de 1,2,3,4,5,6-hexaclorociclohexano e peso molecular de 290,8. Sua estrutura química básica, bem como a de seu principal isômero (γ -HCH), pode ser observada na Figura 6.

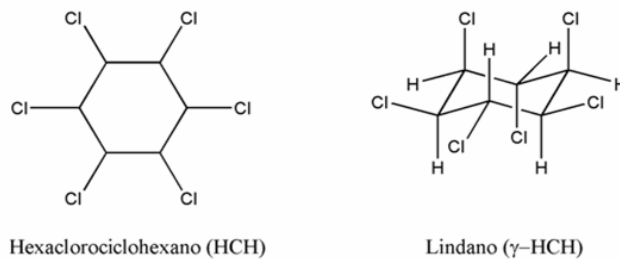


Figura 6 – Estrutura molecular do HCH e seu isômero gama (Lindano).

O HCH é constituído de diversos isômeros, sendo o alfa (α), beta (β), gama (γ) e delta (δ) os principais, os quais compõe o produto técnico. Após terem sido isolados, descobriu-se surpreendentemente que somente o isômero gama, conhecido pelo nome técnico de Lindano, é que apresentava ação inseticida. A partir de então, a mistura comercial passou a ser cada vez mais refinada para a síntese do Lindano, chegando a processos de até 99% de rendimento (WARE, 1978). Apesar de ser bastante eficaz no combate da maioria dos insetos, sua utilização em lavouras tornou-se impraticável devido ao seu alto custo. Porém, foi amplamente utilizado em formulações farmacêuticas para uso humano como pediculicida e

escabicida (KOROLKOVAS, 1995). No Brasil, somente a RDC n° 62, de 03 de julho de 2000, proibiu o uso deste composto neste tipo de formulações (BRASIL, 2000).

O Aldrin (1,2,3,5,10,10-hexacloro-1,4,4a,5,8,8a-hexaidro-1,4-endo-exo-5,8-dimetano-naftaleno) é estável a luz, calor e umidade, não se decompondo facilmente na presença de ácidos e bases. O produto de grau técnico contém no mínimo 95% do composto puro (WHO, 1979). Foi extensivamente utilizado como formicida, em formulações do tipo pó concentrado, concentrado emulsionável e em mistura com fertilizantes (LARINI, 1999). É transformado no solo e pelas plantas em sua forma epóxido, o Dieldrin (1,2,3,4,10,10-hexacloro-6,7-epoxi-1,4,4a,5,6,7,8,8a-octaidro-1,4-endo-exo-5,8-dimetanonaftaleno), que também apresenta ação praguicida, possuindo ambas as formas a mesma toxicidade e pronunciada ação residual (MIDIO & MARTINS, 2000). Já o Endrin (1,2,3,4,10,10-hexacloro-6,7-epoxi-1,4,4a,5,6,7,8,8a-octaidro-1,4-endo-endo-5,8-dimetanonaftaleno) é um estéreo-isômero do Dieldrin, utilizado como inseticida nas culturas de algodão e cereais e combate a gafanhotos (LARINI, 1999). Na Figura 7 apresentam-se as estruturas químicas do Aldrin, Dieldrin e Endrin.

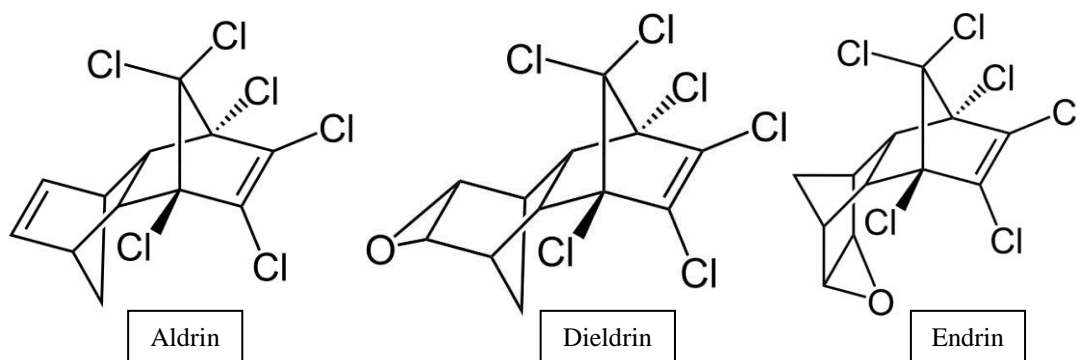


Figura 7 – Estrutura molecular dos compostos Aldrin, Dieldrin e Endrin.

O Heptacloro (3,4,5,6,7,8,8a-heptacloro-3a,4,7,7a,-tetraidro-4,7-endometanoindeno) técnico é constituído de 72% do composto puro, tendo sido utilizado quase que exclusivamente como formicida. Uma vez no meio ambiente, é facilmente oxidado a Heptacloro Epóxido, sendo mais tóxico que o seu precursor para todas as espécies de organismos (LARINI, 1999; MIDIO & MARTINS, 2000).

Último integrante da lista dos POPs, o Endosulfan (1,2,3,4,7,7a-hexacloro-biciclo(2,2,1)hepteno-2,5,6,bis(metileno)sulfito) é um dos praguicidas mais utilizados no

mundo (LI & MACDONALD, 2005). Tipicamente, a mistura técnica contém dois estereoisômeros: o Alfa Endosulfan, com uma configuração exo, e o Beta Endosulfan, com uma configuração endo. Sua estrutura molecular básica encontra-se na Figura 8.

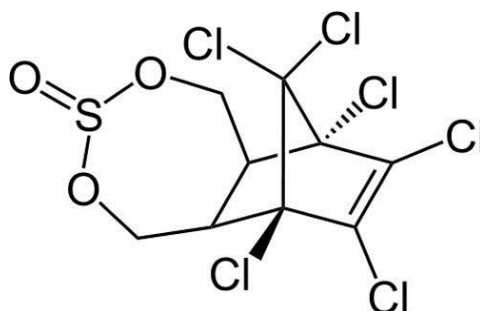


Figura 8 – Estrutura molecular do Endosulfan.

A mistura técnica contém os seus dois estereoisômeros na proporção de 70% (Alfa) e 30% (Beta). Juntamente com o seu produto de degradação, o Endosulfan Sulfato, estes compostos tem sido detectados em uma grande variedade de ambientes naturais, distantes das regiões de aplicação (BECKER et al., 2011). No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) determinou sua retirada programada do mercado no prazo de três anos, contados a partir de 31 de julho de 2010 (BRASIL, 2010). Portanto, desde o dia 31 de julho de 2013, a utilização deste produto está completamente proibida em culturas agrícolas.

Com relação à utilização dos demais compostos, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) proibiu a comercialização, uso e distribuição da maioria dos praguicidas organoclorados destinados à agropecuária. Fazem exceção a esta proibição: o Aldrin, quando utilizado em iscas formicidas e cupinicidas; o emprego de compostos em campanhas de saúde pública, quando aplicados por órgãos públicos competentes; a utilização dos compostos no processo de industrialização da madeira (BRASIL, 1985).

Já em relação à segurança alimentar, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento determina limite máximo de resíduos (LMR) para os praguicidas organoclorados em alimentos de origem animal (carnes, pescados, mel de abelhas e ovos) (BRASIL, 2013).

3.2 Mel de abelhas

O mel de abelhas, substância natural produzida pelas abelhas melíferas (*Apis mellifera*) a partir do néctar de flores ou exsudatos de plantas, tem sido utilizado como alimento e medicamento desde os tempos mais remotos. As primeiras referências escritas a respeito do mel datam do ano 2.000 a.C., mencionando seu uso como um medicamento e unguento (CRANE, 1975). Já nas civilizações mais antigas, o mel era utilizado tanto para fins medicinais, como nutricionais (ALLSOP & MILLER, 1996; CRANE, 1999), o que persiste até os dias de hoje.

Sua composição é bastante variável e depende principalmente de sua origem botânica (PERSANO-ODDO & PIRO, 2004). Porém, alguns fatores externos também influenciam na composição, tais como a sazonalidade, fatores ambientais e o processamento (ALVAREZ-SUAREZ et al., 2010). O mel de abelhas contém pelo menos 181 substâncias (CHOW, 2002), sendo basicamente uma solução supersaturada de açúcares, principalmente frutose (38%) e glicose (31%), contendo também diversos minerais, proteínas, aminoácidos, enzimas e vitaminas (PÉREZ, 2002; TERRAB et al., 2003). Uma grande variedade de constituintes minoritários também está presente, muitos dos quais possuem reconhecidas propriedades antioxidantes. Estes incluem os flavonoides e ácidos fenólicos (DIMITROVA, GEVRENOVA & ANKLAM, 2007; MARTOS et al., 2000; TOMAS-BARBERÁN et al., 2001), certas enzimas (catalase, glicose oxidase) (MOLAN & BETTS, 2004) e aminoácidos (GONZÁLEZ-PARAMÁS et al., 2006; PATZOLD & BRUCKNER, 2006; PÉREZ et al., 2007). Na Tabela 4 apresenta-se a composição média do mel de abelhas.

Tabela 4 – Composição média do mel de abelhas (em g/100 g).

| Componente | Média (%) |
|--------------------------------------|-----------|
| Água | 17,2 |
| Frutose | 38,2 |
| Glicose | 31,3 |
| Sacarose | 1,3 |
| Dissacarídeos (como maltose) | 7,3 |
| Outros açúcares | 1,5 |
| Ácidos totais (como ácido glucônico) | 0,57 |
| Cinzas | 0,17 |
| Nitrogênio | 0,04 |
| Minerais | 0,2 |
| Aminoácidos e proteínas | 0,3 |

FONTE: Adaptado de ALVAREZ-SUAREZ et al. (2010).

Assim como a composição específica do mel de abelhas depende da origem botânica do mesmo, os contaminantes que podem estar presentes também dependem das culturas que encontram-se ao redor das colmeias (ALIFERIS et al., 2010). A aplicação de praguicidas na agricultura e as emissões de poluentes industriais contaminam o solo, o ar, a água, bem como as flores as quais as abelhas coletam néctar e pólen, ocasionando uma contaminação indireta do mel (RIAL-OTERO et al., 2007). Este, porém, não é o único problema relacionado às abelhas e seus produtos. Nos últimos anos, um fenômeno tem causado o seu desaparecimento e devastado um grande número de colmeias, causando sérios prejuízos também para as atividades agrícolas que necessitam de polinização. Este fenômeno, denominado de “desordem do colapso das colônias” (CCD: *Colony Collapse Disorder*), ainda não possui um consenso sobre sua origem, supondo-se que possa ser tanto devido à introdução de um novo agente infeccioso, quanto pelo uso indiscriminado de praguicidas (NOZAL et al., 2008; WIEST et al., 2011).

Nos Estados Unidos, o problema com a CCD é tão grave que recentemente foi tema de uma reportagem de capa na Revista *Time*, edição do dia 19 de agosto de 2013 (WALSH, 2013). No texto pode-se ter ideia da importância que as abelhas representam para produção de alimentos no mundo. Essas operárias incansáveis, não remuneradas e anônimas do sistema agrícola adicionam mais de 15 bilhões de dólares à produção agrícola do país a cada ano. Segundo o autor, devemos agradecer às abelhas por uma a cada três porções de alimentos consumidas por dia. Mesmo sabendo da importância econômica e social das abelhas, a CCD ainda continua sendo um mistério. No último inverno dos Estados Unidos, este fenômeno

devastou um terço das colônias de abelhas do país, um aumento de 42% em relação ao ano anterior.

Em diversos países, a maioria das análises residuais de produtos das abelhas (mel, cera, própolis) tem revelado algum tipo de praguicida. Com relação aos praguicidas organoclorados, alguns estudos foram encontrados dentre a literatura consultada. Na Espanha, Blasco et al. (2004) analisaram resíduos em amostras de mel provenientes de Portugal e Espanha, encontrando os compostos HCB, α -HCH, β -HCH e γ -HCH em todas as amostras analisadas. Yavuz et al. (2010) analisaram amostras de mel da Turquia, detectando resíduos dos compostos Aldrin, Dieldrin, Clordano, DDT e análogos, Endosulfan, HCH e Heptacloro em mais de 96% das amostras. Já Choudhary & Sharma (2008), na Índia, detectaram DDT e análogos em menos de 8% das amostras analisadas, enquanto que os isômeros de HCH foram detectados em menos de 18%. No Brasil, estudos sobre a análise de resíduos de organoclorados em mel são raros. Dentre a literatura consultada somente o estudo de Rissato et al. (2007) foi encontrado, onde foram analisados resíduos em amostras de mel colhidas nos anos de 2003 e 2004, provenientes de Bauru/SP. Neste estudo, resíduos de HCB, Endosulfan Sulfato e Tetradifona foram detectados em todas as amostras analisadas.

Com relação aos PCBs, dois estudos foram encontrados. O primeiro, realizado na Espanha, analisou seis PCBs indicadores em 111 amostras de mel, detectando os PCBs 138 e 28 em 83% e 58% das amostras, respectivamente, além dos PCBs 52, 101, 153 e 180 com menor frequência (HERRERA et al., 2005). O segundo estudo, realizado na Turquia, analisou os sete PCBs indicadores em nove amostras de mel, detectando o PCB 28 em todas as amostras analisadas (ERDOGRUL, 2007). Já a respeito de estudos com BFRs, somente um foi encontrado (WANG et al., 2010), onde foram analisados 27 PBDEs em 50 amostras provenientes de diferentes países. Em relação à análise de dioxinas, furanos e DL-PCBs em mel de abelhas, nenhum estudo foi encontrado.

3.3 Métodos analíticos para determinação de Poluentes Orgânicos Persistentes em alimentos

Para a determinação de resíduos os alimentos necessitam de uma etapa prévia de preparação de amostra. Este tipo de matriz é considerado complexo devido à existência de propriedades químicas distintas, as quais podem ser incompatíveis com as colunas

cromatográficas. Adicionalmente, a concentração dos compostos a ser analisada está em nível de traços, o que requer uma extração ainda mais criteriosa (QUEIROZ et al., 2001).

Com o passar dos anos, diversas técnicas têm sido desenvolvidas e aprimoradas para a extração dos POPs, buscando cada vez mais eficiência e seletividade. Alguns autores optam por analisar a gordura do alimento, enquanto outros analisam o alimento como um todo. Essa escolha depende muito da quantidade de gordura disponível para extração, o que é mais utilizado, naturalmente, para alimentos de origem animal.

Dentre as técnicas de extração consultadas destaca-se a de dispersão da matriz em fase sólida (MSPD: *Matrix Solid Phase Dispersion*), a qual tornou-se frequentemente utilizada em estudos com matrizes ambientais e de alimentos. De maneira geral, a amostra põe-se em contato com um sorvente adequado (C18, sílica, alumina, Florisil®) até conseguir sua dispersão homogênea na superfície do sorvente. O pó seco assim obtido é então colocado em uma coluna cromatográfica ou cartucho de extração em fase sólida (SPE: *Solid Phase Extraction*) para a sua extração com solventes. O passo seguinte depende do tipo de matriz analisada e dos analitos de interesse, mas geralmente o extrato resultante é submetido a etapas de limpeza e purificação através de colunas multicamadas de sílica (ácida e básica), seguido ou não de fracionamento através de cartuchos de SPE recheados com carbono. Esta técnica possibilita a extração e separação dos extratos contendo os diferentes grupos de POPs em uma grande variedade de alimentos, os quais necessitam ser analisados por diferentes equipamentos cromatográficos. Como exemplos da aplicação deste método, pode-se verificar a análise de praguicidas organoclorados, PCBs, PCDDs e PCDFs em peixes (BORDAJANDI et al., 2003; GÓMARA et al., 2005), PBDEs e PCBs em leite humano (GÓMARA et al., 2011), PBDEs em diversos gêneros alimentícios (GÓMARA, HERRERO & GONZÁLEZ, 2006), PCDDs, PCDFs e PCBs em fígado ovino (BRUNS-WELLER, KNOLL & HEBERER, 2010), leite de búfala (ESPOSITO et al., 2010), pescados (STORELLI et al., 2011), entre outros. Na Figura 9 encontra-se um esquema representativo deste método.

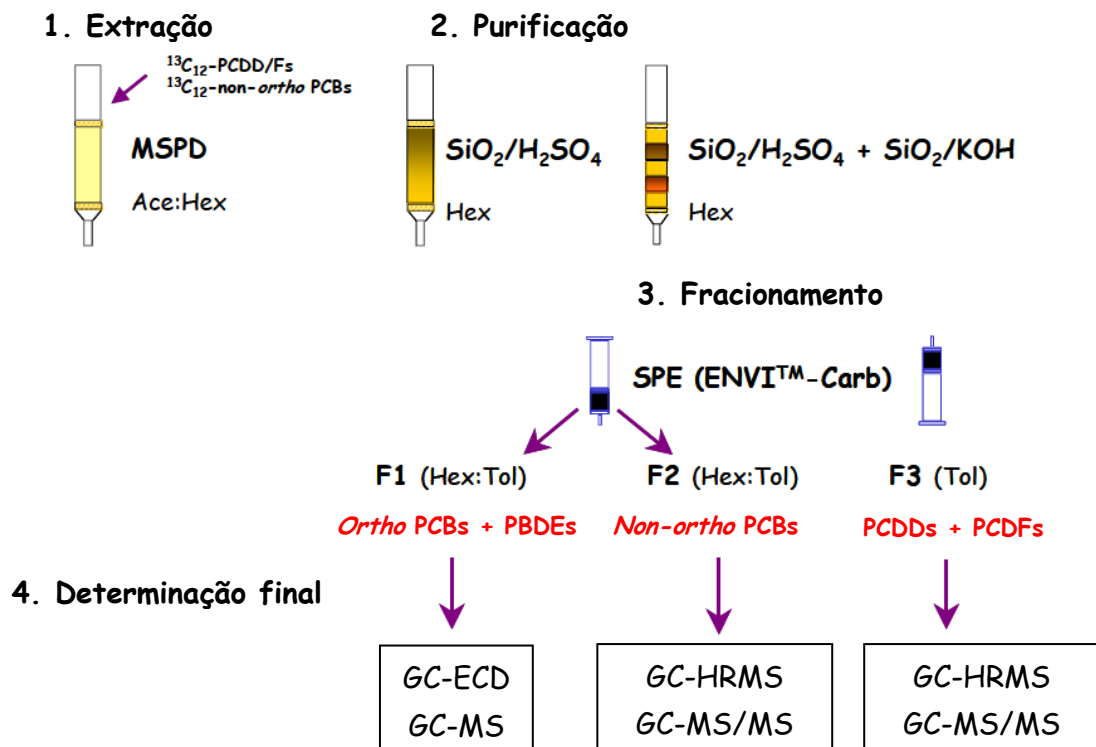


Figura 9 – Esquema representativo do método de dispersão da matriz em fase sólida (MSPD).

A extração através de solventes, utilizando a extração líquido-líquido (LLE: *Liquid-Liquid Extraction*) com o auxílio ou não do sistema Soxhlet, também tem sido utilizada para a extração de POPs em diversos tipos de alimentos (FROMBERG et al., 2011; VOORSPOELS et al., 2008; XING et al., 2009). Esta, porém, deve sempre ser seguida de outra técnica para a remoção de interferentes, como a hidrólise ácida (SILVA et al., 2009; USYDUS et al., 2008), a cromatografia em coluna multicamadas ou a SPE (PERELLÓ et al., 2010; SCHECTER et al., 2011; XING et al., 2009; ZHANG et al., 2008). Para leite humano, um estudo foi realizado para extração de PCBs através da Microextração em Fase Sólida (SPME: *Solid Phase Micro Extraction*). Esse sistema consiste em uma fibra de PDMS onde os PCBs são adsorvidos em determinadas condições de tempo e temperatura (KOWALSKI et al., 2010). Este, porém, foi o único trabalho a utilizar esta técnica para POPs dentro da bibliografia consultada.

Com relação aos praguicidas, um método desenvolvido por Anastassiades et al. (2003) tem sido bastante utilizado para amostras de alimentos. Este método, denominado de QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*), apresenta muitas vantagens e, como diz o próprio nome, promete ser rápido, fácil, barato, efetivo, robusto e seguro. Durante

o seu desenvolvimento, grande ênfase foi dada para a obtenção de um procedimento dinâmico, que pudesse ser aplicado em qualquer laboratório, devido à simplificação das etapas (PRESTES et al., 2009). Na Figura 10 encontra-se representado o fluxograma original do método QuEChERS (ANASTASSIADES et al., 2003).

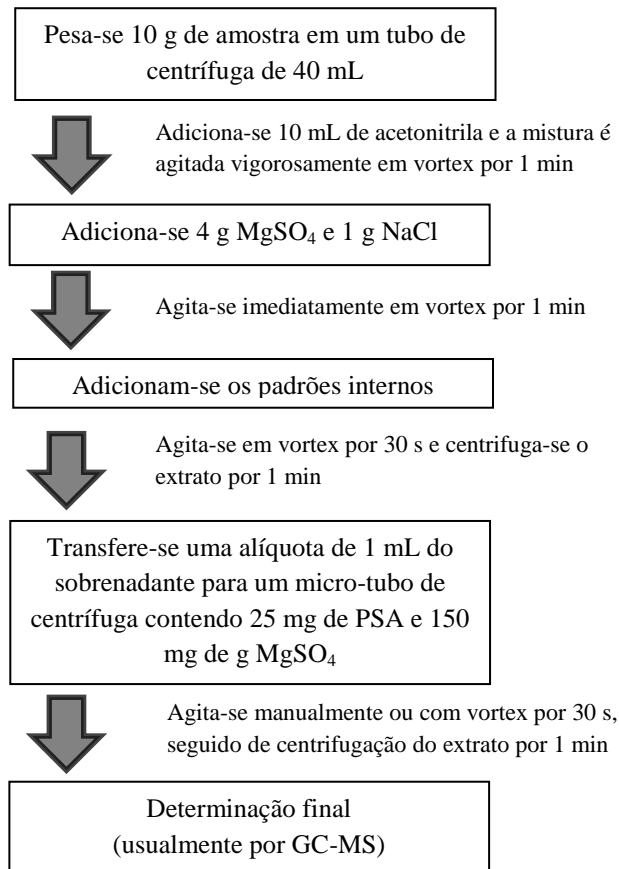


Figura 10 – Fluxograma representativo do método QuEChERS original.
 FONTE: Adaptado de ANASTASSIADES et al. (2003).

O método é baseado na extração dos resíduos da matriz por centrifugação, utilizando como solvente a acetonitrila. A água é separada do solvente pela adição de sais (sulfato de magnésio e cloreto de sódio). O extrato passa então por uma etapa de limpeza através da extração em fase sólida dispersiva (D-SPE: *Dispersive Solid Phase Extraction*) utilizando como sorvente amina primária secundária (PSA: *Primary Secondary Amine*), o qual eficientemente remove a maioria das substâncias polares interferentes presentes na matriz.

Finalmente, o extrato preparado desta forma encontra-se pronto para a determinação final através dos sistemas cromatográficos.

Após a versão original, este método tem sido utilizado com algumas modificações em uma ampla gama de alimentos, com excelentes resultados para a extração dos praguicidas organoclorados. Como exemplo, pode-se verificar a sua aplicação em repolho e rabanete (NGUYEN et al., 2008), frutas (CIESLIK et al., 2011), cereais (WALORCZYK, 2007), alimento infantil a base de frutas (CAJKA et al., 2008), feno para alimentação animal (TSIPLAKOU et al., 2010), uvas e vinhos (DASGUPTA et al., 2010), sendo este último o único trabalho encontrado o qual também utilizou o método QuEChERS para PCBs.

Após a extração dos POPs da matriz e purificação dos extratos, os analitos são separados, identificados e quantificados por cromatografia a gás. A escolha do detector acoplado ao sistema depende da sensibilidade exigida para o grupo de POPs o qual se deseja analisar. Para os praguicidas organoclorados, NDL-PCBs e PBDEs, os detectores de captura de elétrons (ECD: *Electric Capture Detection*) e espectrômetro de massas quadrupolo (MS: *Mass Spectrometry*) apresentam bons resultados, tendo sido utilizados em uma grande variedade de pesquisas. Como exemplo, pode-se verificar a aplicação em estudos com peixes (BOTARO et al., 2011; KOENIG, HUERTAS & FERNÁNDEZ, 2013; LAVANDIER et al., 2013; ZHANG et al., 2012), leite humano (ASANTE et al., 2011; KOWALSKI et al., 2010), carne e produtos cárneos (COSTABEBER et al., 2006), queijos (SANTOS et al., 2006), leite bovino (HECK et al., 2007), milho (SCHWANZ et al., 2012), mel de abelhas (ERDOGRUL, 2007; KUJAWSKI, PINTEAUX & NAMIESNIK, 2012; RISSATO et al., 2007; TSIROPOULOS & AMVRAZI, 2011; YAVUZ et al., 2010), entre outros. Na Figura 11 pode-se observar o esquema de funcionamento de um espectrômetro de massas tipo quadrupolo.

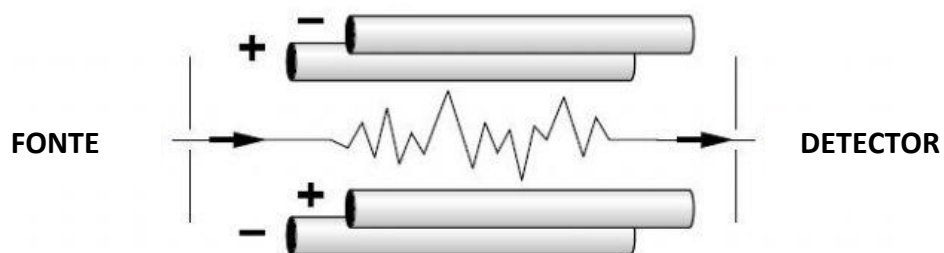


Figura 11 – Esquema de funcionamento de um detector MS-Q.

Além destas técnicas convencionais, detectores de espectrometria de massas mais sensíveis necessitam ser utilizados para a determinação de compostos que encontram-se nas amostras em níveis mais baixos, especialmente os DL-PCBs, PCDDs e PCDFs. Dentre os mais utilizados, destaca-se a espectrometria de massas de alta resolução (HRMS: *High Resolution Mass Spectrometry*), a qual alcança inquestionável seletividade e sensibilidade para uma grande variedade de compostos. Como exemplo, pode-se verificar a aplicação em estudos com frutas, legumes e verduras (GRASSI et al., 2010), suplementos alimentares (MARTÍ et al., 2010), alimentos infantis (PANDELOVA et al., 2010), leite de búfala e derivados (DE FILIPPIS et al., 2013; ESPOSITO et al., 2010), leite de ovelha (BRAMBILLA et al., 2011), leite humano (BIANCO et al., 2013; BORDAJANDI, ABAD & GONZÁLEZ, 2008; CROES et al., 2012; SHEN et al., 2012; TAI et al., 2011), peixes (ÇAKIROGULLARI, UÇAR & KILIÇ, 2011; GÓMARA et al., 2005), em estudos que analisaram diversos alimentos da dieta da população local (MARÍN et al., 2011; SONG et al., 2011; WINDAL et al., 2010), entre outros.

A espectrometria de massas sequencial ou *tandem* (MS/MS), com analisador do tipo triplo quadrupolo (QqQ), também tem sido utilizada para determinar várias classes de POPs. Estudos comparando a eficiência e seletividade do sistema HRMS com o MS/MS-QqQ tem sido realizados, uma vez que seu custo de manutenção e operação é bastante inferior quando comparado a sistemas de HRMS. Estes demonstram que esta técnica também possui sensibilidade suficiente para detectar compostos a níveis de pg (picograma) e/ou fg (fentogramas) em amostras de alimentos (GARCÍA-BERMEJO et al., 2011; MACKINTOSH et al., 2012). Neste sistema, três quadrupolos funcionam em sequência: o primeiro (Q1) e o último (Q3) operam como filtros selecionadores de massas, enquanto que o segundo (Q2) opera como câmara de colisão, onde os íons são fragmentados através de energias de colisão (Figura 12).

Existem diferentes formas de varredura (*scan*) com os quais um MS/MS pode operar. Para análise e quantificação de compostos com concentrações muito baixas, como é o caso das PCDDs e PCDFs, o QqQ pode operar no modo de monitoramento de reações múltiplas (MRM: *Multiple Reaction Monitoring*), onde o íon precursor é selecionado (Q1), fragmentado com uma energia de colisão (CID: *Collision Induce Dissociation*) previamente selecionada (Q2), seguida da análise dos íons do produto (Q3) (Figura 13). Desta forma, além de ser quantificado, o composto o qual se está buscando é identificado e confirmado qualitativamente com base na proporção dos íons de produto, assegurando uma análise muito mais confiável.

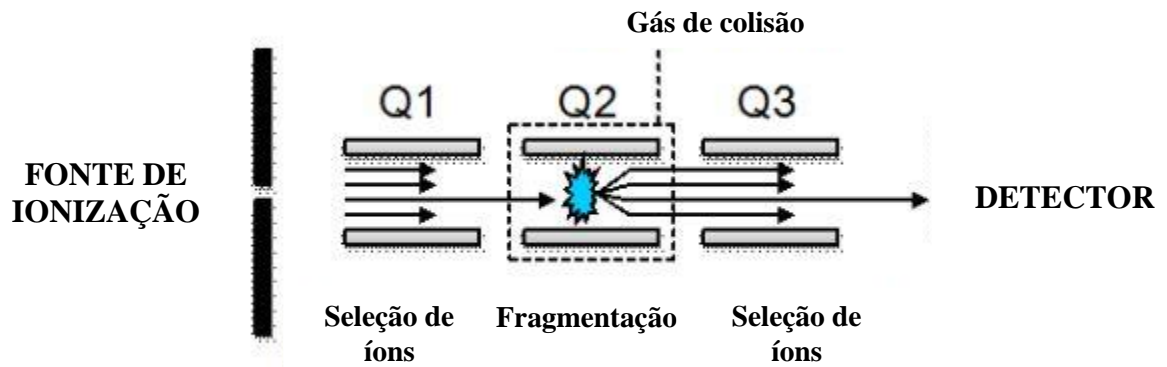


Figura 12 – Esquema de funcionamento de um MS/MS-QqQ.

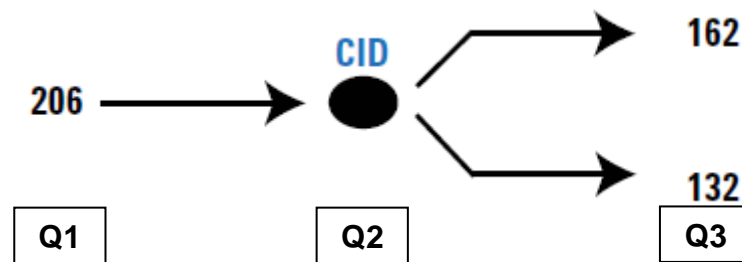


Figura 13 – Exemplo de funcionamento de um detector MS/MS-QqQ no modo MRM.

Exemplos de aplicação da análise de alguns POPs por MS/MS-QqQ podem ser encontrados em estudos com peixes (KALACHOVA et al., 2013; LABADIE et al., 2010; MACKINTOSH et al., 2012), carnes (HUO et al., 2012), além de diversos alimentos da dieta (CIMENCI et al., 2013).

4 ARTIGOS CIENTÍFICOS

4.1 Manuscrito 1

Manuscrito em fase final de revisão pelos autores, a ser submetido ao periódico

Food Research International.

Configurado conforme as normas do periódico.

**MEL DE ABELHAS COMO BIOINDICADOR DA CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL
POR PRAGUICIDAS ORGANOCLORADOS: OCORRÊNCIA NA REGIÃO SUL DO
BRASIL**

**Mel de abelhas como bioindicador da contaminação ambiental por praguicidas
organoclorados: ocorrência na região Sul do Brasil**

**Susana Mohr^a, Thiago Guilherme Schwanz^a, Joseane de Oliveira Mozzaquatro^a,
Nilo Zanatta^b, Ijoni Hilda Costabeber^{c*}**

^a Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Campus Camobi, Santa Maria, RS, Brasil

^b Departamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Campus Camobi, Santa Maria, RS, Brasil

^c Departamento de Morfologia, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Campus Camobi, Santa Maria, RS, Brasil

* Autor para correspondência:

Ijoni H. Costabeber

Departamento de Morfologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Campus Camobi, Av. Roraima 1000, Prédio 19, Sala 3201, 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil

Telefone: +55 55 3220 9375

ijonicostabeber@gmail.com

Endereços de e-mail: susana@viamicro.com.br (S. Mohr), tgsnapo@gmail.com (T. G. Schwanz), josemozzaquatro@yahoo.com.br (J. O. Mozzaquatro), zanatta@base.ufsm.br (N. Zanatta), ijonicostabeber@gmail.com (I. H. Costabeber).

RESUMO

Os praguicidas organoclorados são motivo de preocupação, devido a sua presença em alimentos e no meio ambiente. No presente estudo, doze destes compostos foram investigados em 186 amostras de mel de abelhas provenientes da região Sul do Brasil, coletadas entre os anos de 2009 e 2011. A concentração dos compostos variou entre <LQ e 92 ng g^{-1} , sendo que 77% das amostras estavam contaminadas. Os praguicidas endosulfan alfa (média de $1,84 \text{ ng g}^{-1}$), endosulfan sulfato (média de $1,68 \text{ ng g}^{-1}$) e endrin (média de $2,95 \text{ ng g}^{-1}$) foram os mais frequentes, sendo detectados em 50, 49 e 24% das amostras, respectivamente. Com relação ao estado de origem, o somatório total das médias dos praguicidas foi de $12,6 \text{ ng g}^{-1}$ (RS), $12,2 \text{ ng g}^{-1}$ (SC) e $8,9 \text{ ng g}^{-1}$ (PR). O mel de abelhas proveniente do estado de SC apresentou maior contaminação do composto aldrin (média de $4,6 \text{ ng g}^{-1}$), quando comparado aos provenientes do RS (média de $0,5 \text{ ng g}^{-1}$) e PR (média de $0,3 \text{ ng g}^{-1}$). Com relação ao ano de colheita, o somatório total das médias dos praguicidas foi de $13,2 \text{ ng g}^{-1}$ (2009), $15,5 \text{ ng g}^{-1}$ (2010) e $7,1 \text{ ng g}^{-1}$ (2011), enquanto que o composto endrin diferiu significativamente entre as amostras coletadas nos anos de 2010 (média de $6,2 \text{ ng g}^{-1}$) e 2011 ($0,6 \text{ ng g}^{-1}$). De acordo com o limite máximo de resíduos estabelecido pela legislação brasileira, 18% das amostras apresentaram concentrações superiores ao permitido, o que pode representar risco à saúde do consumidor. Apesar destes compostos encontrarem-se banidos ou severamente restringidos, ainda continuam a ser detectados em mel de abelhas, o que indica a sua utilização como bioindicador da contaminação ambiental.

Palavras-chave: mel de abelhas; praguicidas organoclorados; segurança alimentar; contaminação ambiental; bioindicador.

1. Introdução

O mel é um produto natural, produzido pelas abelhas melíferas (*Apis mellifera*) a partir do néctar de flores ou exsudatos de plantas. Além dos componentes majoritários, que são os açúcares (glicose, frutose, sacarose, maltose, entre outros) e a água, também possui em sua composição diversas substâncias em pequenas quantidades, entre elas os sais minerais (K, Na, Cl, S, Ca, P, Fe, Mg), vitaminas (tiamina, riboflavina, vitamina K, ácido fólico, biotina, piridoxina), enzimas (invertase, diástase, glicose oxidase, catalase e fosfatase), aminoácidos, substâncias aromáticas, ácidos orgânicos, pigmentos e outras substâncias (Belitz & Grosch, 2002).

A composição específica de cada tipo de mel, bem como os contaminantes que podem estar presentes, depende das culturas que se encontram ao redor das colmeias (Aliferis, Tarantilis, Harizanis, & Alissandrakis, 2010). A aplicação de praguicidas na agricultura contamina o solo, ar, água, bem como as flores as quais as abelhas coletam o néctar para a produção de mel. Todos os dias, milhares de abelhas operárias realizam 10 viagens, em média, a fim de explorar em torno de sete km² de área ao redor de suas colmeias, coletando néctar, água e pólen. Durante este processo, vários produtos químicos e partículas em suspensão são interceptados por estas abelhas, retidos em seu corpo, inalados e ingeridos através da traqueia (Devillers & Pham-Delegue, 2002). Nestas condições, as abelhas, que são organismos quase onipresentes e requerem modestas fontes de alimentos, são altamente sensíveis a fatores biológicos, químicos e físicos, tais como parasitas, contaminantes industriais e praguicidas. Consequentemente, abelhas e seus produtos, tais como o mel e o pólen apícola, podem ser utilizados como bioindicadores da contaminação ambiental

(Kujawski, Pinteaux, & Namiesnik, 2012; Lambert et al., 2013; Rissato, Galhiane, Almeida, Generutti, & Apon, 2007; Wiest et al., 2011).

Nos últimos anos, o desaparecimento das abelhas tem devastado grande número de colmeias ao redor do mundo, causando sérios prejuízos tanto para a apicultura, quanto para as atividades agrícolas que necessitam de polinização. Este fenômeno, denominado nos Estados Unidos de “desordem do colapso das colônias” (CCD: *Colony Collapse Disorder*), ainda não possui um consenso sobre sua origem, supondo-se que possa ser tanto devido à introdução de um novo agente infeccioso, quanto pelo uso indiscriminado de praguicidas (Nozal et al., 2008; Wiest et al., 2011). O envenenamento de abelhas por praguicidas é um sério problema, pois as abelhas são os principais polinizadores de muitas culturas. Neste sentido, a determinação de praguicidas em produtos apícolas é necessária para monitorar a contaminação, além de garantir a saúde do consumidor (Morzycka, 2002).

A contaminação de alimentos por praguicidas organoclorados tem sido considerada um sério perigo à saúde humana devido a sua persistência ambiental, bioacumulação e toxicidade. No Brasil, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) proibiu a comercialização, o uso e a distribuição destes compostos destinados à agropecuária em todo o território nacional através da Portaria nº 329, de 02 de setembro de 1985 (Brasil, 1985). Porém, esta mesma portaria permite sua utilização em campanhas de saúde pública no combate a vetores de agentes etiológicos de moléstias. Com relação ao praguicida endosulfan, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) determinou a sua retirada programada do mercado brasileiro no prazo de três anos, contados a partir de 31 de julho de 2010, através da RDC nº 28, de 9 de agosto de 2010 (Brasil, 2010). Portanto, este produto que antes era utilizado em culturas de café, soja, cacau, algodão e cana-de-açúcar, encontra-se completamente proibido desde o dia 31 de julho de 2013.

Em diversos países, a maioria das análises residuais em mel de abelhas tem detectado algum tipo de praguicida. Estudos realizados na França (Lambert et al., 2013), Grécia (Tsiropoulos & Amvrazi, 2011), Turquia (Yavuz, Guler, Aktumsek, Cakmak, & Oaparlakm, 2010) e Índia (Choudhary & Sharma, 2008; Mukherjee, 2009) revelaram a presença constante do praguicida endosulfan. No Brasil, um estudo realizado com amostras do município de Bauru, estado de São Paulo, também detectou o praguicida endosulfan, além de resíduos de aldrin (Rissato et al., 2007). A presença de outros praguicidas organoclorados, tais como DDT (diclorodifeniltricloroetano), lindano, endrin, hexaclorociclohexano (HCH), heptacloro, entre outros, também foi detectada em mel de abelhas da Espanha (Blasco, Lino, Picó, Pena, Font, & Silveira, 2004; Herrera et al., 2005) e Polônia (Kujawski, Pinteaux, & Namiesnik, 2012), além de um estudo com amostras de diversos países, principalmente dos Estados Unidos (Wang, Kliks, Jun, & Li, 2010).

Com relação à segurança alimentar, a legislação brasileira determina limite máximo de resíduos (LMR) para os praguicidas organoclorados em mel de abelhas através da Instrução Normativa N° 17, de 29/05/2013, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (Brasil, 2013). O valor de referência para os compostos investigados no presente estudo é de $10 \mu\text{g Kg}^{-1}$.

Este estudo teve como objetivos determinar os níveis residuais de praguicidas organoclorados em mel de abelhas da região Sul do Brasil; comparar os valores encontrados com os estabelecidos pela legislação; verificar a distribuição dos praguicidas conforme o estado de origem e o ano de coleta das amostras e elucidar as possíveis fontes da contaminação ambiental utilizando o mel de abelhas como bioindicador.

2. Material e Métodos

2.1 Amostragem

Foram analisadas 186 amostras de mel de abelhas, obtidas de estabelecimentos comerciais em diferentes cidades dos estados da região Sul do Brasil durante os anos de 2009 ($n=63$), 2010 ($n=64$) e 2011 ($n=59$). Para fins de informação, foram considerados os rótulos disponibilizados nas embalagens. Do total de amostras analisadas, 124 eram do estado do Rio Grande do Sul, 38 do estado de Santa Catarina e 24 do estado do Paraná. Após a coleta, as amostras foram transportadas até o laboratório, onde permaneceram armazenadas a temperatura ambiente em armário fechado, protegido da luz, até o momento das análises.

2.2 Reagentes e padrões

Acetonitrila grau HPLC foi adquirida de Mallinckrodt Baker, Inc. (NJ, USA). Os reagentes sulfato de magnésio anidro (Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, USA), cloreto de sódio (Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, USA) e amina primária/secundária (PSA) 40 μm (Supelco, Inc., Bellefonte, Pennsylvania, USA) eram de pureza analítica certificada para a análise de pesticidas. Água ultrapura foi obtida pelo sistema Milli-Q[®] (Millipore, Bedford, MA, USA).

Os praguicidas organoclorados investigados foram: aldrin, dieldrin, *p,p'*-DDE, *p,p'*-DDD, *p,p'*-DDT, endosulfan alfa, endosulfan beta, endosulfan sulfato, endrin, heptacloro, heptacloro epóxido e metoxicloro. Padrões certificados destes compostos foram adquiridos de AccuStandard, Inc. (New Haven, USA), com grau de pureza superior a 95%.

2.3 Preparação das amostras

Os praguicidas foram extraídos e purificados através do método QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*) (Anastassiades, Lehotay, Stajnbaher, & Schenk, 2003), com algumas modificações. Maiores detalhes do procedimento podem ser observados na Figura 1.

2.4 Análise cromatográfica

Os extratos foram analisados em um cromatógrafo a gás 6890N acoplado a um espectrômetro de massas 5975B inert XL (Agilent Technologies). Um μL dos extratos foi injetado em modo *splitless* através de injetor automático, com a temperatura do injetor permanecendo constante a $250\text{ }^{\circ}\text{C}$. A separação dos praguicidas foi realizada em uma coluna capilar de sílica fundida DB-5MS (30 m comprimento, 0,25 mm diâmetro interno e 0,25 μm de espessura de fase estacionária; J &W Scientific). Hélio foi utilizado como gás de arraste a uma pressão inicial de 13.37 psi, com fluxo constante de $1,5\text{ mL min}^{-1}$. A programação de temperatura do forno foi como segue: $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ (1min), $20\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ até $150\text{ }^{\circ}\text{C}$, $2\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ até $220\text{ }^{\circ}\text{C}$, $50\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ até $280\text{ }^{\circ}\text{C}$ (3.3min). A linha de transferência, temperatura da fonte e do quadrupolo permaneceram constantes a $290\text{ }^{\circ}\text{C}$, $230\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $150\text{ }^{\circ}\text{C}$, respectivamente. As análises foram realizadas no modo de impacto de elétrons (EI) com energia a 70 eV, bem como no modo de monitoramento de íons selecionados (SIM). A identificação e quantificação dos compostos foram realizadas através da comparação dos tempos de retenção dos picos encontrados nas amostras com os tempos de retenção individuais dos padrões de referência, sob as mesmas condições de trabalho, bem como pela comparação da abundância dos íons majoritários de cada um dos compostos, obtidos a partir dos padrões de referência, com os íons encontrados nas amostras. Os íons selecionados foram m/z 65, 100, 271 e 273 (heptacloro); m/z 66, 79, 91 e 262 (aldrin); m/z 350, 352 e 354 (heptacloro epóxido); m/z 194, 206, 236 e 238 (endosulfan alfa); m/z 77, 79, 81 e 82 (dieldrin); m/z 246, 247, 315 e 317 (*p,p'*-DDE); m/z 67, 81, 262 e 264 (endrin); m/z 194, 206, 236 e 240 (endosulfan beta); m/z 165, 235, 236 e 237 (*p,p'*-DDD e *p,p'*-DDT); m/z 228, 236, 271 e 273 (endosulfan sulfato); m/z 227 e 228 (metoxicloro).

2.5 Controle de qualidade

O método proposto foi previamente validado, com resultados satisfatórios para todos os parâmetros testados. Os coeficientes de variação (CV) para repetibilidade e precisão intermediária variaram entre 9,8 e 17,1% e entre 13,2 e 20%, respectivamente. Os coeficientes de correlação para a linearidade foram superiores a 0,99 na faixa de 0,5 a 64,0 ng g⁻¹ para todos os praguicidas. A recuperação média variou entre 68 e 114%. Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) variaram entre 0,1 e 1,3 ng g⁻¹ e entre 0,5 e 4,0 ng g⁻¹, respectivamente. Brancos foram realizados para cada lote de amostras extraídas, com o objetivo de identificar possíveis interferências.

2.6 Análises estatísticas

Os dados obtidos foram analisados através do programa Statistica 7[®]. Devido ao fato de que as concentrações dos praguicidas não apresentaram distribuição normal, o teste não paramétrico Kruskal-Wallis ANOVA foi utilizado para avaliar as diferenças dos contaminantes entre os estados de origem e os anos de colheita. Para concentrações <LQ, ½ LD foi utilizado nas análises estatísticas. As diferenças foram consideradas significativas quando $p \leq 0,05$.

3. Resultados e discussão

Na Tabela 1 apresentam-se as concentrações (média, desvio-padrão, mediana, mínimo e máximo), bem como a frequência de determinação dos praguicidas organoclorados em mel de abelhas da região Sul do Brasil.

Dentre os 12 praguicidas analisados, oito foram detectados acima do limite de quantificação. Do total de amostras analisadas, 77% (144 amostras) apresentaram

contaminação por algum destes praguicidas. Os mais frequentes foram o endosulfan alfa, endosulfan sulfato e endrin, detectados em 50, 49 e 24% das amostras, respectivamente. Os demais compostos obtiveram uma frequência de determinação menor que 10% (*p,p'*-DDT, heptacloro, aldrin, metoxicloro e *p,p'*-DDD). Os praguicidas dieldrin, *p,p'*-DDE, endosulfan beta e heptacloro epóxido não foram detectados entre as amostras analisadas. Com relação às concentrações, o endrin obteve a maior média (2,95 ng g⁻¹), seguido dos compostos endosulfan alfa (1,84 ng g⁻¹), endosulfan sulfato (1,68 ng g⁻¹), heptacloro (1,57 ng g⁻¹) e aldrin (1,07 ng g⁻¹). Os praguicidas *p,p'*-DDT, metoxicloro e *p,p'*-DDD obtiveram as concentrações mais baixas, com médias de 0,26, 0,03 e 0,01 ng g⁻¹, respectivamente.

As abelhas estão sempre em contato com o meio ambiente, coletando alimento e água para sua subsistência e fabricação do mel. Os resíduos detectados foram provavelmente introduzidos no mel através das abelhas, as quais se alimentaram de néctar e/ou pólen de flores contaminadas. O praguicida que obteve maior frequência de detecção, o endosulfan, foi o único de utilização ainda permitida durante o período de coleta das amostras. Este composto é um inseticida e acaricida extensivamente utilizado na agricultura em uma grande variedade de culturas, devido a sua versatilidade. A mistura técnica, forma como o praguicida é comercializado, contém os dois isômeros (alfa e beta) em uma proporção 7:3. Juntamente com o seu produto de degradação, endosulfan sulfato, tem sido detectado em diversos ambientes naturais, distantes do seu local de aplicação (Becker, Scheringer, Schenker, & Hungerbühler, 2011). Um estudo recente demonstrou que a taxa de degradação do isômero beta em endosulfan sulfato é superior a do isômero alfa (Tiwaki & Guha, 2013), o que pode explicar a ausência do isômero beta dentre as amostras analisadas.

Comparando-se o presente estudo com outros dentre a literatura consultada (Tabela 2), a concentração média dos praguicidas organoclorados foi menor quando comparada a estudos realizados na Turquia (Yavuz et al., 2010) e Índia (Choudhary & Sharma, 2008). Porém, em

relação ao endosulfan (alfa e sulfato), as amostras do presente estudo apresentaram maiores concentrações. Já os estudos realizados na Espanha e Portugal (Blasco et al., 2004; Herrera et al., 2005) demonstraram níveis mais baixos dentre a maioria dos compostos pesquisados.

Diferenças entre os perfis e concentrações das amostras de acordo com o estado de origem podem ser observadas (Figura 2). Na Figura 2A observa-se o perfil da concentração total dos praguicidas. O estado do Rio Grande do Sul obteve a maior concentração ($12,6 \text{ ng g}^{-1}$), seguido dos estados de Santa Catarina ($12,2 \text{ ng g}^{-1}$) e Paraná ($8,9 \text{ ng g}^{-1}$). Já na Figura 2B, observam-se as diferenças nas concentrações individuais de cada composto. Embora alguns praguicidas demonstrem a tendência de estarem em maior concentração em algum dos estados, somente o aldrin diferiu significativamente, apresentando-se em maior concentração nas amostras de Santa Catarina (média de $4,6 \text{ ng g}^{-1}$), enquanto que as amostras provenientes dos estados do Rio Grande do Sul e Paraná apresentaram valores médios de $0,5$ e $0,3 \text{ ng g}^{-1}$, respectivamente. É importante ressaltar que estudos anteriores realizados pelo nosso grupo de pesquisa sugerem a relação do aldrin com a ocorrência do câncer de mama em mulheres (COSTABEBER, 2000).

Com relação ao ano de colheita, algumas diferenças podem ser observadas (Figura 3). A concentração total de praguicidas detectados em 2010 foi superior ao ano de 2009, com valores totais de $15,5 \text{ ng g}^{-1}$ e $13,2 \text{ ng g}^{-1}$, respectivamente. Porém, no ano de 2011, houve uma redução na concentração total quando comparado aos anos anteriores, o qual apresentou um valor total de $7,1 \text{ ng g}^{-1}$ (Figura 3A). Já em relação à concentração individual dos compostos, somente o endrin diferiu significativamente entre as concentrações das amostras coletadas em 2010 ($6,2 \text{ ng g}^{-1}$) e 2011 ($0,6 \text{ ng g}^{-1}$) (Figura 3B). Apesar de os demais compostos apresentarem tendências de redução ou aumento na concentração com o passar dos anos, esta diferença não foi significativa.

Com relação à segurança alimentar, uma quantidade importante de amostras superou o limite máximo de resíduos (LMR) permitido pela legislação, que é de 10 ng g^{-1} para os compostos analisados no presente estudo. De um total de 186 amostras, 34 superaram o limite estabelecido, o que significa que mais de 18% nos méis analisados estão em desacordo com a legislação. Dentre estas 34 amostras, 4 superaram o limite para o aldrin (entre $14,0$ e $72,0 \text{ ng g}^{-1}$), 1 para o *p,p'*-DDT ($11,9 \text{ ng g}^{-1}$), 5 para o endosulfan alfa (entre $12,3$ e $31,7 \text{ ng g}^{-1}$), 17 para o endrin (entre $11,6$ e $64,6 \text{ ng g}^{-1}$) e 7 para o heptacloro (entre $11,5$ e $90,3 \text{ ng g}^{-1}$).

4. Conclusões

As amostras analisadas no presente estudo apresentaram uma contaminação importante por praguicidas organoclorados. Do total de amostras investigadas, 77% estavam contaminadas por algum praguicida, com predominância dos compostos endosulfan alfa, endosulfan sulfato e aldrin. Diferenças entre as concentrações dos praguicidas de acordo com o estado de origem e ano de colheita foram observadas. O composto aldrin apresentou maior concentração nas amostras do estado de Santa Catarina, enquanto que o endrin obteve uma redução significativa nas amostras coletadas no ano de 2011. Com relação à segurança alimentar, 18% das amostras apresentaram concentrações superiores ao limite máximo de resíduos permitido pela legislação, o que representa um risco à saúde do consumidor. Os resultados encontrados no presente estudo demonstram a importância da utilização do mel de abelhas como bioindicador da contaminação ambiental, pois apesar da maioria dos compostos investigados terem sido banidos há muitos anos, ainda continuam presentes no meio ambiente devido a sua persistência.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao CNPq (Processo 578343/2008-8) pelo aporte financeiro para a realização desta pesquisa. S. Mohr e T.G. Schwanz agradecem a CAPES pela bolsa de doutorado. N. Zanatta e I.H. Costabeber agradecem ao CNPq pela bolsa de produtividade em pesquisa.

Referências

- Aliferis, K.A., Tarantilis, P.A., Harizanis, P.C., & Alissandrakis, E. (2010). Botanical discrimination and classification of honey samples applying gas chromatography/mass spectrometry fingerprinting of headspace volatile compounds. *Food Chemistry*, *121*, 856-862.
- Anastassiades, M., Lehotay, S., Stajnbaher, D., & Schenck, F.J. (2003). Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. *Journal of AOAC International*, *86*, 412-431.
- Becker, L., Scheringer, M., Schenker, U., & Hungerbühler, K. (2011). Assessment of the environmental persistence and long-range transport of endosulfan. *Environmental Pollution*, *159*, 1737-1743.
- Belitz, H., & Grosch, W. (1992). *Química de los alimentos*. (2nd ed.). Zaragoza: Editorial ACRIBIA, S.A.
- Blasco, C., Lino, C.M., Picó, Y., Pena, A., Font, G., & Silveira, M.I.N. (2004). Determination of organochlorine pesticide residues in honey from the central zone of Portugal and the Valencian community of Spain. *Journal of Chromatography A*, *1049*, 155-160.

- Brasil (1985). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Portaria n° 329, de 02 de setembro de 1985.
- Brasil (2010). Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). RDC n° 28, de 09 de agosto de 2010.
- Brasil (2013). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Instrução Normativa n°17, de 29 de maio de 2013.
- Choudhary, A., & Sharma, D.C. (2008). Pesticide residues in honey samples from Himachal Pradesh (India). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 80, 417-422.
- Costabeber, I. (2000). Resíduos de inseticidas organoclorados. Factor de riesgo para cancer mamario. *Revista Medica del Instituto Mexicano de Seguro Social*, 39, 127-132.
- Devillers, J., & Pham-Delegue, M.H. (2002). *Honey bees: Estimating the environmental impact of chemicals*. London: CRC Press.
- Herrera, A., Pérez-Arquillué, C., Conchello, P., Bayarri, S., Lázaro, R., Yagüe, C., et al. (2005). Determination of pesticides and PCBs in honey by solid-phase extraction cleanup followed by gas chromatography with electron-capture and nitrogen-phosphorus detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 381, 695-701.
- Kujawski, M.W., Pinteaux, E., & Namiesnik, J. (2012). Application of dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of selected pesticides in honey by gas chromatography-mass spectrometry. *European Food Research and Technology*, 234, 223-230.
- Lambert, O., Piroux, M., Puyo, S., Thorin, C., L'Hostis, M., Wiest, L., et al. (2013). Widespread occurrence of chemical residues in beehive matrices from apiaries located in different landscapes of Western France. *PLOS ONE*, 8, 1-12.

- Morzycka, B. (2002). Simple method for the determination of trace levels of pesticides in honeybees using matrix solid-phase dispersion and gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, 982, 267-273.
- Mukherjee, I. (2009). Determination of pesticide residues in honey samples. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 83, 818-821.
- Nozal, M.J., Bernal, J.L., Martín, M.T., Bernal, J., Álvaro, A., Martín, R., et al. (2008). Trace analysis of fumagillin in honey by liquid chromatography-diode array-electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1190, 224-231.
- Rissato, S.R., Galhiane, M.S., Almeida, M.V., Generutti, M., & Apon, B.M. (2007). Multiresidue determination of pesticides in honey samples by gas chromatography-mass spectrometry and application in environmental contamination. *Food Chemistry*, 101, 1719-1726.
- Tiwaki, M.K. & Guha, S. (2013). Kinetics of the biodegradation pathway of endosulfan in the aerobic and anaerobic environments. *Chemosphere*, 93, 567-573.
- Tsiropoulos, N.G., & Amvrazi, E.G. (2011). Determination of pesticide residues in honey by single-drop microextraction and gas chromatography. *Journal of AOAC International*, 94, 634-644.
- Yavuz, H., Guler, G.O., Aktumsek, A., Cakmak, Y.S., & Ozparlak, H. (2010). Determination of some organochlorine pesticide residues in honeys from Konya, Turkey. *Environmental Monitoring and Assessment*, 168, 277-283.
- Wang, J., Kliks, M.M., Jun, S., & Li, Q.X. (2010). Residues of organochlorine pesticides in honeys from different geographic regions. *Food Research International*, 43, 2329-2334.
- Wiest, L., Buleté, A., Giroud, B., Fratta, C., Amic, S., Lambert, O., et al. (2011). Multi-residue analysis of 80 environmental contaminants in honeys, honeybees and pollens by

one extraction procedure followed by liquid and gas chromatography coupled with mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A*, 1218, 5743-5756.

Tabela 1 – Concentração de praguicidas organoclorados (ng g^{-1}) em mel de abelhas da região Sul do Brasil ($n=186$).

| Praguicida | Média | DP | Mediana | Mín.-Máx. | % > LQ (n) |
|---------------------------------------|--------------|-------------|----------------|--------------------|----------------------|
| Aldrin | 1,07 | 7,54 | 0,00 | <LQ-72,0 | 5% (9) |
| Dieldrin | ND | – | ND | ND | 0% (0) |
| <i>p,p'</i> -DDE | ND | – | ND | ND | 0% (0) |
| <i>p,p'</i> -DDD | 0,01 | 0,10 | 0,00 | <LQ-1,31 | 1% (1) |
| <i>p,p'</i> -DDT | 0,26 | 1,15 | 0,00 | <LQ-11,9 | 8% (15) |
| Endosulfan alfa | 1,84 | 3,37 | 0,54 | <LQ-31,7 | 50% (93) |
| Endosulfan beta | ND | – | ND | ND | 0% (0) |
| Endosulfan sulfato | 1,68 | 3,02 | 0,00 | <LQ-23,9 | 49% (92) |
| Endrin | 2,95 | 8,82 | 0,00 | <LQ-64,6 | 24% (44) |
| Heptacloro | 1,57 | 9,21 | 0,00 | <LQ-90,3 | 5% (10) |
| Heptacloro epóxido | ND | – | ND | ND | 0% (0) |
| Metoxicloro | 0,03 | 0,18 | 0,00 | <LQ-1,57 | 2% (4) |
| ΣPraguicidas | 9,41 | 15,4 | 3,81 | <LQ-92,0 | 77% (144) |

DP: desvio padrão. LQ: limite de quantificação. ND: não detectado acima do LQ. Valores < LQ foram considerados como zero para os cálculos da média e mediana.

Tabela 2 – Concentrações de praguicidas organoclorados em mel de abelhas de diferentes países.

| País (n° amostras) | Concentração média (ng g ⁻¹) | | | | | | | | | | | | Referência |
|-----------------------|--|----------|----------------------|----------------------|----------------------|--------------------|--------------------|-----------------------|--------|------------|-----------------------|-------------|------------|
| | Aldrin | Dieldrin | <i>p,p'</i> - DDE | <i>p,p'</i> - DDD | <i>p,p'</i> - DDT | Endosulfan alfa | Endosulfan beta | Endosulfan sulfato | Endrin | Heptacloro | Heptacloro epóxido | Metoxicloro | |
| Espanha (111) | 0,57 | 0,34 | 2,18 | ND | 0,45 | NA | ND | 0,50 | 0,44 | 0,17 | 0,20 | NA | (1) |
| Espanha (25) | NA | NA | ND | 0,19 | ND | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | (2) |
| Portugal (24) | NA | NA | 0,18 | 0,07 | 0,07 | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | (2) |
| Turquia (9) | 0,06 | 0,36 | ND | 0,39 | 0,10 | 0,09 | 0,27 | NA | ND | 0,04 | NA | NA | (3) |
| Turquia (109) | 3,20 | 3,60 | 7,70 | 3,50 | 2,50 | 1,60 | 1,80 | NA | 3,60 | 11,60 | 14,90 | 18,30 | (4) |
| Índia (51) | NA | NA | 0,48 | 1,49 | 1,80 | 1,55 | 2,27 | NA | NA | NA | NA | NA | (5) |
| Índia (6) | NA | NA | NA | NA | NA | 0,17 | 0,22 | 0,11 | NA | NA | NA | NA | (6) |
| Grécia (17) | NA | NA | NA | NA | NA | 0,23 | 0,16 | 0,20 | NA | NA | NA | NA | (7) |
| Brasil (186) * | 1,07 | ND | ND | 0,01 | 0,26 | 1,84 | ND | 1,68 | 2,95 | 1,57 | ND | 0,03 | * |

NA: não analisado; ND: não detectado; * Este estudo.

(1) Herrera et al. (2005); (2) Blasco, Lino, Picó, Pena, Font & Silveira (2004); (3) Erdogru (2007); (4) Yavuz, Guler, Aktumsek, Cakmak & Ozparlak (2010); (5) Choudhary & Sharma (2008); (6) Mukherjee (2009); (7) Tsiropoulos & Amvrazi (2011).

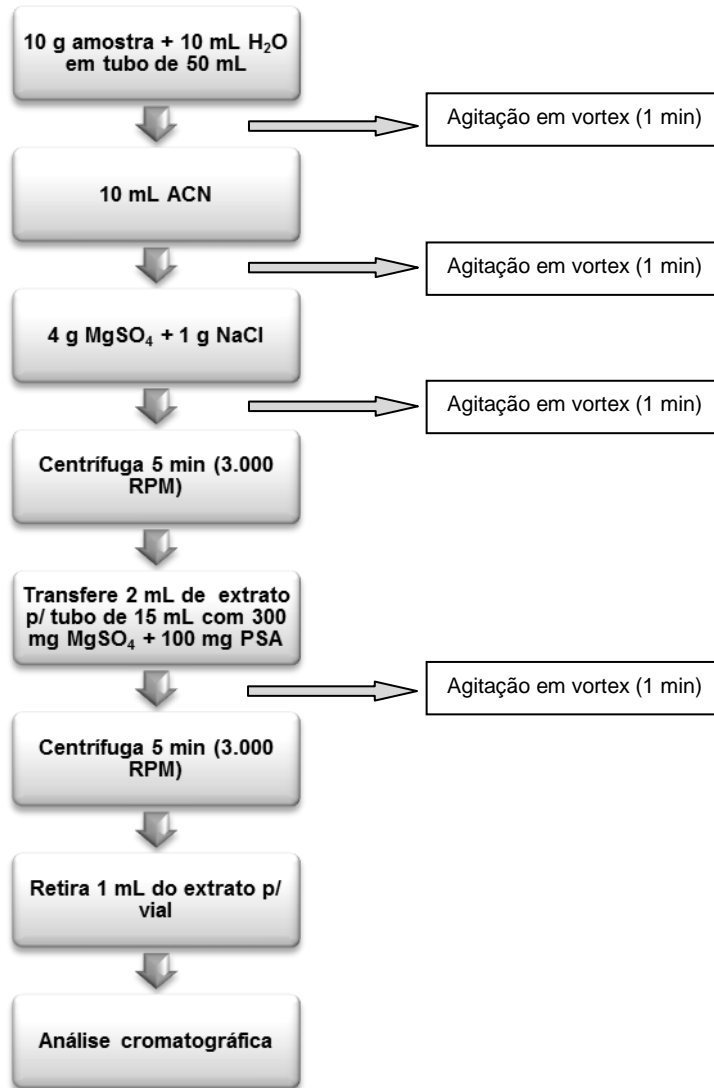


Figura 1 – Fluxograma representativo do método de extração utilizado (QuEChERS modificado).

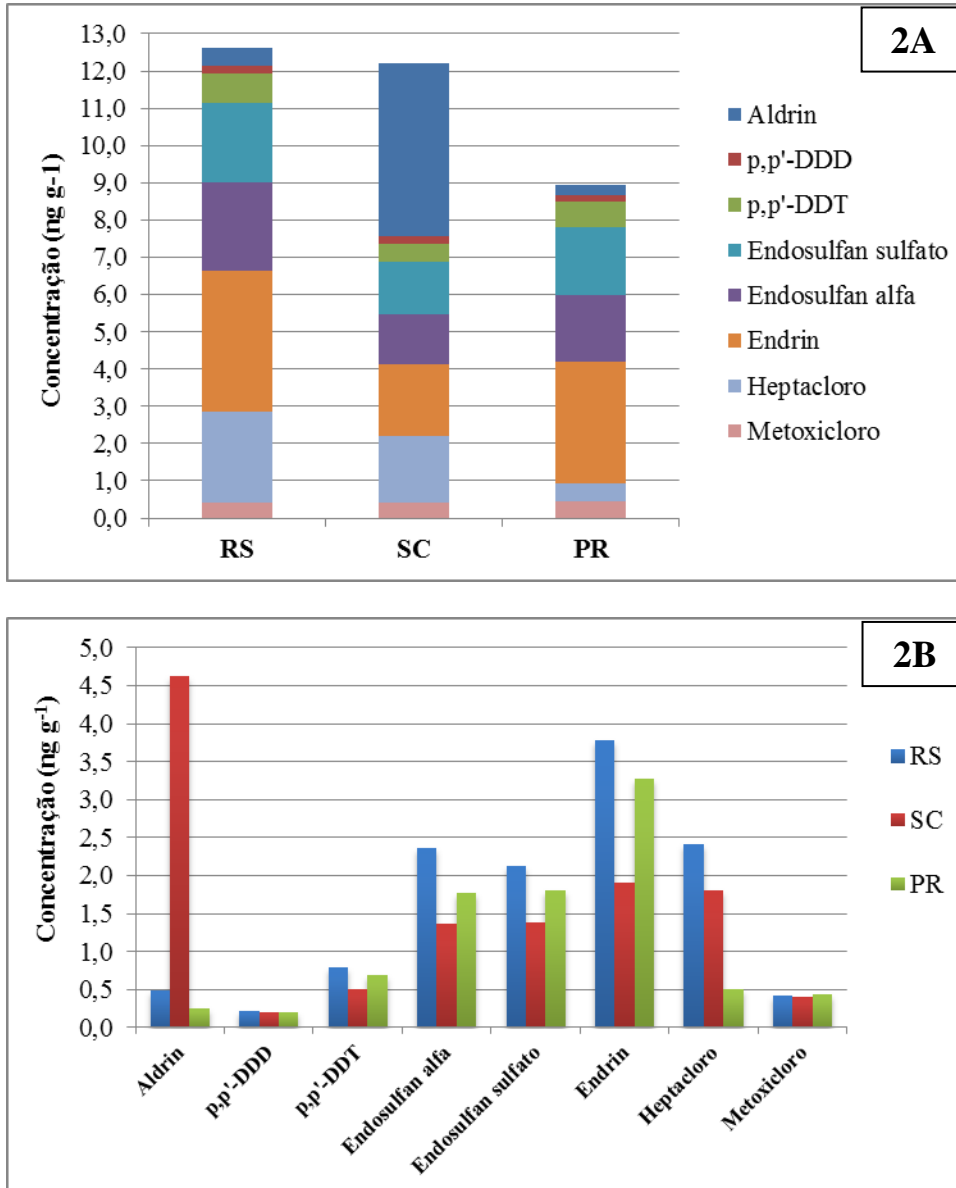


Figura 2 – Perfil da concentração total (2A) e concentração individual dos praguicidas organoclorados (2B) em mel de abelhas da região Sul do Brasil de acordo com o estado de origem.

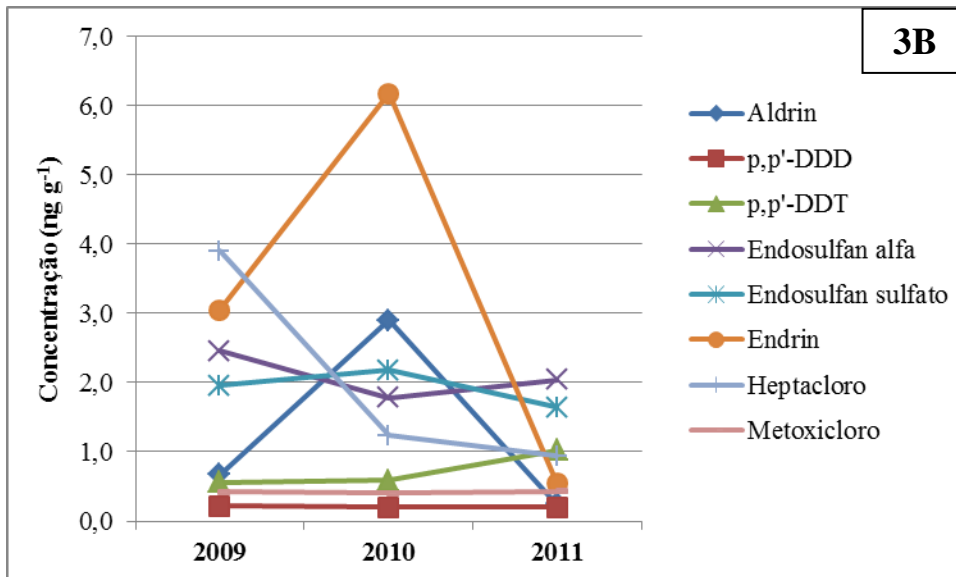
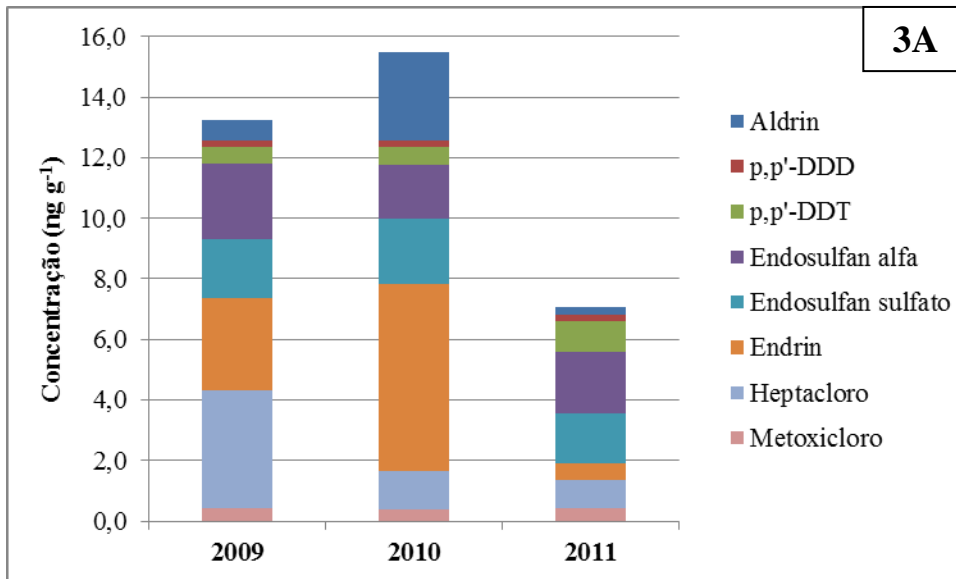


Figura 3 – Perfil da concentração total (3A) e concentração individual dos praguicidas organoclorados (3B) em mel de abelhas da região Sul do Brasil de acordo com o ano de colheita.

4.2 Manuscrito 2

Manuscrito em fase final de revisão pelos autores, a ser submetido ao periódico

Food and Chemical Toxicology.

Configurado conforme as normas do periódico.

**DETERMINATION OF POLYCHLORINATED BIPHENYL (PCBs) LEVELS IN
HONEY SAMPLES FROM BRAZIL**

Determination of polychlorinated biphenyls (PCBs) levels in honey samples from Brazil

Susana Mohr^a, Thiago G. Schwanz^a, Joseane de O. Mozzaquatro^a,

Giane Magrini Pigatto^a, Nilo Zanatta^b, Ijoni H. Costabeber^{c*}

^a Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Campus Camobi, Santa Maria, RS, Brazil

^b Departamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Campus Camobi, Santa Maria, RS, Brazil

^c Departamento de Morfologia, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Campus Camobi, Santa Maria, RS, Brazil

*Corresponding author:

Ijoni H. Costabeber

Departamento de Morfologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Campus Camobi, Av. Roraima 1000, Prédio 19, Sala 3201, 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil

Telefone: +55 55 3220 9375

ijonicostabeber@gmail.com

E-mail addresses: susana@viamicro.com.br (S. Mohr), tgsnapo@gmail.com (T. G. Schwanz), josemozzaquatro@yahoo.com.br (J. O. Mozzaquatro), zanatta@base.ufsm.br (N. Zanatta), ijonicostabeber@gmail.com (I. H. Costabeber).

Abstract

The presence of the seven indicators polychlorinated biphenyls (PCBs) was investigated, for the first time, in 137 honey samples from Brazil, collected between 2009 and 2011. PCB congeners were found in the following rank: 28 (1.18 ng g^{-1}) > 52 (0.74 ng g^{-1}) > 180 (0.21 ng g^{-1}) > 118 (0.03 ng g^{-1}) > 101 and 153 (0.01 ng g^{-1}) > 138 (not detected), with a Σ PCB amounting to 2.19 ng g^{-1} . PCB levels were higher in samples from São Paulo state (Σ PCBs 7.52 ng g^{-1}), followed by samples from the states of Paraná (Σ PCBs 5.40 ng g^{-1}), Santa Catarina (Σ PCBs 2.59 ng g^{-1}), and Rio Grande do Sul (Σ PCBs 1.24 ng g^{-1}), with significant difference for congeners 28 and 52. With regard to the harvest year, there was a trend in the increase of the concentration over the years for PCBs 28, 52 and 180, although this difference was not significant. These results indicate the presence of PCBs in honey samples from Brazil, but the levels were quite low when compared with other foodstuffs in the literature.

Keyword: Honey; PCBs; POPs; Brazil; food safety.

1. Introduction

Honey is an exported product from Brazil with increasing economic importance. It has been used as a food and medical product since the earliest times, once it is a natural substance produced by honeybees (*Apis mellifera*) from the nectar of blossoms or from exudates of trees and plants (Alvarez-Suarez et al., 2010). Nowadays, it is well-known that bee mortality has never been so high all over the world. One of the factors that may explain it is the increasing presence of chemicals in the environment (Wiest et al., 2011).

Polychlorinated biphenyls (PCBs) are ubiquitous, persistent and toxic environmental pollutants that have been the subject of many investigations. They were extensively used from 1930 until the late 1970s in a wide range of industrial and commercial applications such electrical and hydraulic equipment; as plasticizers in paints, plastic and rubber products; in pigments, dyes and carbonless copy paper; and many other industrial applications (EPA, 2013). These compounds are easily transported through the atmosphere, accumulating in organisms and biomagnifying through the food chain due to their hydrophobic nature and persistence in the environment (WHO, 1993). PCBs were never produced in Brazil; however most of the transformer oils already in use today in the country contain PCBs, since these oils were imported (Penteado and Vaz, 2001). In January 1981, the Brazilian government established the ban of PCBs manufacturing, sale and use; however, allowed for equipment already using these compounds to continue in operation until the replacement of the dielectric fluid for other PCB-free products (Brasil, 1981).

There are a high number of recent studies concerning the presence of PCBs in foods from northern hemisphere countries (Cimenci et al., 2013; De Filippis et al., 2013; Roszko et al., 2014). However, recent studies conducted in the southern hemisphere are quite scarce

(Mohr and Costabeber, 2012). Regarding to studies investigating the presence of PCBs in honey, only two were found in the literature (Erdogrul, 2007; Herrera et al., 2005).

This paper reports the residue concentrations of the 7 indicators PCBs found in honey samples collected in the South and Southeast of Brazil, in the years 2009, 2010 and 2011. The comparison among the PCBs concentrations and profiles found in the different states and harvest years were also reported.

2. Material and Methods

2.1 Sampling collection

A total of 137 honey samples were collected in Brazil during 2010, 2011 and 2012, purchased in different supermarkets in the states of Rio Grande do Sul ($n=99$), Santa Catarina ($n=20$), Paraná ($n=5$), and São Paulo ($n=13$). The samples were of different botanical origin, transported to the laboratory and stored at room temperature in a fresh and dark place before analysis.

2.2 Chemicals

The polychlorinated biphenyls under investigation were the seven indicators: 28 (2,4,4'-trichlorobiphenyl), 52 (2,2',5,5'-tetrachlorobiphenyl), 101 (2,2',4,5,5'-pentachlorobiphenyl), 118 (2,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl), 138 (2,2',3,4,4',5'-hexachlorobiphenyl), 153 (2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl), and 180 (2,2',3,4,4',5,5'-heptachlorobiphenyl). Certified standards from these compounds were purchased from AccuStandard, Inc. (New Haven, USA). HPLC grade acetonitrile were acquired from Mallinckrodt Baker, Inc. (NJ, USA). The reagents anhydrous magnesium sulphate P.A. (Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, USA), sodium chloride P.A. (Sigma-Aldrich, Co., St. Louis,

USA), and Bondesil Primary/Secondary Amine (PSA) 40 μ m (Supelco, Inc., Bellefonte, Pennsylvania, USA) were analytical purity.

2.3 Analytical procedure

2.3.1 Extraction and clean-up

Honey samples were analysed based on QuEChERS method described by Anastassiades et al. (2003), with a few modifications. A portion of 10 g homogenized sample was weighted into a 50 mL PTFE centrifuge tube and 10 mL of water were added, soaking for 1 min by using a vortex mixer. Then, 10 mL of acetonitrile were added and the mixture was vortexed again (1 min). 4 g MgSO₄ and 1 g NaCl were added, vortexed immediately for 1 min, and then the extract was centrifuged for 5 min at 3000 rpm. 2 mL aliquots of the extracts were transferred to 15 mL tubes and 300 mg of MgSO₄ and 100 mg of PSA were added. After centrifugation at 3000 rpm for 5 min, 1 mL aliquots of the extract was withdrawn and directly analysed by GC/MS.

2.3.2 GC/MS analysis

Analysis were performed on a gas chromatograph Agilent Technologies 6890N coupled to a mass spectrometer 5975B inert XL CI/EI MSD. 1 μ L of the extracts was injected in a *split/splitless* injector operating on splitless mode, through a 7683 Agilent Technologies auto sampler. The temperature of the injector remained constant at 250 °C. The separation of PCBs was performed in a DB-5MS fused silica capillary column (J & W Scientific) with a length of 30 m, internal diameter of 0.25 mm, and a thickness of 0.25 μ m of the stationary phase. Helium was used as carrier gas under an initial pressure of 13.38 psi. The flow, which remained constant, was 1.5 mL min⁻¹. The oven temperature programming was: 60 °C (1

min), 10 °C min⁻¹ up to 200 °C, 5 °C min⁻¹ up to 225 °C, 10 °C min⁻¹ up to 280 °C (9.5 min). The transfer line temperature was kept at 290 °C. For the analysis, the EI (electron impact) mode was used at 70 eV, operated in selected ion monitoring mode (SIM). The temperatures of the source and quadrupole were 230 °C and 150 °C, respectively. The identification and quantification of compounds were performed by comparing the retention times of the peaks found in the samples with individual retention times of the standards of polychlorinated biphenyls, under the same working conditions as well as by comparing the abundance of the main ions of each of the six congeners, which were obtained from the reference standards, with the ions found in the sample. The ions selected were *m/z* 186, 256, 258, and 260 (PCB 28); *m/z* 220, 222, 289, and 291 (PCB 52); *m/z* 254, 323, 325, and 327 (PCBs 101 and 118); *m/z* 289, 357, 359, and 361 (PCBs 138 and 153); *m/z* 323, 393, 395, and 397 (PCB 180).

2.4 Quality control

The proposed method was previously validated, with satisfactory results for all the tested parameters, including selectivity and linearity. Relative standard deviation (RSDs) of repeatability and intermediate precision ranged from 9.1 to 11.8% and from 11.2 to 14.5%, respectively. Correlation coefficients of linearity were greater 0.998 from 0.5 to 32 ng g⁻¹ for all PCBs. The recovery ranged from 97.4 to 126%, with RSDs <17%. The limit of detection (LOD) was 0.1 ng mL⁻¹, while the limit of quantification (LOQ) was 0.5 ng mL⁻¹ for all PCB congeners. Blanks were made for each batch of samples extracted in order to identify possible interferences.

2.5 Statistical analysis

As honey PCB concentrations do not follow a normal distribution, non-parametric Kruskal-Wallis ANOVA test was used to evaluate the differences of contaminants in honeys

between the states and the harvest years. The level of significance was set as $p \leq 0.05$ throughout this study. Data were analyzed using STATISTICA[®] 7.0 software. In addition, it must be pointed out that, for the calculations, $\frac{1}{2}$ LOD was used for those congeners which concentration was below LOD.

3. Results and Discussion

Table 1 shows the levels of PCB congeners (expressed in ng g^{-1} fresh weight) in 137 honey samples from Brazil. A sample was considered positive when residue level was $>$ LOD. PCBs 52 and 28 were the most frequent, being detected in 41 and 39% of the samples, respectively, and followed by PCB 180 (11%). PCB 138 was detected in none of them, while PCBs 101, 118 and 153 were detected in only one sample. It is important to note that 65% of the samples analysed presented contamination. Concerning to the PCBs that were detected in more than 10% of the samples, PCB 28 exhibited the highest mean values (1.18 ng g^{-1} f.w.), followed by PCB 52 (0.74 ng g^{-1} f.w.), and PCB 180 (0.21 ng g^{-1} f.w.).

No study was found describing PCB levels in honey samples from Brazil. So, it is difficult to compare the results obtained in the present study with those found in other similar studies. Among the literature, only two studies that investigated the presence of PCBs in honey were found. In Spain, Herrera et al. (2005) found similar mean concentrations with the present study for PCBs 52 (0.73 ng g^{-1}) and 180 (0.28 ng g^{-1}), but PCBs 28 (25.4 ng g^{-1}), 101 (1.32 ng g^{-1}), 138 (2.04 ng g^{-1}), and 153 (0.81 ng g^{-1}) were higher. In Turkey, Erdogru (2007) found the PCB 28 in all the samples analysed (mean of 0.83 ng g^{-1}), while PCBs 101 and 180 were detected in none of them. PCBs 52, 118, 153 and 138 were also investigated, with means of 1.26, 0.10, 0.21, and 0.10 ng g^{-1} , respectively.

Analyzing the PCB distribution in honey from different states of Brazil (Table 2), statistically significant differences were observed. PCB 28 was higher mean concentrations in samples from São Paulo (5.19 ng g^{-1}) and Paraná (4.78 ng g^{-1}), when compared to Rio Grande do Sul (0.59 ng g^{-1}) and Santa Catarina (0.63 ng g^{-1}). Regarding to PCB 52, São Paulo and Paraná presented the higher levels (1.86 and 1.68 ng g^{-1} , respectively), statistically different to Rio Grande do Sul (0.43 ng g^{-1}) and Paraná (0.19 ng g^{-1}). It is important to note that the Σ PCB levels were also higher in samples from São Paulo (7.52 ng g^{-1}), followed by Paraná (5.40 ng g^{-1}), Santa Catarina (2.59 ng g^{-1}), and Rio Grande do Sul (1.24 ng g^{-1}). This is probably due to the fact that São Paulo state is located on the southeast region of Brazil, one of the metropolitan areas most industrially developed in South America (Martins et al., 2011).

Several studies report that PCB levels in foods tend to decrease over the years due to the ban on their manufacture and use (Törnqvist et al., 2011, Glynn et al., 2008). In the present study it cannot be found (Fig. 1). Although no statistically significant difference was observed, the samples collected in 2011 showed higher mean concentrations of PCBs 28, 52 and 180. PCB 28 obtained mean concentrations of 0.96 , 1.20 , and 1.59 ng g^{-1} f.w. in the years 2009, 2010, and 2011, respectively. PCBs 52 and 180 exhibited similar levels in the years 2009 and 2010 (0.71 and 0.69 ng g^{-1} for PCB 28; 0.14 and 0.07 for PCB 180, respectively), but in 2011 these levels were higher (0.90 ng g^{-1} for PCB 52; 0.61 ng g^{-1} for PCB 180).

Regarding to recent studies that have been conducted in Brazil investigating the presence of PCB residues in food, a few were found in the literature. Lavandier et al. (2013) investigated the presence of PCBs in fish from an estuary in the coast of Rio de Janeiro state, with concentrations ranged from 2.29 to 27.60 ng g^{-1} w.w. in muscle. Schwanz et al. (2012) detected the presence of PCBs in corn from Rio Grande do Sul state, with levels lower than those found in fish samples (range of 0.00 to 2.54 ng g^{-1}). The difference between the levels

detected in these two studies is probably due to the type of food, once PCBs have the characteristic of accumulate in fatty foods.

PCB concentrations found in the honey samples from the present study are in the lowest range levels found in other non-fatty foods and plants in the related literature (Pérez et al., 2013; Qin et al., 2011; Roszko et al., 2014). The presence of contaminants in honey could be due to its constituents (nectar and pollen) or their transfer by bees when transforming nectar (Lambert et al., 2012). Nectar, the basic constituent of honey, has low lipid content and then its capacity to accumulate PCBs is very limited, what would explain the low concentrations detected in the honey samples. Brazilian legislation has not established limits to the PCB levels in honey. There are only limits for fatty-foods from animal origin (beef, pork, chicken, fish farming and eggs) (Brasil, 2013).

4. Conclusions

This is the first time that PCB levels in honeys from Brazil have been reported. There is no indication of important health risks associated with the consumption of these products on the basis of current toxicological knowledge, once the levels are quite low when compared with those found in other foods. Significantly differences among PCB levels in honeys from different states were found for PCBs 28 and 52. Samples from São Paulo exhibited the higher levels, while honeys from the Rio Grande do Sul the lowest. Regarding to the levels according to the harvest year, an increase was noted between 2009 and 2011, although this difference was not statistically significant. The data from this study may also serve as a basis for the inclusion of PCBs in the Brazilian legislation that establishes the maximum residue levels of PCBs, similar to what already exists for food of animal origin.

Acknowledgments

The authors gratefully thank the CNPq (Proc.: 578343/2008-8) for financial support of this search. S. Mohr, T.G. Schwanz and G.M. Pigatto thank CAPES for the doctorate scholarships. N. Zanatta and I. H. Costabeber thank CNPq for the research productivity scholarship.

References

- Alvarez-Suarez, J.M., Tulipani, S., Romandini, S., Bertoli, E, Battino, M., 2010. Contribution of honey in nutrition and human health: a review. *Mediterr. J. Nutr. Metab.* 3, 15-23.
- Anastassiades, M., Lehotay, S., Stajnbaher, D., Schenck, F.J., 2003. Fast and easy Multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. *J. AOAC Int.* 86, 412-431.
- Brasil, 1981. Portaria Interministerial n.19 de 29 de janeiro de 1981.
- Brasil, 2013. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n.17 de 29 de maio de 2013. Programa de controle de resíduos de contaminantes em carnes, leites, mel, ovos e pescado – PNCRC/2013.
- Cimenci, O., Vandevijvere, S., Gosciny, S., Van Den Bergh, M.A., Hanot, V., Vinx, C., Bolle, F., Van Loco, J., 2013. Dietary exposure of the Belgian adult population to non-dioxin-like PCBs. *Food Chem. Toxicol.* 59, 670-679.
- De Filippis, S.P., Chirollo, C., Brambilla, G., Anastasio, A., Sarnelli, P., De Felip, E., di Domenico, A., Iamiceli, A.L., Cortesi, M.L., 2013. Polychlorodibenzodioxin and – furan

and dioxin-like polychlorobiphenyl distribution in tissues and dairy products of dairy buffaloes. *J. Agric. Food Chem.* 61, 6552-6561.

EPA. <http://www.epa.gov/epawaste/hazard/tsd/pcbs/about.htm>

Erdogrul, Ö., 2007. Levels of selected pesticides in honey samples from Kahramanmaraş, Turkey. *Food Control* 18, 866-871.

Glynn, A., Aune, M., Nilsson, I., Darnerud, P.O., Ankarberg, E.H., Bignert, A., Nordlander, I., 2009. Declining levels of PCB, HCB and *p,p'*-DDE in adipose tissue from food producing bovines and swine in Sweden 1991-2004. *Chemosphere* 74, 1457-1462.

Herrera, A., Pérez-Arquillué, C., Conchello, P., Bayarri, S., Lázaro, R., Yagüe, C., Ariño, A., 2005. Determination of pesticides and PCBs in honey by solid-phase extraction cleanup followed by gas chromatography with electron-capture and nitrogen-phosphorus detection. *Anal. Bioanal. Chem.* 381, 695-701.

Lambert, O., Veyrand, B., Durand, S., Marchand, P., Le Bizec, B., Piroux, M., Puyo, S., Thorin, C., Delbac, F., Pouliquen, H., 2012. Polycyclic aromatic hydrocarbons: Bees, honey and pollen as sentinels for environmental chemical contaminants. *Chemosphere* 86, 98-104.

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

Martins, C.C., Bicego, M.C., Mahiques, M.M., Figueira, R.C.L., Tessier, M.G., Montone, R.C., 2011. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in a large South American industrial coastal area (Santos Estuary, Southeastern Brazil): sources and depositional history. *Mar. Pollut. Bull.* 63, 452-458.

- Mohr, S., Costabeber, I.H., 2012. Aspectos toxicológicos e ocorrência dos bifenilos policlorados em alimentos. *Ciência Rural* 42, 559-566.
- Penteado, J.C., Vaz, J.M., 2001. O legado das bifenilas policloradas (PCBs). *Quím. Nova* 24, 390-398.
- Pérez, R.A., Tadeo, J.L., Albero, B., Miguel, E., Sánchez-Brunete, C., 2013. Gas chromatography-triple quadrupole mass spectrometry for analysis of selected polyhalogenated pollutants in plants. Comparison of extraction methods. *Anal. Bioanal. Chem.* 405, 389-400.
- Qin, Y.Y, Leung, C.K.M., Leung, A.O.W., Zheng, J.S., Wong, M.H., 2011. Persistent organic pollutants in food items collected in Hong Kong. *Chemosphere* 82, 1329-1336.
- Roszkó, M., Jedrzejczak, R., Szymczyk, K., 2014. Polychlorinated biphenyls (PCBs), polychlorinated diphenyl ethers (PBDEs) and organochlorine pesticides in selected cereals available on the Polish retail market. *Sci. Total Environ.* 466-467, 136-151.
- Schwanz, T.G., Mohr, S., Porte, L.M.F., Zanatta, N., Bonacorso, H.G., Martins, M.A.P., Costabeber, I.H., 2012. Determinação de bifenilos policlorados em milho através de extração em fase sólida seguida de cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas. *Quím. Nova* 35, 553-558.
- Törnkvist, A., Glynn, A., Aune, M., Darnerud, P. O., Ankarberg, E. H., 2011. PCDD/F, PCB, PBDE, HBCD and chlorinated pesticides in a Swedish market basket from 2005 – Levels and dietary intake estimation. *Chemosphere* 83, 193-199.
- WHO. World Health Organization, 1993. Polychlorinated biphenyls and terphenyls; Environmental Health Criteria 140, World Health Organization, Geneva.
- Wiest, L., Buleté, A., Giroud, B., Fratta, C., Amic, S., Lambert, O., Pouliquen, H., Arnaudguilhem, C., 2011. Multi-residue analysis of 80 environmental contaminants in honeys, honeybees and pollens by one extraction procedure followed by liquid and gas

chromatography coupled with mass spectrometric detection. *J. Chromatogr. A* 1218, 5743-5756.

Table 1 – PCB residues (ng g⁻¹ f.w.) in honey samples from Brazil (n=137).

| Congener | Mean | SD | Median | Range | % Positive samples (n) |
|--------------|-------------|-------------|-------------|---------------------|------------------------|
| PCB 28 | 1.18 | 3.21 | 0.00 | <LOD-22.5 | 39% (54) |
| PCB 52 | 0.74 | 1.04 | 0.00 | <LOD-3.92 | 41% (56) |
| PCB 101 | 0.01 | 0.15 | 0.00 | <LOD-1.74 | 1% (1) |
| PCB 118 | 0.03 | 0.33 | 0.00 | <LOD-3.83 | 1% (1) |
| PCB 153 | 0.01 | 0.17 | 0.00 | <LOD-2.00 | 1% (1) |
| PCB 138 | ND | – | ND | ND | 0% (0) |
| PCB 180 | 0.21 | 0.59 | 0.00 | <LOD-2.33 | 11% (15) |
| ∑PCBs | 2.19 | 3.57 | 1.32 | <LOD-22.5 | 65% (89) |

Values below the limit of detection (LOD) were set to zero for the calculation of means. SD: standard deviation; ND: not detected.

Table 2 – PCB residues (ng g⁻¹ f.w.) in honey samples from Brazil according to the State of origin.

| Brazil State | PCB 28 | PCB 52 | PCB 101 | PCB 118 | PCB 153 | PCB 138 | PCB 180 | ∑PCBs |
|---------------------------------|---------------|---------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|---------------------|
| Rio Grande do Sul (n=99) | | | | | | | | |
| Mean | 0.59 | 0.43 | 0.02 | 0.04 | ND | ND | 0.17 | 1.24 |
| SD | 1.24 | 0.74 | 0.17 | 0.38 | – | – | 0.53 | 1.63 |
| Median | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | ND | ND | 0.00 | 0.95 |
| Range | <LOD-9.56 | <LOD-2.71 | <LOD-1.74 | <LOD-3.83 | ND | ND | <LOD-2.11 | <LOD-9.56 |
| % Positive (n) | 34% (34) | 31% (31) | 1% (1) | 1% (1) | 0% (0) | 0% (0) | 9% (9) | 55% (55) |
| Santa Catarina (n=20) | | | | | | | | |
| Mean | 0.63 | 1.68** | ND | ND | 0.10 | ND | 0.18 | 2.59 |
| SD | 0.83 | 1.28 | – | – | 0.44 | – | 0.54 | 1.59 |
| Median | 0.00 | 1.92 | ND | ND | 0.00 | ND | 0.00 | 2.10 |
| Range | <LOD-2.23 | <LOD-3.64 | ND | ND | <LOD-2.00 | ND | <LOD-1.77 | <LOD-5.58 |
| % Positive (n) | 40% (8) | 70% (14) | 0% (0) | 0% (0) | 5% (1) | 0% (0) | 10% (2) | 90% (18) |
| Paraná (n=5) | | | | | | | | |
| Mean | 4.78* | 0.19 | ND | ND | ND | ND | 0.43 | 5.40 |
| SD | 9.94 | 0.42 | – | – | – | – | 0.95 | 9.61 |
| Median | 0.00 | 0.00 | ND | ND | ND | ND | 0.00 | 1.38 |
| Range | <LOD-22.5 | <LOD-0.94 | ND | ND | ND | ND | <LOD-2.13 | <LOD-22.5 |
| % Positive (n) | 40% (2) | 20% (1) | 0% (0) | 0% (0) | 0% (0) | 0% (0) | 20% (1) | 80% (4) |
| São Paulo (n=13) | | | | | | | | |
| Mean | 5.19* | 1.86** | ND | ND | ND | ND | 0.47 | 7.52 |
| SD | 6.63 | 1.20 | – | – | – | – | 0.90 | 6.72 |
| Median | 2.40 | 2.28 | ND | ND | ND | ND | 0.00 | 5.48 |
| Range | <LOD-19.4 | <LOD-3.92 | ND | ND | ND | ND | <LOD-2.33 | <LOD-22.3 |
| % Positive (n) | 77% (10) | 77% (10) | 0% (0) | 0% (0) | 0% (0) | 0% (0) | 23% (3) | 92% (12) |

Values below the limit of detection (LOD) were set to zero for the calculation of means and medians. SD: standard deviation. ND: not detected.

* Significantly different from Rio Grande do Sul and Santa Catarina. ** Significantly different from Rio Grande do Sul and Paraná.

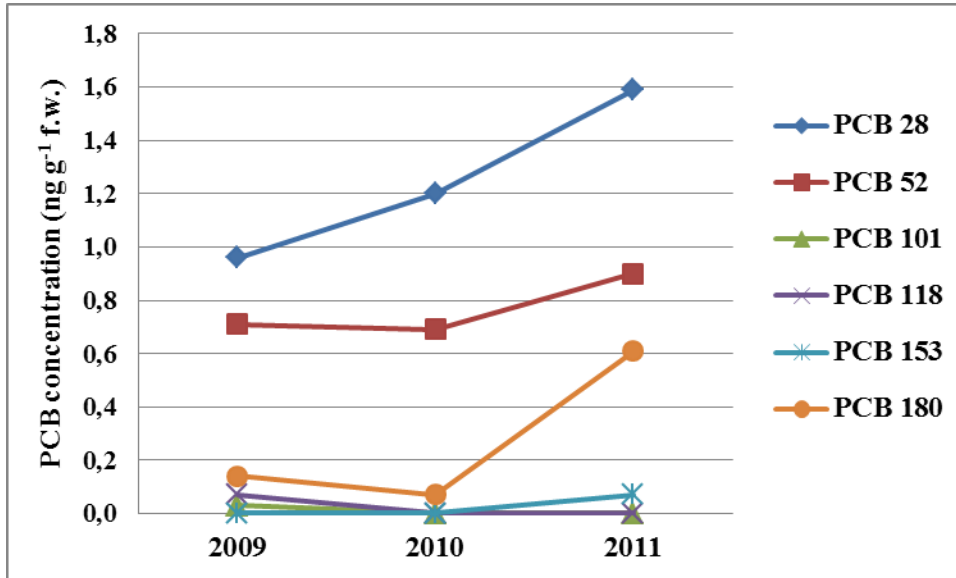


Fig. 1. PCB concentrations (ng g^{-1} f.w.) in honey samples from Brazil according to the harvest year.

4.3 Manuscrito 3

Manuscrito em fase final de revisão pelos autores, a ser submetido ao periódico

Food Chemistry.

Configurado conforme as normas do periódico.

**DETERMINATION OF POLYCHLORINATED DIBENZO-*p*-DIOXINS (PCDDs),
DIBENZOFURANS (PCDFs) AND DIOXIN-LIKE POLYCHLORINATED
BIPHENYLS (DL-PCBs) IN COMMERCIAL HONEYS FROM BRAZIL BY GC-
MS/MS-QqQ**

**Determination of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins (PCDDs), dibenzofurans (PCDFs)
and dioxin-like polychlorinated biphenyls (DL-PCBs) in commercial honeys from Brazil
by GC-MS/MS-QqQ**

**Susana Mohr^{a,b,c}, Angel García-Bermejo^a, Laura Herrero^a, Belén Gómara^a,
Ijoni Hilda Costabeber^d, María José González^{a*}**

^a Department of Instrumental Analysis and Environmental Chemistry, IQOG (CSIC), Juan de la Cierva 3, 28006 Madrid, Spain

^b Department of Food Science and Technology, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Av. Roraima 1000, Prédio 42, Sala 3135, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil

^c CAPES Foundation, Ministry of Education of Brazil, 70040-020, Brasília, DF, Brazil

^d Department of Morphology, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Av. Roraima 1000, Prédio 19, Sala 3201, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil

*Correspondence author. Tel.: +34 91 5622900; Fax: +34 91 5644853 (M. J. González).

Email addresses: susana@viamicro.com.br (S. Mohr), a.garcia-bermejo@iqog.csic.es (A. García-Bermejo), lherrero@iqog.csic.es (L. Herrero), bgomara@iqog.csic.es (B. Gómara), ijonicostabeber@gmail.com (I. H. Costabeber), mariche@iqog.csic.es (M. J. González).

ABSTRACT

The polychlorinated dibenzo-*p*-dioxin (PCDD), dibenzofuran (PCDF) and dioxin-like polychlorinated biphenyl (DL-PCB) contents of 16 commercial honey samples collected in four different states of Brasil in 2010 and 2011 were investigated for the first time. Mean DL-PCB concentrations ranged from 24.3 to 260 pg g⁻¹ fresh weight (f.w.). The 2,3,7,8 substituted PCDD/F mean current levels ranged from <LOD to 5.40 pg g⁻¹ f.w. Toxic equivalent quantities (WHO-TEQ) ranged from 0.002 to 0.343 pg WHO-TEQ g⁻¹ f.w. The most remarkable findings of this study were the presence of DL-PCBs and the high contribution of DL-PCBs to total WHO-TEQs in all investigated samples. OCDD and OCDF were detected in 50 % and 31% of the samples, respectively. PeCDD/Fs, HxCDD/Fs, and 1,2,3,4,7,8,9-HpCDF were not detected in any sample. No significant differences among PCDD/F and DL-PCB concentrations between different states were found.

Keywords: Honey; PCDDs; PCDFs; DL-PCBs; GC-MS/MS-QqQ; Brazil.

1. Introduction

The term “dioxins” refers to a group of 75 polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins (PCDDs) and 135 polychlorinated dibenzofuran (PCDFs) congeners, of which 17 are considered to be biologically active (Van den Berg et al., 2006). Polychlorinated biphenyls (PCBs) are structurally related to dioxins and have similar chemical and physical properties. They were widely manufactured from the 1930s to the 1970s for a range of industrial applications. There are 209 theoretically possible PCB congeners, of which 12 coplanar (non-*ortho* and mono-*ortho* chlorinated substituted) congeners exhibit similar biological activity to PCDDs and PCDFs and are therefore referred to as “dioxin-like” PCBs (Pazerfall, 2002; Safe, 1990). In 2006, the World Health Organization (WHO) re-validated the toxicity equivalent factors (TEFs) assigned to dioxins and dioxin-like PCBs for the calculation of the toxic equivalent quantities (TEQs) (Van den Berg et al, 2006).

For the general population, dietary intake is the main route of PCDD/Fs and PCBs exposure, contributing with more than 90% to the daily exposure (Hays & Aylward, 2003; Sweetman, Alcock, Wittsiepe & Jones, 2000). Public concern over the adverse health effects of these toxicants at this time has been intensified by a number of dioxin contamination incidents involving food and feedstuffs (Bernard et al., 2002; Malisch, 2000). Reports concerning toxicological aspects have led to a re-valuation of the tolerable daily intake (TDI) of dioxins (Van Leeuwen, Feeley, Schrenk, Larsen, Farland & Younes, 2000) and have prompted wide-ranging efforts and the tightening of regulations to reduce dioxin release into the environment (EC/76/2000). To prevent the health risk from dioxin exposure, the European Commission has recently established maximum permissible levels of dioxins and dioxin-like polychlorinated biphenyls (PCBs) in foods (EC/1881/2006; EC/565/2008).

Honey is a natural product produced by *Apis mellifera* bees from the nectar or secretions of plants, and has been consumed by many people around the world as a natural food, in medical therapies, and as an alimentary supplement. Its chemical composition is variable, due to contribution of the plant, climate, environmental conditions and the ability of the beekeeper (White, 1978). Nowadays, bee products are being produced in an environment polluted by different sources of contamination, which can be transported by honeys bees to the hive and incorporated into honey (Tomasini, Sampaio, Caldas, Buffon, Duarte & Primel, 2012). It is difficult to protect food and animal feed from the sources of toxic chemicals ubiquitous in the environment (Kim, M., Kim, D., Bong, Jang & Son, 2013), particularly in the case of honey, since honeybees travel long distances and come close to many plants.

Residues of some POPs have been found in honey samples, such as organochlorine pesticides (Kujawski, Pinteaux & Namiesnik, 2012; Tsiropoulos & Amvrazi, 2011; Wang, Kliks, Jun & Li, 2010) and non-dioxin-like polychlorinated biphenyls (NDL-PCBs) (Erdogrul, 2007; Herrera et al., 2005). But no data regarding PCDDs, PCDFs, and DL-PCBs levels in honeys have been reported in the related literature.

We present here, for the first time, the DL-PCBs, PCDDs, and PCDFs concentrations found in honey samples commercially available in Brazil markets in 2010 and 2011. The differences in dioxin and DL-PCB concentrations among Brazil States were also reported. Finally, the results were compared with those found in other surveys conducted in Brazil and other countries.

2. Experimental

2.1. Standards and reagents

All reagents used for the analysis were of trace analysis grade. Ethyl acetate and petroleum ether, both Pestipur grade, were supplied from Carlo Erba (Milan, Italy). *n*-hexane, sulphuric acid (95-97%) and silica gel 60 were supplied from Merck Co. (Darmstadt, Germany), granular anhydrous sodium sulphate from J.T. Baker (Deventer, The Netherlands), and ENVI-Carb tubes from Supelco (Bellefonte, Pennsylvania, USA). The water used was purified by a Milli-Q water system (Millipore, USA). Standards of native and $^{13}\text{C}_{12}$ labelled PCB, PCDD and PCDF congeners were purchased from Wellington Laboratories (Ontario, Canada).

2.2. PCB and PCDD/F congeners analysed

A total of twelve individual DL-PCB congeners were analysed, which have been assigned a toxic equivalency factor by the WHO (the non-*ortho* PCBs 77, 81, 126, and 169, and the mono-*ortho*-substituted PCBs 105, 114, 118, 123, 156, 157, 167, and 189), named according to IUPAC nomenclature (Ballschmiter & Zell, 1980). Individual concentrations of the 17 2,3,7,8-substituted toxic congeners were reported for PCDD/Fs.

2.3. Sampling collection

Sixteen honey samples were collected between August 2010 and September 2011, purchased in different supermarkets of Brazil. Samples were from four Brazilian States: Rio Grande do Sul (H-1 to H-4), Santa Catarina (H-5 to H-8), Paraná (H-9 to H-12), and São Paulo (H-13 to H-16). The samples were of different botanical origin, transported to the laboratory, and stored at room temperature in a fresh and dark place until analysis.

2.4. Analytical procedure

2.4.1. Sample preparation

The samples were extracted by liquid-liquid extraction as described in detail elsewhere (Blasco, Lino, Picó, Pena, Font & Silveira, 2004), with a few modifications. Approximately 10 g of sample was homogenate with Milli-Q[®] water and spiked with a mixture containing 11 ¹³C₁₂-labeled PCBs at 50 pg μL⁻¹ and 15 ¹³C₁₂-labeled 2,3,7,8-substituted PCDDs and PCDFs at 100-200 pg μL⁻¹. Afterwards, 10 mL of ethyl acetate and petroleum ether (9:1, v/v) was added and the sample was vortexed for 1 min. The mixture was centrifuged (3800 rpm, 10 min) for phase separation, and the organic phase was collected. The extraction procedure was repeated two more times, and the organic phases were combined and evaporated up to approximately 1 mL. Further cleanup step was performed by using acid impregnated silica gel multilayer columns, using *n*-hexane as elution solvent. The elution solvent was evaporated up to approximately 1 mL in a rotary evaporator and the final fractionation among the different families was achieved by using Supelclean[™] Supelco ENVI[™]-Carb tubes. Three fractions were eluted: the first one contained the mono-*ortho*-substituted PCBs, the second the non-*ortho* PCBs, and the last fraction the PCDD/Fs congeners. A standard solution of 50 pg μL⁻¹ of ¹³C₁₂-labeled PCBs 70, 111, 138, and 170 was used as injection standard for recoveries calculation of the labeled PCBs added as surrogates, as well as a standard solution of 200 pg μL⁻¹ of ¹³C₁₂-labeled 1,2,3,4-tetrachloro-dibenzo-*p*-dioxin and 1,2,3,7,8,9-hexachloro-dibenzo-*p*-dioxin was used as injection standard for recoveries calculation of the labeled PCDDs and PCDFs added as surrogates.

2.4.2. Instrument analysis

The sample extracts were analysed by GC-QqQ-MS/MS on a TRACE GC Ultra (Thermo Fisher Scientific, Milan, Italy) coupled to a TSQ Quantum XLS triple quadrupole mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany), operating in EI mode (40

eV electron energy). Injections were performed in the PTV mode (1 μ l; 80 °C, hold for 0.05 min, then to 275 °C at 10 °C seg⁻¹, hold for 1.2 min, and then to 300 °C at 10 °C seg⁻¹, hold for 37 min; splitless time: 1.2 min) in a capillary HP-5ms column (30 m, 0.25 mm i.d., 0.25 μ m film thickness) purchased from Agilent Technologies (Palo Alto, CA, USA). For PCB analysis, the temperature program was as follows: initial temperature of 90 °C (2 min), first ramp at 15 °C min⁻¹ to 160 °C, second ramp at 4 °C min⁻¹ to 225 °C, third ramp at 7 °C min⁻¹ to 290 °C and the final ramp was 10 °C min⁻¹ to 310 °C, which was held constant for 10 min. For PCDD/Fs analysis, the column temperature was programmed from 90 °C (4 min) to 160 °C at a rate of 15 °C min⁻¹, then to 225 °C at 4 °C min⁻¹ and then to 290 °C (4 min) at 7 °C min⁻¹. Helium was used as the carrier gas at a constant flow rate of 1.2 and 0.8 mL min⁻¹ for PCB and PCDD/F analysis, respectively. The temperature of the transfer line and the MS source were set as 290° and 240 °C, respectively. The mass spectrometer was operated in multiple reaction monitoring (MRM), with two transitions monitored using argon as the collision gas, which was set to 1 mTorr for all the analyses. The MS/MS collision energy and the ion transitions monitored were optimized for each compound individually for identification and quantification, as shown in Tables 1a and 1b (García-Bermejo, Ábalos, Sauló, Abad, González & Gómara, 2011). Isotope dilution technique was used as quantification method.

2.5. Quality control and assurance

All analyses such as blanks, recoveries, and parallel analyses were complied with analytical standards as recommended by the EU Commission in the directive for measuring dioxins in food (EC/1883/2006). A method blank in each set of analysis (three analyses and a blank) was carried out. To eliminate interferences in blanks, all the glassware, chemicals, solvents, and equipment used during extraction and clean-up procedures as well as the

instrumentation used have been routinely checked. Satisfactory repeatability and intermediate precision were achieved when analyzing standard solutions, with relative standard deviation (RSDs) generally below 10 and 19%, respectively. Recoveries for the spiked compounds were in range established by the EPA as acceptable for the PCBs (40 to 87%) and 2,3,7,8-PCDD/Fs (42 to 90%). Method detection limits (LOD) for the honey samples were in the range 0.008 to 0.17 pg g^{-1} for PCBs, and 0.018 to 0.141 pg g^{-1} for PCDD/Fs, respectively. Our laboratory has participated in different international inter-laboratory studies and several international quality control studies for the analysis of PCBs and PCDD/Fs in different food matrices (Becher, Nicolaysen & Thomsen, 2007-2009). The results were consistent at all times with the consensus means given by the inter-laboratory organization.

2.6. Statistical analysis

The non-parametric Kruskal-Wallis ANOVA test was performed to verify significant differences ($p \leq 0.05$) of contaminants in honeys among the States of origin. For samples with concentration below LOD, $\frac{1}{2}$ LOD was used for the calculations. The Statistica software package (version 7, Statisoft[®]) was used to run the statistical analysis.

3. Results and discussion

Table 2 shows the mean and range of concentrations of the 12 DL-PCB and 17 PCDD/F congeners analysed, along with their frequencies of detection (concentrations above DL) in the studied samples.

For DL-PCBs, the highest overall frequency of detection corresponds to PCBs 118, 77, and 81, which were detected in 100% of all the analysed samples, with mean concentrations of 71.8 pg g^{-1} f.w., 4.35 pg g^{-1} f.w., and 0.32 pg g^{-1} f.w., respectively. PCBs

105, 156, and 167 were detected in 93% of the samples, followed by PCBs 123 (87%), 114 (75%), 157 (62%), and 189 (43%).

Regarding to the PCDD/Fs, the congeners 2,3,7,8-TCDD and -TCDF, as well as 1,2,3,4,6,7,8-HpCDD and -HpCDF, were detected in one sample, and the Penta and Hexa congeners were detected in none of them. The highest mean concentrations and frequency were for OCDD, which was detected in 50% of the samples (mean of 0.29 pg g⁻¹), followed by OCDF in 31% of the samples (mean 0.02 pg g⁻¹).

The concentrations of DL-PCBs, PCDDs and PCDFs, expressed as pg of WHO-TEQ g⁻¹ fresh weight in the honey samples analysed, were shown in Table 3. The WHO-TEQ levels ranged between 0.002 to 0.343 pg g⁻¹, with a mean of 0.049 pg g⁻¹. Non-*ortho*-PCBs exhibited the higher mean (0.025 pg g⁻¹), followed by PCDDs (0.021 pg g⁻¹), and mono-*ortho*-PCBs (0.003 pg g⁻¹). It is important to note the high WHO-TEQ values found in one of the analyzed sample (H-10), which was due to the presence of 2,3,7,8-TCDD (0.331 pg g⁻¹), since this compound has the highest TEF value. This sample is from Paraná State, which also has the highest Total WHO-TEQ mean values (0.10 pg g⁻¹), followed by Total WHO-TEQs values found in Santa Catarina (0.05 pg g⁻¹), Rio Grande do Sul (0.03 pg g⁻¹), and São Paulo State (0.02 pg g⁻¹) (Fig. 1). On the other hand, no statistically significant differences ($p \leq 0.05$) were found among the concentration levels, expressed in WHO-TEQ values, found in different States.

This study is the first to report the concentration levels of DL-PCBs, PCDDs, and PCDFs in honey samples. So, it is difficult to compare the results obtained in the present study with those found in other similar studies. The levels found in the honey samples of the present study were in the lowest range levels when they are compared with studies performed with fatty-foods (De Filippis et al., 2013; Gómara et al., 2005; Song et al., 2011; Zhang et al., 2008), and non-fatty foods found in the related literature (Grassi, Fattore, Generoso, Fanelli,

Arvati & Zuccato, 2010; Marin, Villalba, Diaz-Ferrero, Font & Yusà, 2011; Song et al., 2011). Regarding to the levels that were found, Brazilian legislation has not established limits to DL-PCBs, PCDDs, and PCDFs in honeys.

4. Conclusions

It is the first time that the presence of PCDDs, PCDFs, and DL-PCBs in commercial honeys from Brazil has been reported. Although the concentrations levels were very low, it is important to note that all analysed samples were contaminated by some DL-PCB, while 63% were contaminated by some PCDD/Fs. Regarding to WHO-TEQ concentrations, Non-*ortho* PCBs have the higher contribution, followed by PCDDs, Mono-*ortho* PCBs and PCDFs. The most important finding of this study is to have detected the presence of some of the most toxic congeners of PCDD/Fs and most of the DL-PCBs, on a substrate, such as honeys, should be free of this type of contaminants. Honey samples from Paraná State presented the highest dioxin and DL-PCBs levels, although no significant differences among Brazil States were found. As it was suggested for another POPs and pesticides, honey could be used as “sentinel” samples for DL-PCBs, PCDDs, and PCDFs environmental contamination.

Acknowledgments

This study was supported by the CM (Spain) and European funding from FEDER programme (Project S2009/AGR-1464, ANALISYC-II) and AGL2009-09733 Spanish National Project. S. Mohr was supported by a scholarship from the CAPES Foundation, Ministry of Education of Brazil (Process 9899/11-1). A. García-Bermejo wishes to thank Spanish Ministry of Education and Science for his Ph.D. grant.

References

- Ballschmiter, K., & Zell, M. (1980). Analysis of polychlorinated biphenyls (PCB) by glass capillary gas chromatography. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 302, 20-31.
- Becher, G., Nicolaysen, T., & Thomsen, C. (2007-2009). Interlaboratory Comparison on Dioxins in Food 2006-2008. National Institute of Public Health: Folkehelse, Final Report 7, 8, 9; Oslo, Norway.
- Bernard, A., Breockaert, F., de Poorter, G., de Cock, A., Hermans, C., Seagerman, C., et al. (2002). The Belgian PCB/Dioxin crisis: analysis of the food chain contamination and health risk evaluation. *Environmental Research Section A*, 88, 1-18.
- Blasco, C., Lino, C.M., Picó, Y., Pena, A., Font, G., & Silveira, M.I.N. (2004). Determination of organochlorine pesticide residues in honey from the central zone of Portugal and the Valencian community of Spain. *Journal of Chromatography A*, 1049, 155-160.
- De Filippis, S.P., Chirollo, C., Brambilla, G., Anastasio, A., Sarnelli, P., De Felip, E., et al. (2013). Polychlorodibenzodioxin and -furan and dioxin-like polychlorobiphenyl distribution in tissues and dairy products of dairy buffaloes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 6552-6561.
- Erdogrul, Ö. (2007). Levels of selected pesticides in honey samples from Kahramanmaras, Turkey. *Food Control*, 18, 866-871.
- Commission Regulation (EC) No 76/2000/EC setting maximum levels for dioxins in emissions of municipal waste incinerators. *Official Journal of the European Communities*, L 321, 91-100.
- Commission Regulation (EC) No 1881/2006/EC setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Official Journal of the European Communities*, L 364.

Commission Regulation (EC) No 565/2008/EC of 18 June 2008, amending Regulation (EC) No 1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards the establishment of a maximum level for dioxins and PCBs in fish live. *Official Journal of the European Communities, L 160*.

Commission Regulation (EC) No 1883/2006 of 19 December 2006 laying down methods of sampling and analysis for the official control of levels of dioxins and dioxin-like PCBs in certain foodstuffs.

García-Bermejo, Á., Ábalos, M., Sauló, J., Abad, E., González, M.J., & Gómara, B. (2011). Feasibility of triple-quadrupole GC-MS/MS as an alternative technique to GC-HRMS for the analysis of PCDD/Fs and DL-PCBs in food and feedstuff samples. *Organohalogen Compounds, 73*, 653-656.

Gómara, B., Bordajandi, L.R., Fernández, M.A., Herrero, L., Abad, E., Abalos, M., et al. (2005). Levels and trends of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins/furans (PCDD/Fs) and dioxin-like polychlorinated biphenyls (PCBs) in Spanish commercial fish and shellfish products, 1995-2003. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53*, 8406-8413.

Grassi, P., Fattore, E., Generoso, C., Fanelli, R., Arvati, M., & Zuccato, E. (2010). Polychlorobiphenyls (PCBs), polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins (PCDDs) and dibenzofurans (PCDFs) in fruit and vegetables from an industrial area in northern Italy. *Chemosphere, 79*, 292-298.

Hays, S.M., & Aylward, L.L. (2003). Dioxin risk in perspective: past, present, and future. *Regulatory Toxicology and Pharmacology, 37*, 202-217.

Herrera, A., Pérez-Arquillué, C., Conchello, P., Bayarri, S., Lázaro, R., Yagüe, C., et al. (2005). Determination of pesticides and PCBs in honey by solid-phase extraction cleanup followed by gas chromatography with electron-capture and nitrogen-phosphorus detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry, 381*, 695-701.

- Kim, M., Kim, D., Bong, Y.H., Jang, J., & Son, S. (2013) Concentrations of PCDD/Fs, dioxin-like PCBs, PBDEs, and hexachlorobenzene in fat samples from cattle of different ages and gender in Korea. *Food Chemistry*, *138*, 1786-1791.
- Kujawski, M.W., Pinteaux, E., & Namiesnik, J. (2012). Application of dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of selected organochlorine pesticides in honey by gas chromatography-mass spectrometry. *European Food Research and Technology*, *234*, 223-230.
- Malisch, R. (2000). Increase of the PCDD/F-contamination of milk, butter and meat samples by use of contaminated citrus pulp. *Chemosphere*, *40*, 1041-1053.
- Marin, S., Villalba, P., Diaz-Ferrero, J., Font, G., & Yusà, V. (2011). Congener profile, occurrence and estimated dietary intake of dioxins and dioxin-like PCBs in foods marketed in the Region of Valencia (Spain). *Chemosphere*, *82*, 1253-1261.
- Pazerfall, W. (2002). Risk assessment of dioxins contamination in human food. *Food and Chemical Toxicology*, *40*, 1185-1189.
- Safe, S. (1990). Polychlorinated biphenyls (PCBs), dibenzo-*p*-dioxins (PCDDs), dibenzofurans (PCDFs) and related compounds: Environmental and mechanistic considerations which support the development of toxic equivalency factors (TEFs). *Critical Reviews in Toxicology*, *21*, 51-88.
- Song, Y., Wu, N., Han, J., Shen, H., Tan, Y., Ding, G., et al. (2011). Levels of PCDD/Fs and DL-PCBs in selected foods and estimated dietary intake for the local residents of Luqiao and Yuhang in Zhejiang, China. *Chemosphere*, *85*, 329-334.
- Sweetman, A.J., Alcock, R.E., Wittsiepe, J., & Jones, K.C. (2000). Human exposure to PCDD/Fs in the UK: the development of a modeling approach to give historical and future perspectives. *Environment International*, *26*, 37-47.

- Tomasini, D., Sampaio, M.R.F., Caldas, S.S., Buffon, J.G., Duarte, F.A., & Primel, E.G. (2012). Simultaneous determination of pesticides and 5-hydroxymethylfurfural in honey by the modified QuEChERS method and liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Talanta*, *99*, 380-386.
- Tsiropoulos, N.G., & Amvrazi, E.G. (2012). Determination of pesticide residues in honey by single-drop microextraction and gas chromatography. *Journal of AOAC International*, *94*, 634-644.
- United Nations Environment Programme (UNEP) (2001). Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants.
- Van den Berg, M., Birnbaum, L.S., Denison, M., De Vito, M., Farland, W., Feeley, M., et al. (2006). The 2005 World Health Organization reevaluation of human and mammalian Toxic Equivalency Factors for dioxins and dioxin-like compounds. *Toxicological Sciences*, *93*, 223-241.
- Van Leeuwen, F.X.R., Feeley, M., Schrenk, D., Larsen, J.C., Farland, W., & Younes, M. (2000). Dioxins: WHO's tolerable daily intake (TDI) revisited. *Chemosphere*, *40*, 1095-1101.
- Wang, J., Klils, M.M., Jun, S., & Li, Q.X. (2010). Residues of organochlorine pesticides in honeys from different geographic regions. *Food Research International*, *43*, 2329-2334.
- White, J.W. (1978). Honey. *Advances in Food Research*, *24*, 287-374.
- World Health Organization (WHO) (1993). Polychlorinated biphenyls and terphenyls; Environment Health Criteria: 140, 2nd ed., Geneva: World Health Organization, 682p.
- Zhang, J., Jiang, Y., Zhou, J., Fang, D., Jiang, J., Liu, G., et al. (2008). Concentrations of PCDD/PCDFs and PCBs in retail foods and an assessment of dietary intake for local population of Shenzhen in China. *Environment International*, *34*, 799-803.

Table 1a

Chromatographic segments, retention times, MRM transitions and CID voltages selected for native DL-PCBs.

| Segment No. | Time (min) | Congener | Precursor ion | Product ion | CID (V) | | |
|-------------|-------------|----------|---------------|-------------|---------|-----|----|
| 1 | 21.0 - 22.8 | PCB 77 | 290 | 220 | 23 | | |
| | | | 292 | 222 | 24 | | |
| | | PCB 81 | 290 | 220 | 23 | | |
| | | | 292 | 222 | 24 | | |
| 2 | 22.8 - 26.2 | PCB 123 | 326 | 254 | 25 | | |
| | | | 328 | 256 | 26 | | |
| | | PCB 118 | 326 | 254 | 25 | | |
| | | | 328 | 256 | 25 | | |
| | | PCB 114 | 326 | 254 | 23 | | |
| | | | 328 | 256 | 25 | | |
| | | PCB 105 | 326 | 254 | 25 | | |
| | | | 328 | 256 | 26 | | |
| | | PCB 126 | 326 | 254 | 24 | | |
| | | | 328 | 256 | 26 | | |
| | | 3 | 26.2 - 29.4 | PCB 167 | 360 | 290 | 26 |
| | | | | | 362 | 290 | 27 |
| PCB 156 | 360 | | | 290 | 26 | | |
| | 362 | | | 290 | 26 | | |
| PCB 157 | 360 | | | 290 | 26 | | |
| | 362 | | | 290 | 26 | | |
| PCB 169 | 360 | | | 290 | 25 | | |
| | 362 | | | 290 | 25 | | |
| 4 | 29.4 - 32.0 | PCB 189 | 394 | 324 | 27 | | |
| | | | 396 | 326 | 26 | | |

Table 1b

Chromatographic segments, retention times, MRM transitions and CID voltages selected for native PCDD/Fs.

| Segment No. | Time (min) | Congener | Precursor ion | Product ion | CID (V) | | |
|-------------------|-------------|---------------------|---------------|-------------------|---------|-----|----|
| 1 | 24.0 - 27.0 | 2,3,7,8-TCDF | 304 | 241 | 28 | | |
| | | | 306 | 243 | 27 | | |
| | | 2,3,7,8-TCDD | 320 | 257 | 21 | | |
| | | | 322 | 259 | 20 | | |
| 2 | 27.0 - 30.0 | 1,2,3,7,8-PeCDF | 340 | 277 | 27 | | |
| | | | 342 | 279 | 25 | | |
| | | 2,3,4,7,8-PeCDF | 340 | 277 | 27 | | |
| | | | 342 | 279 | 25 | | |
| | | 1,2,3,7,8-PeCDD | 356 | 293 | 19 | | |
| | | | 358 | 295 | 20 | | |
| | | 3 | 30.0 - 32.4 | 1,2,3,4,7,8-HxCDF | 374 | 311 | 28 |
| | | | | | 376 | 313 | 28 |
| 1,2,3,6,7,8-HxCDF | 374 | | | 311 | 29 | | |
| | 376 | | | 313 | 28 | | |
| 2,3,4,6,7,8-HxCDF | 374 | | | 311 | 28 | | |
| | 376 | | | 313 | 29 | | |
| 1,2,3,4,7,8-HxCDD | 390 | | | 327 | 17 | | |
| | 392 | | | 329 | 20 | | |
| 1,2,3,6,7,8-HxCDD | 390 | | | 327 | 19 | | |
| | 392 | | | 329 | 19 | | |
| 1,2,3,7,8,9-HxCDD | 390 | | | 327 | 20 | | |
| | 392 | | | 329 | 17 | | |
| 1,2,3,7,8,9-HxCDF | 374 | | | 311 | 28 | | |
| | 376 | | | 313 | 29 | | |
| 4 | 32.4 - 35.2 | 1,2,3,4,6,7,8-HpCDF | 408 | 345 | 29 | | |
| | | | 410 | 347 | 29 | | |
| | | 1,2,3,4,6,7,8-HpCDD | 424 | 361 | 20 | | |
| | | | 426 | 363 | 20 | | |
| | | 1,2,3,4,7,8,9-HpCDF | 408 | 345 | 27 | | |
| | | | 410 | 347 | 28 | | |
| 5 | 35.2 - 37.0 | OCDD | 458 | 395 | 19 | | |
| | | | 470 | 397 | 18 | | |
| | | OCDF | 442 | 379 | 27 | | |
| | | | 444 | 381 | 27 | | |

Table 2

Concentrations of DL-PCBs and PCDD/Fs (expressed in pg g^{-1} f.w.) in honey samples from Brazil ($n=16$).

| Congener | Mean | SD | Median | Range | % Positive samples (n) |
|---|-------------|-------------|-------------|---------------------|----------------------------|
| <i>PCBs</i> | | | | | |
| PCB 77 | 4.35 | 5.33 | 2.35 | 0.80-21.7 | 100% (16) |
| PCB 81 | 0.32 | 0.54 | 0.12 | 0.03-1.82 | 100% (16) |
| PCB 105 | 17.9 | 12.9 | 14.5 | <LOD-47.3 | 94% (15) |
| PCB 114 | 0.71 | 0.72 | 0.43 | <LOD-2.27 | 75% (12) |
| PCB 118 | 71.8 | 39.6 | 61.6 | 18.7-169 | 100% (16) |
| PCB 123 | 4.07 | 5.69 | 1.25 | <LOD-17.7 | 88% (14) |
| PCB 126 | 0.23 | 0.22 | 0.15 | <LOD-0.90 | 94% (15) |
| PCB 156 | 4.52 | 2.85 | 3.89 | <LOD-9.53 | 94% (15) |
| PCB 157 | 0.30 | 0.28 | 0.20 | <LOD-0.81 | 63% (10) |
| PCB 167 | 3.94 | 3.27 | 2.64 | <LOD-8.15 | 94% (15) |
| PCB 169 | 0.06 | 0.14 | 0.01 | <LOD-0.55 | 31% (5) |
| PCB 189 | 0.09 | 0.15 | 0.02 | <LOD-0.55 | 44% (9) |
| ΣMono-ortho-PCBs | 103 | 60.9 | 74.7 | 23.3-251 | 100% (16) |
| ΣNon-ortho-PCBs | 4.96 | 5.93 | 2.92 | 0.98-23.6 | 100% (16) |
| Total PCBs | 108 | 61.4 | 85.3 | 24.3-260 | 100% (16) |
| <i>PCDD/Fs</i> | | | | | |
| 2,3,7,8-TCDF | 0.001 | 0.01 | 0.00 | <LOD-0.02 | 6% (1) |
| 2,3,7,8-TCDD | 0.02 | 0.08 | 0.00 | <LOD-0.32 | 6% (1) |
| 1,2,3,7,8-PeCDF | nd | nd | nd | nd | nd |
| 2,3,4,7,8-PeCDF | nd | nd | nd | nd | nd |
| 1,2,3,7,8-PeCDD | nd | nd | nd | nd | nd |
| 1,2,3,4,7,8-HxCDF | nd | nd | nd | nd | nd |
| 1,2,3,6,7,8-HxCDF | nd | nd | nd | nd | nd |
| 2,3,4,6,7,8-HxCDF | nd | nd | nd | nd | nd |
| 1,2,3,4,7,8-HxCDD | nd | nd | nd | nd | nd |
| 1,2,3,6,7,8-HxCDD | nd | nd | nd | nd | nd |
| 1,2,3,7,8,9-HxCDD | nd | nd | nd | nd | nd |
| 1,2,3,7,8,9-HxCDF | nd | nd | nd | nd | nd |
| 1,2,3,4,6,7,8-HpCDF | 0.004 | 0.02 | 0.00 | <LOD-0.07 | 6% (1) |
| 1,2,3,4,6,7,8-HpCDD | 0.09 | 0.38 | 0.00 | <LOD-1.51 | 6% (1) |
| 1,2,3,4,7,8,9-HpCDF | nd | nd | nd | nd | nd |
| OCDD | 0.29 | 0.05 | 0.00 | <LOD-3.58 | 50% (8) |
| OCDF | 0.02 | 0.05 | 0.00 | <LOD-0.18 | 31% (5) |
| ΣPCDDs | 0.40 | 1.34 | 0.02 | <LOD-5.40 | 50% (8) |
| ΣPCDFs | 0.03 | 0.05 | 0.00 | <LOD-0.18 | 38% (6) |
| Total PCDD/Fs | 0.43 | 1.33 | 0.06 | <LOD-5.40 | 63% (10) |

Table 3

Concentrations of DL-PCBs, PCDDs and PCDFs (expressed in pg of WHO-TEQ g⁻¹ f.w.) in the honey samples from Brazil, in the Lower Bond Determination Level (ND = 0).

| Sample | Mono- <i>ortho</i> PCBs | Non- <i>ortho</i> PCBs | PCDDs | PCDFs | Total WHO- TEQ |
|-----------|----------------------------|---------------------------|---------------|---------------|-------------------|
| H-1 | 0.002 | 0.055 | 0.000 | 0.000 | 0.057 |
| H-2 | 0.008 | 0.042 | 0.000 | 0.000 | 0.049 |
| H-3 | 0.002 | 0.008 | 0.000 | 0.000 | 0.010 |
| H-4 | 0.002 | 0.009 | 0.000 | 0.000 | 0.011 |
| H-5 | 0.002 | 0.097 | 0.000 | 0.000 | 0.099 |
| H-6 | 0.002 | 0.032 | 0.000 | 0.000 | 0.034 |
| H-7 | 0.002 | 0.014 | 0.000 | 0.000 | 0.016 |
| H-8 | 0.005 | 0.031 | 0.000 | 0.000 | 0.036 |
| H-9 | 0.005 | 0.022 | 0.000 | 0.001 | 0.028 |
| H-10 | 0.003 | 0.009 | 0.331 | 0.000 | 0.343 |
| H-11 | 0.002 | 0.016 | 0.000 | 0.000 | 0.017 |
| H-12 | 0.006 | 0.012 | 0.000 | 0.002 | 0.020 |
| H-13 | 0.001 | 0.012 | 0.000 | 0.000 | 0.012 |
| H-14 | 0.002 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.002 |
| H-15 | 0.003 | 0.034 | 0.000 | 0.000 | 0.037 |
| H-16 | 0.004 | 0.008 | 0.000 | 0.000 | 0.012 |
| Mean (SD) | 0.003 (0.002) | 0.025 (0.024) | 0.021 (0.083) | 0.000 (0.001) | 0.049 (0.082) |
| Range | 0.001 - 0.008 | 0.000 - 0.097 | 0.000 - 0.331 | 0.000 - 0.002 | 0.002 - 0.343 |

SD: standard deviation.

H-1 to H-4 (RS); H-5 to H-8 (SC); H-9 to H-12 (PR); H-13 to H-16 (SP).

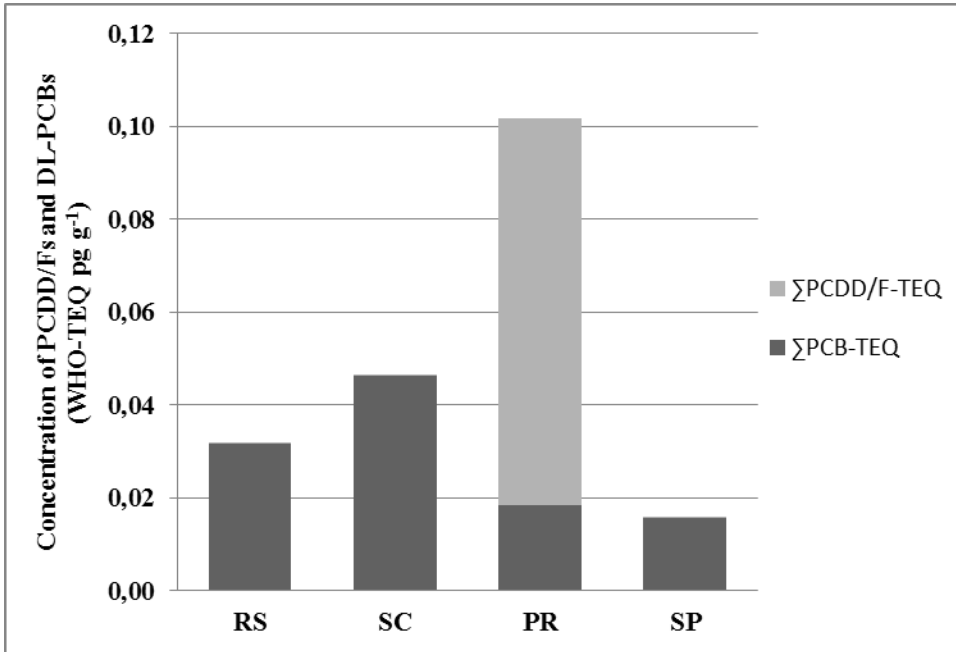


Fig. 1. Mean of WHO-TEQ values for PCDD/Fs and DL-PCBs in honey samples from Brazil according to the State of origin. RS: Rio Grande do Sul; SC: Santa Catarina; PR: Paraná; SP: São Paulo.

4.4 Artigo 1

LEVELS OF BROMINATED FLAME RETARDANTS (BFRs) IN HONEY SAMPLES FROM DIFFERENT GEOGRAPHIC REGIONS

MOHR, Susana; GARCÍA-BERMEJO, Ángel; HERRERO, Laura; GÓMARA, Belén; COSTABEBER, Ijoni Hilda; GONZÁLEZ, María José. Levels of brominated flame retardants (BFRs) in honey samples from different geographic regions. **Science of the Total Environment**, v. 472, p. 741-745, 2014. doi: 10.1016/j.scitotenv.2013.11.035.



Contents lists available at ScienceDirect

Science of the Total Environment

journal homepage: www.elsevier.com/locate/scitotenv

Short Communication

Levels of brominated flame retardants (BFRs) in honey samples from different geographic regions



Susana Mohr^{a,b,c}, Ángel García-Bermejo^a, Laura Herrero^a,
Belén Gómara^a, Ijoni Hilda Costabeber^d, María José González^{a,*}

^a Department of Instrumental Analysis and Environmental Chemistry, IQQG (CSIC), Juan de la Cierva 3, 28006 Madrid, Spain

^b Department of Food Science and Technology, Federal University of Santa Maria (UFSM), Roraima 1000#2, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil

^c CAPES Foundation, Ministry of Education of Brazil, 70040-020 Brasília, DF, Brazil

^d Department of Morphology, Federal University of Santa Maria (UFSM), Roraima 1000/19, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil

HIGHLIGHTS

- Differences among BFR levels and profiles were found in honeys from different countries.
- BDE-47 was the predominant BFR in honeys from Slovenia, Spain and Portugal.
- BTBPE and DBDPE were the most abundant BFRs in honeys from Brazil and Morocco.

ARTICLE INFO

Article history:

Received 1 October 2013

Received in revised form 5 November 2013

Accepted 5 November 2013

Available online xxxxx

Keywords:

Honey

BFRs

PBDEs

BTBPE

DBDPE

ABSTRACT

Concentrations of 17 brominated flame retardants (BFRs), including two “novel” BFRs (1,2-bis(2,4,6-tribromophenoxy)ethane, BTBPE and decabromodiphenylethane, DBDPE), have been determined to be in 35 commercial honey samples from Brazil, Spain, Portugal, Slovenia and Morocco. The results revealed the presence of low amounts (between < LOD to 24.7 pg g⁻¹ fresh weight) of individual BFRs. The highest total BFR concentrations were found in Brazilian honeys (mean of 5.19, range of 0.46–25.2 pg g⁻¹ f.w.), followed by Moroccan (mean of 4.40, range of 2.49–8.0 pg g⁻¹ f.w.), Portuguese (mean of 2.24, range of 1.33–3.81 pg g⁻¹ f.w.), Spanish (mean of 1.77, range of 0.49–2.96 pg g⁻¹ f.w.), and Slovenian (mean of 0.93, range of 0.75–1.09 pg g⁻¹ f.w.) honey samples. The most remarkable findings in this study were the large contribution of the low brominated PBDEs, principally BDE-47, found in honey samples from Slovenia, Spain and Portugal. Meanwhile the most abundant BFRs found in Brazilian and Moroccan honeys were the two novel BFRs (BTBPE and DBDPE). The detection of BFRs in honeys from different countries highlights the risk that their presence poses to the health of humans and wildlife since honey is a non-fatty natural product that is highly consumed all over the world.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Brominated flame retardants (BFRs), especially polybrominated diphenyl ethers (PBDEs), are used to protect people from fires by reducing the flammability of combustible materials (Domingo, 2012). They have been found to be increasingly present in human tissues throughout the world, mainly due to their wide range of industrial applications (Frederiksen et al., 2009) and their persistence and lipophilic nature which makes them concentrate in the food chain, and thus accumulate in the human body (Gómara et al., 2011; Jakobsson et al., 2012).

PBDEs are commercialized as technical mixtures named Deca-BDE, Octa-BDE and Penta-BDE which contain different PBDE congeners (Rahman et al., 2001). Similar to other Persistent Organic Pollutants (POPs), they can have teratogenic, mutagenic, and carcinogenic effects on wildlife and humans (Darnerud, 2003). Consequently, the European Union (EU) introduced new regulations to restrict or ban the usage of Penta-BDE and Octa-BDE technical mixtures (Directive, 2003/11/EC), which have also been added to the list of Stockholm Convention POPs (Convention, 2009a, Convention, 2009b). Since July 2008, the use of Deca-BDE has been banned for electrical and electronic applications in the EU (Court of Justice, 2008). However, the production and usage of Deca-BDE mixtures in other parts of the world are still in use (Hu et al., 2008).

After the phase-out of those mixtures, many new and alternative BFRs have been used as replacements for the banned formulations. Important representatives of this group are DBDPE (decabromodiphenylethane)

* Corresponding author. Tel.: +34 91 5622900; fax: +34 91 5644853.

E-mail addresses: susana@viamicro.com.br (S. Mohr), a.garcia-bermejo@iqog.csic.es (Á. García-Bermejo), lherrero@iqog.csic.es (L. Herrero), bgomara@iqog.csic.es (B. Gómara), ijonikostabeber@gmail.com (I.H. Costabeber), mariche@iqog.csic.es (M.J. González).

and BTBPE (1,2-bis(2,4,6-tribromophenoxy)ethane), called “novel” brominated flame retardants (NBFRs) (Covaci et al., 2011). BTBPE has been announced as a potential replacement for the Octa-BDE technical mixture (Gauthier et al., 2009). DBDPE is structurally similar to decabromodiphenyl ether (BDE-209) and it is marketed as an alternative to technical Deca-BDE (Kierkegaard et al., 2004). The presence of the NBFRs has already been reported in the environment (Gorga et al., 2013; Nyholm et al., 2013) but their potential sources and environmental behaviors are still not clear (Hu et al., 2010) which emphasizes the need for further research relating to these compounds.

Honey is a natural product consumed by many people around the world. Its composition depends strongly on the plant species from which nectar, pollen and honeydew were collected and other factors such as environmental conditions and climate. Honeybees (*Apis mellifera* L.) perform the vital task of pollinating agricultural crops and native species and are important for the commercial products of honey and beeswax. Every day, 10,000–25,000 honeybee workers make an average of 10 journeys to explore roughly 7 km² in the area near the hive, gathering nectar, water, and pollen from flowers. During this process, various chemical products and particles, which are suspended in the air, are intercepted by these workers and retained in the hair of their body surface, or inhaled and attached to their trachea (Devillers and Pharm-Delegue, 2002). Thus, honeybees are greatly affected by industrial chemicals and transport them to the colony and, for these reasons, bees and honey have been used as indicators of environmental pollution in several studies (Rissato et al., 2007; Blasco et al., 2011). Residues of some POPs have been found in honey samples such as organochlorine pesticides (Wang et al., 2010a; Kujawski et al., 2012) and polychlorinated biphenyls (PCBs) (Herrera et al., 2005). But data on BFR concentrations in honey samples are very scarce in the literature (Wang et al., 2010b).

This paper reports the residue concentrations of 17 BFRs, including two “novel” BFRs (BTBPE and DBDPE), found in honey samples collected in Brazil, Spain, Portugal, Slovenia and Morocco in the years 2010, 2011 and 2012. The comparisons among the BFR concentrations and profiles found in the different countries were also reported.

2. Experimental

2.1. Reagents, standards and compounds analyzed

All reagents used for the analysis were of trace analysis grade. Ethyl acetate and petroleum ether, both Pestipur® grade, were supplied from Carlo Erba (Milan, Italy). *n*-Hexane, sulfuric acid (95–97%) and silica gel 60 were supplied from Merck Co. (Darmstadt, Germany) and granular anhydrous sodium sulfate from J.T. Baker (Deventer, The Netherlands). The water used was purified by a Milli-Q® water system (Millipore, USA). Standards of native and ¹³C₁₂ labeled PBDE congeners, as well as native BTBPE and DBDPE, were purchased from Wellington Laboratories (Ontario, Canada). A total of fifteen individual PBDE congeners were analyzed including the most abundant in both technical mixtures and environmental matrices (BDE-17 (2,2',4-tri-BDE), -28 (2,4,4'-tri-BDE), -47 (2,2',4,4'-tetra-BDE), -66 (2,3',4,4'-tetra-BDE), -85 (2,2',3,4,4'-penta-BDE), -99 (2,2',4,4',5-penta-BDE), -100 (2,2',4,4',6-penta-BDE), -153 (2,2',4,4',5,5'-hexa-BDE), -154 (2,2',4,4',5,6'-hexa-BDE), -183 (2,2',3,4,4',5,6-hepta-BDE) and -209 (2,2',3,3',4,4',5,5',6,6'-deca-BDE)) and those formed during the reductive debromination of BDE-209 (BDE-184 (2,2',3,4,4',6,6'-hepta-BDE), -191 (2,3,3',4,4',5,6'-hepta-BDE), -196 (2,2',3,3',4,4',5,6'-octa-BDE) and -197 (2,2',3,3',4,4',6,6'-octa-BDE)). Two NBFRs were included in the study: BTBPE (1,2-bis(2,4,6-tribromophenoxy)ethane) and DBDPE (decabromodiphenylethane). A solution of 50 pg μL⁻¹ of labeled ¹³C₁₂-BDEs 47, 99, 100 and 153 was used as a spiking standard. A solution of 50 pg μL⁻¹ of ¹³C₁₂-labeled BDEs 77 and 138 was used as an injection standard for recoveries calculation. The calibration curves were performed using five

calibration points with concentrations between 1 and 500 pg μL⁻¹ for all BFRs except for BDE-209 and DBDPE which were between 10 and 5000 pg μL⁻¹.

2.2. Sampling collection

A total of 35 honey samples (most of them multi-flower), collected during 2010, 2011 and 2012, were purchased in different supermarkets of Brazil (*n* = 16), Spain (*n* = 8), Portugal (*n* = 4), Morocco (*n* = 3) and Slovenia (*n* = 4). The samples were transported to the laboratory and stored at room temperature in a fresh and dark place before their analysis.

2.3. Analytical procedure

2.3.1. Sample preparation

The samples were extracted by liquid–liquid extraction as described in detail elsewhere (Blasco et al., 2004), with a few modifications. Approximately 10 g of sample was homogenate with Milli-Q® water and spiked with a mixture containing 50 pg μL⁻¹ of labeled ¹³C₁₂-BDEs 47, 99, 100 and 153. Afterwards, 10 mL of ethyl acetate and petroleum ether (9:1, v/v) was added and the sample was vortexed for 1 min. The mixture was centrifuged (3800 rpm, 10 min) for phase separation, and the organic phase was collected. The extraction procedure was repeated two more times, and the organic phases were combined and evaporated up to approximately 1 mL. A further cleanup step was performed by using a multilayer column filled with neutral silica gel, silica gel activated and modified with sulfuric acid (44%, w/w and 22%, w/w) and anhydrous sodium sulfate, and *n*-hexane as elution solvent. A standard solution of 50 pg μL⁻¹ of ¹³C₁₂-labeled BDEs 77 and 138 was used as an injection standard for recoveries calculation of the labeled BFRs added as surrogates.

2.3.2. Instrument analysis

The sample extracts were analyzed by GC–QQQ–MS/MS on a TRACE GC Ultra (Thermo Fisher Scientific, Milan, Italy) coupled to a TSQ Quantum XLS triple quadrupole mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany), operating in EI mode (40 eV of electron energy). Injections were performed in the PTV mode (2 μL; 90 °C, hold for 0.05 min, then to 300 °C at 10 °C seg⁻¹, hold for 1.5 min, and then to 330 °C at 10 °C seg⁻¹, hold for 30 min; splitless time: 1.5 min) in a capillary VF-5ht column (15 m, 0.25 mm I.D., 0.10 μm film thickness) purchased from Varian, Inc. (Palo Alto, CA, USA). The temperature program was as follows: initial temperature of 90 °C (held for 2 min), first ramp at 15 °C min⁻¹ to 160 °C, second ramp at 4 °C min⁻¹ to 225 °C, third ramp at 7 °C min⁻¹ to 290 °C and the final ramp was 10 °C min⁻¹ to 310 °C, which was held constant for 10 min. Helium was used as the carrier gas at a constant flow rate of 1.2 mL min⁻¹, and argon was used as collision gas, which was set to 1 mTorr for all the analyses. The mass spectrometer was operated in the multiple reaction monitoring (MRM) mode, monitoring two transitions for each compound. The transitions selected for PBDEs correspond to the loss of Br₂ for tri- to hexa-BDEs, and Br₂ and COBr, for hepta- to deca-BDEs. The precursor ions were [M]⁺ (tri- to hexa-BDEs) and [M–Br₂]⁺ (hepta- to deca-BDEs). In the case of BTBPE, the loss of [C₂H₄Br]⁺ from [M–C₈H₆Br₃O]⁺ was monitored. For DBDPE, the transitions selected correspond to [M–C₇H₂Br₅]⁺ as a precursor ion, losing one and two bromine atoms to obtain the product ions. The MS/MS collision energy and the ion transitions monitored were individually optimized for each compound. The isotope dilution technique was used as a quantification method.

2.4. Quality control and assurance

All analyses such as blanks, recoveries, and parallel analyses were complied with analytical standards as recommended by the EU Commission in the directive for measuring dioxins in food (EC, 2006).

A method blank in each set of analyses (three analyses and a blank) was carried out and no detectable BFR levels were found in any of the blanks. To eliminate interferences in blanks, all the glassware, chemicals, solvents, and equipment used during extraction and cleanup procedures as well as the instrumentation used were routinely checked. Satisfactorily repeatability and intermediate precision were achieved with relative standard deviation (RSD) below 7 and 20%, respectively. Recoveries of the labeled congeners in samples and in spiked blanks were always higher than 98%, with a mean of $108\% \pm 7\%$ (standard deviation). Instrumental detection limits were in the range of $0.06\text{--}27\text{ pg }\mu\text{L}^{-1}$ for all the BFRs investigated. BDE-17 exhibited the lowest LOD levels, and BDE-209 the highest one. The laboratory has participated in different international inter-laboratory studies and several international quality control studies for the analysis of PBDEs in different food matrices (Becher et al., 2007–2009). The results were consistent at all times with the consensus values given by the inter-laboratory organization.

2.5. Statistical analysis

As honey BFR concentrations do not follow a normal distribution, the non-parametric Kruskal–Wallis ANOVA test was used to evaluate the differences of contaminants in honeys between the countries. The level of significance was set as $p \leq 0.05$ throughout this study. Data were analyzed using STATISTICA® 7.0 software. In addition, it must be pointed out that, for the calculations, $\frac{1}{2}$ LOD was used for those congeners whose concentration was below LOD.

3. Results and discussion

The concentrations (expressed in pg g^{-1} fresh weight (f.w.)) of 15 individual PBDE congeners as well as 2 NBFRs determined in the honey samples studied are shown in Table 1. This study is the first to report the concentration levels of the two “novel” BFRs (BTBPE and DBDPE) in commercial honey samples of different countries. The highest total BFR mean concentrations were found in Brazilian honeys (5.19 pg g^{-1} f.w.), followed by Moroccan (4.40 pg g^{-1} f.w.), Portuguese (2.24 pg g^{-1} f.w.), Spanish (1.77 pg g^{-1} f.w.) and Slovenian (0.93 pg g^{-1} f.w.) honey samples.

Table 1
BFR mean concentrations, standard deviations (SD), ranges and number of positive (>LOD) samples found in honeys (expressed as pg g^{-1} f.w.) from Brazil, Spain, Portugal, Slovenia and Morocco ($n = 35$).

| Compound | Mean | SD | Range | % positive (n) |
|----------------|------|------|-----------|----------------|
| BDE-17 | <LOD | – | – | – |
| BDE-28 | <LOD | 0.01 | <LOD–0.08 | 3% (1) |
| BDE-47 | 0.87 | 0.69 | <LOD–2.45 | 91% (32) |
| BDE-66 | <LOD | 0.01 | <LOD–0.08 | 3% (1) |
| BDE-85 | <LOD | – | – | – |
| BDE-99 | 0.16 | 0.23 | <LOD–1.05 | 63% (22) |
| BDE-100 | 0.01 | 0.03 | <LOD–0.13 | 11% (4) |
| BDE-153 | 0.04 | 0.21 | <LOD–1.24 | 3% (1) |
| BDE-154 | <LOD | – | – | – |
| BDE-183 | <LOD | – | – | – |
| BDE-184 | <LOD | – | – | – |
| BDE-191 | 0.12 | 0.48 | <LOD–2.14 | 6% (2) |
| BDE-196 | <LOD | – | – | – |
| BDE-197 | <LOD | – | – | – |
| BDE-209 | <LOD | – | – | – |
| Σ PBDEs | 1.20 | 0.95 | – | – |
| BTBPE | 1.51 | 4.87 | <LOD–24.7 | 17% (6) |
| DBDPE | 0.80 | 1.88 | <LOD–7.81 | 20% (7) |
| Σ NBFRs | 2.31 | 4.97 | – | – |
| Σ BFRs | 3.51 | 4.97 | – | – |

Values below the limit of detection were set to zero for the calculation of the arithmetic means. LOD: limit of detection.

BTBPE, DBDPE, BDE-47, BDE-99 and BDE-100 were detected in more than 10% of the samples, BDEs 28, 66, 153 and 191 were detected in less than 10% of the studied samples, and BDEs 17, 85, 154, 183, 184, 196, 197 and 209 in none of them.

Concerning the BFRs that were detected in more than 10% of the samples, BTBPE exhibited the highest mean values of 1.51 pg g^{-1} f.w., followed by BDE-47 (0.87 pg g^{-1} f.w.), DBDPE (0.80 pg g^{-1} f.w.), BDE-99 (0.16 pg g^{-1} f.w.), and BDE-100 (0.01 pg g^{-1} f.w.). Regarding the frequency of detection, BDEs 47, 99 and 100 were detected in 91%, 63% and 11% of the samples, respectively, while BTBPE and DBDPE were detected in 17% and 20% of the samples, respectively.

Differences in congener profiles and concentrations in honey samples collected in various countries are shown in Table 2. The highest total PBDE mean concentration values were found in the Spanish honeys (1.39 pg g^{-1} f.w.) and the lowest ones in the Moroccan honeys (0.18 pg g^{-1} f.w.). The total PBDE mean concentration levels in the samples from Portugal, Brazil and Slovenia were 1.37, 1.32 and 0.93 pg g^{-1} f.w., respectively. With regard to the total mean concentration of NBFR levels, the Moroccan honeys exhibited the highest concentrations (4.22 pg g^{-1} f.w.), while the Slovenian honeys exhibited the lowest ones (<LOD) since no NBFRs have been detected. The total NBFR mean concentrations in Brazilian, Portuguese and Spanish honeys were 3.87, 0.87 and 0.38 pg g^{-1} f.w., respectively. On the other hand, no statistically significant differences ($p < 0.05$) were found among the concentration levels of individual BFRs from different countries.

BFR profiles (Fig. 1) indicate some similarities and differences among the studied samples depending on the geographical origin. The most remarkable of those results are the important contribution of BDE-47 (between 50 and 95%) to total BFR concentrations in honey samples from Portugal, Spain and Slovenia as well as the very high contribution (96%) of DBDPE in honeys from Morocco, and the high contribution of BTBPE (68%) in honey samples from Brazil. Regarding PBDEs, it is interesting to note that almost all samples have detectable amounts of BDEs 47 and 99, which are the most abundant congeners in the penta-BDE technical mixture (Alaee et al., 2003). In samples from Portugal, Spain, and Slovenia, the most developed countries of this study, these two PBDEs contributed with a 60%, 78% and 100% respectively to the total amount of BFRs whereas these two PBDEs represent less than 21% of the BFRs in Brazilian honeys and less than 4% in Moroccan honeys. With regard to NBFRs, as previously mentioned, they are the most abundant BFRs in developing countries. DBDPE is the most abundant compound in Moroccan samples by far (96%) and also has an important contribution to the total BFRs in Portuguese (39%), Spanish (18%) and Brazilian (12%) honey samples as its contribution is negligible in the case of Slovenian samples. The contribution of BTBPE to the total BFRs is very high (68%) in Brazilian honeys whereas it is almost negligible in the rest of studied regions, 4% in Spain and non-detected in Morocco, Portugal and Slovenia.

To our knowledge, only one study (Wang et al., 2010b) has been performed to investigate concentration levels of PBDEs in honey samples. They analyzed 27 PBDEs in 50 honey samples from different countries and regions, and the concentrations found were always higher than those found in the present study. Most of the studies carried out with honeybees or honeybee products (honey, wax, pollen) have been used as tools for assessing environmental pollution in agricultural and industrial areas, so they have been mainly performed with pesticides (Rissato et al., 2007; Balayiannis and Balayiannis, 2008). BFR concentrations found in the honey samples studied in the present work are in the lowest range levels found in other foods in the related literature (Qin et al., 2011; Cristale et al., 2012; Roszko et al., 2014), although it should be noted that the BFR levels reported in the literature almost always concern foods with high lipid content in which neutral and lipophilic contaminants, such as BFRs, are concentrated. The presence of contaminants in honey might be due to either its constituents (nectar and pollen) or its transfer by bees when transforming nectar (Lambert et al., 2012). Nectar, the basic constituent of honey, has low lipid content

Table 2Mean (SD) of BFR concentrations, with frequencies higher than 10%, expressed in pg g^{-1} fw., in honey samples from different countries.

| | BDE-47 | BDE-100 | BDE-99 | BTBPE | DBDPE | Σ PBDEs | Σ NBFRs | Σ BFRs |
|----------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|----------------|----------------|---------------|
| Brazil | 0.80 (0.67) | 0.01 (0.03) | 0.18 (0.28) | 3.28 (6.90) | 0.59 (1.75) | 1.32 (1.09) | 3.87 (6.82) | 5.19 (6.86) |
| Morocco | 0.09 (0.09) | <LOD | 0.07 (0.06) | <LOD | 4.22 (3.11) | 0.18 (0.08) | 4.22 (3.11) | 4.40 (3.11) |
| Portugal | 1.15 (0.57) | 0.02 (0.03) | 0.21 (0.27) | <LOD | 0.87 (1.74) | 1.37 (0.78) | 0.87 (1.74) | 2.24 (1.10) |
| Spain | 1.18 (0.89) | 0.02 (0.03) | 0.18 (0.18) | 0.06 (0.17) | 0.32 (0.89) | 1.39 (1.01) | 0.38 (0.88) | 1.77 (0.97) |
| Slovenia | 0.87 (0.18) | <LOD | 0.05 (0.06) | <LOD | <LOD | 0.93 (0.15) | <LOD | 0.93 (0.15) |

Values below the limit of detection were set to zero for the calculation of the arithmetic means. SD: standard deviation. LOD: limit of detection.

and consequently its capacity to accumulate BFRs is very limited; that would explain the low concentrations of BFRs detected in the honey samples. But, in any case, they reflect the BFRs environmental pollution in the area where the honeybees collect pollen. Regarding the levels that were found in the present study, neither European nor Brazilian nor Moroccan legislations have established limits to the BFRs in honeys.

4. Conclusions

This is the first time that the presence of two “novel” BFRs (BTBPE and DBDPE) in honeys from different countries has been reported. The levels of PBDEs found in the studied honeys are much lower than those found by Wang et al. (2010b) and are in the lowest ranges of those found in other foodstuffs. Differences among BFR concentrations and profiles in honeys from different countries were found. The most important findings are the high contribution of the novel BFRs investigated (BTBPE and DBDPE) to the total BFRs studied in honeys from Brazil, Morocco and Portugal, and the presence of the main components of Penta-BDE technical mixture, the BDEs 47 and 99 in all the investigated samples, BDE-47 being the predominant BFR in samples from Slovenia, Spain and Portugal. Those findings indicate that the Penta-BDE commercial mixture is still in the environment and the novel BFRs, synthesized to replace the Octa- and Deca-technical BDE mixtures are being used with increasing frequency. The results found in this study make necessary to conduct more and wider studies in order to explain the BFR concentrations and profiles found in honeys collected in different countries located in various regions.

Acknowledgments

This study was supported by the CM (Spain) and European funding from FEDER program (Project S2009/AGR-1464, ANALISYC-II) and

AGL2009-09733 Spanish National Project. S. Mohr was supported by a scholarship from the CAPES Foundation, Ministry of Education of Brazil (Process 9899/11-1). A. García-Bermejo wishes to thank Spanish Ministry of Education and Science for his Ph.D. grant.

References

- Alaee M, Anas P, Sjödin A, Bergman A. An overview of commercially used brominated flame retardants, their applications, their use patterns in different countries/regions and possible modes of release. *Environ Int* 2003;29:683–9.
- Balayiannis G, Balayiannis P. Bee honey as an environmental bioindicator of pesticides' occurrence in six agricultural areas of Greece. *Arch Environ Contam Toxicol* 2008;55:462–70.
- Becher G, Nicolaysen T, Thomsen C. Interlaboratory comparison on dioxins in food 2006–2008. National Institute of Public Health 2007–2009; Folkehelse, Final Report 7, 8, 9; Oslo, Norway.
- Blasco C, Lino CM, Picó Y, Pena A, Font G, Silveira MIN. Determination of organochlorine pesticide residues in honey from the central zone of Portugal and the Valencian community of Spain. *J Chromatogr A* 2004;1049:155–60.
- Blasco C, Vazquez-Roig P, Onghena M, Masia A, Picó Y. Analysis of insecticides in honey by liquid chromatography–ion-trap–mass-spectrometry: comparison of different extraction procedures. *J Chromatogr A* 2011;1218:4892–901.
- Court of Justice, Court Proceedings 2008/C 116/02. *Off J Eur Union C* 2008; 116:2.
- Covaci A, Harrad S, Abdallah MAE, Ali N, Law RJ, Herzke D, et al. Novel brominated flame retardants: A review of their analysis, environmental fate and behavior. *Environ Int* 2011;37:532–56.
- Cristale J, Quintana J, Chalier R, Ventura F, Lacorte S. Gas chromatography/mass spectrometry comprehensive analysis of organophosphorus, brominated flame retardants, by-products and formulation intermediates in water. *J Chromatogr A* 2012;1241:1–12.
- Darnerud PO. Toxic effects of brominated flame retardants in man and in wildlife. *Environ Int* 2003;29:841–53.
- Devillers J, Pharm-Delegue MH. Honey bees: estimating the environmental impact of chemicals. London: CRC Press; 2002.
- Directive 2003/11/EC of the European parliament and of the council of 6 February 2003 amending for the 24th time Council Directive 76/769/EEC relating to restrictions on the marketing and use of certain dangerous substances and preparations (pentabromodiphenyl ether, octabromodiphenyl ether). *Off J Eur Union* 2003; L42, 45.
- Domingo JL. Polybrominated diphenyl ethers in food and human dietary exposure: a review of the recent scientific literature. *Food Chem Toxicol* 2012;50:238–49.

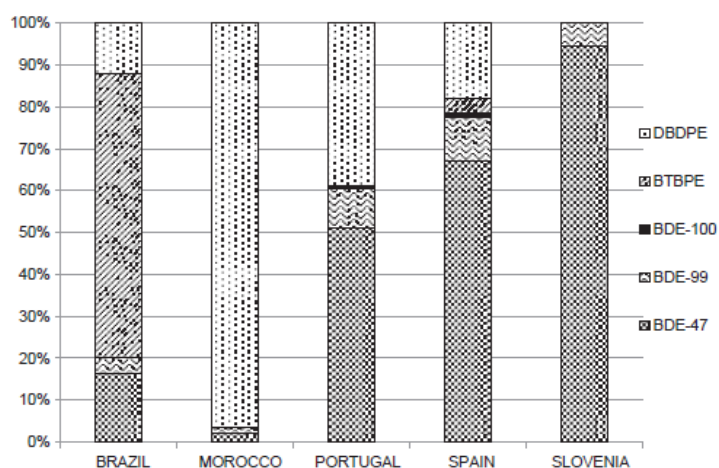


Fig. 1. Profiles of contribution (in %) of each compound detected in more than 10% of the samples to the total BFR concentrations in each studied country.

- EC. European Commission. Commission Regulation 1883/2006 of 19 December 2006 laying down methods of sampling and analysis for the official control of levels of dioxins and dioxin-like PCBs in certain foodstuffs; 2006.
- Frederiksen M, Vorkamp K, Thomsen M, Knudsen IE. Human internal and external exposure to PBDEs – a review of levels and sources. *Int J Hyg Environ Health* 2009;212:109–34.
- Gauthier LT, Potter D, Hebert CE, Letcher RJ. Temporal trends and spatial distribution of non-polybrominated diphenyl ether flame retardants in the eggs of colonial populations of Great Lakes Herring Gulls. *Environ Sci Technol* 2009;43:312–7.
- Gómara B, Herrero L, Pacepavicius G, Ohta S, Alae M, González MJ. Occurrence of co-planar polybrominated/chlorinated biphenyls (PXBs), polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) and polychlorinated biphenyls (PCBs) in breast milk of women from Spain. *Chemosphere* 2011;83:799–805.
- Gorga M, Martínez E, Ginebreda A, Eljarrat E, Barceló D. Determination of PBDEs, HBB, PBEB, DBDPE, HBCD, TBBPA and related compounds in sewage sludge from Catalonia (Spain). *Sci Total Environ* 2013;444:51–9.
- Herrera A, Pérez-Arquillué C, Conchello P, Bayarri S, Lázaro R, Yagüe C, et al. Determination of pesticides and PCBs in honey by solid-phase extraction cleanup followed by gas chromatography with electron-capture and nitrogen–phosphorus detection. *Anal Bioanal Chem* 2005;381:695–701.
- Hu GC, Luo XJ, Dai JY, Zhang XL, Wu H, Zhang CL, et al. Brominated flame retardants, polychlorinated biphenyls, and organochlorine pesticides in captive giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*) and red panda (*Ailurus fulgens*) from China. *Environ Sci Technol* 2008;42:4704–9.
- Hu G, Xu Z, Dai J, Mai B, Cao H, Wang J, et al. Distribution of polybrominated diphenyl ethers and decabromodiphenylethane in surface sediments from Fuhe River and Baiyangdian Lake, North China. *J Environ Sci* 2010;22:1833–9.
- Jakobsson K, Fang J, Athanasiadou M, Rignell-Hydrom A, Bergman A. Polybrominated diphenyl ethers in maternal serum, umbilical cord serum, colostrum and mature breast milk. Insights from a pilot study and the literature. *Environ Int* 2012;47:121–30.
- Kierkegaard A, Bjorklund J, Friden U. Identification of the flame retardant decabromodiphenyl ethane in the environment. *Environ Sci Technol* 2004;38:3247–53.
- Kujawski MW, Pinteaux E, Namiesnik J. Application of dispersive liquid–liquid microextraction for the determination of selected organochlorine pesticides in honey by gas chromatography–mass spectrometry. *Eur Food Res Technol* 2012;234:223–30.
- Lambert O, Veyrand B, Durand S, Marchand P, Le Bizec B, Piroux M, et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons: bees, honey and pollen as sentinels for environmental chemical contaminants. *Chemosphere* 2012;86:98–104.
- Nyholm JR, Grabic R, Arp HPH, Moskeland T, Andersson PL. Environmental occurrence of emerging and legacy brominated flame retardants near suspected sources in Norway. *Sci Total Environ* 2013;443:307–14.
- Qin YY, Leung CKM, Leung AOW, Zheng JS, Wong MH. Persistent organic pollutants in food items collected in Hong Kong. *Chemosphere* 2011;82:1329–36.
- Rahman F, Langford KH, Scrimshaw MD, Lester JN. Polybrominated diphenyl ether (PBDE) flame retardants. *Sci Total Environ* 2001;275:1–17.
- Rissato SR, Galhiane MS, Almeida MV, Generutti M, Apon BM. Multiresidue determination of pesticides in honey samples by gas chromatography–mass spectrometry and application in environmental contamination. *Food Chem* 2007;101:1719–26.
- Rosko M, Jedrzejczak R, Szymczyk K. Polychlorinated biphenyls (PCBs), polychlorinated diphenyl ethers (PBDEs) and organochlorine pesticides in selected cereals available on the Polish retail market. *Sci Total Environ* 2014;466–467:136–51.
- Convention Stockholm, Part IV of Annex A, decision SC-4/14: listing of hexabromodiphenyl ether and heptabromodiphenyl ether; 2009a.
- Convention Stockholm, Part IV of Annex A, decision SC-4/18: listing of tetrabromodiphenyl ether and pentabromodiphenyl ether; 2009b.
- Wang J, Kliks MM, Jun S, Li QX. Residues of organochlorine pesticides in honeys from different geographic regions. *Food Res Int* 2010a;43:2329–34.
- Wang J, Kliks MM, Jun S, Li QX. Residues of polybrominated diphenyl ethers in honeys from different geographic regions. *J Agric Food Chem* 2010b;58:3495–501.

5 DISCUSSÃO

As abelhas são excelentes bioindicadores ambientais, pois podem demonstrar os prejuízos do homem ao meio ambiente ao qual vivem através de dois sinais: a alta mortalidade (no caso de praguicidas) e os resíduos químicos presentes no mel. Algumas características morfológicas e comportamentais também colaboram para que a abelha seja considerada um “detector ecológico confiável”: é um organismo de fácil reprodução, ubíquo e requer modestas fontes de alimentos; possui o corpo coberto de pelos, os quais facilitam a adesão de partículas em suspensão e substâncias químicas; é altamente sensível à maioria dos praguicidas, revelando de imediato quando estes são impróprios ao meio ambiente; sua grande mobilidade e amplo raio de voo permitem com que uma grande área seja monitorada (PORRINI et al., 2003).

Dentre os Poluentes Orgânicos Persistentes investigados no presente trabalho, os praguicidas organoclorados foram os que apresentaram as maiores concentrações de resíduos nas amostras de mel de abelhas, apesar de estarem proibidos e/ou severamente restringidos há mais de duas décadas em nosso país. O praguicida Endosulfan, o último dos POPs incluídos na lista do Convênio de Estocolmo no ano de 2011, ainda era permitido em culturas agrícolas nos anos em que as amostras foram coletadas (entre 2009 e 2011), o que reflete diretamente nos resultados do Manuscrito 1. Estudos comprovam a dispersão e contaminação global do meio ambiente por este praguicida em matrizes como ar, solo e água do mar (BECKER et al. 2011), justificando a sua inclusão na lista dos POPs. No caso específico das amostras analisadas, a contaminação pode ser devida à sua utilização em culturas de soja, café e cana-de-açúcar, as quais são cultivadas nos três estados da região Sul do Brasil.

Com relação aos resíduos de PCBs indicadores, analisados no Manuscrito 2, os congêneres que apresentaram as maiores concentrações, bem como frequência de detecção, foram os menos clorados: PCBs 28 (triclorobifenil) e 52 (tetraclorobifenil). Isso pode ser devido ao fato de que os PCBs mais clorados, principalmente os hexa- e heptaclorobifenil, tendem a acumular-se em maior quantidade em alimentos gordurosos quando comparados aos congêneres de menor cloração. Estudos prévios realizados pelo nosso grupo de pesquisa em alimentos como carne, produtos cárneos, leite e milho, confirmam esta suposição (COSTABEBER et al., 2006; HECK et al., 2007; SCHWANZ et al., 2012), bem como a existência de contaminação ambiental por PCBs no estado do Rio Grande do Sul. Com

relação a outros estudos, uma pesquisa realizada com mel de abelhas da Turquia detectou concentrações semelhantes às encontradas no presente estudo (ERDOGRUL, 2007), comprovando o fato de que o mel de abelhas também pode ser utilizado para monitorar a contaminação ambiental por PCBs. Nos resultados do Manuscrito 2, as concentrações dos PCBs 28, 52 e 180 possuem a tendência de aumentar com o passar dos anos (2009 < 2010 < 2011). Embora essa diferença não seja estatisticamente significativa, somente o fato de que as concentrações estão aumentando já é motivo de preocupação.

As dioxinas, furanos e DL-PCBs foram analisados em amostras comerciais do Brasil, cujos resultados encontram-se no Manuscrito 3. Embora as concentrações detectadas sejam baixas quando comparadas a outros alimentos, o fato de que um alimento como o mel de abelhas possua a capacidade de acumular alguma quantidade destes compostos é preocupante, pois o mesmo não possui gordura em sua composição. Somente uma amostra, proveniente do estado do Paraná, apresentou 0,343 pg de WHO-TEQ g⁻¹ de mel, uma concentração surpreendente para um alimento desta natureza. Para peixes, um dos alimentos que mais acumula esta classe de compostos, o limite permitido pela legislação brasileira é de 3,5 pg de WHO-TEQ g⁻¹ de músculo, enquanto que para carne de aves o limite é de 1,75 pg de WHO-TEQ g⁻¹ de gordura (BRASIL, 2013). Para os demais alimentos não há limites estabelecidos. Dentre a literatura consultada, nenhum estudo que reportasse a análise destes compostos em mel de abelhas foi encontrado. Adicionalmente, nenhum estudo reportando concentrações de dioxinas e furanos em alimentos do Brasil foi encontrado, o que faz com que o mesmo tenha ainda mais relevância.

No Manuscrito 4, retardantes de chama bromados (BFRs) foram determinados em amostras de mel de abelhas provenientes do Brasil, Espanha, Portugal, Eslovênia e Marrocos. Como todos os POPs, a ingestão de alimentos contaminados com pequenas concentrações de resíduos é a maior causa da exposição humana (ROSS, 2004). Porém, segundo Frederiksen et al. (2009), a presença dos PBDEs em diversos produtos com os quais temos contato diário pode levar à exposição adicional no ambiente doméstico, através da inalação tanto do ar quanto da poeira contaminados. Adicionalmente, diversos estudos têm detectado resíduos de BFRs nos mais diversos tipos de matrizes, incluindo água, solo e sedimentos, mesmo em áreas mais remotas (COVACI et al., 2011; DE WIT, ALAEE & MUIR, 2006; HALE et al., 2003; LAW et al., 2006). Embora as concentrações detectadas nas amostras analisadas tenham sido baixas, o fato de que estes compostos estão presentes no ar e na poeira pode explicar a presença destes compostos no mel de abelhas. Dentre a literatura consultada, somente um estudo reportando a análise de PBDEs em mel de abelhas foi encontrado

(WANG et al., 2010), o qual apresentou concentrações bastante superiores ao do presente estudo. Adicionalmente, nenhum estudo foi encontrado reportando níveis de NBFRs em mel. Com relação aos níveis detectados, ainda não há legislação sobre limite máximo de resíduos em alimentos, tanto no Brasil, quanto na Europa.

Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2011), a região Sul do Brasil é a maior produtora de mel do país, região esta onde foram coletadas as amostras brasileiras analisadas nos manuscritos apresentados na seção anterior. Ainda com relação aos praguicidas organoclorados, além da contaminação ambiental detectada através do mel de abelhas, o fato de que mais de 18% das amostras analisadas superaram o limite máximo de resíduos permitido pela legislação também é preocupante no que diz respeito à segurança alimentar. Apesar do consumo *per capita* do mel como alimento ser baixo em nosso país, com média de 80 gramas ao ano (IBGE, 2009), somos um dos maiores exportadores do mundo deste alimento, principalmente para a Alemanha e os Estados Unidos, países estes que possuem um consumo *per capita* anual superior a 1 Kg.

Diante do exposto, a necessidade da realização de mais pesquisas sobre o tema torna-se evidente. É preciso investigar as causas da contaminação ambiental e dos alimentos por estes compostos em nosso país, bem como elucidar as suas fontes. Contudo, novas investigações dependem principalmente da disponibilidade de equipamentos e recursos financeiros, uma vez que parte das análises desta pesquisa foi realizada fora do país.

6 CONCLUSÕES

- ✓ As amostras de mel de abelhas analisadas no presente estudo apresentaram contaminações importantes por POPs, demonstrando a grande repercussão da contaminação ambiental nas regiões estudadas.
- ✓ 77 % das amostras da região Sul do Brasil estavam contaminadas por algum tipo de praguicida organoclorado, com predominância dos compostos Endosulfan alfa, Endosulfan sulfato e Aldrin, sendo este último detectado em maior concentração no mel proveniente do estado de Santa Catarina. O composto Endrin apresentou concentração superior nas amostras do ano de 2010 quando comparado com as de 2011. Adicionalmente, 18% apresentaram concentrações superiores ao limite máximo de resíduos permitido pela legislação brasileira.
- ✓ Os PCBs indicadores foram detectados em 65% das amostras provenientes dos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná e São Paulo. O mel de abelhas proveniente dos estados do Paraná e São Paulo apresentou maiores concentrações do PCB 28, enquanto que o PCB 52 foi detectado em níveis mais elevados nas amostras provenientes de Santa Catarina e São Paulo. Já as PCDDs, PCDFs e DL-PCBs apresentaram níveis bastante baixos, com exceção de uma amostra proveniente do Paraná, a qual apresentou 0,343 pg WHO-TEQ g⁻¹ de mel, uma quantidade surpreendente para este tipo de alimento.
- ✓ BFRs, incluindo PBDEs e NBFRs, foram analisados em amostras provenientes de cinco diferentes países. Os resultados demonstram grande contribuição dos PBDEs de baixa bromação, principalmente o BDE-47, nas amostras provenientes da Espanha, Portugal e Eslovênia. Adicionalmente, no mel proveniente do Brasil e do Marrocos, os NBFRs foram mais abundantes.
- ✓ Dentre a literatura consultada, este foi o primeiro estudo realizado reportando níveis de diversas classes de POPs em amostras de mel de abelhas provenientes da região Sul do Brasil. Adicionalmente, nenhum estudo foi encontrado reportando níveis de DL-PCBs, PCDDs e PCDFs em mel de abelhas.
- ✓ É preciso investigar as causas desta contaminação ambiental, uma vez que esta pode estar diretamente relacionada ao desaparecimento das abelhas, colocando em risco a sobrevivência do mais importante agente polinizador para a produção de alimentos.

REFERÊNCIAS

ABAD, E. et al. Comprehensive study on dioxin contents in binder and anti-caking agent feed additives. **Chemosphere**, v. 46, p. 1417-1421, 2002.

ABRAHAM, K. et al. Severe 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) intoxication: clinical and laboratory effects. **Environmental Health Perspectives**, v. 109, p. 865-869, 2001.

ADENUGBA, A. et al. Polychlorinated biphenyls in bile of patients with biliary tract cancer. **Chemosphere**, v.76, p.841-846, 2009.

ALAEI, M. et al. An overview of commercially used brominated flame retardants, their applications, their use patterns in different countries/regions and possible modes of release. **Environment International**, v. 29, p. 683-689, 2003.

ALIFERIS, K. A. et al. Botanical discrimination and classification of honey samples applying gas chromatography/mass spectrometry fingerprinting of headspace volatile compounds. **Food Chemistry**, v. 121, p. 856-862, 2010.

ALLSOP, K. A.; MILLER, J. B. Honey revisited: a reappraisal of honey in pre-industrial diets. **British Journal of Nutrition**, v. 75, p. 513-520, 1996.

ALVAREZ-SUAREZ, J. M. et al. Contribution of honey in nutrition and human health: a review. **Mediterranean Journal of Nutrition and Metabolism**, v. 3, p. 15-23, 2010.

ANASTASSIADES, M. et al. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. **Journal of AOAC International**, v. 86, p. 412-431, 2003.

ASANTE, K. A. et al. Human exposure to PCBs, PBDEs and HBCDs in Ghana: Temporal variation, sources of exposure and estimation of daily intakes by infants. **Environment International**, v. 37, p. 921-928, 2011.

ATSDR. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. **Toxicological profile for polychlorinated biphenyls (PCBs)**. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, 2000. Disponível em: <<http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp.asp?id=142&tid=26>>. Acesso em: 30 out. 2013.

BALAYIANNIS, G.; BALAYIANNIS, P. Bee honey as an environmental bioindicator of pesticides' occurrence in six agricultural areas of Greece. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 55, p. 462-470, 2008.

BALLSCHMITER, K. H.; ZELL, M. Analysis of polychlorinated biphenyls (PCBs) by glass capillary chromatography. **Fresenius Zeitschrift fur Analytische Chemie**, v. 302, p. 20-31, 1980.

BARBIERI, J. C. **Gestão ambiental empresarial: conceitos, modelos e instrumentos**. São Paulo: Saraiva, 2007.

BECKER, L. et al. Assessment of the environmental persistence and long-range transport of endosulfan. **Environmental Pollution**, v. 159, p. 1737-1743, 2011.

BERNARD, A. et al. Food contamination by PCBs and dioxins. **Nature**, v. 401, p. 231-232, 1999.

BIANCO, G. et al. Dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans in human breast milk collected in the area of Taranto (Southern Italy): first case study. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 405, p. 2405-2410, 2013.

BLASCO, C. et al. Determination of organochlorine pesticide residues in honey from the central zone of Portugal and the Valencian community of Spain. **Journal of Chromatography A**, v. 1049, p. 155-160, 2004.

BORDAJANDI, L. R. et al. Study of PCBs, PCDD/Fs, organochlorine pesticides, heavy metals and arsenic content in freshwater fish species from the River Turia (Spain). **Chemosphere**, v. 53, p. 163-171, 2003.

BORDAJANDI, L. R.; ABAD, E.; GONZÁLEZ, M. J. Occurrence of PCBs, PCDD/Fs, PBDEs and DDTs in Spanish breast milk: Enantiometric fraction of chiral PCBs. **Chemosphere**, v. 70, p. 567-575, 2008.

BOTARO, D. et al. Organochlorine pesticides residues in feed and muscle of farmed Nile tilapia from Brazilian fish farms. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, p. 2125-2130, 2011.

BRAMBILLA, G. et al. Polychlorodibenzodioxin and -furan (PCDD and PCDF) and dioxin-like polychlorobiphenyl (DL-PCB) congener levels in milk of grazing sheep as indicators of the environmental quality of rural areas. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 8513-8517, 2011.

BRASIL. Portaria Interministerial n. 19 de 29 de janeiro de 1981. Disponível em: <<http://www.ipef.br/legislacao/bdlegislacao/detalhes.asp?Id=235>>. Acesso em: 28 out. 2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Portaria n. 329 de 02 de setembro de 1985.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução – RDC n. 62 de 03 de julho de 2000.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução – RE n. 899 de 29 de maio de 2003.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução – RDC n. 28 de 09 de agosto de 2010.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Instrução Normativa – IN n. 17 de 29 de maio de 2013.

BRUNS-WELLER, E.; KNOLL, A., HEBERER, T. High levels of polychlorinated dibenzodioxins/furans and dioxin like-PCBs found in monitoring investigations of sheep liver samples from Lower Saxony, Germany. **Chemosphere**, v. 78, p. 653-658, 2010.

CAJKA, T. et al. Rapid analysis of multiple pesticide residues in fruit-based baby food using programmed temperature vaporiser injection-low-pressure gas chromatography-high-resolution time-of-flight mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1186, p. 281-294, 2008.

CHEN, D.; HALE, R. C. A global review of polybrominated diphenyl ether flame retardant contamination in birds. **Environment International**, v. 36, p. 800-811, 2010.

CHOUDHARY, A.; SHARMA, D. C. Pesticide residues in honey samples from Himachal Pradesh (India). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 80, p. 417-422, 2008.

CHOW, J. Probiotics and prebiotics: a brief overview. **Journal of Renal Nutrition**, v. 12, p. 76-86, 2002.

CIESLIK, E. et al. Evaluation of QuEChERS method for the determination of organochlorine pesticide residues in selected groups of fruits. **Food Chemistry**, v. 125, p. 773-778, 2011.

CIMENCI, O. et al. Dietary exposure of the Belgian adult population to non-dioxin-like PCBs. **Food and Chemical Toxicology**, v. 59, p. 670-679, 2013.

COSTABEBER, I. et al. Levels of polychlorinated biphenyls (PCBs) in meat and meat products from the state of Rio Grande do Sul, Brazil. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, p. 1-7, 2006.

COVACI, A. et al. Novel brominated flame retardants: a review of their analysis, environmental fate and behavior. **Environment International**, v. 37, p. 532-556, 2011.

CRANE, E. **History of honey**. London: William Heinemann, 1975.

CRANE, E. **The world history of beekeeping and honey hunting**. London: Gerald Duckworth & Co., 1999.

CROES, K. et al. Persistent organic pollutants (POPs) in human milk: A biomonitoring study in rural areas of Flanders (Belgium). **Chemosphere**, v. 89, p. 988-994, 2012.

ÇAKIROGULLARI, G. Ç.; UÇAR, Y; KILIÇ, D. PCDD, PCDF and PCB contamination in *Atherina boyeri* (Risso, 1810) from Turkey. **Food Control**, v. 22, p. 67-71, 2011.

DALLAIRE, F. et al. Effect of prenatal exposure to polychlorinated biphenyls on incidence of acute respiratory infections in preschool Inuit children. **Environmental Health Perspectives**, v.114, p.1301-1305, 2006.

DARNERUD, P. O. et al. Polybrominated diphenyl ethers: occurrence, dietary exposure, and toxicology. **Environmental Health Perspectives (Suppl. 1)**, v. 109, p. 49-68, 2001.

DASGUPTA, S. et al. Optimization of two-dimensional gas chromatography time-of-flight mass spectrometry for separation and estimation of the residues of 160 pesticides and 25 persistent organic pollutants in grape and wine. **Journal of Chromatography A**, vol. 1217, p. 3881-3889, 2010.

DE FILIPPIS, S. P. et al. Polychlorodibenzodioxin and -furan and dioxin-like polychlorobiphenyl distribution in tissues and dairy products of dairy buffaloes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, p. 6552-6561, 2013.

DE WIT, C. A.; ALAEE, M.; MUIR, D. C. Levels and trends of brominated flame retardants in the Arctic. **Chemosphere**, v. 64, p. 209-233, 2006.

DIMITROVA, B.; GEVRENOVA, R.; ANKLAM, E. Analysis of phenolic acids in honeys of different floral origin by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography. **Phytochemical Analysis**, v. 18, p. 24-32, 2007.

EFSA. European Food Safety Authority. Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the commission related to the presence of non dioxin-like polychlorinated biphenyls (PCB) in feed and food. **European Food Safety Authority Journal**, n.284, p.1-137, 2005.

ERDOGRUL, O. Levels of selected pesticides in honey samples from Kahramanmaras, Turkey. **Food Control**, v. 18, p. 866-871, 2007.

ERICKSON, M. D.; KALEY II, R. G. Applications of polychlorinated biphenyls. **Environmental Science and Pollution Research**, v.18, p.135-151, 2011.

ESPOSITO, M. et al. Contamination levels and congener distribution of PCDDs, PCDFs and dioxin-like PCBs in buffalo's milk from Caserta province (Italy). **Chemosphere**, v. 79, p. 341-348, 2010.

EVERETT, C. J. et al. Association of polychlorinated biphenyls with hypertension in the 1999-2002 National Health and Nutrition Examination Survey. **Environment Research**, v.108, p.94-97, set. 2008.

FERRANTE, M. C. et al. Polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides in European eel (*Anguilla Anguilla*) from the Garigliano River (Campania region, Italy). **Chemosphere**, v.78, p.709-716, 2010.

FERRANTE, M. C. et al. Effects of non-dioxin-like polychlorinated biphenyl congeners (PCB 101, PCB 153 and PCB 180) alone or mixed on J774A.1 macrophage cell line: modification of apoptotic pathway. **Toxicology Letters**, v.202, p.61-68, 2011.

FERRARIO, J. B.; BYRNE, C. J.; CLEVERLY, D. H. 2,3,7,8-dibenzo-*p*-dioxins in mined clay products from the United States: Evidence for possible natural origin. **Environmental Science & Technology**, v. 34, p. 4524-4532, 2000.

FIEDLER, H. Sources of PCDD/PCDF and impact on the environment. **Chemosphere**, v. 32, p. 55-64, 1996.

FREDERIKSEN, M. et al. Human internal and external exposure to PBDEs – A review of levels and sources. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 212, p. 109-134, 2009.

FROMBERG, A. et al. Estimation of dietary intake of PCB and organochlorine pesticides for children and adults. **Food Chemistry**, v. 125, p. 1179-1187, 2011.

GARCÍA-BERMEJO, A. et al. Feasibility of triple-quadrupole GC-MS/MS as an alternative technique to GC-HRMS for the analysis of PCDD/Fs and DL-PCBs in food and feedstuff samples. **Organoalogen Compounds**, v. 73, p. 653-656, 2011.

GÓMARA, B. et al. Levels and trends of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins/furans (PCDD/Fs) and dioxin-like polychlorinated biphenyls (PCBs) in Spanish commercial fish and shellfish products, 1995-2003. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 8406-8413, 2005.

GÓMARA, B. et al. Occurrence of co-planar polybrominated/chlorinated biphenyls (PXBs), polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) and polychlorinated biphenyls (PCBs) in breast milk of women from Spain. **Chemosphere**, v. 83, p. 799-805, 2011.

GÓMARA, B.; HERRERO, L.; GONZÁLEZ, M. J. Survey of polybrominated diphenyl ether levels in Spanish commercial foodstuffs. **Environmental Science & Technology**, v. 40, p. 7541-7547, 2006.

GONZÁLEZ-PARAMÁS, A. M. et al. HPLC-fluorimetric method for analysis of amino acids in products of the hive (honey and bee-pollen). **Food Chemistry**, v. 95, p. 148-156, 2006.

GRASSI, P. et al. Polychlorobiphenyls (PCBs), polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins (PCDDs) and dibenzofurans (PCDFs) in fruit and vegetables from an industrial area in northern Italy. **Chemosphere**, v. 79, p. 292-298, 2010.

HALE, R. C. et al. Polybrominated diphenyl ether flame retardants in the North American environment. **Environment International**, v. 29, p. 771-779, 2003.

HARRAD, S. et al. Indoor contamination with hexabromocyclodecanes, polybrominated diphenyl ethers, and perfluoroalkyl compounds: an important exposure pathway for people? **Environmental Science & Technology**, v. 44, p. 3221-3231, 2010.

HAYWARD, D. G. et al. Elevated TCDD in chicken eggs and farm-raised catfish fed a diet with ball clay from a Southern United States mine. **Environmental Research Section A**, v. 81, p. 248-256, 1999.

HECK, M. C. et al. Estimation of children exposure to organochlorine compounds through milk in Rio Grande do Sul, Brazil. **Food Chemistry**, v. 102, p. 288-294, 2007.

HEILIER, J. F. et al. Increased dioxin-like compounds in the serum of women with peritoneal endometriosis and deep endometriotic (adenomyotic) nodules. **Fertility and Sterility**, vol.84, p.305-312, ago. 2005.

HERRERA, A. et al. Determination of pesticides and PCBs in honey by solid-phase extraction cleanup followed by gas chromatography with electron-capture and nitrogen-phosphorus detection. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 381, p. 695-701, 2005.

HOWSAM, M. et al. Organochlorine exposure and colorectal cancer risk. **Environmental Health Perspectives**, n. 112, p.1460-1466, 2004.

HUE, O. et al. Increased plasma levels of toxic pollutants accompanying weight loss induced by hipocaloric diet or by bariatric surgery. **Obesity Surgery**, v.16, p.1145-1154, 2006.

HUO, L. G. et al. The determination of PCBs in meat and sea food by GC-QqQ-MS/MS. **Food Analytical Methods**, v. 5, p. 1481-1491, 2012.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATISTICA (IBGE). **Pesquisa de Orçamentos Familiares – POF 2008-2009**. Rio de Janeiro, 2009. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/pesquisas/pesquisa_resultados.php?id_pesquisa=25>. Acesso em: 29 out. 2013.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATISTICA (IBGE). **Produção da Pecuária Municipal**, v.38, 2010, Brasil. Rio de Janeiro: IBGE, 2011. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2010/ppm2010.pdf>>. Acesso em: 29 out. 2013.

KALACHOVA, K. et al. Gas chromatography-triple quadrupole tandem mass spectrometry: a powerful tool for the (ultra)trace analysis of multiclass environmental contaminants in fish and fish feed. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 405, p. 7803-7815, 2013.

KIM, M. J. et al. Fate and complex pathogenic effects of dioxins and polychlorinated biphenyls in obese subjects before and after drastic weight loss. **Environmental Health Perspectives**, v.119, p.377-383, 2011.

KOENIG, S.; HUERTAS, D.; FERNÁNDEZ, P. Legacy and emergent persistent organic pollutants (POPs) in NW Mediterranean deep-sea organisms. **Science of the Total Environment**, v. 443, p. 358-366, 2013.

KOROLKOWAS, A. **Dicionário Terapêutico**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1995.

KOWALSKI, C. H. et al. Determination of polychlorinated biphenyls in Brazilian breast milk samples using solid-phase microextraction and gas chromatography-electron capture detection. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 21, p. 502-509, 2010.

KUJAWSKI, M. W.; PINTEAUX, E.; NAMIESNIK, J. Application of dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of selected organochlorine pesticides in honey by gas chromatography-mass spectrometry. **European Food Research and Technology**, v. 234, p. 223-230, 2012.

LABADIE, P. et al. Determination of polybrominated diphenyl ethers in fish tissues by matrix solid-phase dispersion and gas chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry: Case study on European eel (*Anguilla anguilla*) from Mediterranean coastal lagoons. **Analytica Chimica Acta**, v. 675, p. 97-105, 2010.

LARINI, L. **Toxicologia dos Praguicidas**. São Paulo: Manole, 1999.

LAVANDIER, R. et al. Polychlorinated biphenyls (PCBs) and polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in three species from an estuary in the southeastern coast of Brazil. **Chemosphere**, v. 90, p. 2435-2443, 2013.

LAW, R. J. et al. Levels and trends of brominated flame retardants in the European environment. **Chemosphere**, v. 64, p. 187-208, 2006.

LEVIN, M. et al. Non-coplanar PCB-mediated modulation of human leukocyte phagocytosis: a new mechanism for immunotoxicity. **Journal of Toxicology and Environmental Health A**, v.68, p.1977-1993, 2005.

LI, Y.F.; MACDONALD, R. W. Sources and pathways of selected organochlorine pesticides to the Arctic and the effect of pathway divergence on HCH trends in biota: a review. **Science of the Total Environment**, v. 342, p. 87-106, 2005.

LLERENA, J. J. et al. An episode of dioxin contamination in feedingstuffs: the choline chloride case. **Chemosphere**, v. 53, p. 679-683, 2003.

LUEBKE, R. W. et al. Suppression of immune function and susceptibility to infections in humans: association of immune function with clinical disease. **Journal of Immunotoxicology**, v.1, p.15-24, 2004.

MACKINTOSH, S. A. et al. Analytical performance of a triple quadrupole mass spectrometer compared to a high resolution mass spectrometer for the analysis of polybrominated diphenyl ethers in fish. **Analytica Chimica Acta**, v. 747, p. 67-75, 2012.

MALISCH, R. Increase of PCDD/F-contamination of milk, butter and meat samples by use of contaminated citrus pulp. **Chemosphere**, v. 40, 1041-1053, 2000.

MARÍN, S. et al. Congener profile, occurrence and estimated dietary intake of dioxins and dioxin-like PCBs in foods marketed in the Region of Valencia (Spain). **Chemosphere**, v. 82, p. 1253-1261, 2011.

MARTÍ, M. et al. Persistent organic pollutants (PCDD/Fs, dioxin-like PCBs, marker PCBs, and PBDEs) in health supplements on the Spanish market. **Chemosphere**, v. 78, p. 1256-1262, 2010.

MARTOS, I. et al. Flavonoids in monospecific Eucalyptus honeys from Australia. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 4744-4748, 2000.

MAERVOET, J. et al. A reassessment of the nomenclature of polychlorinated biphenyl (PCB) metabolites. **Environmental Health Perspectives**, v.112, p.291-294, 2004.

McDONALD, T. A. A perspective on the potential health risks of PBDEs. **Chemosphere**, v. 46, p. 745-755, 2002.

MIDIO, A. F.; MARTINS, D. I. **Toxicologia de Alimentos**. São Paulo: Varela, 2000.

MOHR, S. **Influência de hábitos maternos na concentração de bifenilos policlorados (PCBs) em soro de cordão umbilical**. 2010. 89f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos) – Curso de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Maria.

MOLAN, P. C.; BETTS, J. A. Clinical usage of honey as a wound dressing: an update. **Journal of Wound Care**, v. 13, p. 353-356, 2004.

NGUYEN, T. D. et al. A multiresidue method for the determination of 107 pesticides in cabbage and radish using QuEChERS simple preparation method and gas Chromatography mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 110, p. 207-213, 2008.

NOZAL, M. J. et al. Trace analysis of fumagillin in honey by liquid chromatography-diode array-electrospray ionization mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1190, p. 224-231, 2008.

OEHME, M. et al. Determination of levels of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins, dibenzofurans, biphenyls and pesticides in Harp Seals from the Greenland Sea. **Science of the Total Environment**, v. 162, p. 75-91, 1995.

OMAYE, S. T. **Food and nutritional toxicology**. Boca Ranton: CRC Press, 2004. 319p.

PANDELOVA, M. et al. Assessment of dietary exposure to PCDD/F and dioxin-like PCB in infant formulae available on the EU market. **Chemosphere**, v. 81, p. 1018-1021, 2010.

PATZOLD, R.; BRUCKNER, H. Gas chromatographic detection of D-amino acids in natural and thermally treated bee honeys and studies on the mechanism of their formation as result of the Maillard reaction. **European Food Research and Technology**, v. 223, p. 347-354, 2006.

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

PEREIRA, M. S. Polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins (PCDD), dibenzofurans (PCDF) and polychlorinated biphenyls (PCB): main sources, environmental behaviour and risk to man and biota. **Química Nova**, v. 27, p. 934-943, 2004.

PERELLÓ, G. et al. Influence of various cooking processes on the concentrations of PCDD/PCDFs, PCBs and PBDEs in foods. **Food Control**, v. 21, p. 178-185, 2010.

PÉREZ, R. A. Analysis of volatiles from Spanish honeys by solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 2633-2637, 2002.

PÉREZ, A. R. et al. Amino acid composition and antioxidant capacity of Spanish honeys. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, 360-365, 2007.

PERSANO-ODDO, L.; PIRO, R. Main European unifloral honeys: descriptive sheets. **Apidologie**, v. 35, p. 38-81, 2004.

PORRINI, C. et al. Honey bees and bee products as monitors of the environmental contamination. **APIACTA**, v. 38, p. 63-70, 2003.

PRESTES, O. D. et al. QuEChERS – Um método moderno de preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas. **Química Nova**, v. 32, p. 1620-1634, 2009.

PRINCE, M. M. et al. Mortality and exposure response among 14.458 electrical capacitor manufacturing workers exposed to polychlorinated biphenyls (PCBs). **Environmental Health Perspectives**, v. 114, p. 1508-1514, 2006.

QUEIROZ, S. C. N. et al. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluídos biológicos para posterior determinação cromatográfica. **Química Nova**, v. 24, p. 68-76, 2001.

RAPPE, C. Dioxin, patterns and source identification. **Fresenius' Journal of Analytical Chemistry**, v. 348, p. 63-75, 1994.

RECIO-VEGA, R. et al. Serum levels of polychlorinated biphenyls in Mexican women and breast cancer risk. **Journal of Applied Toxicology**, v. 31, p. 270-278, 2011.

RIAL-OTERO, R. et al. Chromatographic-based methods for pesticide determination in honey: An overview. **Talanta**, v. 71, p. 503-514, 2007.

RISSATO, S. R. et al. Multiresidue determination of pesticides in honey samples by gas chromatography-mass spectrometry and application in environmental contamination. **Food Chemistry**, v. 101, p. 1719-1726, 2007.

ROOSENS, L. et al. Factors influencing concentrations of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in students from Antwerp, Belgium. **Environmental Science & Technology**, v. 43, p. 3535-3541, 2009.

ROSS, G. The public health implications of polychlorinated biphenyls (PCBs) in the environment. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 59, p. 275-291, 2004.

RYAN, J. J. Human poisonings and the Yushchenko case. **Organohalogen Compounds**, v. 67, p. 1699-1701, 2005.

SAFE, S. et al. PCBs: structure-function relationships and mechanism of action. **Environmental Health Perspectives**, v. 60, p. 47-56, 1985.

SAFE, S. H. Comparative toxicology and mechanism of action of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 26, p. 371-399, 1986.

SANTOS, J. S. et al. Assessment of polychlorinated biphenyls (PCBs) in cheese from Rio Grande do Sul, Brazil. **Chemosphere**, v. 65, p. 1544-1550, 2006.

SCHECTER, A. et al. Perfluorinated compounds, polychlorinated biphenyls, and organochlorine pesticide contamination in composite food samples from Dallas, Texas, USA. **Environmental Health Perspectives**, v. 118, p. 796-802, 2010.

SELGRADE, M. K. Immunotoxicity: the risk is real. **Toxicol Sci**, v. 100, p. 328-332, 2007.

SHEN, H. et al. Polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins/furans (PCDD/Fs), polychlorinated biphenyls (PCBs), and polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in breast milk from Zhejiang, China. **Environment International**, v. 42, p. 84-90, 2012.

SCHWANZ, T. G. et al. Determinação de bifenilos policlorados em milho através de extração em fase sólida seguida de cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas. **Química Nova**, v. 35, p. 553-558, 2012.

SILVA, C. E. A.; TORRES, J. P. M.; MALM, O. Toxicologia das bifenilas policloradas. **Oecol Bras**, v. 11, p. 179-187, 2007.

SILVA, C. E. A. et al. Organochlorine compounds in sharks from the Brazilian coast. **Marine Pollution Bulletin**, v. 58, p. 294-298, 2009.

SONG, Y. et al. Levels of PCDD/Fs and DL-PCBs in selected foods and estimated dietary intake for the local residents of Luqiao and Yuhang in Zhejiang, China. **Chemosphere**, v. 85, p. 329-334, 2011.

STORELLI, M. M.; PERRONE, V. G. Detection and quantitative analysis of organochlorine compounds (PCBs and DDTs) in deep sea fish liver from Mediterranean Sea. **Environmental Science and Pollution Research International**, v. 17, p. 968-976, 2010.

STORELLI, M. M. et al. Polychlorinated biphenyls (PCBs), dioxins and furans (PCDD/Fs): Occurrence in fishery products and dietary intake. **Food Chemistry**, v. 127, p. 1648-1652, 2011.

SUPERINTENDÊNCIA DE CONTROLE DE ENDEMIAS DO ESTADO DE SÃO PAULO (SUCEN). **Segurança em Controle Químico de Vetores**. Disponível em: <<http://www.saude.sp.gov.br/sucen-superintendencia-de-controle-de-endemias/programas/seguranca-do-trabalhador/seguranca-em-controle-quimico-de-vetores>>. Acesso em 25 out. 2013.

TAI, P. T. et al. Dioxin concentrations in breast milk of Vietnamese nursing mothers: A survey four decades after the herbicide spraying. **Environmental Science & Technology**, v. 45, p. 6625-6632, 2011.

TERRAB, A. et al. Characterization of Moroccan unifloral honeys using multivariate analysis. **European Food Research and Technology**, v. 218, p. 88-95, 2003.

TOMAS-BARBERÁN, F. A. et al. HPLC flavonoid profiles as markers for the botanical origin of European unifloral honeys. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 81, p. 485-496, 2001.

TSIPLAKOU, E. et al. Pesticide residues in milks and feedstuff of farm animals drawn from Greece. **Chemosphere**, v. 80, p. 504-512, 2010.

TSIROPOULOS, N. G.; AMVRAZI, E. G. Determination of pesticide residues in honey by single-drop microextraction and gas chromatography. **Journal of AOAC International**, v. 94, p. 634-644, 2011.

TSUKIMORI, K. et al. Long-term effects of polychlorinated biphenyls and dioxins on pregnancy outcomes in women affected by Yusho incident. **Environmental Health Perspectives**, v. 116, p. 626-630, 2008.

UNITED NATIONS ENVIRONMENTAL PROGRAMME (UNEP). **Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants (POPs)**. Stockholm, Sweden, 2001. Disponível em: <<http://chm.pops.int/TheConvention/Overview/TextoftheConvention/tabid/2232/Default.aspx>>. Acesso em: 29 out. 2013.

UNITED NATIONS ENVIRONMENTAL PROGRAMME (UNEP). **Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants (POPs) as amended in 2009: Text and annexes.** Disponível em: <<http://chm.pops.int/TheConvention/Overview/TextoftheConvention/tabid/2232/Default.aspx>>. Acesso em: 29 out. 2013.

UNITED NATIONS ENVIRONMENTAL PROGRAMME (UNEP). **An amendment to Annex A adopted by the Conference of the Parties to the Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants at its fifth meeting (Decision SC-5/3).** 2011. Disponível em: <<http://chm.pops.int/TheConvention/Overview/TextoftheConvention/tabid/2232/Default.aspx>>. Acesso em: 29 out. 2013.

USYDUS, Z. et al. Food of marine origin: Between benefits and potential risks. Part I. Canned fish on the Polish market. **Food Chemistry**, v. 111, p. 556-563, 2008.

VAN DEN BERG, M. et al. Toxic equivalency factors (TEFs) for PCBs, PCDDs, PCDFs for humans and wildlife. **Environmental Health Perspectives**, v. 106, p. 775-792, 1998.

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**, v. 93, p. 223-241, 2006.

VOORSPOELS, S. et al. Dietary PCB intake in Belgium. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 25, p. 179-182, 2008.

WALORCZYK, S. Development of a multi-residue screening method for the determination of pesticides in cereals and dry animal feed using gas chromatography-triple quadrupole tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1165, p. 200-212, 2007.

WALSH, B. The plight of the honeybee. **Time Magazine**, v.182, n.8, 2013.

WANG, J. et al. Residues of polybrominated diphenyl ethers in honeys from different geographic regions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 3495-3501, 2010.

WARE, G. W. **The pesticide book.** San Francisco: W. H. Freeman & Co., 1978.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Data Sheets on Pesticides No. 41: Aldrin.** Geneva: World Health Organization, 1979. Disponível em: <http://www.inchem.org/documents/pds/pds/pest41_e.htm>. Acesso em: 29 out. 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). International Programme on Chemical Safety (IPCS). **Environmental Health Criteria 88: Polychlorinated dibenzo-*para*-dioxin and dibenzofurans.** Geneva: World Health Organization, 1987. Disponível em: <<http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc88.htm>>. Acesso em: 29 out. 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). International Programme on Chemical Safety (IPCS). **Environmental Health Criteria 140: Polychlorinated Biphenyls and Terphenyls.** Geneva: World Health Organization, 1993. Disponível em: <<http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc140.htm>>. Acesso em: 29 out. 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). International Programme on Chemical Safety (IPCS). **Environmental Health Criteria 162: Brominated diphenyl ethers.** Geneva: World Health Organization, 1994. Disponível em: <<http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc162.htm>>. Acesso em: 29 out. 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Concise International Chemical Assessment Document 55: Polychlorinated biphenyls: human health aspects.** Geneva: World Health Organization, 2003. Disponível em: <<http://www.who.int/ipcs/publications/cicad/en/cicad55.pdf>>. Acesso em: 29 out. 2013.

WIEST, L. et al. Multi-residue analysis of 80 environmental contaminants in honeys, honeybees and pollens by one extraction procedure followed by liquid and gas chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, p. 5743-5756, 2011.

WINDAL, I. et al. Dietary intake of PCDD/Fs and dioxin-like PCBs of the Belgian population. **Chemosphere**, v. 79, p. 334-340, 2010.

XING, G. H. et al. Environmental impact and human exposure to PCBs in Guiyu, an electronic waste recycling site in China. **Environment International**, v. 35, p. 76-82, 2009.

YAVUZ, H. et al. Determination of some organochlorine pesticide residues in honeys from Konya, Turkey. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 168, p. 277-283, 2010.

ZHANG, J. et al. Concentrations of PCDD/PCDFs and PCBs in retail foods and an assessment of dietary intake for local population of Shenzhen in China. **Environment International**, v. 34, p. 799-803, 2008.

ZHANG, D. P. et al. Intakes of omega-3 polyunsaturated fatty acids, polybrominated diphenyl ethers and polychlorinated biphenyls via consumption of fish from Taihu Lake, China: A risk-benefit assessment. **Food Chemistry**, v. 132, p. 975-981, 2012.

ANEXO A

ARTIGO CIENTÍFICO: ASPECTOS TOXICOLÓGICOS E OCORRÊNCIA DOS BIFENILOS POLICLORADOS EM ALIMENTOS

MOHR, Susana; COSTABEBER, Ijoni Hilda. Aspectos toxicológicos e ocorrência dos bifenilos policlorados em alimentos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 42, n. 3, p. 559-566, mar. 2012. doi: 10.1590/S0103-84782012000300028.

Aspectos toxicológicos e ocorrência dos bifenilos policlorados em alimentos

Toxicological aspects and occurrence of polychlorinated biphenyls in food

Susana Mohr^I Ijoni Hilda Costabeber^{II}

- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA -

RESUMO

Os PCBs são compostos orgânicos sintéticos que foram muito utilizados na indústria como fluidos dielétricos em transformadores e capacitores, tintas e óleos lubrificantes hidráulicos. Após serem detectados no meio ambiente no final dos anos 60, em seguida foram identificados como contaminantes de todo o ecossistema global, incluindo o ar, água, solo, plantas, animais, seres humanos e alimentos, o que levou à sua proibição em 1977, nos Estados Unidos, e, em 1981, no Brasil. Porém, sua utilização ainda é permitida no nosso país em equipamentos eletrônicos antigos, até que seja realizada a sua substituição por produto isento de PCBs. Esse fato tem resultado em diversos episódios de utilização, armazenamento e descarte inadequados, contaminando o meio ambiente, os animais, os seres humanos e toda a cadeia alimentar. Estudos demonstram que esses compostos são capazes de causar relevantes alterações, tais como neurotoxicidade, disfunção endócrina, imunossupressão, entre outros. Segundo a IARC, os PCBs estão classificados no Grupo 2A (provavelmente carcinogênicos para seres humanos), com exceção do PCB 126, que pertence ao Grupo 1 (carcinogênico para seres humanos). Como estes compostos são altamente lipofílicos, acumulam-se na cadeia alimentar e têm sido detectados nos mais diversos tipos de alimentos com bastante frequência, sendo esta a principal fonte de contaminação dos seres humanos. Esta revisão bibliográfica tem por objetivo apresentar os principais aspectos relacionados aos bifenilos policlorados em alimentos, incluindo suas características, aspectos toxicológicos e ocorrência.

Palavras-chave: bifenilos policlorados, poluentes orgânicos persistentes, contaminação de alimentos, segurança alimentar, toxicidade.

ABSTRACT

PCBs are synthetic organic compounds that were widely used in industry as dielectric fluids in transformers and capacitors, paints and lubricants hydraulic oils. After being detected in the environment on the end of 60, then they were identified as contaminants in the whole ecosystem, including the air, water, soil, plants, animals, humans and food, which led to its prohibition in 1977, in the United States, and in 1981, in Brasil. Nevertheless, its use is still allowed in our country in old electronics, until its replacement by other free PCB product. This has resulted in several use episodes, inadequate storage and disposal, contaminating the environment, animals, humans and all the food chain. Studies show that these compounds are able to cause significant changes, such as neurotoxicity, endocrine disruption, and immunosuppression, among others. According to the IARC, PCBs are classified in Group 2A (probably carcinogenic to humans), with the exception of PCB 126, which belongs to Group 1 (carcinogenic to humans). Because their high lipophilicity, accumulates in the food chain and, consequently, has been detected often in many kinds of food, which is the main source of human contamination. The aim of this review is to present the mains aspects related to polychlorinated biphenyls in foods, including their characteristics, toxicological aspects and occurrence.

Key words: polychlorinated biphenyls, persistent organic pollutants, food contamination, food security, toxicity.

INTRODUÇÃO

A busca por alimentos seguros pode ser considerada na atualidade como uma forma de

^IDepartamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brasil.

^{II}Departamento de Morfologia, UFSM, Avenida Roraima, 1000, Prédio 19, 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil. E-mail: ijonicostabeber@gmail.com. Autor para correspondência.

conhecimento aplicado à qualidade de vida. Na visão atual do consumidor, o conceito de qualidade de um alimento não engloba somente as características de sabor, aroma e aparência, mas também a preocupação de que não cause danos à saúde e seja livre de contaminantes físicos, químicos e microbiológicos. Disponibilizar alimentos seguros para a população é uma tarefa que envolve todas as esferas do governo, bem como as empresas e estabelecimentos privados afins ao processo.

A presença de contaminantes químicos nos alimentos pode causar vários danos, incluindo reações de hipersensibilidade e toxicidade, que podem ocorrer de forma aguda, crônica e/ou retardada, como a ação carcinogênica (MIDIO & MARTINS, 2000). Dentre esses contaminantes químicos, destacam-se os bifenilos policlorados (PCBs), compostos pertencentes à classe dos poluentes orgânicos persistentes (POPs), presentes em inúmeras amostras indicadoras da contaminação ambiental. Sua descoberta ocorreu há mais de cem anos, tendo sido amplamente utilizados pela indústria durante décadas em diversas aplicações (ERICKSON & KALEY II, 2011). Inicialmente detectados no meio ambiente no final dos anos 60, foram identificados como contaminantes em quase todos os componentes do ecossistema global, resultando em inúmeros efeitos tóxicos e biológicos. Estes compostos são comprovadamente causadores de problemas reprodutivos, imunológicos e de danos ao fígado (SAFE et al., 1985). As proporções da dispersão e transferência desses compostos para os animais, vegetais e seres humanos são difíceis de serem estimadas (WHO, 1993).

O objetivo desta revisão bibliográfica é apresentar os principais aspectos relacionados aos bifenilos policlorados em alimentos, incluindo suas características, aspectos toxicológicos e ocorrência.

Características gerais dos bifenilos policlorados

Os PCBs são hidrocarbonetos clorados, fabricados comercialmente pela progressiva cloração do bifenil na presença de um catalisador. Dependendo das condições de reação, as proporções de cloração podem variar entre 21 e 68%. Quimicamente, são caracterizados por dois anéis benzênicos unidos por uma ligação C-C, tendo a fórmula geral de $C_{12}H_{(10-n)}Cl_n$ ($1 \leq n \leq 10$). Suas moléculas podem apresentar diversas substituições em relação à quantidade de átomos de cloro, variando de 1 a 10 átomos, podendo ser obtidas até 209 estruturas diferentes, denominadas de congêneres (PEREIRA, 2004; ERICKSON & KALEY II, 2011). Os anéis de benzeno podem girar em torno da ligação que os une, resultando em duas conformações

espaciais: planar ou coplanar. A conformação planar apresenta átomos de cloro na posição *orto* (2,2'), enquanto que a coplanar não possui átomos de cloro nessa posição (PENTEADO & VAZ, 2001). A estrutura dos PCBs possui uma considerável resistência a ácidos, bases, altas temperaturas e correntes elétricas, além de ser uma substância não inflamável (OMAYE, 2004). São praticamente insolúveis em água e facilmente solúveis em carboidratos, gorduras e outros compostos orgânicos, sendo rapidamente absorvidos por tecidos gordurosos (WHO, 1993; SILVA et al., 2007).

Devido ao grande emprego de PCBs, a produção mundial acumulada foi de aproximadamente 1.200.000 toneladas. Destes, cerca de 60% foram utilizados em transformadores e capacitores, 15% como fluídos de transferência de calor e 25% como aditivos na formulação de plastificantes, tintas, adesivos e pesticidas (PENTEADO & VAZ, 2001). Segundo Omaye (2004), a produção de PCBs nos Estados Unidos foi interrompida em 1977, entretanto, mais de 500.000 toneladas foram produzidas naquele país. Estima-se que dois terços foram degradados ou destruídos, mas, devido a seu alto grau de estabilidade, cerca de 200.000 toneladas ainda podem estar presentes no meio ambiente.

No Brasil, não se tem registros de sua produção, sendo o produto importado principalmente dos Estados Unidos e Alemanha. A Portaria Interministerial 19, de 29 de janeiro de 1981, estabeleceu a proibição da fabricação, comercialização e uso de PCBs em todo território nacional, porém permite que os equipamentos já instalados continuem em funcionamento até a sua substituição integral ou troca do fluído dielétrico por produto isento de PCBs (BRASIL, 1981).

A contaminação ambiental ocorre principalmente a partir do descarte de equipamentos elétricos antigos em locais não apropriados, contaminando o solo e as águas. Também ocorre durante a incineração do lixo industrial e municipal, pois os incineradores não são efetivos em sua destruição. Os PCBs são inflamáveis a altas temperaturas e os produtos de sua combustão podem ser muito mais perigosos do que o produto original, como os furanos (PCDFs). A combustão dos produtos de grau técnico contendo PCBs e benzenos clorados, como os fluídos dielétricos, pode também produzir as dioxinas (PCDDs) (WHO, 2003; PEREIRA, 2004). Segundo a legislação do Conselho Nacional do Meio Ambiente (BRASIL, 2002), todo sistema de tratamento térmico para resíduos industriais deverá atingir a taxa de eficiência de destruição e remoção (EDR) superior ou igual a 99,99% para os PCBs, com as câmaras

operando a uma temperatura mínima de 800°C. Por esse motivo, muitos equipamentos desativados contendo PCBs ainda continuam armazenados em depósitos, como ocorreu recentemente no Porto de Rio Grande (RS), o qual foi autuado e multado pelo IBAMA por manter 21 toneladas de óleo Ascarel (denominação comercial do óleo de PCBs no Brasil) armazenadas em transformadores desativados e tonéis. Isso demonstra que, apesar de esse produto estar proibido há quase três décadas no país, o risco de contaminação ambiental ainda é muito grande.

Aspectos toxicológicos dos bifenilos policlorados

O homem pode contaminar-se com PCBs a partir do meio ambiente, por ingestão através de alimentos, inalação, absorção dérmica e processos de combustão inadequados. As vias de entrada dos PCBs no organismo humano são através do trato gastrointestinal, pulmões ou epiderme (WHO, 1993). Segundo ROSS (2004), a exposição humana aos PCBs ocorre principalmente pela ingestão acidental de alimentos com baixos níveis de contaminação. O mecanismo e a cinética da biotransformação dos PCBs dependem de inúmeros fatores, incluindo a capacidade metabólica do organismo e a estrutura do congêneres de PCB (MAERVOET et al., 2004). Aqueles congêneres que não contêm átomos de cloro na posição *orto*, mas possuem átomos de cloro na posição *para* e têm no mínimo um par de cloros na posição *meta*, são considerados os mais tóxicos, devido à alta afinidade com o receptor Ah (*aryl hydrocarbon*), tais como o 3,3',4,4'-tetraclorobifenil (PCB 77), 3,4,4',5-tetraclorobifenil (PCB 81), 3,3',4,4',5-pentaclorobifenil (PCB 126) e 3,3',4,4',5,5'-hexaclorobifenil (PCB 169). Os mecanismos de ação bioquímico e toxicológico desses compostos são semelhantes aos da 2,3,7,8-tetraclorodibenzeno-*p*-dioxina (TCDD) (SAFE et al., 1985; SILVA et al., 2007) e, por esse motivo, estes congêneres são chamados de PCBs semelhantes às dioxinas (*DL-PCBs: dioxin-like PCBs*). Já as dioxinas são formadas indesejavelmente a partir dos PCBs, sendo que a maioria dos casos de contaminação resulta de sua formação a partir de processos industriais, incineração do lixo industrial (WEBER et al., 2008), ou incêndio acidental (VASSILIADOU et al., 2009). O termo "dioxinas" compreende um total de 210 congêneres, os quais estão quimicamente e estruturalmente relacionados aos hidrocarbonetos aromáticos clorados, incluindo 75 congêneres de PCDD e 135 congêneres de PCDF. Seu potencial toxicológico difere significativamente, dependendo do grau de cloração e da posição dos átomos de cloro em seus dois anéis aromáticos. Todos os 17 congêneres de PCDD/PCDFs

com substituições nas posições 2, 3, 7 e 8 possuem um perfil toxicológico semelhante, os quais incluem toxicidade dérmica, carcinogenicidade, imunotoxicidade e toxicidade no sistema reprodutivo (SAFE, 1986). Porém, os congêneres 2,3,7,8-tetraclorodibenzeno-*p*-dioxina, 2,3,4,7,8-pentaclorodibenzenofurano, bem como o PCB 126 (3,3',4,4',5-pentaclorobifenil) foram recentemente classificados pela *International Agency for Research on Cancer* (IARC) no Grupo 1 (comprovadamente carcinogênicos para os seres humanos) (BAAN et al., 2009).

A maioria das misturas comerciais de PCBs, porém, está baseada nos sete indicadores (28, 52, 101, 118, 138, 153 e 180). O somatório de seis desses indicadores, com exceção do PCB 118, representa cerca de 50% da contaminação dos alimentos por PCBs não semelhantes às dioxinas (*NDL-PCBs: non-dioxin like PCBs*) (EFSA, 2005; FERRANTE et al., 2011). Os NDL-PCBs são reconhecidamente menos tóxicos que os congêneres DL, embora sejam igualmente perigosos devido ao fato de serem comumente encontrados nos seres humanos, animais selvagens e peixes (FERRANTE et al., 2010), expostos através da cadeia alimentar em concentrações muito maiores do que os DL-PCBs (STORELLI & PERRONE, 2010). Está cada vez mais claro que a maioria dos PCBs que possuem átomos de cloro na posição *orto* (NDL-PCBs), os quais possuem pequena afinidade pelos receptores Ah e que se pensava ser biologicamente inativos, estão envolvidos em relevantes alterações, tais como neurotoxicidade, disfunção endócrina e imunossupressão (SELGRADE, 2007). A respeito dos efeitos dos NDL-PCBs no sistema imune, alguns estudos *in vivo* demonstraram supressão na produção de anticorpos e da resposta imune durante a fagocitose, além da diminuição na resistência a infecções em seres humanos e animais expostos (LUEBKE et al., 2004; LEVIN et al., 2005; DALLAIRE et al., 2006; SELGRADE, 2007). As condições que levam à liberação e redistribuição desses compostos podem fornecer informações sobre seu perfil toxicológico, cinética e efeitos patológicos em seres humanos (KIM et al., 2011). Uma perda de peso moderada foi associada com o aumento na concentração de PCBs no plasma sanguíneo, sugerindo que a redução desses poluentes na massa de gordura corporal pode estar associada ao aumento da lipólise (HUE et al., 2006).

Os compostos mais clorados são mais persistentes, sendo absorvidos pelo sistema intestinal, acumulando-se principalmente nos tecidos gordurosos e fígado, nos quais podem permanecer por diversos anos. Já as formas menos cloradas entram na circulação hepática portal, são submetidas a um metabolismo

primário e podem ser metabolizadas e excretadas (ATSDR, 2000). As principais rotas de eliminação dos PCBs são as fezes, a urina e o leite materno (WHO, 2003).

Ao nível de exposição atual, é pouco provável que os PCBs causem graves efeitos a curto prazo na saúde humana. Alguns estudos demonstram que a exposição direta pode causar problemas na pele, irritação no nariz e pulmões, mal estar gastrointestinal, alterações sanguíneas e hepáticas, além de depressão e fadiga, principalmente em locais onde são mantidos ou consertados transformadores que ainda contém PCBs (ATSDR, 2000). Já os efeitos na saúde a longo prazo, porém, são inúmeros. Segundo a *International Agency for Research on Cancer* (IARC), os PCBs estão classificados no Grupo 2A (provavelmente, carcinogênicos para seres humanos), com exceção do PCB 126, já mencionado anteriormente (Grupo 1). Além disso, diversos estudos têm sugerido que a exposição aos PCBs está associada ao aumento do risco do câncer de mama (RECIO-VEGA et al., 2011), câncer do trato biliar (ADENUGBA et al., 2009), câncer de fígado, estômago, intestino e próstata (PRINCE et al., 2006), entre outros.

Ocorrência dos bifenilos policlorados em alimentos

A entrada dos PCBs na cadeia alimentar deve-se principalmente as suas propriedades físico-químicas. Esses compostos podem sofrer um processo de bioconcentração, no qual ocorre um acúmulo resultante da absorção e eliminação simultâneas, ou uma biomagnificação, resultado do processo de acúmulo da concentração de PCBs nos tecidos dos organismos vivos na passagem de cada nível trófico da cadeia alimentar (PENTEADO & VAZ, 2001). Devido ao fato de que a mais importante via de exposição humana aos PCBs é a ingestão de alimentos contaminados, muitos estudos têm sido realizados para detectar os níveis de contaminação dos alimentos. O maior número de pesquisas concentra-se em países fabricantes de PCBs, como Itália, Alemanha, Japão, Estados Unidos, além de locais com ocorrência de acidentes ambientais com esses materiais.

É sempre preferível que o perigo químico não esteja presente no alimento. Porém, como nem sempre isso é possível, os órgãos governamentais estabelecem os níveis que são aceitos, ou seja, a concentração do perigo que é considerada "aceitável", como limite de referência. A legislação brasileira prevê limites de referência para PCBs em carne ($200\mu\text{g kg}^{-1}$ de gordura), leite ($100\mu\text{g L}^{-1}$) e peixe de cultivo ($15\mu\text{g kg}^{-1}$) (BRASIL, 2011). Já os limites máximos aceitos pela União Europeia são expressos em TEQ (total de toxicidade equivalente) para o somatório de PCDDs e PCDFs e para o somatório de PCDDs e DL-PCBs (CEE, 2006).

A tabela 1 apresenta a ocorrência de bifenilos policlorados em alimentos de diversos países, com estudos realizados entre os anos de 2006 e 2011. Com relação à carne, produtos cárneos e fígado, observa-se que a salsicha hot-dog analisada no Brasil foi a que apresentou a maior contaminação (COSTABEBER et al., 2006). Já o fígado bovino, que é um dos locais em que os PCBs armazenam-se no organismo, apresentou baixa contaminação quando relacionado aos outros alimentos do grupo (TURRIO-BALDASSARI, 2009). No grupo dos pescados, uma concentração considerável foi detectada no salmão proveniente da Bélgica (VOORSPOELS et al., 2008), seguido do salmão da Dinamarca (FROMBERG et al., 2011). Esse mesmo estudo na Bélgica também detectou uma alta contaminação em ovos. Já em outro estudo com ovos, realizado mais recentemente na Dinamarca, a contaminação foi menor (FROMBERG et al., 2011). Em relação aos lácteos, uma grande contaminação foi detectada no leite bovino do Irã (BAYAT et al., 2011), seguido pelo leite do Brasil (HECK et al., 2007). Já os leites provenientes da Dinamarca (FROMBERG et al., 2011) e da Itália (TURRIO-BALDASSARI et al., 2009) apresentaram contaminações inferiores. No que diz respeito aos queijos, os provenientes do Brasil (SANTOS et al., 2006) apresentaram contaminação superior quando comparados aos provenientes da Dinamarca (FROMBERG et al., 2011). O leite materno, uma das principais vias de eliminação dos PCBs do organismo, apresentou grande quantidade de resíduos nos estudos realizados recentemente na Espanha (GÓMARA et al., 2011) e no Japão (TOKADA et al., 2010). Porém, comparando-se com o estudo realizado na China, o valor apresenta-se inferior (XING et al., 2009). Suplementos alimentares a base de óleo de fígado de bacalhau e azeite de oliva virgem também foram analisados na Espanha, constatando-se uma alta concentração de PCBs (YAGÜE et al., 2005; MARTÍ et al., 2010).

Com base nesses dados, pode-se analisar melhor a situação da contaminação dos alimentos do Brasil. Embora ainda haja poucos estudos sobre o tema, pode-se observar que os alimentos analisados apresentaram uma contaminação significativa (leite bovino, queijo e salsicha hot-dog), uma vez que não existiram fábricas de PCBs no país. O descarte inadequado de resíduos e equipamentos elétricos antigos talvez possa ser a maior causa dessa contaminação. Um estudo recente realizado no estado do Rio Grande do Sul demonstrou que o índice de contaminação por PCBs em soro de cordão umbilical de recém nascidos foi considerado elevado, quando comparado com estudos da Europa e Estados Unidos (MOHR et al., 2011), indicando que essa contaminação também está presente nos seres humanos.

Tabela 1 - Ocorrência de bifenilos policlorados em alimentos de diversos países.

| País | Alimento | Congêneres de PCBs analisados | Σ PCBs | Referência |
|-----------|--------------------------------|--|---------------------------------------|---------------------------------|
| Japão | Peito de frango | 36 congêneres: 18, 37, 44, 49, 52, 70, 74, 77, 81, 87, 99, 101, 105, 114, 118, 119, 123, 126, 128/158, 138, 151, 156, 157/153, 167, 168, 169, 170, 177, 180, 183, 187, 189, 194, 199 | 3,06ng g ⁻¹ | QIN et al. (2011) |
| Brasil | Salsicha hot-dog | 6 congêneres: 10, 28, 52, 138, 153, 180 | 31,19ng g ⁻¹ gordura | COSTABEBER et al. (2006) |
| Brasil | Carne bovina | 6 congêneres: 10, 28, 52, 138, 153, 180 | 2,82ng g ⁻¹ gordura | COSTABEBER et al. (2006) |
| Itália | Fígado bovino | 6 congêneres: 28, 52, 101, 138, 153, 180 | 0,85 a 1,82ng g ⁻¹ gordura | TURRIO-BALDASSARI et al. (2009) |
| Argentina | Peixe (truta) | 9 congêneres: 44, 87, 110, 118, 138, 149, 153, 180, 187 | 4,7ng g ⁻¹ gordura | ONDARZA et al. (2011) |
| Bélgica | Salmão | 23 congêneres: 28, 52, 74, 95, 99, 101, 105, 110, 118, 128, 138/163, 149, 153, 156, 170,180, 183, 187, 194, 196/203, 199 | 24ng g ⁻¹ | VOORSPOELS et al. (2008) |
| Dinamarca | Salmão | 10 congêneres: 28, 52, 101, 105, 118, 138, 153, 156, 170, 180 | 15,8ng g ⁻¹ | FROMBERG et al. (2011) |
| Bélgica | Ovos | 23 congêneres: 28, 52, 74, 95, 99, 101, 105, 110, 118, 128, 138/163, 149, 153, 156, 170, 180, 183, 187, 194, 196/203, 199 | 35ng g ⁻¹ | VOORSPOELS et al. (2008) |
| Dinamarca | Ovos | 10 congêneres: 28, 52, 101, 105, 118, 138, 153, 156, 170, 180 | 4,7ng g ⁻¹ | FROMBERG et al. (2011) |
| Irã | Leite bovino | 6 congêneres: 28, 52, 101, 138, 153, 180 | 27,06ng g ⁻¹ gordura | BAYAT et al. (2011) |
| Brasil | Leite bovino | 5 congêneres: 10, 28, 52, 138, 180 | 15,5ng g ⁻¹ gordura | HECK et al. (2007) |
| Dinamarca | Leite bovino | 10 congêneres: 28, 52, 101, 105, 118, 138, 153, 156, 170, 180 | 4,4ng g ⁻¹ gordura | FROMBERG et al. (2011) |
| Itália | Leite bovino | 6 congêneres: 28, 52, 101, 138, 153, 180 | 0,18 a 0,48ng g ⁻¹ gordura | TURRIO-BALDASSARI et al. (2009) |
| Brasil | Queijo | 6 congêneres: 10, 28, 52, 138, 153, 180 | 30,84ng g ⁻¹ gordura | SANTOS et al. (2006) |
| Dinamarca | Queijo | 10 congêneres: 28, 52, 101, 105, 118, 138, 153, 156, 170, 180 | 6,8ng g ⁻¹ gordura | FROMBERG et al. (2011) |
| Espanha | Leite materno | 24 congêneres: 28, 52, 77, 81, 95, 101, 105, 114, 118, 123, 126, 132, 138, 149, 153, 156, 157, 167, 169, 170, 180, 183, 189, 194 | 125ng g ⁻¹ gordura | GÓMARA et al. (2011) |
| Japão | Leite materno | 6 congêneres: 28, 52, 101, 138, 153, 180 | 48,28ng g ⁻¹ gordura | TOKADA et al. (2010) |
| China | Leite materno | 36 congêneres: 18, 37, 44, 49, 52, 70, 119, 123, 126, 128/158, 138, 151, 156, 74, 77, 81, 87, 99, 101, 105, 114, 118, 157/153, 167, 168, 169, 170, 177, 180, 183, 187, 189, 194, 199 | 9,50ng g ⁻¹ gordura | XING et al. (2009) |
| Japão | Amêndoa | 36 congêneres: 18, 37, 44, 49, 52, 70, 74, 77, 81, 87, 99, 101, 105, 114, 118, 119, 123, 126, 128/158, 138, 151, 156, 157/153, 167, 168, 169, 170, 177, 180, 183, 187, 189, 194, 199 | 2,69ng g ⁻¹ | QIN et al. (2011) |
| Espanha | Azeite de oliva (virgem) | 5 congêneres: 28, 52, 138, 153, 180 | 37,1ng g ⁻¹ | YAGÜE et al. (2005) |
| Espanha | Supl.alimentar (óleo bacalhau) | 7 congêneres: 28, 52, 101, 118, 138, 153, 180 | 49,7a 98,3ng g ⁻¹ | MARTÍ et al. (2010) |

CONCLUSÃO

Os aspectos toxicológicos dos PCBs são bastante variáveis, devido à quantidade e posição dos átomos de cloro em sua molécula. Os DL-PCBs são os mais tóxicos, pois possuem alta afinidade com os receptores Ah, além de apresentarem um mecanismo de ação toxicológico semelhante à dioxina 2,3,7,8-TCDD. Já os congêneres NDL-PCBs, apesar de apresentarem uma toxicidade menor, são igualmente perigosos, pois foram os mais utilizados em misturas comerciais e, conseqüentemente, os mais detectados em amostras ambientais, seres humanos, animais e alimentos. Estudos já comprovaram que esses congêneres, apesar de possuírem pequena afinidade pelos receptores Ah, estão envolvidos em mecanismos de neurotoxicidade, disfunção endócrina e imunossupressão. Apesar de os PCBs terem sido proibidos há mais de três décadas, seus resíduos ainda são detectados nos mais diversos tipos de alimentos de vários países, inclusive do Brasil. A maior causa talvez esteja nos frequentes acidentes de armazenamento e descarte incorretos, somado a sua grande persistência e bioacumulação. Sua ocorrência em alimentos do mundo inteiro demonstra que o problema é global, incluindo países desenvolvidos e em desenvolvimento. Na maioria das referências consultadas, não se observou uma diminuição nos níveis de PCBs com o passar dos anos, como era de se esperar. As proporções do efeito da contaminação dos PCBs nos seres humanos ainda são difíceis de ser estimadas, porém estudos já comprovaram o seu poder carcinogênico, mutagênico e teratogênico. A necessidade da realização de mais pesquisas no país é evidente, porém os custos para este tipo de análise ainda são muito altos, o que justifica os poucos trabalhos dentre as referências consultadas. Contudo, mais pesquisas sobre a ocorrência dos PCBs em alimentos fazem-se necessárias no mundo inteiro, devido à grande variabilidade nos resultados obtidos dentro da literatura consultada.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq - Processo 578343/2008-8). S. Mohr é bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). I. Costabeber é bolsista de Produtividade em Pesquisa (CNPq).

REFERÊNCIAS

- ADENUGBA, A. et al. Polychlorinated biphenyls in bile of patients with biliary tract cancer. *Chemosphere*, v.76, n.6, p.841-846, 2009. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S004565350900441X>>. Acesso em: 28 nov. 2011. doi: 10.1016/j.chemosphere.2009.04.003.
- ATSDR. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. **Toxicological profile for polychlorinated biphenyls (PCBs)**. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, 2000. Acesso em: 28 nov. 2011. Online. Disponível em: <<http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp.asp?id=142&tid=26>>.
- BAAH, R. et al. A review of human carcinogens – Part F: chemical agents and related occupations. *Lancet Oncology*, v.10, n.12, p.1143-1144, 2009. Disponível em: <[http://www.thelancet.com/journals/lanonc/article/PIIS1470-2045\(09\)70358-4/fulltext](http://www.thelancet.com/journals/lanonc/article/PIIS1470-2045(09)70358-4/fulltext)>. Acesso em: 28 nov. 2011. doi: 10.1016/S1470-2045(09)70358-4.
- BAYAT, S. et al. Survey of organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in commercial pasteurized milk in Iran. *Environmental Monitoring and Assessment*, v.175, p.469-474, 2011. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/e67811h228744614/>>. Acesso em: 28 nov. 2011. doi: 10.1007/s10661-010-1544-y.
- BRASIL. Portaria Interministerial n.19 de 29 de janeiro de 1981. Acesso em: 28 nov. 2011. Online. Disponível em: <<http://www.ipef.br/legislacao/bdlegislacao/detalhes.asp?Id=235>>.
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Resolução n.316 de 29 de outubro de 2002. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Poder Executivo, Brasília, DF, 20 de novembro de 2002, seção 1.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Programa de controle de resíduos de contaminantes em carnes, leite, mel, ovos e pescado – PNCRC/2011**. Instrução Normativa n.24 de 9 de agosto de 2011.
- CEE. Comissão das Comunidades Europeias. Regulamento (CE) n.1881/2006 de 19 de dezembro de 2006. **Fixa os teores máximos de certos contaminantes presentes em gêneros alimentícios**. Acesso em: 28 nov. 2011. Online. Disponível em: <<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2006:364:0005:0024:PL:PDF>>.
- COSTABEBER, I. et al. Levels of polychlorinated biphenyls (PCBs) in meat and meat products from the state of Rio Grande do Sul, Brazil. *Food and Chemical Toxicology*, v.44, n.1, p.1-7, 2006. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278691505000207>>. Acesso em: 28 nov. 2011. doi: 10.1016/j.fct.2005.01.005.
- DALLAIRE, F. et al. Effect of prenatal exposure to polychlorinated biphenyls on incidence of acute respiratory infections in preschool Inuit children. *Environmental Health Perspectives*, v.114, n.8, p.1301-1305, 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1289/ehp.9084>>. Acesso em: 28 nov. 2011. doi: 10.1289/ehp.8683.
- EFSA. European Food Safety Authority. Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the commission related to the presence of non dioxin-like polychlorinated biphenyls (PCB) in feed and food. *European Food Safety Authority Journal*, n.284, p.1-137, 2005. Disponível em: <<http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/284.htm>>. Acesso em: 28 nov. 2011. doi: 10.2903/j.efsa.2005.284.

- ERICKSON, M.D.; KALEY II, R.G. Applications of polychlorinated biphenyls. **Environmental Science and Pollution Research**, v.18, n.2, p.135-151, 2011. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/43r52v1238412618/>>. Acesso em: 28 nov. 2011. doi: 10.1007/s11356-010-0392-1.
- FERRANTE, M.C. et al. Polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides in European eel (*Anguilla Anguilla*) from the Garigliano River (Campania region, Italy). **Chemosphere**, v.78, n.6, p.709-716, 2010. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653509013836>>. Acesso em: 28 nov. 2011. doi: 10.1016/j.chemosphere.2009.11.026.
- FERRANTE, M.C. et al. Effects of non-dioxin-like polychlorinated biphenyl congeners (PCB 101, PCB 153 and PCB 180) alone or mixed on J774A.1 macrophage cell line: modification of apoptotic pathway. **Toxicology Letters**, v.202, n.1, p.61-68, 2011. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378427411000257>>. Acesso em: 28 nov. 2011. doi: 10.1016/j.toxlet.2011.01.023.
- FROMBERG, A. et al. Estimation of dietary intake of PCB and organochlorine pesticides for children and adults. **Food Chemistry**, v.125, n.4, p.1179-1187, 2011. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814610012720>>. Acesso em: 28 nov. 2011. doi: 10.1016/j.foodchem.2010.10.025.
- GÓMARA, B. et al. Occurrence of co-planar polybrominated/chlorinated biphenyls (PXBs), polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) and polychlorinated biphenyls (PCBs) in breast milk of women from Spain. **Chemosphere**, v.83, n.6, p.799-805, 2011. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S004565351100244X>>. Acesso em: 28 nov. 2011. doi: 10.1016/j.chemosphere.2011.02.080.
- HECK, M.C. et al. Estimation of children exposure to organochlorine compounds through milk in Rio Grande do Sul, Brazil. **Food Chemistry**, v.102, n.1, p.288-294, 2007. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814606004109>>. Acesso em: 28 nov. 2011. doi: 10.1016/j.foodchem.2006.05.019.
- HUE, O. et al. Increased plasma levels of toxic pollutants accompanying weight loss induced by hypocaloric diet or by bariatric surgery. **Obesity Surgery**, v.16, n.9, p.1145-1154, 2006. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/60022m76182v2493/>>. Acesso em: 28 nov. 2011. doi: 10.1381/096089206778392356.
- KIM, M.J. et al. Fate and complex pathogenic effects of dioxins and polychlorinated biphenyls in obese subjects before and after drastic weight loss. **Environmental Health Perspectives**, v.119, n.3, p.377-383, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1289/ehp.1002848>>. Acesso em: 28 nov. 2011. doi: 10.1289/ehp.1002848.
- LEVIN, M. et al. Non-coplanar PCB-mediated modulation of human leukocyte phagocytosis: a new mechanism for immunotoxicity. **Journal of Toxicology and Environmental Health A**, v.68, n.22, p.1977-1993, 2005. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/15287390500227126>>. Acesso em: 28 nov. 2011. doi: 10.1080/15287390500227126.
- LUEBKE, R.W. et al. Suppression of immune function and susceptibility to infections in humans: association of immune function with clinical disease. **Journal of Immunotoxicology**, v.1, n.1, p.15-24, 2004. Disponível em: <<http://informahealthcare.com/toc/imt/1/1/>>. Acesso em: 28 nov. 2011. doi: 10.1080/15476910490438342.
- MAERVOET, J. et al. A reassessment of the nomenclature of polychlorinated biphenyl (PCB) metabolites. **Environmental Health Perspectives**, v.112, n.3, p.291-294, 2004. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1289/ehp.6409>>. Acesso em: 28 nov. 2011. doi: 10.1289/ehp.6409.
- MARTÍ, M. et al. Persistent organic pollutants (PCDD/Fs, dioxin-like PCBs, marker PCBs, and PBDEs) in health supplements on the Spanish market. **Chemosphere**, v.78, n.10, p.1256-1262, mar. 2010. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653509014611>>. Acesso em: 28 nov. 2011. doi: 10.1016/j.chemosphere.2009.12.038.
- MIDIO, A.F.; MARTINS, I.S. **Toxicologia de alimentos**. São Paulo: Varela, 2000. 295p.
- MOHR, S. et al. Determinação de bifenilos policlorados em soro de cordão umbilical através de extração por hidrólise ácida seguida de cromatografia a gás acoplada a um microdetector de captura de elétrons. **Química Nova**, v.34, n.3, p.444-449, 2011. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/qn/v34n3/15.pdf>>. Acesso em: 28 nov. 2011. doi: 10.1590/S0100-40422011000300015.
- OMAYE, S.T. **Food and nutritional toxicology**. Boca Raton: CRC, 2004. 319p.
- ONDARZA, P.M. et al. Polybrominated diphenyl ethers and organochlorine compound levels in Brown trout (*Salmo trutta*) from Andean Patagonia, Argentina. **Chemosphere**, v.83, n.11, p.1597-1602, 2011. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653511000075>>. Acesso em: 28 nov. 2011. doi:10.1016/j.chemosphere.2011.01.005.
- PENTEADO, J.C.; VAZ, J.M. O legado das bifenilas policloradas (PCBs). **Química Nova**, v.24, n.3, p.390-398, 2001. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/qn/v24n3/a16v24n3.pdf>>. Acesso em: 28 nov. 2011. doi: 10.1590/S0100-40422001000300016.
- PEREIRA, M.S. Polychlorinated dibenzo-p-dioxins (PCDD), dibenzofurans (PCDF) and polychlorinated biphenyls (PCB): main sources, environmental behaviour and risk to man and biota. **Química Nova**, v.27, n.6, p.934-943, 2004. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/qn/v27n6/22284.pdf>>. Acesso em: 28 nov. 2011. doi: 10.1590/S0100-40422004000600018.
- PRINCE, M.M. et al. Mortality and exposure response among 14,458 electrical capacitor manufacturing workers exposed to polychlorinated biphenyls (PCBs). **Environmental Health Perspectives**, v.114, n.10, p.1508-1514, 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1289/ehp.9175>>. Acesso em: 28 nov. 2011. doi: 10.1289/ehp.9175.
- QIN, Y.Y. et al. Persistent organic pollutants in food items collected in Hong Kong. **Chemosphere**, v.82, n.9, p.1329-1336, 2011. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/>>

- science/article/pii/S0045653510013998>. Acesso em: 28 nov. 2011. doi: 10.1016/j.chemosphere.2010.12.009.
- RECIO-VEGA, R. et al. Serum levels of polychlorinated biphenyls in Mexican women and breast cancer risk. **Journal of Applied Toxicology**, v.31, n.3, p.270-278, 2011. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jat.1672/abstract>>. Acesso em: 28 nov. 2011. doi: 10.1002/jat.1672.
- ROSS, G. The public health implications of polychlorinated biphenyls (PCBs) in the environment. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.59, n.3, p.275-291, 2004. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0147651304000909>>. Acesso em: 28 nov. 2011. doi: 10.1016/j.ecoenv.2004.06.003.
- SAFE, S. et al. PCBs: structure-function relationships and mechanism of action. **Environmental Health Perspectives**, v.60, p.47-56, 1985. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1289/ehp.856047>>. Acesso em: 28 nov. 2011. doi: 10.1289/ehp.856047.
- SAFE, S.H. Comparative toxicology and mechanism of action of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v.26, p.371-399, 1986. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.pa.26.040186.002103>>. Acesso em: 28 nov. 2011. doi: 10.1146/annurev.pa.26.040186.002103.
- SANTOS, J.S. et al. Assessment of polychlorinated biphenyls (PCBs) in cheese from Rio Grande do Sul, Brazil. **Chemosphere**, v.65, n.9, p.1544-1550, 2006. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653506004255>>. Acesso em: 28 nov. 2011. doi: 10.1016/j.chemosphere.2006.04.003.
- SELGRADE, M.K. Immunotoxicity: the risk is real. **Toxicological Sciences**, v.100, n.2, p.328-332, 2007. Disponível em: <<http://toxsci.oxfordjournals.org/content/100/2/328.full>>. Acesso em: 28 nov. 2011. doi: 10.1093/toxsci/kfm244.
- SILVA, C.E.A. et al. Toxicologia das bifenilas policloradas. **Oecologia Brasiliensis**, v.11, n.2, p.179-187, 2007.
- STORELLI, M.M.; PERRONE, V.G. Detection and quantitative analysis of organochlorine compounds (PCBs and DDTs) in deep sea fish liver from Mediterranean Sea. **Environmental Science and Pollution Research**, v.17, n.4, p.968-976, 2010. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/x384658156724021/>>. Acesso em: 28 nov. 2011. doi: 10.1007/s11356-010-0300-8.
- TOKADA, T. et al. Relationship between the concentrations of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins, polychlorinated dibenzofurans, and polychlorinated biphenyls in maternal blood and those in breast milk. **Chemosphere**, v.78, n.2, p.185-192, 2010. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653509011394>>. Acesso em: 28 nov. 2011. doi: 10.1016/j.chemosphere.2009.09.047.
- TURRIO-BALDASSARI, L. et al. PCB, PCDD and PCDF contamination of food of animal origin as the effect of soil pollution and the cause of human exposure in Brescia. **Chemosphere**, v.76, n.2, p.278-285, 2009. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653509002896>>. Acesso em: 28 nov. 2011. doi: 10.1016/j.chemosphere.2009.03.002.
- VASSILIADOU, I. et al. Dioxin contamination after an accidental fire in the municipal landfill of Tagarades, Thessaloniki, Greece. **Chemosphere**, v.74, n.7, p.879-884, 2009. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653508014124>>. Acesso em: 28 nov. 2011. doi: 10.1016/j.chemosphere.2008.11.016.
- VOORSPOELS, S. et al. Dietary PCB intake in Belgium. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v.25, n.2, p.179-182, 2008. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1382668907001639>>. Acesso em: 28 nov. 2011. doi: 10.1016/j.etap.2007.10.013.
- WEBER, R. et al. Dioxin – contemporary and future challengers of historical legacies. **Environmental Science and Pollution Research**, v.15, n.2, p.96-100, 2008. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/9032774680846044/>>. Acesso em: 28 nov. 2011. doi: 10.1065/espr2008.01.473.
- WHO. World Health Organization. **Polychlorinated biphenyls and terphenyls**. Environmental Health Criteria: 140. Geneva: World Health Organization, 1993. 682p.
- WHO. World Health Organization. **Polychlorinated biphenyls: human health aspects**. Disponível em: <<http://www.inchem.org/documents/cicads/cicads/cicad55.htm>>. Online. Acesso em: 28 nov. 2011.
- XING, G.H. et al. Environmental impact and human exposure to PCBs in Guiyu, an electronic waste recycling site in China. **Environment International**, v.35, n.1, p.76-82, 2009. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0160412008001505>>. Acesso em: 28 nov. 2011. doi: 10.1016/j.envint.2008.07.025.
- YAGÜE, C. et al. Determination of pesticides and PCBs in virgin olive oil by multicolumn solid-phase extraction cleanup followed by GC-NPD/ECD and confirmation by ion-trap GC-MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, n.13, p.5105-5109, 2005. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf0502471>>. Acesso em: 28 nov. 2011. doi: 10.1021/jf0502471.