

Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**



ESCOLA NACIONAL DE SAÚDE PÚBLICA  
SERGIO AROUCA  
ENSP

Julio Cesar Simões Rosa

**Avaliação da exposição de puérperas a éteres difenílicos polibromados no município do  
Rio de Janeiro: uma contribuição ao Projeto PIPA**

Rio de Janeiro

2020

Julio Cesar Simões Rosa

**Avaliação da exposição de puérperas a éteres difenílicos polibromados no município do Rio de Janeiro: uma contribuição ao Projeto PIPA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública e Meio Ambiente da Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, na Fundação Oswaldo Cruz, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Toxicologia Ambiental.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Rabello Alves

Coorientadoras: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Cristina Simões Rosa e Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Eline Gonçalves Simões

Rio de Janeiro

2020

**Evaluation of the exposure of puerperal women to polybrominated diphenyl ethers in the city of Rio de Janeiro: a contribution to the PIPA Project**

Catálogo na fonte  
Fundação Oswaldo Cruz  
Instituto de Comunicação e Informação Científica e Tecnológica em Saúde  
Biblioteca de Saúde Pública

R788a Rosa, Julio Cesar Simões.  
Avaliação da exposição de puérperas a éteres difenílicos polibromados no município do Rio de Janeiro: uma contribuição ao Projeto PIPA / Julio Cesar Simões Rosa. -- 2020.  
87 f. : il. color. ; graf. ; tab.

Orientador: Sérgio Rabello Alves.  
Coorientadoras: Ana Cristina Simões Rosa e Eline Gonçalves Simões.  
Dissertação (mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, Rio de Janeiro, 2020.

1. Éteres Fenílicos. 2. Poluentes Orgânicos. 3. Agente Extintor. 4. Plasma. 5. Cromatografia Gasosa. 6. Espectrometria de Massas.  
I. Título.

CDD – 23.ed. – 547.8098153

Julio Cesar Simões Rosa

**Avaliação da exposição de puérperas a éteres difenílicos polibromados no município do Rio de Janeiro: uma contribuição ao projeto PIPA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde Pública e Meio Ambiente, da Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, na Fundação Oswaldo Cruz, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Toxicologia ambiental.

Aprovada em: 07 de agosto de 2020

Banca Examinadora

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Aline de Souza Espindola Santos  
Instituto de Estudos de Saúde Coletiva - Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof. Dr. Josino Costa Moreira  
Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca – Fiocruz

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Eline Gonçalves Simões (Coorientadora)  
Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca - Fiocruz

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Ana Cristina Simões Rosa (Coorientadora)  
Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca - Fiocruz

Prof. Dr. Sérgio Rabello Alves (Orientador)  
Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca - Fiocruz

Rio de Janeiro

2020

Dedico essa obra às minhas filhas Jade, Luisa e Julia.

## AGRADECIMENTOS

Agradecimentos a todas pessoas que contribuíram para a conquista dessa etapa de vida.

À minha mulher, que me apoia, os meus erros e acertos, que reclama de tudo, mas é única. Hoje é dia de retribuir com essa conquista. As minhas filhas Jade, Luisa e Julia que nem sempre entendem minhas ausências, mas continuam firmes e fortes atrapalhando minha concentração, e me trazendo distração, amor e energia para continuar. Amo vocês mais que tudo...até depois do máximo.

À minha mãe por sempre me incentivar e apoiar. Obrigado por você ter sido incansável e nunca ter desistido de mim.

À Tia Célia, que sempre acreditou e deu força para seguir em frente.

À minha irmã e orientadora Ana Cristina, que sempre foi meu exemplo de competência. Me ensinou um monte de coisas, mas o principal foi o amor e a amizade, parceria para vida inteira. Meu cunhado André, meu afilhado Gabriel e Mari pela paciência com a Tina.

À minha orientadora Eline, pela disponibilidade e pronta ajuda em vários momentos em que eu não acreditava que as coisas iriam deslanchar, você, mesmo com o Murilo, Rafa e Lucas exigindo total atenção, me incentivava e cobrava ...conseguimos.

Ao meu orientador Sérgio, que aceitou de primeira me orientar, superamos todos os contratemplos que surgiram nesse percurso.

À Valquíria, por me ajudar na minha caminhada de recuperação, elaborar e ressignificar várias questões...está funcionando.

Aos amigos da Uned Nilópolis, Marcelo, Vítor, Tyson, Luciano, Jajá, Graciele, Sharon, Dani, Charles e Renata um forte abraço.

Ao Beto, Pedro, André e toda turma do abraço...é só por hoje, funciona!!!

Aos grupos de trabalho que me formaram ao longo da vida, Unidade sete na Resitec, unidade fabril com trabalho em turnos, ensinou-me a ser um elo da corrente, enxergar o quanto cada um é importante no processo produtivo. Em Biomanguinhos, no departamento de vacinas bacterianas (DEBAC), muitos amigos, Felipão, Joubert, Simon, Aline, Úrsula, Eliane Mendes. Um abraço do Julião. No Laboratório tecnologia diagnóstica (LATED), fui abraçado e apoiado no momento mais delicado da minha vida. Agradecimento à Eliane Mendes, que me encaminhou para esse laboratório e sempre acreditou na minha recuperação. Ao Edmilson, Eliane, Keila, Rafaela, Michel, Shaik, Cris Marques, Bernardo, Felipe, Mau Mau, Martha, Nara, Leila, Marcele que moram no meu coração.

Aos meus amigos e companheiros de Trabalho do Cesteh, Vanessa, Leandro, Isabele, Sandra, Mário, Gabriele, Igor, Heldis, Renato, Fernanda, Lucineide, Simone, Josino, Cristiane, Carol, Simone, Regina, Léo, Thelma, Tatyane sempre me escutando e dividindo todas as demandas e me apoiando. Tatyane novamente, pela paciência e dedicação durante o processo analítico.

As professoras Elvira Seixas e Beatriz Oliveira, por toda força e parceria.

E finalmente a Maternidade Escola, toda equipe do IESC e ao Programa Infantil de poluentes atmosféricos...pela possibilidade de desenvolver esse trabalho lindo e de tamanha importância para saúde pública. O meu agradecimento especial as mães, gestantes, mulheres que contribuíram participando do estudo nesse momento tão delicado da vida.

Educação não transforma o mundo.

Educação muda as pessoas.

E pessoas transformam o mundo.

FREIRE, 1979, página 84.

## RESUMO

Os éteres difenílicos polibromados (PBDEs) são utilizados como aditivos retardantes de chamas, principalmente nas indústrias eletroeletrônicas, em materiais de construção (móveis) e na indústria têxtil (roupas e carpetes). Considerados emergentes, são substâncias potencialmente tóxicas e os efeitos na saúde e no ambiente ainda não são totalmente conhecidos. São lipossolúveis e resistentes à degradação, acumulam-se na cadeia trófica, interferindo no sistema endócrino e no sistema imunológico, além do metabolismo e transporte dos hormônios da tireóide devido a sua semelhança com eles. Alguns componentes da família dos PBDEs foram classificados como provavelmente cancerígenos (grupo 2 A) segundo a Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer. A Convenção de Estocolmo listou o éter pentabromodifenílico e o éter octabromodifenílico como poluentes orgânicos persistentes (POPs). Esse trabalho tem como objetivo avaliar as concentrações basais dos PBDEs em amostras de plasma das genitoras em um estudo de seguimento de bebês nascidos em uma área programática do município do Rio de Janeiro. As amostras das mães foram coletadas na maternidade escola da UFRJ pela equipe do Projeto PIPA (Programa Infantil e Poluentes Ambientais) no período de outubro de 2017 a março de 2018, no momento da consulta pré-natal e foram transportadas até o laboratório e condicionadas em freezer até o momento da análise. O método analítico utilizado consistiu na extração dos analitos BDE 47, BDE 99, BDE 100, por extração em fase sólida em coluna de  $C_{18}$  e detecção e quantificação por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas sequencial com triplo quadrupolo. A faixa de trabalho do método otimizado na matriz plasma foi determinada entre 0,2 a 6,0  $ng\ mL^{-1}$ . Os limites de detecção e quantificação foram 0,097 e 0,295  $ng\ mL^{-1}$  para o PBDE 47; 0,157 e 0,475  $ng\ mL^{-1}$  para o PBDE 99; 0,180 e 0,545  $ng\ mL^{-1}$  para o PBDE 100. A recuperação dos compostos foi verificada nas concentrações de 0,2; 1,0; 6,0  $ng\ mL^{-1}$ . Os resultados obtidos variaram de 56 a 97% para o PBDE 47, 76 a 103% para o PBDE 99 e de 60 a 113% para o PBDE 100, indicando que o método apresentou boa exatidão para utilização em plasma humano. As concentrações encontradas em apenas 9 amostras, representando 7,5 % do total de 120 amostras analisadas, foram 0,15  $ng\ mL^{-1}$  para o PBDE 47 e 0,23  $ng\ mL^{-1}$  para o PBDE 99 no plasma das gestantes, estando estes valores entre os limites de detecção e de quantificação. Estes valores observados mostram baixa exposição das mães avaliadas e estão compatíveis com os valores descritos em população ambientalmente exposta a esta classe de contaminantes químicos, no mundo.

Palavras-chave: Éteres difenílicos polibromados (PBDE), poluentes orgânicos persistentes, retardadores de chamas, plasma, cromatografia em fase gasosa, espectrometria de massas.

## ABSTRACT

PBDEs are flame retardant additives and are used mainly in electronics, building materials and textile industries. They are also called emerging pollutants, and are potentially toxic substances and health effects on human and environment are not fully known. Some PBDE species were classified as probably carcinogenic in group 2A at the International Agency for Research on Cancer. The Stockholm Convention listed Pentabromodiphenyl ether and octabromodiphenyl ether as persistent organic pollutants (POPs). Because they have structural similarity to polychlorinated biphenyls and polybrominated biphenyls are liposoluble and resistant to treatment and degradation, and accumulate in the trophic chain, interfering in endocrine and immune systems, besides metabolism and transport of thyroid hormones due to their similarity with this substances. The aim of this study was to evaluate the basal levels of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in plasma samples from mothers in a follow-up study of infants born in an area in Rio de Janeiro city. These samples were collected at UFRJ maternity school by the PIPA Project team (Children's Program and Environmental Pollutants) from October 2017 to March 2018, at the time of prenatal consultation, were transported to the laboratory and conditioned in a freezer until analysis. The analytical method was based in extraction of PBDE 47, PBDE 99, PBDE 100, by solid phase extraction in C<sub>18</sub> column, detection and quantification by liquid chromatography coupled to sequential mass spectrometry with triple quadrupole. The range of optimized method in plasma was determined between 0.2 to 6.0 ng mL<sup>-1</sup>. The limits of detection and quantification were 0.097 and 0.295 ng mL<sup>-1</sup> for PBDE 47; 0.157 and 0.475 ng mL<sup>-1</sup> for PBDE 99; 0.180 and 0.545 ng mL<sup>-1</sup> for PBDE 100. The recovery was checked at 0.2; 1.0; 6.0 ng mL<sup>-1</sup> levels. The results of averages at tested concentrations were from 56 to 97% for PBDE 47, 76 to 103% for PBDE 99 and 60 to 113% for PBDE 100, showing the method had good accuracy in human plasma. The Concentrations found in only 9 samples, representing 7,5 % of the total of 120 samples, were 0,15 ng mL<sup>-1</sup> for PBDE 47 e 0,23 ng mL<sup>-1</sup> for PBDE 99 in the plasma of pregnant women. These results are betwin limit of detection and limit of quantification. These observed values are low exposure of mothers assessed and the same as described in an environmentally exposed population to this class of chemical contaminants, in other countries.

Keywords: Polybrominated biphenyl ethers (PBDE), Emerging pollutants, Flame retardants, plasma, gas chromatography, Mass spectrometry.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Representação molecular básica dos PBDEs.....	23
Figura 2-	Ocupações relatadas pelas gestantes.....	58
Figura 3-	Equação da reta do congênere PBDE 47 em hexano.....	59
Figura 4-	Equação da reta do congênere PBDE 99 em hexano.....	59
Figura 5-	Cromatograma de íons totais dos PBDE 47, 99 e 100.....	61
Figura 6-	Transição de quantificação e as duas qualificadoras do PBDE 47.....	62
Figura 7-	Transição de quantificação e as duas qualificadoras do PBDE 99.....	62
Figura 8-	Transição de quantificação e as duas qualificadoras do PBDE 100.....	62
Figura 9-	Equação da reta do congênere PBDE 47.....	66
Figura 10-	Equação da reta do congênere PBDE 99.....	66
Figura 11-	Equação da reta do congênere PBDE 100.....	66
Figura 12-	Valores do teste de resíduo para o congênere PBDE 47.....	67
Figura 13-	Valores do teste de resíduo para o congênere PBDE 99.....	67
Figura 14-	Valores do teste de resíduo para o congênere PBDE 100.....	67

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	POPs listados na Convenção de Estocolmo.....	22
Tabela 2-	Linha temporal dos marcos da utilização e restrição dos PBDEs.....	25
Tabela 3-	Congêneres estudados, produto comercial tetra e penta BDEs e suas propriedades.....	27
Tabela 4-	Outros retardantes de chama.....	32
Tabela 5-	Variáveis socioeconômicas.....	57
Tabela 6-	Equação da reta em hexano para os congêneres PBDE 47 e 99.....	59
Tabela 7-	Limites de detecção e quantificação para os PBDE 47 e 99.....	60
Tabela 8-	Transições de Monitoramento Seletivo de Reação dos PBDEs.....	61
Tabela 9-	Resultados de recuperação percentual na etapa de otimização.....	63
Tabela 10-	Resultado do teste F para os congêneres PBDE 47, 99 e 100.....	64
Tabela 11-	Resultado da homocedasticidade.....	65
Tabela 12-	Equação da reta em plasma.....	65
Tabela 13-	Limites de detecção e de quantificação do método.....	68
Tabela 14-	Percentual de recuperação nas concentrações 0,2; 1,0 e 6,0 ng mL <sup>-1</sup> .....	68
Tabela 15-	Avaliação do critério de repetibilidade através do desvio padrão relativo.	69
Tabela 16-	Compostos pesquisados.....	70

## ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas;
APCI	Ionização Química à Pressão Atmosférica (do inglês, Atmospheric Pressure Chemical Ionization);
API	Ionização à Pressão Atmosférica (do inglês, Atmospheric Pressure Ionization);
ATSDR	Agência para substâncias tóxicas e registros de doenças;
AOAC	Association of Official Analytical Chemists;
ASTM	American Society for Testing and Materials;
BDE	Éter difenílico bromado;
CAS	Banco de dados do Chemical Abstracts Service - Chemical American Society;
CEP	Comitê de ética em pesquisa;
CGCRE	Coordenação Geral de Acreditação;
CMD	Concentração Média Determinada;
COP	Conferência das partes, Nações Unidas;
CS	Convenção de Estocolmo;
CV	Coeficiente de Variação;
DICLA	Divisão de Acreditação de Laboratórios;
DOQ	Documento Orientativo da Qualidade;
DP	Desvio Padrão;
DPR	Desvio Padrão Relativo;
ENSP	Escola Nacional de Saúde Pública;
EPA	Agência de proteção ambiental;
EI	Ionização por Elétrons (do inglês, Electron Ionization);
ESI	Ionização por Electrospray (do inglês, Electrospray Ionization);
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz;
GC MSMS	Cromatografia em fase gasosa hifenada a espectrometria de massas de tri- plo quadrupólo (do inglês, gas chromatography triple quadrupole mass spectrometry)

GC ID HRMS	Cromatografia em fase gasosa com espectrometria de massas de alta resolução e diluição isotópica (do inglês, Gas chromatography with high resolution mass spectrometry and isotopic dilution)
GC MS ENCI	Cromatografia em fase gasosa com espectrometria de massas e captura de elétrons (do inglês, Gas chromatography with mass spectrometry and electron capture)
IEC	International Electrotechnical Commission;
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde;
IOC	Instituto Oswaldo Cruz;
ISSO	International Organization for Standardization;
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry;
LD	Limite de Detecção;
LMR	Nível mínimo de risco;
LQ	Limite de Quantificação;
ME	Maternidade escola;
MR	Material de referência;
MRC	Material de Referência Certificado;
MS	Ministério da Saúde;
NBR	Norma Brasileira;
NIT	Norma Inmetro Técnica;
PBB	Bifenilos polibromados;
PBDE	Éteres difenílicos polibromados;
PCB	Bifenilos policlorados;
POP	Poluentes orgânicos persistentes;
SPE	Extração em fase sólida;
TSP	Ionização por Thermospray (do inglês, Thermospray Ionization);
TSQ	Thermo Scientific Quantum;
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro;
USP	Universidade de São Paulo;
VIM	Vocabulário Internacional de Metrologia.

## LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem;
°C	Graus Celsius;
°C min <sup>-1</sup>	Graus Celsius por minuto;
Br	Bromo;
mL min <sup>-1</sup>	Mililitro por minuto;
mL	Mililitro;
ng mL <sup>-1</sup>	Nanograma por mililitro;
pg m <sup>-3</sup>	Picograma por metro cúbico
ng g <sup>-1</sup>	Nanograma por grama

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	18
2	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	21
2.1	POLUENTES ORGÂNICOS PERSISTENTES.....	21
2.2	ÉTERES DIFENÍLICOS POLIBROMADOS (PBDEs) .....	23
2.3	TOXICOCINÉTICA, TOXICODINÂMICA E EFEITOS NA SAÚDE E AMBIENTE.....	26
2.4	NOVOS RETARDANTES DE CHAMA.....	31
2.5	EXPOSIÇÃO NÃO OCUPACIONAL.....	33
2.6	TÉCNICAS DE PREPARO DE AMOSTRAS E EXTRAÇÃO.....	39
2.7	TÉCNICAS ANALÍTICAS UTILIZADAS.....	41
2.8	VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO.....	43
2.8.1	<b>Seletividade</b> .....	43
2.8.2	<b>Linearidade e sensibilidade</b> .....	44
2.8.3	<b>Limites de detecção e de quantificação</b> .....	44
2.8.4	<b>Tendência e recuperação</b> .....	44
2.8.5	<b>Precisão</b> .....	45
3	<b>JUSTIFICATIVA DO TEMA</b> .....	45
4	<b>OBJETIVO</b> .....	47
4.1	OBJETIVO GERAL.....	47
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	47
5	<b>METODOLOGIA</b> .....	48
5.1	POPULAÇÃO ESTUDADA.....	48
5.2	PREPARO DE SOLUÇÕES PADRÃO.....	48
5.3	FORTIFICAÇÃO DO PLASMA.....	49
5.4	PREPARO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO EM SOLVENTE ORGÂNICO.....	49
5.5	PARÂMETROS AJUSTADOS NA CROMATOGRAFIA E NA ESPECTROMETRIA.....	50
5.6	OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO.....	50
5.7	VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA.....	52

5.8	ANÁLISE DAS AMOSTRAS.....	52
5.9	DESENHO DO ESTUDO.....	54
5.10	CRITÉRIOS DE ELEGIBILIDADE.....	54
5.11	ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA.....	54
5.11.1	<b>Parecer consubstanciado do CEP, UFRJ.....</b>	<b>55</b>
5.11.2	<b>Parecer consubstanciado do CEP, Instituto Oswaldo Cruz IOC/FIOCRUZ.....</b>	<b>55</b>
5.12	ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS.....	55
6	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>56</b>
6.1	CARACTERÍSTICAS DA POPULAÇÃO ESTUDADA.....	56
6.2	CARACTERÍSTICAS DA CURVA DE CALIBRAÇÃO EM SOLVENTE ORGÂNICO.....	58
6.3	OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO E ESPECTROMÉTRICO.....	60
6.4	OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA.....	62
6.5	PARÂMETROS DE VALIDAÇÃO DO MÉTODO.....	64
6.5.1	<b>Seletividade / Efeito Matriz.....</b>	<b>64</b>
6.5.2	<b>Linearidade e faixa de trabalho.....</b>	<b>64</b>
6.5.3	<b>Limites de Detecção e de Quantificação do método.....</b>	<b>67</b>
6.5.4	<b>Recuperação.....</b>	<b>68</b>
6.5.5	<b>Precisão / Repetibilidade.....</b>	<b>68</b>
6.6	<b>Algumas características socioeconômicas.....</b>	<b>76</b>
7	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>77</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>78</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Os Éteres Difenílicos Polibromados (PBDEs) pertencem à uma classe de substâncias químicas utilizadas como aditivos retardantes de chamas em aparelhos elétrico-eletrônicos, como televisão e computadores, em materiais de construção e também na indústria têxtil. Esses compostos são estruturalmente semelhantes às Bifenilas Policloradas (PCB) e às Bifenilas Polibromadas (PBB) e, portanto, têm propriedades semelhantes. Os PBDEs possuem 209 congêneres dependendo do número e das posições dos átomos de bromo nos dois anéis benzênicos (ALAEE *et al.*, 2003a).

Com a utilização aliada ao avanço tecnológico, os retardantes de chamas são utilizados para diminuir o risco de danos causados por incêndio (ALAEE *et al.*, 2003b), mas como essas substâncias não são facilmente degradadas, podem ser liberadas para o ambiente e devido às suas propriedades físico-químicas com o passar do tempo contaminam a atmosfera de ambientes internos ou externos, sedimentam nos ambientes aquáticos, são transportadas por grandes distâncias e se acumulam na biota e nos sedimentos (HALE *et al.*, 2003).

A demanda global por PBDE no ano de 1999 foi estimada em cerca de 70.000 toneladas (“BSEF - Bromine: Powering Science and Technologies”, 2019) mas atualmente, sua produção e uso vêm sendo limitados pelas restrições implantadas a partir da inclusão de alguns desses compostos na Convenção de Estocolmo como Poluentes Orgânicos Persistentes (POPs) em 2006 (HUNG *et al.*, 2016).

Apesar desses contaminantes não estarem incluídos em programas de monitoramento de rotina pelos órgãos de controle ambiental e de saúde, eles estão inseridos em normas ou legislações específicas. A Agência de Proteção Ambiental Americana (USEPA), por exemplo, recomenda uma ingesta máxima de  $7 \times 10^{-4}$  (mg kg dia)<sup>-1</sup> e para água potável uma concentração máxima de  $2 \times 10^{-8}$  µg L<sup>-1</sup> (US EPA *et al.*, 2017). A USEPA também estabeleceu limites toleráveis para a presença de PBDEs em solo residencial, solo industrial e água de torneira (USEPA, 2018).

Já a Agência para Substâncias Tóxicas e Registro de Doenças (ATSDR), estabeleceu como concentração mínima de risco (LMR) o valor de 0,006 mg m<sup>-3</sup> para a exposição por inalação média diária e ainda um LMR de  $6 \times 10^{-5}$  (mg Kg dia)<sup>-1</sup> para exposição oral aguda e  $3 \times 10^{-6}$  (mg Kg dia)<sup>-1</sup> para exposição oral de duração intermediária (ATSDR, 2017a).

As principais rotas de exposição aos PBDEs são a ingestão, o manuseio de alimentos, solos e materiais contaminados e a respiração do ar contendo tais substâncias. Além disso,

há registro de contaminação oriunda da utilização de lodos contendo PBDE para adubar o solo e os produtos nele desenvolvidos. Equipamentos eletrônicos contendo essas substâncias também são fontes de exposição tanto pela quantidade deste material descartado (lixo eletroeletrônico) quanto pela liberação dessas substâncias para o ar com o passar do tempo (ANNUNCIACÃO *et al.*, 2018).

Nos Estados Unidos, a poeira doméstica é uma importante rota de exposição, pois mesmo estando presente em baixas concentrações nessa matriz, são responsáveis por 80% do total de contaminação dos indivíduos (USEPA, 2018). A ingestão de alimentos gordurosos, como alguns peixes e leite materno, onde por afinidade química os PBDEs se acumulam, é a causa mais frequente de contaminação. Não há muitas evidências de que a água seja uma fonte de contaminação tão importante devido à sua baixa solubilidade dessas substâncias nessa matriz. Já nos países europeus, onde a vigilância tem maior rigor, esse quadro se inverte, ficando a ingestão de alimentos contaminados como a principal fonte de exposição (ATSDR, 2017a).

Vários estudos investigam essa classe de substâncias em diversas matrizes, tanto biológicas (sangue, leite materno, urina e outros tecidos ) quanto ambientais (materiais particulados atmosféricos, aquáticos, sedimento) (FROMME *et al.*, 2016), sempre indicando que a exposição pode acarretar alterações imunológicas, hepatológicas, neurológicas e interferência endócrina (HERBSTMAN *et al.*, 2010). A exposição ao PBDEs durante gestação é de particular interesse porque existem evidências de que essa exposição pode levar a ocorrência de efeitos adversos ao nascer e na infância (MIRANDA *et al.*, 2015; POON *et al.*, 2018; ZHAO *et al.*, 2019). Entretanto, até o momento nenhum estudo quantificou e avaliou esses poluentes em uma população de gestantes no Brasil.

Os potenciais efeitos à saúde ambiental causados pela contaminação dos PBDEs ainda são pouco estudados no Brasil. Por isto, este estudo se propõe a determinar a contaminação humana de puérperas residentes na região do Grande Rio.

A caracterização do perfil de exposição aos PBDEs em gestantes é uma etapa primordial que descreve a intensidade e a extensão dessa exposição, e norteia a investigação dos potenciais efeitos adversos dessas substâncias ao nascer e durante a infância. Para realizar essa caracterização é preciso desenvolver uma metodologia analítica válida para a determinação dessas substâncias. Assim este trabalho teve por objetivo desenvolver um método analítico por CG e espectrometria de massas sensível, preciso e válido para a determinação dos níveis séricos de PBDEs, em especial os congêneres 47, 99 e 100 em

gestantes de uma população urbana no Rio de Janeiro descrever e comparar esses níveis com os encontrados em populações de gestantes e não gestantes de outros países.

Esse projeto faz parte de um estudo transversal dentro de uma coorte, que é um estudo de seguimento de gestantes e de bebês nascidos e acompanhados até o sexto mês de vida, em uma área programática do município do Rio de Janeiro. Outras substâncias químicas, além dos PBDEs, estão sendo analisadas, como por exemplo organoclorados, piretróides, metais e perfluorados, em outros recortes desse grande projeto (PIPA, 2017).

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1- POLUENTES ORGÂNICOS PERSISTENTES

As substâncias que compõem este grupo são consideradas ambientalmente persistentes devido à sua estabilidade química, sendo alguns compostos incluídos na lista da Convenção de Estocolmo sobre Poluentes Orgânicos Persistentes (POPs) supervisionada pelo Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente (PNUMA) em 2001 (EPA, 2015).

A princípio, 12 substâncias formaram a lista da Convenção de Estocolmo, que foi ampliada em 2009 na 4ª Conferência das Partes (COP 4) com mais 9 substâncias, e depois, em 2011, com a inclusão do Endossulfan. Na COP 6, em maio de 2013, foi adicionado o Hexabromociclododecano. Na COP 7, em maio de 2015, foi incluído o Hexaclorobutadieno, o Pentaclorofenol, seus sais e ésteres e os Naftalenos Policlorados. Em 2017, durante a COP 8, foram adicionados, o Éter Decabromodifenílico e as Parafinas Cloradas de Cadeia Curta. (TEMER *et al.*, 2015).

O Brasil é um dos países signatários desta convenção e deve acolher e seguir as determinações acordadas, sendo o Decreto Legislativo nº 204, de 7 de maio de 2004 e o Decreto nº 5.472, de 20 de junho de 2005, consequências da Convenção de Estocolmo, mesmo não existindo ainda condições ideais de controle dos processos produtivos nas indústrias, controle das importações, exportações e o uso no âmbito nacional (ANNUNCIACÃO *et al.*, 2018a). A pesquisa e o monitoramento de POPs no ambiente em todo o mundo têm sido de grande importância para promover a vigilância desses compostos e mudanças na legislação relacionadas à produção e controle dessas substâncias (EPA, 2015).

As obrigações dos signatários da Convenção de Estocolmo para POPs implicam a criação de medidas para reduzir ou eliminar a produção, uso, importação e exportação, identificar e destinar adequadamente os estoques, produtos e artigos em uso que contêm ou estão contaminados, medidas para identificação, gerenciamento e destinação final de resíduos contaminados com essas substâncias, identificar áreas contaminadas, redução progressiva de emissões e eliminação de fontes produzidas não intencionalmente, fortalecimento e criação de capacidades institucionais para a gestão adequada, disseminação de informações, conscientização do público e capacitação, fortalecimento da capacidade analítica nacional e monitoramento, e por último fortalecer a pesquisa, desenvolvimento e

inovação em soluções e tecnologias alternativas ao uso/liberação desses produtos (TEMER *et al.*, 2015).

As substâncias listadas nos três anexos da Convenção de Estocolmo têm usos agrícola e industrial, o que as tornam contaminantes massivos em grande parte do mundo (TEMER *et al.*, 2015). As substâncias, sua utilização e plano de manejo encontram-se resumidos na tabela 1.

Tabela 1: POPs listados na Convenção de Estocolmo.

POP	USO	ANEXO*
Aldrin	Agrotóxico	A
Clordano	Agrotóxico	A
Clordecano	Agrotóxico	A
Dieldrin	Agrotóxico	A
Endrin	Agrotóxico	A
Heptacloro	Agrotóxico	A
Hexabromobifenil (HBB), Éter Hexabromodifenílico (HexaBDE) e Éter Heptabromodifenílico (HeptaBDE), principais componentes do Éter Octabromodifenílico comercial (c-OctaBDE)	Industrial	A
Hexaclorobenzeno (HCB)	Agrotóxico, industrial e produção não intencional	A e C
Alfa Hexaclorociclohexano (AlfaHCH)	Agrotóxico e produção não intencional	A
Beta Hexaclorociclohexano (Beta HCH)	Agrotóxico e produção não intencional	A
Lindano	Agrotóxico	A
Pentaclorobenzeno	Agrotóxico, industrial e produção não intencional	A e C
Éter Tetrabromodifenílico (TetraBDE) e Éter Pentabromodifenílico (PentaBDE), principais componentes do Éter Pentabromodifenílico comercial (c-PentaBDE)	Industrial	A
Ácido Perfluorooctano Sulfônico (PFOS), seus sais e Fluoreto de Perfluorooctano Sulfônico (PFOSF)	Industrial	B
DDT	Agrotóxico	B
Toxafeno	Agrotóxico	A
Dodecacloro (Mirex)	Agrotóxico	A
Bifenilas Policloradas (PCBs)	Industrial e produção não intencional	A e C
Dioxinas (PCDDs)	Produção não intencional	C
Furanos (PCDFs)	Produção não intencional	C
Endossulfam	Agrotóxico	A

Fonte: Adaptado de Plano Nacional de Implementação Brasil - Convenção de Estocolmo (TEMER *et al.*, 2015).

\*Anexo A – Determina a eliminação, proibindo o uso e estabelece compromisso de eliminação em prazos específicos.

Anexo B – Determina a restrição, permitindo alguns usos com finalidade aceitável, caso não exista substituto viável.

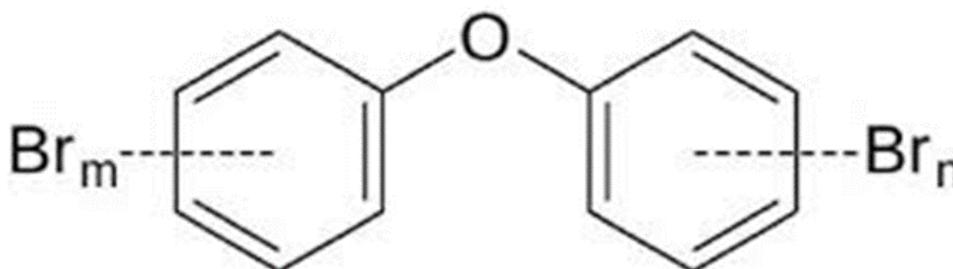
Anexo C – Qualifica a produção não intencional, verificando produtos que podem ser gerados via processos de combustão ou intermediários em reações químicas industriais.

Informações adicionais sobre os efeitos potenciais dessas substâncias sobre a saúde e o ambiente podem ser encontradas em TEMER *et al.*, 2015.

## 2. 2- ÉTERES DIFENÍLICOS POLIBROMADOS (PBDES)

A estrutura química básica dos PBDEs é mostrada na Figura 1.

Figura 1: Representação da estrutura molecular básica dos PBDEs. As letras m e n indicam o número de Br substituítes nos anéis aromáticos e podem variar de 1 a 5, cada.



Os PBDEs possuem de 2 a 10 átomos de bromo em sua estrutura molecular (ATSDR, 2017a). São substâncias utilizadas como retardantes de chama em uma grande variedade de produtos eletroeletrônicos, plásticos, estofamentos, móveis, têxteis e outros produtos domésticos (ATSDR, 2017a; PROTECTION *et al.*, 2017), pois a altas temperaturas, liberam o radical bromo, reduzindo tanto a taxa de combustão quanto a propagação de fogo (MCDONALD, 2002).

São encontrados sob a forma de misturas de substâncias semelhantes chamadas congêneres, com estruturas moleculares singulares (ATSDR, 2017a; PROTECTION *et al.*,

2017). Os três congêneres encontrados com maior frequência são o pentabromodifenil éter (pentaBDE), octabromodifenil éter (octaBDE) e o decabromodifenil éter (decaBDE), sendo o último o mais utilizado nos Estados Unidos da América (ATSDR, 2015; EPA, 2009).

Os principais setores industriais que usam essa classe de substâncias foram nas indústrias de organobromados, de eletroeletrônicos, de transportes, de móveis, de tecidos e tapetes, de construção e de reciclagem (TEMER *et al.*, 2015).

A indústria dos eletroeletrônicos relata que fez uso dos polibromados em quantidade estimada de Octa BDE de 1,6 mil toneladas além de 174,9 toneladas de Hexa BDE e 683,9 toneladas de Hepta BDE (TEMER *et al.*, 2015).

Outra indústria que utiliza grande quantidade de PBDE é a automobilística. Carros, ônibus e caminhões utilizam essas substâncias no tratamento de espumas flexíveis de poliuretano usadas nos bancos e tetos, consoles, acústica, painéis e volantes, e em todo o revestimento e acabamento dos veículos, justamente com a finalidade de retardar a possível propagação do fogo em caso de incêndio (TEMER *et al.*, 2015; UNEP, 2012). Uma estimativa do Sindicato do Comércio Atacadista de Sucata Ferrosa e Não Ferrosa (Sindifesa), mostra que 98,5% da frota do país termina em desmanches e ferropolhos, e que apenas 1,5% da frota é reciclada devidamente, ou seja, com mão de obra especializada, em estabelecimento com licença ambiental (FILHO, 2012). Este desmanche sem o devido cuidado expõe tanto os trabalhadores quanto a população vizinha e o meio ambiente.

A perspectiva de mudanças com a criação da Lei nº 12.977, em 20 de maio de 2014, que regulamenta a atividade de desmontagem de veículos automotores terrestres no Brasil, conhecida como “desmanche”, se dá pela adoção de melhores práticas de reaproveitamento de peças usadas e destino correto de resíduos. As carcaças são enviadas para siderurgia e trituradas para serem reaproveitadas todo o material ferroso. Já os materiais que contêm PBDEs, espumas de poliuretano e carpetes é uma parte menor de resíduo desse segmento industrial e são descartados nos aterros sanitários (FILHO, 2012). No entanto questiona-se se esta deposição pura e simples dessas partes contaminadas com PBDEs nos aterros, sem o devido controle, é suficiente para garantir a segurança da saúde ambiental.

Poucos países, apenas Estados Unidos e o Reino Unido, possuem regulação específica e normas de inflamabilidade bem definidas para a destinação dos resíduos de móveis, colchões, têxteis, materiais de construção e borrachas. No Brasil não há legislação que regule o trabalho com materiais que possuem alta inflamabilidade e os dois segmentos industriais brasileiros que mais utilizam PBDEs são a indústria de equipamentos

eletroeletrônicos e a indústria automobilística, com atenção especial aos compartimentos de plásticos, carpetes e de espumas de poliuretano (ANNUNCIACÃO *et al.*, 2018).

Uma linha temporal com os marcos de utilização e restrição do uso dos congêneres de éteres difenílicos polibromados de 1871 até o cenário atual, bem como as contribuições significativas de ordem econômica, de saúde pública e do meio ambiente dessas substâncias, está elencada na tabela 2, podendo ser observado que o período de cerca de 15 anos (entre 1965 e 1979) foi suficiente para que os impactos ambientais fossem avaliados e já determinasse a interrupção do uso massivo desses compostos.

Tabela 2: Marcos temporais da utilização e proibição dos éteres difenílicos polibromados.

Ano	Marco temporal
1871	Hoffmeister sintetiza congêneres mono e dibromo
1910	Cook sintetiza congêneres de tetrabromo
1960	Primeira patente emitida para penta PBDEs como retardadores de chama
1965	Inicia a fabricação de produtos comerciais contendo PBDEs
1975	O estudo de toxicidade de dois anos em ratos considera octa e deca BDE essencialmente não-tóxico
1979	A fabricação de PCBs é proibida nos EUA. A presença de deca BDE é detectada pela primeira vez no ambiente
1981	Os congêneres Br3 – Br6 PBDEs são encontrados pela primeira vez em peixes (rio Viskan, Suécia) atingindo até 27.000 ng g <sup>-1</sup> de lipídeos
1987	Os PBDEs são sugeridos pela primeira vez como contaminantes globais. O Instituto Nacional de Saúde considera que os PBDEs causam um número aumentado de nós neoplásicos no fígado de ratos
1989	A Alemanha e Holanda interrompem voluntariamente a produção e o uso do deca BDE
1990	PBDEs encontrados em tecidos adiposos humanos até 1 ng g <sup>-1</sup> de níveis Organohalogenados. O Japão cessa voluntariamente a produção comércio do penta BDEs
1995	A EPA dos EUA classifica o deca BDE como um possível agente cancerígeno humano
1998	A análise do leite materno arquivado da Suécia mostra um aumento significativo dos níveis de PDBEs ao longo dos anos

- 1999 Produção global de PBDEs foi estimada em cerca de 70.000 toneladas
- 2003 Convenção de Roterdã listou o penta BDE como químico controlado
- 2004 Duas das três principais misturas comerciais de PBDEs (penta BDEs e octa BDEs) são proibidas pelo fabricante primário da América do Norte e a União Européia cessa a produção das misturas de penta e octa BDEs
- 2005 Níveis totais recorde de PBDEs total são relatados em um artigo de lipossistema residente em Nova York: 9.630 ng g<sup>-1</sup> de lipídeos
- 2006 Deca BDE foi listado como “substância tóxica” sob a Lei de Proteção Ambiental do Canadá
- 2007 Suécia restringe o uso do deca BDE em têxteis, móveis e produtos eletrônicos
- 2008 A banca do uso de deca BDE em colchões e móveis começa nos estados de Maine e Washington (EUA). O Canadá proíbe toda produção de PBDEs. Noruega Bane o uso de PBDE
- 2009 No Brasil, inclusão na COP 7 da convenção de Estocolmo do éter Tetrabromodifenílico, éter pentabromodifenílico, éter Hexabromodifenílico e do éter heptabromodifenílico para serem eliminados listadas no anexo A
- 2012 Inclusão de 11 novos POPs na lista da convenção de Estocolmo, incluindo o penta BDEs e octa BDEs
- 2014 A Agência Européia das substâncias químicas da União Européia propõe a restrição ao uso do Deca BDE
- 2017 No Brasil, A COP 8 incluiu o éter decabromodifenílico como Poluente orgânico persistente

---

Fonte: Adaptada de (JINHUI; YUAN; WENJING, 2017; VONDERHEIDE *et al.*, 2008; TEMER *et al.*, 2015).

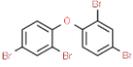
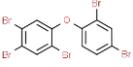
### 2.3- TOXICOCINÉTICA, TOXICODINÂMICA E EFEITOS NA SAÚDE E AMBIENTE

Por apresentarem estruturas químicas muito semelhantes, serem lipossolúveis ou apolares e terem alto coeficiente de partição octanol/água (hidrofóbicos), os PBDEs, podem sofrer bioacumulação e biomagnificação, já que permanecem por muito tempo na cadeia trófica. Por apresentarem grande semelhança estrutural que diferenciam apenas pelo número

de H dos anéis aromáticos substituídos pelo Br e por suas disposições espaciais, as substâncias pertencentes a esta classe são chamadas de congêneres. São 209 os congêneres conhecidos (HUNG *et al.*, 2016).

A tabela 3 apresenta informações de 3 importantes moléculas do conjunto de congêneres estudados, as quais foram contempladas no presente estudo, nomes das substâncias, estruturas químicas, fórmulas moleculares, números do CAS, massa molar, estrutura química, coeficiente de partição octanol/água, solubilidade em água e pressão de vapor em mmHg.

Tabela 3: Congêneres estudados, produto comercial tetra e penta BDE e suas propriedades.

Congêneres	Nome	Estrutura química	FM	CAS	MM	Log K <sub>ow</sub>	SW	P
BDE 47	2,2',4,4'- éter tetrabromo difenílico		C <sub>12</sub> H <sub>6</sub> Br <sub>4</sub> O	5436-43-1	485,8	6,55	0,015	1,4x10 <sup>-6</sup>
BDE 99	2,2',4,4',5- éter pentabromo difenílico		C <sub>12</sub> H <sub>3</sub> Br <sub>5</sub> O	60348-60-09	564,7	7,13	0,0094	1,32x10 <sup>-7</sup>
BDE 100	2,2',4,4',6- éter pentabromo difenílico		C <sub>12</sub> H <sub>3</sub> Br <sub>5</sub> O	189084-64-08	564,7	6,86	0,040	2,15x10 <sup>-7</sup>

FM: fórmula molecular, MM: massa molar em g mol<sup>-1</sup>, K<sub>ow</sub>: coeficiente de partição octanol/água. Sw: solubilidade em água em µg mL<sup>-1</sup>, P: pressão de vapor em mmHg a 25°C

Fonte: (DANIEL LUIZ RODRIGUES DA ANNUNCIACÃO, 2017).

A exposição inalatória pela poeira, principalmente em ambientes fechados como casas ou ambientes do trabalho (exposição *indoor*), onde essas substâncias enriquecem a atmosfera e a poeira e podem ser inaladas é talvez a forma de contaminação mais importante. Além disso, essas substâncias podem contaminar o esgoto e por consequência as águas, contribuindo para potencializar o problema para a saúde pública (WANG *et al.*, 2014).

Existem várias publicações sobre a toxicocinética dos PBDEs, mas a maioria dos estudos tratam de experimentação animal, não havendo grande disponibilidade de estudos em humanos.

A absorção dos PBDEs pelos organismos vivos ocorre de formas diferentes entre os

congêneres. Usualmente, os estudos são feitos com padrões marcados isotopicamente com C<sub>14</sub>, individualmente, ou com mistura de congêneres. Por exemplo, o PBDE 209 administrado pela via oral tem pouca absorção gastrointestinal, enquanto outros congêneres com menor número de átomos de Br substituintes têm absorção bem mais elevada.

A via oral é identificada como a mais importante devido a absorção da dieta, seguida da via inalatória (EFSA, 2011).

A absorção do PBDE 47 estudada em ratos e camundongos variou entre 75 to 95% em vários estudos (ATSDR, 2017)

A distribuição dos PBDEs em humanos tem sido investigada em mulheres grávidas e sua transferência para o feto e bebê, se dá tanto intra-útero pelo cordão umbilical (ATSDR, 2017b) e passagem transplacentária (FREDERIKSEN *et al.*, 2009), quanto pelo leite materno durante o aleitamento (HITES, 2004).

Estudos em animais, com os PBDEs 47, 99 e 100 marcados isotopicamente, revelam que esses compostos se distribuem pelos organismos em até 24 horas, acumulando no tecido adiposo (20,8%), na pele (7,0%), no músculo (5,2%), no fígado (2,1%), no sangue e cérebro (0,3% cada um) e nos pulmões (0,1%)(ATSDR, 2017b).

O metabolismo dos PBDE 47, 99 e 100 está ligado à hidroxilação destes compostos nos microsomas hepáticos, principalmente sob a ação de enzimas da família dos citocromos como a CYP2B6. Há diferenças entre os metabólitos identificados em estudos em animais e os estudos *in vitro* com células humanas, quando são demonstrados mecanismos de debromação oxidativa nos microsomas hepáticos. Por outro lado, alguns estudos apontam a debromação oxidativa através da presença de metabólitos nas fezes de animais tratados com vários congêneres. Estudos sobre teratogênese, fetotoxicidade e desenvolvimento, em animais, não evidenciam este tipo de ação dos PBDEs, porém alguns estudos indicam que a exposição a doses baixas está associada ao baixo peso neonatal, anormalidades no neurodesenvolvimento, no desenvolvimento do sistema reprodutivo, principalmente o masculino, imunossupressão, e sistema endócrino (ATSDR, 2017b).

Os PBDEs podem causar danos nas vias respiratórias. Diversas patologias relacionadas com os pulmões e as vias aéreas apresentam relação com a exposição aos PBDEs. De acordo com ALBANO e colaboradores (2020), células pulmonares saudáveis foram expostas à diversas concentrações dos PBDEs 47, 99 e 209 por períodos de 4 horas ou 24 horas e observaram que os PBDEs estudados afetaram o mecanismo bioquímico e fisiológico que leva ao estresse oxidativo, que por sua vez pode ser um agravante das

patogênias relacionadas aos epitélios e liberação de citocinas, mediadores inflamatórios. Foi notado também um aumento considerável nos níveis de danos de acordo com o tempo de exposição. Os danos relatados pelos pesquisadores nas células foram, além dos supracitados, acidificação do pH, hipersecreção de muco, aumento das propriedades viscoelásticas e perda de tecido epitelial, além de perda de função de membrana (ALBANO *et al.*, 2020).

Um estudo realizado por SHELLER-MILLER e colaboradores (2020) avaliou a correlação entre a exposição aos PBDEs nos exossomos placentários e os efeitos histológicos e morfológicos causados. Segundo esses autores a exposição aos PBDEs está relacionada com lesões e inflamações nucleares e celulares da placenta, além de morte celular e, necrose, que podem levar ao nascimento prematuro do feto (< 37 semanas de gestação) (SHELLER-MILLER *et al.*, 2020). No entanto, estudos realizados na China avaliando os efeitos da exposição aos PBDEs presentes no leite materno e em fórmulas infantis sobre a saúde das crianças não evidenciou qualquer efeito óbvio. Segundo estes autores, estas crianças estariam muito mais expostas à contaminação por PBDEs durante a os cuidados posteriores (ZHANG *et al.*, 2014).

Como os PBDEs possuem alguma semelhança estrutural com a tiroxina, foi sugerido que poderiam interferir com este hormônio em seu metabolismo e transporte (MEERTS *et al.*, 2000). Além disso, podem desencadear atividade estrogênica *in vitro* (DARNERUD, 2003).

A exposição aos PBDEs também pode estar relacionada a idade da menarca feminina, já que são compostos que atuam como desreguladores do sistema endócrino e assim, podendo afetar os aparelhos reprodutivos, das mulheres principalmente (ATTFIELD *et al.*, 2019). Outros estudos têm sugerido associações positivas entre a exposição a diferentes congêneres de PBDEs na gestação e redução do perímetro cefálico, retardo no crescimento fetal e defeitos congênitos (MIRANDA *et al.*, 2015; POON *et al.*, 2018; ZHAO *et al.*, 2019).

No estudo de ZHANG e colaboradores (2020), a neurotoxicidade de PBDEs foi observada pelo aumento na concentração de lactato desidrogenase (LDH), que é um indicador de dano tecidual, bem como o aumento do apoptose nas células do córtex cerebral. Também foram observadas alterações nos níveis de espécies reativas de oxigênio, de malondialdeído, que estão ligados ao estresse oxidativo, óxido nítrico e RNAm de óxido nítrico sintetase, que estão relacionados ao estresse nitrosativo, além de algumas outras enzimas colinérgicas. Substâncias antioxidantes, como a peroxiredoxina 1 e 2, por exemplo, teriam efeito de maneira a intervir nesse estresse oxidativo/nitrosativo diminuindo os níveis

de LDH e os níveis de morte celular programada a algo mais próximo ao normal (ZHANG *et al.*, 2020a).

A meia vida de alguns congêneres dos PBDEs foi verificada em um grupo de trabalhadores expostos e seus tempos de meia vida variaram entre 15 a 94 dias e as principais vias de eliminação dos PBDEs absorvidos por via oral são a urinária, biliar e fecal em animais de experimentação (ATSDR, 2017a).

Em um estudo na Irlanda foi desenvolvido um modelo toxicocinético compartimentalizado, usado para prever diferentes formas de exposições a retardantes de chamas via ar, poeira e dieta. Neste país foi proibida a produção dos PBDE e houve a substituição por estruturas químicas similares. No escopo do trabalho foi feita a comparação de níveis de exposição antes e depois da proibição do uso, ou seja, de 2011 até 2016 observando-se um decaimento na ordem de 20 % nesses 5 anos (WEMKEN *et al.*, 2020).

Além disso, foi observado que os PBDEs podem se acumular também em plantas, na biota aquática, no sedimento de fundo, em invertebrados e em várias espécies de peixe que são consumidas por outros animais e pelos seres humanos (DARNERUD, 2003; SCHECTER *et al.*, 2006).

SUN e colaboradores, através de um estudo ecotoxicológico, avaliou a fitotoxicidade induzida por PBDEs em plantas chinesas. Esse estudo incluiu diferentes índices funcionais, concentrações de PBDEs e durações experimentais, todas essas variáveis influenciaram os impactos avaliados. Observou-se ainda um aumento das espécies reativas de oxigênio indicando que as plantas sofrem estresse oxidativo pela exposição aos PBDEs, o que pode acarretar danos nas estruturas celulares e nas suas funções fisiológicas (MO *et al.*, 2019; SUN *et al.*, 2020).

Éteres difenílicos polibromados di-hidroxilados são os produtos do metabolismo dos PBDEs em peixes. Análise de músculos de diferentes tipos de peixes mostraram que possivelmente os PBDEs mais bromados são metabolizados para PBDEs com menor número de átomos de bromo (ZHANG *et al.*, 2020b).

Outro estudo com mexilhões verdes, que são uma importante fonte de alimento da população no norte da China, avaliou a biota local, e também seres humanos, devido à bioacumulação dos PBDEs. É um estudo que se faz importante, pelo fato de se tratar de uma região com um dos maiores níveis de poluição de PBDEs do mundo. As concentrações de PBDEs nos mexilhões verdes são considerados de moderados a altos, para os padrões mundiais. Os PBDE encontrados em maior abundância foram os congêneres 47, 99 e 209.

Os resultados obtidos sugerem que o PBDE 209, o segundo em maior quantidade na pesquisa, sofre metabolização perdendo átomos de Br e se transformando em PBDEs com menor grau de bromação como os PBDEs 99, 100 ou 153 sendo este o poluente mais abundante no local (SUN *et al.*, 2020).

No Canadá, CURRIER e colaboradores desenvolveram um estudo da biomagnificação de PBDEs de forma comparativa entre um aterro sanitário urbano e uma região rural, avaliando a biota do local, invertebrados e aves, além dos ovos dos pássaros para checar a contaminação dos filhotes das aves. Analisaram várias espécies de minhocas e como resultado obtiveram para os invertebrados do aterro urbano a bioacumulação de muitos PBDEs como o 47, 85, 99, 100, 153 e 154, sendo os PBDEs 47 e 99 os encontrados em maiores quantidades na biota local. Nos invertebrados da zona rural, o PBDE 47 foi encontrado em maior prevalência e em valor maior, mas ainda assim substancialmente menor quando comparado ao aterro urbano. Visto que as aves se alimentam desses invertebrados o nível de bioacumulação desses PBDEs se mostrou proporcional às concentrações presentes nos organismos consumidos e dependentes dos locais de alimentação (CURRIER *et al.*, 2020).

Em outro estudo, amostras de solo foram avaliadas longe das cidades e foram encontrados níveis de PBDEs nos ambientes aquáticos. Locais que sofrem grande influência urbana forma constatados concentrações mais elevadas mesmo quando o esgoto era destinado a estações de tratamento de efluentes. Foi observado que mais da metade dessas substâncias continuavam presentes no efluente final, ou seja, não foram removidos apenas com o tratamento de efluentes convencional. Com isso, fica evidente que quando o lodo produzido pela estação é destinado para adubar o solo, essas substâncias contaminam o solo e os vegetais produzidos por ele e pela infiltração, contaminam o lençol freático e os corpos d'água (DENG *et al.*, 2007; PAROLINI; BINELLI, 2012).

#### 2.4- NOVOS RETARDANTES DE CHAMA

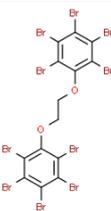
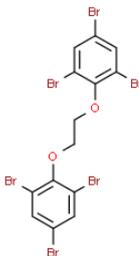
Quando essas substâncias foram incluídas na convenção de Estocolmo a indústria desenvolveu e implantou a sua substituição por estruturas químicas similares, comercializadas como “*DROP-IN*” que são novos retardantes de chama. O decabromodifenil etano (DBDPE), 1,2-bis (2,4, 6-tribromofenoxi) etano (BTBPE), hexabromobenzeno (HBB) e pentabromoetilbenzeno (PBEB) são substâncias alternativas para as misturas comerciais

pentaBDE e octaBDE (XIE *et al.*, 2011).

Há uma diminuição gradual das concentrações desses retardantes de chamas no ambiente e atribuem isso a Convenção de Estocolmo, que determina a proibição da utilização das substâncias nela relacionadas, inclusive diversos PBDEs, principalmente os PBDEs penta e octa. Na Itália, apenas os níveis dos PBDEs 28 e 47 diminuíram. Na Espanha, o deca BDE teve seus valores aumentados. O único PBDE que apresentou aumento segundo os dados foi o 209. Como consequência os substitutos dos PBDEs aumentaram os seus níveis com o passar do tempo, os OPs e os NBFRs (DE LA TORRE *et al.*, 2020).

A tabela 4 mostra três substâncias com suas estruturas, fórmula molecular e massa molar.

Tabela 4: Outros retardantes de chama.

Retardante de chama	Estrutura química	Fórmula molecular	Massa molar
Decabromodifenil etano (DBDPE)		$C_{14}H_4Br_{10}O_2$	1003.220 Da
1,2-bis (2,4, 6-tribromofenoxi) etano (BTBPE)		$C_{14}H_8Br_6O_2$	687.636 Da
Hexabromobenzeno (HBB)		$C_6Br_6$	551.488 Da

A poluição pode variar muito de país para país, o que deve ser atribuído a diversos estilos de vida em diferentes culturas, características de construção e de decoração, hábitos dos residentes ou produtos de consumo, mas também à situação econômica de uma região. Por isso, as tendências temporais e o grau de substituição de poluentes foram avaliados considerando todos os estudos publicados com dados da Bélgica, Itália e Espanha. As concentrações de c-decaBDE aumentaram no caso espanhol, contudo, correlações positivas com seu substituto proposto (DBDPE) e políticas restritas recentes tornam possível assumir

que essa tendência mudará nos próximos anos. Com base na relação entre poluentes, características da casa e hábitos dos habitantes, fontes potenciais foram estudadas. Finalmente, os dados obtidos foram utilizados para determinar a ingestão diária estimada (EDI) via ingestão de poeira doméstica e absorção dérmica de crianças e adultos. As concentrações calculados para EDI, mesmo no pior cenário, estavam abaixo dos valores da dose de referência disponível (RfD) em todos os casos (WEMKEN *et al.*, 2020).

A exposição ocupacional de trabalhadores de algumas fábricas que trabalham com retardantes de chamas foi avaliada em algumas indústrias norte americanas. Os analitos pesquisados se subdividem em três grupos, organofosfato (OFR), PBDEs e retardadores de chamas não polibromados (NPBFR). Amostras de ar nessas indústrias e limpeza das mãos desses trabalhadores foram analisadas e constatou-se que os OFR e os NPBFR se encontram em maiores quantidades em todas as indústrias pesquisadas. Isso se deve ao fato de serem substitutos dos PBDEs, proibidos em 2013. As maiores concentrações de PBDEs encontrados foram nos trabalhadores de sucata eletrônica que ainda trabalham expostos a aparelhos antigos, produzidos antes de 2013, quando ainda era permitida a utilização dos PBDEs por conta das normas Califórnia 117-2013 e Califórnia SB-2019 (ESTILL *et al.*, 2020).

## 2.5- EXPOSIÇÃO NÃO OCUPACIONAL

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), 25% das doenças diagnosticadas nos países latino americanos estão relacionadas às más condições do meio ambiente (PAHO, 2015). Mais de 100.000 mortes de menores de 5 anos são registradas anualmente e a proporção de mortalidade entre menores de 14 anos relacionadas com a falta de condições sanitárias e ambientais adequadas é de 33% para doenças respiratórias pela contaminação do ar é 32% para doenças gastrointestinais (FROES ASMUS *et al.*, 2016; PAHO, 2015).

O emprego do termo “valor de referência” sempre esteve relacionado à interpretação de resultados de exames de análises clínicas. Na toxicologia os termos “níveis *background*” ou “níveis basais” são utilizados para indicar as concentrações dos xenobióticos medidas em amostras biológicas expostas em ambientes não contaminados. O conhecimento desses níveis é o método mais simples e direto para se estabelecer valores orientadores e podem ser usados como ferramenta interpretativa que forneceram significado aos valores encontrados

na população do estudo de Quinágua, 2006, diferenciando exposição ambiental de exposição ocupacional (QUINÁGLIA, 2006).

Vários estudos mostram que os PBDEs são capazes de interferir no sistema endócrino e também no sistema imunológico. Dentre eles, o éter tetrabromodifenílico (Tetra BDEs) e o éter pentabromodifenílico (Penta BDEs). (MCDONALD, 2002; MEEKER *et al.*, 2009).

Estes contaminantes podem ser encontrados em matrizes biológicas, como leite humano, cordão umbilical, plasma sanguíneo e tecido adiposo. ZOTA e colaboradores avaliaram a relação entre os níveis de PBDEs no soro e a função da tireoide em gestantes. (ZOTA *et al.*, 2011; WANG *et al.*, 2014). Entre os congêneres, o PBDEs 47 e o 99 (2,2',4,4'-tetra BDE e 2,2',4,4',5-penta BDE) são os mais frequentemente encontrados no meio ambiente (LINDSTRÖM *et al.*, 1999).

Nesse sentido, algumas contribuições de estudos que trazem dados mundiais de contaminação por PBDEs são apresentadas a seguir. Na Coreia do Sul e em países asiáticos, por exemplo, onde são produzidos eletroeletrônicos em grande escala, foram encontradas concentrações acima do recomendado pela USEPA que é  $7 \times 10^{-4}$  mg kg dia<sup>-1</sup> como valor de risco carcinogênico e para água potável de  $2 \times 10^{-8}$  µg L<sup>-1</sup> (USEPA *et al.*, 2017), dessas substâncias, ficando atrás apenas dos norte-americanos. A fabricação, fornecimento e distribuição dos congêneres pentas e o octa BDE foram proibidos na União Europeia (UE), Canadá, EUA e países asiáticos. Dentre outros congêneres, o deca BDE é o único PBDE que ainda é usado no mundo, excluindo apenas a Suécia e os EUA (CHEN *et al.*, 2014a). No entanto, as misturas de tetra, penta e hexa BDE ainda são detectadas devido a divisão do deca BDE (BDE 209) em congêneres com número menor de bromos substituintes.

Até 2008, as concentrações ambientais encontradas em países orientais demonstravam uma crescente utilização dessas substâncias nas últimas décadas (MINH *et al.*, 2008). Já nos países onde esses produtos foram banidos, há um decaimento nas concentrações encontradas em amostras biológicas (FÄNGSTRÖM *et al.*, 2008). Quando comparadas às concentrações de PBDEs encontradas em amostras de sangue coletadas nos Estados Unidos e na Europa, observa-se níveis muito maiores nos Estados Unidos (GEENS *et al.*, 2010). Na Coreia do Sul, as concentrações de PBDE 209 encontradas no leite materno variaram de 26,4 a 586 ng g<sup>-1</sup> de lipídeos (TANG; ZHAI, 2017).

Em outro estudo estadunidense em 2001, onde foi avaliada uma mistura com 13 congêneres mais comuns (PBDE 15, PBDE 28/33, PBDE 47, PBDE 49, PBDE 66, PBDE 85, PBDE 99, PBDE 100, PBDE 140, PBDE 153, PBDE 154 e PBDE 0183) em exposição

ocupacional a lixo eletrônico (*e-waste*), comparados à população em geral, encontrou-se níveis de  $16,8 \pm 7,5 \text{ ng g}^{-1}$  de lipídeos, valor bem superior àqueles encontrados nos países asiáticos e europeus. Quando foram comparadas as concentrações obtidas em sangue fetal e da genitora, foram concordantes, indicando que essas medições maternas poderiam refletir e prever a exposição fetal (MAZDAI *et al.*, 2003a).

Outros estudos também apontam que amostras biológicas (sangue, urina, cordão umbilical, leite materno e outros tecidos) e ambientais (materiais particulados atmosféricos, aquáticos, solos e alimentos) analisadas na América do Norte (ERDOĞRUL; AZIRAK, 2004), Europa (MEERTS *et al.*, 2000) e na Ásia (BELY *et al.*, 2014; CHEN *et al.*, 2014b) relatam concentrações diferentes de PBDEs. Em amostras de leite materno coletadas entre 1972 a 1997 em Estocolmo, Suécia foram encontradas concentrações relativamente elevadas dessas substâncias, por causa das grandes quantidades usadas na indústria nesse período (MEIRONYTÉ; NORÉN; BERGMAN, 1999). Isto fez com que a partir de 1996 houvesse um decréscimo na utilização dessas substâncias em Uppsala, Suécia (JING; JINXIA, 2017). Nas Filipinas, Estados Unidos e China também foi observado essa diminuição (CHEN *et al.*, 2014b).

A exposição humana de caráter não ocupacional está associada com a presença dos PBDEs no ambiente, mas também nos alimentos. Na Polônia, PIETRON e colaboradores analisaram os PBDEs em produtos alimentícios de origem animal, de várias carnes diferentes, incluindo peixes, leite, ovos, carnes, óleos e gorduras. As menores concentrações de PBDEs foram encontradas em cervos e veados, e as maiores em suínos, sendo o PBDE 209 o mais encontrado (PIETRON *et al.*, 2019).

Análises de PBDEs em diferentes partes da China durante os últimos 10 anos constatou níveis altos de PBDEs provenientes do lixo eletrônico e da própria produção de PBDEs. Nos estudos em áreas rurais, foram descritas as contaminações de PBDEs em ar, água, sedimento, solo, biota, alimentos diários, sangue humano, cabelo e outros tecidos humanos. Os dados não mostraram diferenças óbvias entre o norte e o sul da China, mas as concentrações na China ocidental foram geralmente mais baixas do que no leste da China, o que deve ser atribuído principalmente à produção e ao amplo uso de PBDEs nas regiões orientais. A disponibilidade de dados é maior para os locais de reciclagem de lixo eletrônico, áreas economicamente desenvolvidas e grandes cidades. Estudos em áreas rurais e menos desenvolvidas, especialmente em regiões remotas como o platô tibetano e mar da China meridional, foram limitados pelas dificuldades de acesso (JIANG *et al.*, 2019)(HAN *et al.*,

2020). O desenvolvimento de diabetes tipo 2 foi avaliado no oeste da China, sendo relacionado à exposição aos PBDEs, ajustado por idade, sexo, IMC, triglicerídeos e níveis de colesterol (HAN *et al.*, 2020).

Estudos comportamentais relacionados aos PBDEs descrevem o ambiente domiciliar e os hábitos como fontes potenciais de contaminação. Características dos edifícios, residências localizadas em bairros industriais, apartamentos, casas isoladas e localização geográfica também contribuem para aumentar a exposição a esses poluentes e a necessidade de pesquisar e viabilizar a substituição por produtos regulamentados e avaliar a exposição humana em ambientes fechados. Medindo-se as concentrações de poeira doméstica podemos estimar a exposição humana à ingestão de poeira ou absorção dérmica. Entre todos os poluentes encontrados nas residências, os PBDEs são adicionados a uma ampla variedade de produtos industriais, como têxteis, equipamentos eletroeletrônicos, produtos de construção e tintas, entre outros, com o objetivo de retardar e reduzir os danos humanos e materiais (DE LA TORRE *et al.*, 2020).

Num estudo realizado em Birmingham (HARRAD; DIAMOND, 2006), os autores encontraram em média, altas concentrações no interior dos veículos ( $709 \text{ pg m}^{-3}$ ), seguido pelo escritório ( $166 \text{ pg m}^{-3}$ ), espaços públicos ( $112 \text{ pg m}^{-3}$ ) e interior das casas ( $52 \text{ pg m}^{-3}$ ), e também altíssimas concentrações em dutos de ar condicionado (BJÖRKLUND, 2012).

Nesse sentido, algumas contribuições de estudos que trazem dados mundiais de contaminação por PBDEs são apresentadas a seguir. Por exemplo, ZOTA e colaboradores encontraram uma média geométrica de PBDE 47 e da soma de PBDEs em torno de  $43,1 \text{ ng g}^{-1}$  e  $85,8 \text{ ng g}^{-1}$  de lipídeos em gestantes da Califórnia. Na Coreia do Sul, as concentrações de PBDE 209 encontradas no leite materno variaram de  $26,4$  a  $586 \text{ ng g}^{-1}$  de lipídios (TANG; ZHAI, 2017). Em outro estudo conduzido nos Estados Unidos, MAZDAI e colaboradores (2003) estimaram concentrações de PBDEs totais encontradas no sangue materno que variaram de  $15$  a  $580 \text{ ng g}^{-1}$  de lipídios, enquanto as concentrações encontradas no cordão umbilical variaram de  $14$  a  $460 \text{ ng g}^{-1}$  de lipídeos. Na Espanha, a concentração de PBDEs totais em amostras de leite materno variou de  $1,2$  a  $18,6 \text{ ng g}^{-1}$  de lipídios (LACORTE; IKONOMOU, 2009).

Segundo um estudo sul coreano (KIM *et al.*, 2012b), foram detectados concentrações médias dos congêneres de PBDE 47, PBDE 99, PBDE 100, PBDE 153, PBDE 154, PBDE 209 de  $10,7 \pm 5,13 \text{ ng g}^{-1}$  de lipídio no sangue,  $7,7 \pm 4,2 \text{ ng g}^{-1}$  de lipídios no sangue materno e  $3,0 \pm 1,8 \text{ ng g}^{-1}$  de lipídios no leite materno. Os seis congêneres principais de PBDEs foram

detectados em todas as amostras. As concentrações totais de PBDEs no sangue do cordão umbilical variaram de 2,28 a 30,94 ng g<sup>-1</sup> de lipídios. As concentrações totais de PBDEs em o sangue materno variou de 1,8 a 17,66 ng g<sup>-1</sup> de lipídios. Foram comparados esses achados com os de trabalhadores sul coreanos de lixo eletrônico (*e-waste*). Com base nos resultados desse estudo e comparados com outros estudos mundiais, a concentração de PBDEs nas amostras de sangue do cordão umbilical (valor mediano = 12,0 ng g<sup>-1</sup> de lipídios) é menor na Coréia do Sul do que nos EUA (39 ng g<sup>-1</sup> de lipídios) (HERBSTMAN *et al.*, 2010), mas superior à da Suécia (1,7 ng g<sup>-1</sup> de lipídios) (GÓMARA *et al.*, 2011), Espanha (4,3 ng g<sup>-1</sup> de lipídios) e Bélgica (1,6-6,5 ng g<sup>-1</sup> de lipídios)(GEENS *et al.*, 2010).

Em geral, os principais congêneres de PBDE (PBDE 47, PBDE 99 e PBDE 153) são detectados globalmente no sangue humano mas variam consideravelmente de país para país. (KIM *et al.*, 2012b).

De acordo com Haraguchi, Hisamichi e Endo, 2009, na Coréia do Sul, China e Japão foram identificados cinco congêneres (PBDE 28, 47, 99, 100 e 153) com valores de 1,08 a 8,66 ng g<sup>-1</sup> de lipídios no leite materno. Já no sangue materno, o PBDE 47 e o PBDE 153 foram detectados, porém o PBDE 154 e o PBDE 183 ficaram inferiores ao limite de quantificação (LOQ). Em estudo anterior sobre quantificação de PBDEs, foram detectados seis congêneres no leite materno da Coréia, China e Japão, incluindo PBDE 28, 47, 99, 100, 153 e 154. Na China os níveis nessa matriz biológica foram 3,7 ng g<sup>-1</sup> de lipídios, 1,7 ng g<sup>-1</sup> de lipídios, e 1,9 ng g<sup>-1</sup> de lipídios, respectivamente (HARAGUCHI; HISAMICHI; ENDO, 2009).

A Pesquisa Nacional de Exame de Saúde e Nutrição (NHANES), realizada nos EUA nos anos de 2005/06 a 2013/14, fez uma análise das concentrações de uma série de poluentes ambientais dentre os quais os PBDEs para avaliar se os níveis de exposição a essas substâncias estão decrescendo, e também se as políticas limitantes ao uso dos polibromados têm surtido efeito ou não na exposição da população em geral. Nas análises estatísticas foram considerados apenas os PBDEs que apareceram com uma frequência acima de 60%. Esses PBDEs foram os 28, 47, 99, 100 e 153, muitos destes aparecendo até em 100% das amostras. (SJÖDIN *et al.*, 2019a).

Pelo fato dos PBDEs serem lipofílicos e se distribuírem principalmente nos tecidos lipídicos do corpo, a explicação mais provável para o decréscimo observado é que o aumento do peso corporal com a idade levou a uma diluição sucessivamente maior dos PBDEs. De fato, o percentual total de gordura corporal é 19 a 26% maior nos 49-59 anos contra os 12-

19 anos tanto para mulheres e quanto para homens. Por isso, a alteração no conteúdo de gordura corporal pode explicar a concentração geral mais baixa em uma idade mais avançada, mas não pode explicar o aumento da concentração de PBDE153 observado na faixa etária mais avançada. A diminuição ou o pequeno aumento das concentrações de PBDEs no período da pesquisa entre os 40-59 anos podem ser relacionados ao aumento da frequência da obesidade nessa faixa etária. Com maior volume de distribuição de PBDEs em pessoas obesas, menor proporção de PBDEs circularia no soro, onde deve ocorrer o metabolismo e transporte para órgãos. Por isso, é possível o aumento da meia-vida biológica do PBDEs em indivíduos obesos e mais velhos, resultado de ingestão maior do que a capacidade de eliminação nesses grupos. Através dessas avaliações, foi suposto que a meia vida dos PBDEs diminui entre 5 a 20% a cada dois anos nos EUA, com exceção do PBDE 183 (3 meses) e PBDE 209 (2 semanas), excedendo picos de concentrações observados em outras partes do mundo. O *Centers for Diseases Control (CDC)* passou a adotar a partir do NHANES 2017/18 as análises de soro individuais para o rastreamento de fatores de estilo de vida associados à carga corporal de PBDEs, como idade de residência, status socioeconômico e IMC (SJÖDIN *et al.*, 2019a).

Existem estudos de coorte que acompanham o mesmo grupo de puérperas e crianças, como o CHAMACOS, e estabelecem correlações entre exposição a esses poluentes ambientais e o surgimento de diversos desfechos, como desregulação endócrina e alterações do hormônio da tireoide, neurotoxicidade no útero e a exposição a PBDEs (HERBSTMAN *et al.*, 2010).

Outra coorte muito conhecida é a *Home Study* nos Estados Unidos e trata da exposição de grávidas a diversos tipos de poluentes como pesticidas, organoclorados, e perfluoro alquílicas (PFAS) além dos PBDEs, por exemplo. Esses poluentes no estudo são avaliados de forma agregada. Além disso, também associa possíveis efeitos teratogênicos e nascimentos prematuros aos altos níveis de algumas dessas substâncias encontradas no organismo das gestantes (KALLOO *et al.*, 2020).

Outro estudo desenvolvido avaliou a possibilidade da exposição a PBDEs estar associada ao desenvolvimento de leitura de crianças expostas no período pré-natal, e foram realizados exames de QI verbal e não verbal por psicólogos para ajudar a estabelecer essa correlação. A exposição não apresentou influência na leitura em crianças aos 5 anos, porém aos 8 anos o resultado na mesma criança se mostrou aumentado. (MARGOLIS *et al.*, 2020).

Estudos de intervenções comportamentais na coorte Sibling/Hermanos nos Estados

Unidos foram realizados com o objetivo de avaliar como a limpeza das mãos e da casa podem ajudar a diminuir o nível de contaminação por esses poluentes, seja através do contato mão-boca, seja pela poeira da casa, através das vias respiratórias (GIBSON *et al.*, 2019).

Existem poucos estudos no Brasil que analisaram amostras de sangue materno, do cordão umbilical e do leite materno resultante de exposição ambiental. Também houve modificação dos registros dessas substâncias junto ao Ministério Indústria e Comércio Exterior (MDIC) sendo que as informações sobre importação e exportação entre 1989 e 1996 foram registradas como “éter decabromo difenílico”, e a partir de 1997 como “outros éteres aromáticos”. Conhecer as concentrações de PBDEs tanto em matrizes biológicas quanto ambientais tem grande importância por seus potenciais impactos biológicos, especialmente num país onde ocorre falta de vigilância e de informação, bem como escassez de saneamento básico (ANNUNCIACÃO *et al.*, 2018).

As evidências da exposição pré-natal e após o nascimento aos PBDEs é de grande relevância para a saúde pública, uma vez que durante o desenvolvimento no útero ocorre intensa maturação, diferenciação e crescimento celular, com formação de tecidos e órgãos. A vulnerabilidade do feto aos efeitos dessas substâncias se estende após o nascimento, uma vez que o desenvolvimento do sistema imunológico e nervoso, bem como a maturação das vias de metabolização de xenobióticos ocorrem durante os primeiros anos de vida.

## 2.6- TÉCNICAS DE PREPARO DE AMOSTRAS

A amostragem é a realização da coleta do material biológico, para posterior tratamento. Ela deve garantir a reprodução exata das características e composição química do material pesquisado. Para obtermos um resultado confiável e idôneo (SKOOG; WEST; HOLLER; *et al.*, 2015).

O primeiro passo a ser seguido é identificar corretamente e de forma legível todas as amostras com pelo menos duas informações para garantir a rastreabilidade da amostra e evitar qualquer confundimento. Para que não haja contaminação, todo o material a ter contato com as amostras deve ser submetido a um rigoroso tratamento de descontaminação. No processo de descontaminação, podem ser utilizados os seguintes solventes orgânicos, acetona e metanol e quando possível, o aquecimento a 400°C durante 4 horas (GONÇALVES, 2016). O uso da sonicação com detergente apropriado, antes da etapa de lavagem e rinsagem com solvente orgânico devem ser utilizados também. Para rinsagem

final devem ser empregados solventes ultra puros (GONÇALVES, 2016).

O pré tratamento das amostras coletadas, tem a finalidade de realizar o *clean up*, ou seja, remover todo interferente que possa afetar o resultado da análise e também concentrar os analitos de interesse que, nos casos de exposições ambientais, normalmente estão em concentrações muito baixas (QUEIROZ, 2011).

As técnicas analíticas mais utilizadas para o desenvolvimento das análises de éteres difenílicos polibromados são baseadas na extração em fase sólida (EFS) usando cartuchos C<sub>18</sub> previamente ativados com metanol e água. Então as amostras são submetidas à adsorção dos analitos onde ocorre a interação dos mesmos com a coluna, e por fim os analitos são eluidos com solventes apropriados (SKOOG, 2013).

Este processo, mais detalhadamente, consiste em percolar a amostra através de uma fase estacionária capaz de reter seletivamente os analitos e promover a remoção e eluição dos interferentes, de forma a não interferirem nas análises. Posteriormente deve-se lavar o cartucho com o solvente da amostra, para promover a retirada completa do que restou de amostra no corpo do cartucho e finalizar a eluição dos interferentes. A quarta e última etapa é a de eluição dos analitos, através da passagem de solventes adequados sob condições previamente definidas através da fase estacionária, para promover a dessorção dos analitos e posterior análise instrumental. Pode ser necessário ajustar-se o pH da amostra ou mesmo da fase móvel, tanto para estabilizar as espécies e quanto aumentar ou diminuir sua retenção na fase sólida (QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2001).

Os principais benefícios desse tipo de pré-tratamento de amostras é a eficiência dos tipos de adsorventes, a boa recuperação dos analitos e a economia com os solventes, pois para dessorver, utiliza-se um volume pequeno desses produtos (QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2001).

Os derivados de sílica C<sub>8</sub>, C<sub>18</sub> e CN são os mais utilizados na extração em fase sólida no caso de substâncias de baixa polaridade (QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2001).

A SPE podem ser do modo reverso, normal e troca iônica. Na fase reversa (C<sub>8</sub>, C<sub>18</sub> e CN), o analito fica retido devido às interações de Van der Waals não polares, entre os sítios carbono-hidrogênio do analito com os grupos OH da superfície da sílica. No modo normal, ocorre a interação entre o sítio polar do analito com o adsorvente formando pontes de hidrogênio, interações  $\pi$ - $\pi$  e dipolo-dipolo. E por fim, no modo troca iônica, são realizadas ligações eletrostáticas entre o analito e a fase sólida.

A técnica de SPE possui como desvantagens, a baixa recuperação dos analitos de

interesse (CALDAS *et al.*, 2011).

## 2.7- TÉCNICAS ANALÍTICAS UTILIZADAS

Na cromatografia em fase gasosa, a fase móvel, constituída de gás de arraste inerte, transporta os analitos ao longo da fase estacionária (líquida ou sólida) onde, ocorre o equilíbrio de separação na coluna, e com auxílio do aumento de temperatura. A técnica é baseada na migração diferencial dos solutos por uma fase estacionária (SKOOG, 2013).

A amostra com o analito pesquisado, passa pela coluna com a fase móvel (gás de arraste) e assim os analitos são separadamente eluídos. O produto da análise cromatográfica é registrado, originando um gráfico chamado cromatograma, que mostra a eluição do soluto pelo o tempo de passagem/fluxo ou pelo volume da fase móvel. Em geral, consiste numa série de picos bem definidos de formato gaussiano, correspondentes às substâncias detectáveis presentes na amostra e demonstra a distribuição média das moléculas do analito ao longo do processo de separação. A área de cada pico em relação à sua linha de base corresponde a concentração da substância eluída (QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2001).

A detecção por espectrometria de massas hifenada à cromatografia gasosa, pode ser empregada no estudo de moléculas bastante distintas, desde as de peso molecular baixo ou de cadeia curta até moléculas mais complexas como as proteínas, em baixíssimas concentrações, dando um caráter muito versátil a esta técnica. Neste caso, a molécula do analito é quebrada e o analisador separa e mede a relação entre massa e carga ( $m/z$ ) dos seus fragmentos, originando um espectro de massa, possibilitando a identificação de substâncias químicas mesmo complexas. Para uma amostra ser detectada pelo espectrômetro de massas é necessário ionizá-la. Normalmente essa atomização é feita pelas fontes de dessorção, onde primeiramente é vaporizada e depois ionizada, no caso do seu acoplamento à cromatografia líquida, sendo as fontes mais utilizadas a ionização por eletronebulização (ESI, do inglês, *Eletro Spray Ionization*), Ionização à Pressão Atmosférica (API, do inglês, *Atmospheric Pressure Ionization*), Ionização Química à Pressão Atmosférica (APCI, do inglês, *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*), Ionização por Thermospray (TSP, do inglês, *Thermospray Ionization*), e ionizado através da ionização por impacto de elétrons (EI, do inglês, *Electron Ionization*), no caso do acoplamento à cromatografia em fase gasosa (LANÇAS, 2009; QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2001).

Os equipamentos quadrupolos possuem boa reprodutibilidade e repetibilidade e são

usados para quantificar substâncias químicas. A principal desvantagem é que, comparando ao *Ion Trap* possuem uma menor resolução para quantificar. O TOF apresenta um elevado custo de investimento inicial e manutenção, além de possuir limitações para quantificar substâncias. Porém apresenta maior resolução do que o quadrupolo (LANÇAS, 2009).

O efluente da cromatografia em fase gasosa hifenada ao espectrômetro de massas com triplo quadrupolo passa para o primeiro analisador (Q1) e é selecionado um íon específico da espécie estudada. A seguir, na cela de reação é somado a um gás inerte (hélio), e a colisão fragmentará o íon, gerando novos íons. Estes íons gerados serão analisados em um segundo quadrupolo (Q3). Este processo é denominado dissociação induzida por colisão (CID, do inglês *Collision Induced Dissociation*). Na atualidade, os novos equipamentos possuem essa câmara e não um segundo quadrupolo (LANÇAS, 2009).

Utilizando um padrão analítico, podemos obter o espectro do composto pelos dois analisadores, separadamente. Escolhe-se o íon característico do composto (que pode ser o íon molecular) no primeiro analisador e um dos íons característicos da quebra da molécula no segundo analisador, após a colisão. Após serem escolhidos os íons pelo padrão analítico, efetua-se a análise com a amostra de interesse, onde, se necessário, devem ser aplicados todos os processos necessários para minimizar as interferências de matriz. O íon escolhido no primeiro analisador, denominado íon-pai ou íon-precursor é fragmentado e o íon escolhido para o segundo analisador, que é resultado da fragmentação da molécula após a colisão, é chamado de íon-filho ou íon-produto. Este tipo de monitoramento é, normalmente, relacionado à uma transição  $a \rightarrow b$ , onde “a” é a massa-carga do íon-precursor e b é a massa-carga do íon-produto. Como apenas um íon é escolhido no primeiro analisador, todos os outros são ignorados, e o ruído é bastante reduzido. Isto aumenta a sensibilidade e a seletividade da técnica. Há ainda a possibilidade de fazer a varredura de procura do íon-precursor pelo primeiro analisador, de acordo com o tempo em que as espécies saem da coluna cromatográfica. Essa técnica é comumente chamada de monitoramento seletivo de reação (LANÇAS, 2009).

Como tentativa de solucionar o efeito de matriz em amostras complexas, podemos realizar algumas mudanças nas condições do espectrômetro de massas, parâmetros cromatográficos e melhorias na etapa de preparo de amostras ou *clean up* dos extratos (PERIAT *et al.*, 2016).

## 2.8 – VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO

Segundo o INMETRO, dentro de suas atribuições:

“Validação é a confirmação por exame e fornecimento de evidência objetiva de que os requisitos específicos para um determinado uso pretendido são atendidos (ABNT NBR ISO/IEC 17025, item 5.4.5.1) ”

“Verificação é o fornecimento de evidência objetiva de que um dado item satisfaz requisitos especificados, como por exemplo, a confirmação de que as propriedades relativas ao desempenho ou aos requisitos legais são satisfeitas por um sistema de medição (VIM, item 2.45). ”

É fundamental demonstrar, que o método de ensaio que será executado, gera resultados confiáveis e adequados à aplicação pretendida. Assegurando que, as características de desempenho do método, atendem aos requisitos para as operações analíticas pretendidas, e que sejam normalizados dentro das condições específicas, antes de implantá-los (INMETRO, 2020).

Para este intuito, devem ser feitas curvas de calibração em várias concentrações diferentes, determinar os limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ), determinar a recuperação média dos analitos na matriz de interesse, fazer procedimentos de controle de qualidade durante as análises das amostras (KIM *et al.*, 2012b).

### 2.8.1- Seletividade

Seletividade é o quanto uma metodologia analítica pode avaliar uma substância na presença de outras substâncias que podem realizar uma interferência na análise, conseguindo separar cada uma delas (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002).

Para realizar esse parâmetro de validação, comparamos os resultados da análise da amostra pelo método em estudo com outros métodos previamente validados. Além disso, são verificados se os interferentes aumentam ou diminuem a detecção da substância de interesse (INMETRO, 2020).

### **2.8.2- Linearidade e sensibilidade**

Para se estabelecer a linearidade, é preciso garantir que as respostas geradas pelo equipamento realmente correspondem à concentração do analito e para determinar a faixa de trabalho, é necessário conhecer-se o intervalo de concentração do analito pesquisado, atendendo os critérios de precisão e exatidão. Uma das maneiras de se realizar este estudo é com o uso de padrões com elevado grau de pureza e, para o estudo na matriz de interesse, o uso da padronização interna ou externa na etapa de quantificação dos analitos. A sensibilidade traduz a magnitude da resposta do equipamento frente ao incremento na concentração do analito, estudada a partir da linearidade (INMETRO, 2020).

### **2.8.3- Limites de detecção e de quantificação**

O limite de detecção (LOD) é a menor quantidade de analito que o equipamento é capaz de detectar com segurança. Esta concentração, cerca de três vezes menor que o LOQ, não pode ser quantificada dentro dos padrões de qualidade analítica exigidos (ICH, 2005).

O limite de quantificação (LOQ) é a menor quantidade de analito que o procedimento adotado é capaz de quantificar com segurança e exatidão. Para atingir esse objetivo, realiza-se replicatas (no mínimo 6) no menor ponto de concentração. A determinação do LOQ é feita pela razão entre o desvio padrão da medida no menor ponto e o coeficiente angular obtido na curva de calibração, multiplicando esse resultado por 10 (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002).

### **2.8.4- Tendência ou recuperação**

O estudo desse parâmetro costuma se dar através do ensaio de recuperação, que consiste em adicionar à matriz quantidades conhecidas (fortificação) do analito em pelo menos três pontos de concentrações analíticas comparando-se os resultados encontrados com adições feitas no final do procedimento analítico (AOAC, 2012).

### **2.8.5- Precisão**

É o parâmetro de validação onde avaliamos, através do desvio padrão calculado e do coeficiente de variação de cada análise intradia e interdía, entre operadores e entre equipamentos, para elaborar a repetibilidade, a precisão intermediária e a reprodutibilidade do procedimento analítico (EURACHEM GUIDE, 2014; INMETRO, 2020).

O parâmetro da robustez é opcional pela recomendação do Inmetro e não foi realizada neste trabalho.

### **3 JUSTIFICATIVA DO TEMA**

De acordo com Landrigan & Baker (2015), uma coorte de nascimentos é a forma mais adequada de investigação para avaliar associações entre exposições precoces (intrauterinas e/ou no período pós-natal imediato) a poluentes químicos ambientais e o desenvolvimento de desfechos maléficos à saúde (LANDRIGAN; BAKER, 2015).

A principal contribuição desta tese para saúde pública é a disponibilização de metodologia analítica validada, bem como o conhecimento dos níveis basais dos éteres difenílicos polibromados em amostras biológicas de plasma, que serão qualificadas e quantificadas. A compreensão dos processos de exposição a esses xenobióticos e a produção de dados primários inéditos no Brasil sobre esses contaminantes visam subsidiar futuras pesquisas e outros tipos de estudos epidemiológicos, permitindo a correlação dos níveis encontrados dessas substâncias químicas dispersas no ambiente com os efeitos sobre a saúde infantil, aos quais as crianças estão expostas desde a concepção.

## **4 OBJETIVO**

### **4.1- OBJETIVO GERAL**

Avaliar os níveis de exposição de três congêneres de éteres difenílicos polibromados (congêneres PBDE 47, 99 e 100) em amostras biológicas de plasma de puérperas atendidas em uma maternidade na zona sul da cidade do Rio de Janeiro.

### **4.2- OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Otimizar e validar método analítico para determinação dos congêneres PBDE 47, 99 e 100 em plasma humano;
- Analisar as amostras de plasma de puérperas atendidas em maternidade da área programática A.P. 2.1 no município do Rio de Janeiro;
- Comparar os níveis de PBDEs na população estudada com valores encontrados em outras populações;
- Avaliar a influência de algumas variáveis sociodemográficas sobre os resultados encontrados.

## 5 METODOLOGIA

Neste estudo foram analisados os congêneres PBDE 47 (tetra BDE), PBDE 99 e PBDE 100 (ambos penta-BDE), que representam os PBDEs mais encontrados nos estudos realizados em outros países (ANNUNCIACÃO *et al.*, 2018). Os níveis identificados nesses estudos foram abaixo de 1 ng mL<sup>-1</sup>, sendo necessário o desenvolvimento de metodologia analítica capaz de quantificar esses contaminantes de forma precisa nessa faixa de concentração, esperada de ser encontrada em um grupo populacional não exposto ocupacionalmente, como no caso deste presente estudo.

### 5.1 - POPULAÇÃO ESTUDADA

A população-alvo desse trabalho era constituída por genitoras participantes um estudo de seguimento de bebês nascidos na maternidade escola da UFRJ pela equipe do Projeto PIPA (Programa Infantil e Poluentes Ambientais) no período de outubro de 2017 a março de 2018, em uma área programática do município do Rio de Janeiro. Participaram desse estudo 142 gestantes que depois de assinarem o termo de consentimento livre e esclarecido, preencheram um questionário destinado a caracterizar socioeconomicamente a populaçãoo estudada.

### 5.2- PREPARO DAS SOLUÇÕES-PADRÃO

As substâncias químicas de referência utilizadas no desenvolvimento da metodologia e controle das análises das amostras apresentaram grau de pureza acima de 99%, da marca Sigma Aldrich<sup>®</sup>, disponíveis comercialmente na forma de pó para o PBDE 47 (2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether) e para o PBDE 99 (2,2',4,4',5-pentabromodiphenyl ether) e em solução a 50 µg mL<sup>-1</sup> em iso-octano para o PBDE 100 (2,2',4,4',6-pentabromodiphenyl ether).

Todos os solventes utilizados foram da marca Merck<sup>®</sup>, grau resíduo de pesticidas, e o cartucho de extração em fase sólida da marca Applied Separations<sup>®</sup>, com 500 mg de resina C18 e capacidade de 6mL.

As soluções-padrão de PBDE 47 e 99 foram preparados pela pesagem de 2 mg da substância de referência escolhida em balão volumétrico de 5 mL avolumado com hexano, perfazendo a concentração de 50 µg mL<sup>-1</sup>. Para homegeinização foi feita agitação magnética

e as soluções foram armazenadas em frascos âmbar com tampa com selo de teflon e armazenadas em freezer ( $-20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) em alíquotas de 2 mL para evitar repetidos ciclos de descongelamento.

A preparação da solução contendo uma mistura dos PBDEs de referência que foi usada na fortificação do plasma e demais diluições para o preparo de curvas de calibração consistiu na adição de cada PBDE, para produção de mistura padrão estoque na concentração de  $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

### 5.3 – FORTIFICAÇÃO DO PLASMA

O plasma utilizado para as etapas de otimização e de validação foi previamente aliquotado em balão volumétrico de 100 mL e colocado em banho maria a  $37^{\circ}\text{C}$  por uma hora. Em seguida foi fortificado com a mistura padrão de  $5 \mu\text{g mL}^{-1}$  contendo os PBDE 47, 99 e 100, tendo as concentrações para os testes de otimização definidas em 0,5 e  $1 \text{ ng mL}^{-1}$ . A diluição da mistura de 50 para  $5 \mu\text{g mL}^{-1}$  foi feita em acetona para promover melhor solubilização no plasma. Foi feita homogenização em vórtex por 30 segundos, 5 minutos em ultrassom e posterior agitação magnética durante 30 minutos. Todo plasma fortificado foi armazenado em frasco âmbar e colocado em geladeira ( $5^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) *overnight*.

Após o período *overnight* o plasma fortificado foi aliquotado em frascos pequenos de 25 mL para que em cada lote de análises fosse utilizado 1 frasco, evitando, portanto, o descongelamento desnecessário. Todos os frascos foram armazenados em freezer ( $-20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) até o momento dos testes de otimização ou validação, ou análise de amostras (controle de qualidade).

### 5.4 – PREPARO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO EM SOLVENTE ORGÂNICO

A curva de calibração para os diferentes PBDEs foi preparada a partir de solução contendo a mistura de padrões na concentração de  $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Foram feitas diluições não seriadas nas concentrações de 0,01; 0,02; 0,05; 0,2; 0,5; 1; 2; 3; 4 e  $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ , em hexano.

Os volumes da solução correspondentes às concentrações desejadas foram injetados em triplicata e foi feita a avaliação da repetibilidade, linearidade da resposta do equipamento, bem como os limites de detecção e quantificação do equipamento.

## 5.5- PARÂMETROS AJUSTADOS NA CROMATOGRAFIA E NA ESPECTROMETRIA

A análise para identificação e quantificação dos PBDE foi feita por cromatografia em fase gasosa e detecção por espectrometria de massas por triplo quadrupolo, marca *Thermo Scientific*, modelo TSQ 8000 EVO. A separação cromatográfica foi realizada utilizando-se uma coluna de sílica fundida (TG-5MS; 30 m de comprimento; 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25µm de espessura do filme, Thermo Scientific®). Foram realizados testes na rampa de aquecimento do forno do cromatógrafo de fase gasosa para minimização do tempo da corrida cromatográfica.

As condições espectrométricas para a análises nos quadrupolos foram definidas em consultando as bibliotecas no software Tracefinder®, e as confirmações foram feitas através do AutoSRM através da injeção de padrões puros na concentração de 5 µg mL<sup>-1</sup>.

Todos os testes de otimização das rampas e condições do espectrômetro foram feitos com soluções dos padrões puros na concentração de 5 µg mL<sup>-1</sup>.

## 5.6 - OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO

Os experimentos de otimização foram avaliados através de ensaios de recuperação pela comparação de fortificação antes e depois da execução do método de extração, em triplicata, e também com pontos de branco.

Inicialmente, o condicionamento para preparação dos cartuchos C<sub>18</sub> foram realizados com 3 mL de hexano, 3 mL de metanol e 3 mL de água ultrapura, separadamente. As amostras de plasma devidamente conservadas em congelador - 20° C, foram preparadas com 1 mL de plasma, adicionados 2 mL de água e 1 mL de metanol 100%, para desproteíntização do plasma. Cada tubo foi homogeneizado por 30 segundos para garantir a interação do plasma com o metanol e facilitar a quebra das proteínas.

Ao final do condicionamento da coluna C<sub>18</sub> na cuba de extração, as amostras foram adicionadas e interagiram por dois minutos com a coluna, com a torneira fechada. Foram eluídas sob vácuo baixo e no final da passagem da amostra, o vácuo foi aumentado para -20 pol Hg por 40 minutos para secagem do cartucho. Desligado o vácuo, o cartucho contendo os PBDE foi eluído com 7 mL de hexano sem usar o vácuo e reservado para etapa seguinte de *clean up*. Os cartuchos C<sub>18</sub> foram descartados substituídos pelos cartuchos de florissil.

Foi adicionado 1 grama de sulfato de sódio em cada cartucho, e para condicionar

essas colunas de florisil foram adicionados 3 mL de uma mistura de éter de petróleo com acetona, na proporção 85:15, e depois 3 mL de hexano. Foram eluídos o extrato da etapa anterior e adicionados 2 mL de éter de petróleo mais acetona. Foram adicionados 1 mL de isooctano em cada tubo de amostra e homogeneizados por três segundos para etapa de evaporação.

A evaporação foi feita sob atmosfera de nitrogênio com pureza 99,998% no equipamento Thermo Scientific Reacti Therm III, de forma bem lenta para não haver fluxo com borbulhamento e perda do analito por evaporação, para assim atingir uma boa recuperação. As paredes dos tubos foram rinsadas com hexano quando o volume de cada tubo atingiu 5, 2 e 1 mL sucessivamente. A evaporação foi feita até a secura.

Em cada tubo que foram fortificados antes do método de extração, foram adicionados 100  $\mu$ L de hexano, agitação por vórtex por 3 segundos e transferidos com pipeta pasteur para vial com inserte, devidamente identificado.

Nos tubos com o plasma do experimento depois foram adicionados o padrão necessário calculado previamente para a concentração analisada. Todos os vials foram devidamente lacrados e armazenados para posterior análise em GC-MS/MS. O fator de concentração de 1 mL para 100  $\mu$ L é de 10 vezes.

Os primeiros resultados de recuperação não foram considerados satisfatórios, ficando abaixo de 50% de recuperação. Para melhorar essa recuperação foi necessário testar outras metodologias, experimentos e misturas de solventes.

Outro experimento para otimização da metodologia foi realizado para comparar 4 parâmetros. Todos os experimentos tiveram a mesma concentração de 1 ng mL<sup>-1</sup>.

O primeiro seguiu o mesmo protocolo descrito anteriormente.

No segundo experimento foi retirada a etapa de clean up com florisil.

No terceiro experimento foi acrescentada à etapa final de eluição, uma mistura com 6 mL de hexano mais diclorometano na proporção de 1:1, seguido de 1 mL de diclorometano 100% e 1 mL de iso-octano com etapa *clean up*.

No quarto experimento foi acrescentada à etapa final de eluição, uma mistura com 6 mL de hexano mais diclorometano 1:1, 1 mL de diclorometano 100% e 1 mL de isooctano e retirada a etapa de clean up com florisil.

A próxima etapa de experimento foi testar uma menor concentração, sendo também analisado o ponto de 0,2 ng mL<sup>-1</sup> para verificar a recuperação nesta concentração.

## 5.7- VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA

O planejamento dos experimentos de validação foi baseado no quarto experimento da etapa de otimização, ou seja, através da eluição com 6 mL de mistura contendo hexano e diclorometano na proporção 1:1, 1 mL de diclorometano 100% e 1 mL de isooctano e retirada a etapa de clean up com florisil.

Na etapa de validação do método foram atendidos a maioria dos parâmetros da normativa de orientação sobre validação de métodos analíticos do Inmetro, entre eles seletividade, linearidade, sensibilidade, faixa de trabalho, limites de detecção e de quantificação, recuperação e repetibilidade (INMETRO, 2020). Não foi avaliada a precisão intermediária, reprodutibilidade, robustez e comparação interlaboratorial por falta de disponibilidade de outro laboratório que disponibilizasse um equipamento compatível para realizar a validação da metodologia no prazo necessário.

Foram determinados 5 pontos de concentrações fortificados antes da extração, sendo eles 0,2; 0,5; 1,0; 2,0; e 6,0 ng mL<sup>-1</sup>, todos em triplicata, adicionados em pool de plasma doado pelo Hemorio e devidamente armazenado em congelador -20° C. Foram determinados os pontos de concentração 0,2; 1,0 e 6 ng mL<sup>-1</sup> fortificados depois, todos em triplicata. Também foram feitos brancos, em triplicata. Os experimentos de validação foram realizados em 3 dias. No quarto dia, foi realizado o mesmo procedimento substituindo a matriz plasma por água. Mesmos pontos de concentração e brancos. Não foi avaliada a recuperação na matriz água e num plasma de um indivíduo, experimento feito para comprovação da seletividade, pela avaliação do efeito de matriz, porque o objetivo desse teste é comparar a intensidade do sinal.

## 5.8- ANÁLISE DAS AMOSTRAS

As amostras de sangue foram coletadas na maternidade escola e transportada em caixa térmica devidamente identificadas e refrigeradas para o laboratório do CESTEJ, onde eram centrifugadas e separados o plasma do sangue e armazenados em congelador a -20° C. A cada lote de amostras que foram analisadas foi seguido um protocolo para controle de qualidade diário em três pontos nas concentrações 0,2; 1,0 e 6,0 ng/mL, e também um branco. Os procedimentos do preparo de amostras de plasma seguiram o mesmo protocolo do método otimizado. O controle dos resultados foi feito a partir do acompanhamento dos

valores de abundância nos plasmas fortificados e caso a variação fosse superior a 30% em relação dos dias anteriores, o coeficiente angular da validação deveria ser avaliado para ser utilizado no cálculo das concentrações das amostras.

O cálculo da concentração dos PBDE nas amostras foi feito por padronização externa com a equação da reta e a utilização de coeficientes angulares e lineares para cada um dos congêneres, calculados a partir da curva de calibração mencionada posteriormente.

Também como medida de controle de qualidade, a cada dez amostras foi realizada uma amostra em duplicata.

O padrão interno foi colocado em todas as amostras e controles para avaliação da injeção e condições cromatográficas do lote no qual a amostra foi analisada, sendo monitorada ao longo do tempo a sua área, bem como de todos os analitos numa mistura de padrões com pureza maior que 99%, na concentração de  $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Também eram feitas injeções de solventes de 10 em 10 amostras para avaliação de efeito de memória e limpeza do sistema cromatográfico.

Dessa forma, sistematicamente, a preparação das amostras ocorreu da seguinte forma:

- 1 mL de amostra + 2 mL de água Milli Q + 1 mL de metanol;

-Vórtex por trinta segundos;

-Cuba com um cartucho  $\text{C}_{18}$  em cada canal;

Condicionamento dos cartuchos:

- 3 mL de hexano + 3 mL de metanol + 3 mL de água MilliQ;

-Adicionar a amostra preparada para os cartuchos  $\text{C}_{18}$  e deixar dois minutos de interação;

-Eluir as amostras sob vácuo baixo;

-Ligar o vácuo no máximo por quarenta minutos para secagem dos cartuchos;

-Eluir com 6 mL de hexano com diclorometano 1:1 + 1 mL de diclorometano 100%;

-Recolher o extrato e acrescentar 1 mL de Isooctano;

-Evaporação sob atmosfera de nitrogênio;

-Ressuspensão com  $50 \mu\text{L}$  de hexano e vórtex por três segundos;

-Transferir para vial âmbar com insert e armazenar em freezer  $-20^{\circ}\text{C}$  até a análise cromatográfica.

## 5.9 - DESENHO DO ESTUDO

Este trabalho se trata de um estudo transversal, dentro de uma coorte de nascimentos. Foram convidadas a participar todas as gestantes atendidas nos meses de outubro e novembro de 2017, na maternidade escola da UFRJ, situada na área programática A.P. 2.1 do Projeto Cegonha Carioca, que contempla os seguintes bairros: Botafogo, Catete, Copacabana, Cosme Velho, Flamengo, Gávea, Glória, Humaitá, Ipanema, Jardim Botânico, Lagoa, Laranjeiras, Leblon, Leme, Rocinha, São Conrado, Urca e Vidigal, e que compreende as seguintes unidades de saúde, Clínica da Família (CF) Pavão Pavãozinho/Cantagalo; CF Santa Marta; Centro Municipal de Saúde (CMS) Chapéu Mangueira – Babilônia; CMS Dom Helder Câmara; CMS Manoel José Ferreira (inclui SF Catete); e CMS Rocha Maia. As gestantes têm a maternidade escola como unidade de referência para o parto. Ao todo foram 142 gestantes que aceitaram participar do estudo. Os bebês nascidos dessas mães foram monitorados desde o momento do nascimento até a idade de 6 meses através de avaliações periódicas, clínica e laboratorial (PIPA, 2017).

### 5.10- CRITÉRIOS DE ELEGIBILIDADE

Todas as crianças, sem exclusão devido a intercorrências clínicas de qualquer natureza durante a gestação ou parto, parto normal ou cesáreo, sem limite de idade gestacional, incluindo gestações gemelares, foram incluídos neste estudo.

Recém-natos de mães menores de 16 anos (até 15 anos e 11 meses) foram excluídos.

Em casos de óbito fetal, aborto ou morte neonatal foi realizada uma entrevista com os genitores para identificação de fatores/condições que possam ter contribuído para este desfecho.

### 5.11- ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA

Os procedimentos deste projeto respeitaram os procedimentos éticos da Declaração de Helsinque e da Resolução 466/2013 do Conselho Nacional de Saúde sobre pesquisa envolvendo seres humanos que exige aprovação do projeto por um Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) institucionalmente formalizado e que incorpore um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido que foi assinado pelos sujeitos da pesquisa.

Por se tratar de um projeto interinstitucional, o mesmo foi aprovado em Comitês de Ética das duas instituições envolvidas, para a viabilização da utilização das amostras para a finalidade das análises de PBDE.

#### **5.11.1- Parecer consubstanciado do CEP, UFRJ.**

Pesquisador: Carmen Ildes Rodrigues Froes Asmus

Título da Pesquisa: Estudo longitudinal dos efeitos da exposição a poluentes ambientais sobre a saúde infantil. "Coorte dos bebês".

Instituição Proponente: Maternidade Escola da Universidade Federal do Rio de Janeiro

CAAE: 68341317.0.0000.5275

Número do Parecer: 2.092.440

#### **5.11.2- Parecer consubstanciado do CEP, Instituto Oswaldo Cruz, IOC/FIOCRUZ.**

Pesquisador: Carmen Ildes Rodrigues Froes Asmus.

Título da Pesquisa: Estudo longitudinal dos efeitos da exposição a poluentes ambientais sobre a saúde infantil. "Coorte dos bebês".

Instituição Proponente: Maternidade Escola da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

CAAE: 68341317.0.3001.5248

Elaborado pela Instituição Coparticipante.

Número do Parecer: 2.121.397

### **5.12 - ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS**

A avaliação das amostras, cálculos de concentração e análises descritivas simplificadas foram feitas no software Microsoft Excel<sup>®</sup>, versão 2010.

O cálculo utilizado para quantificação das amostras foi por padronização externa, com aplicação da expressão de equação da reta assim como os testes F, teste t, Teste de Grubbs, Teste de Cochran Ccalc, Correlação linear da reta e de Teste de dispersão.

A análise estatística descritiva de frequências das variáveis nominais e as medidas de tendência central e de dispersão das variáveis contínuas (média, mediana, desvio padrão, percentis de distribuição) foram calculadas na caracterização da amostra.

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1 – CARACTERÍSTICAS DA POPULAÇÃO ESTUDADA

As características da população estudada são mostradas na Tabela 5 e as principais atividades desenvolvidas pelas participantes nessa coorte, na Figura 2.

A média de idade das gestantes foi 28 anos e a etnia mais prevalente no grupo foi de pardas, correspondendo a 45,2% do grupo, seguido da branca (23,3%) e preta (19,9%).

A renda variou entre R\$ 165,00 e R\$ 8.000,00, sendo o valor médio de R\$ 2.503,00 e a renda per capita média de R\$ 884,00.

Quanto ao local de residência, 58,8% das gestantes participantes residem em bairros das zonas Sul e Central da cidade do Rio de Janeiro, sendo as outras 41,2% moradoras de diversos bairros, inclusive de municípios fora do Rio de Janeiro, como Caxias e Nova Iguaçu, prioritariamente.

A maior parte das gestantes tinham ensino superior completo ou incompleto, compreendendo 44,4% do grupo, seguido do ensino médio, também completo ou incompleto, sendo 35,5% do grupo. O percentual de ocupação também foi elevado, de 58,9% do total das participantes.

A procedência da água seria um fator de risco para a exposição ambiental, mas 82,2% das gestantes relataram o uso de água tratada.

As ocupações mais frequentes foram atendente, recepcionista (18%), administração, contadora, caixa (17%), vendedora (12%), salão de beleza, cabeleireira, manicure, cosméticos (10%), doméstica, diarista, cuidadora (9%). A frequência de todas que relataram trabalhar está demonstrada na figura 2.

Tabela 5: Variáveis socioeconômicas (n = 142).

<b>Tabela descritiva</b>	<b>N=142</b>	<b>%</b>
<u>Idade</u>		
Média	28	
Mediana	27	
mínimo - máximo (anos)	16 - 45	
<u>Etnia</u>		
Branco	34	23,3
Preto	29	19,9
Indígena	1	0,7
Pardo	66	45,2
Amarelo	5	3,4
<u>Renda</u>		
Média	R\$ 2.503,00	
Mediana	R\$ 2.400,00	
mínimo - máximo (reais)	R\$ 165,00 – R\$ 8.000,00	
<u>Escolaridade</u>		
Ensino Fundamental	10	7,3
Ensino Médio	48	35,5
Ensino Superior	60	44,4
Pós-graduação	18	13,3
<u>Trabalha</u>		
Não	49	33,6
Sim	86	58,9
<u>Procedência da água</u>		
CEDAE	120	82,2
Poço ou nascente	9	6,2
Reservatório comunitário	4	2,7

Figura 2 – Ocupações relatadas pelas gestantes.



## 6.2 – CARACTERÍSTICAS DA CURVA DE CALIBRAÇÃO EM SOLVENTE ORGÂNICO

Foi verificada a linearidade da resposta, os limites de detecção e quantificação do equipamento, bem como a avaliação da repetibilidade das injeções. As curvas foram injetadas em triplicata, da menor para maior concentração. Não foram verificadas contaminações entre as corridas.

A linearidade foi avaliada pela curva de calibração em hexano para entender a resposta do equipamento sem o efeito da matriz interferindo o resultado de análise. Foi realizada uma curva em solvente com concentrações de 10, 20, 50, 200, 500, 2000, 4000 e 5000 ng mL<sup>-1</sup> dos PBDEs 47 e 99. Os coeficientes de correlação linear da reta dos PBDE 47 e 99 ficaram acima de 0,99, o que é considerada uma boa linearidade. O PBDE 100 não foi avaliado nesta etapa por escassez do padrão puro, que foi economizado para ser utilizado nas etapas de otimização e validação do método analítico na matriz plasma.

Os valores dos coeficientes e equações da reta para os dois PBDE estão demonstrados na tabela 6, e o gráfico que evidencia a linearidade e os desvios de cada ponto da curva e a melhor reta está demonstrada nas figuras 3 E 4.

Tabela 6: Equação da reta em hexano para os congêneres BDE 47 e 99.

Congêneres	Coefficiente de determinação ( $r^2$ )	Equação da reta
PBDE 47	0,9902	$Y = 31,673 X + 2397,5$
PBDE 99	0,9961	$Y = 9,9604 X + 659,88$

Figura 3: Equação da reta do congêner BDE 47 em hexano.

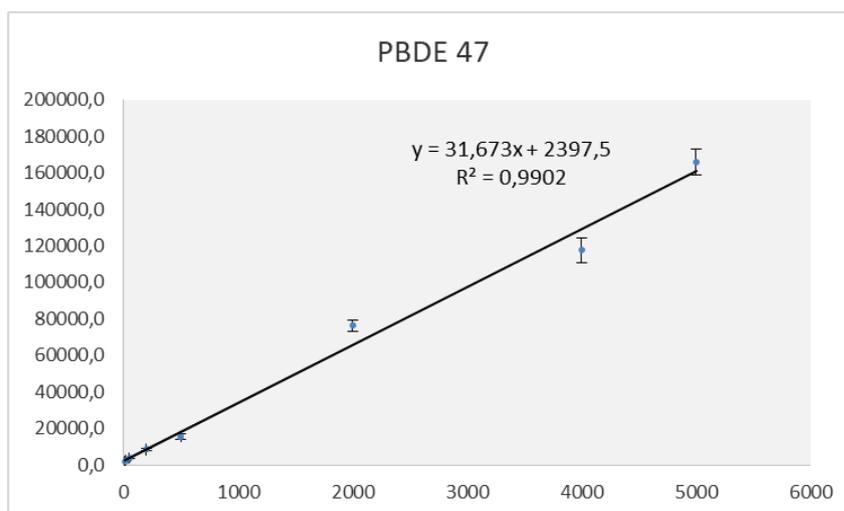
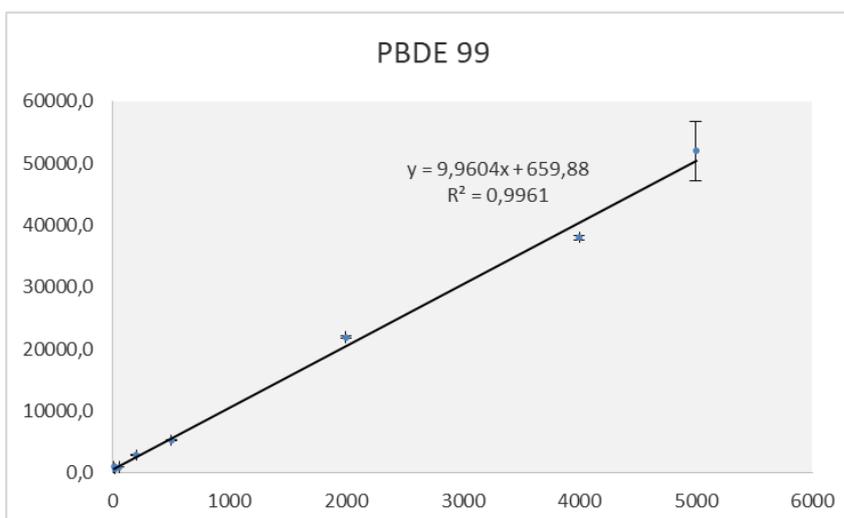


Figura 4: Equação da reta do congêner BDE 99 em hexano.



Em todos os pontos o coeficiente de variação foi menor que 10%, sendo o parâmetro de precisão do instrumento atendido nessa avaliação para os congêneres PBDE 47 e 99.

Apesar do pequeno número de replicatas para a determinação dos limites de detecção e quantificação, foi feita a avaliação dos mesmos através da multiplicação do desvio padrão do ponto de 10 ng mL<sup>-1</sup>, dividido pelo coeficiente angular da reta e multiplicado por 3,3 e 10, respectivamente. Dessa forma, os valores calculados estão descritos na tabela 7.

Tabela 7: Limites de detecção e quantificação para os PBDE 47 e 99.

Congêneres	Limite de Detecção do equipamento (ng mL <sup>-1</sup> )	Limite de Quantificação do equipamento (ng mL <sup>-1</sup> )
PBDE 47	17,6	53,5
PBDE 99	25,8	78,4

### 6.3 – OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO E ESPECTROMÉTRICO

Após vários testes de otimização do tempo da corrida cromatográfica, as condições otimizadas do cromatógrafo em fase gasosa foram:

- Fluxo de hélio ultrapuro (gás de arraste da coluna): 1mL min<sup>-1</sup>
- Modo de carregamento: Pressão constante
- Tipo de Injeção: sem divisão de fluxo (splitless)
- Tempo de splitless: 1 minuto
- Fluxo de Purga: 30mL min<sup>-1</sup> – tempo até a purga: 0 min
- Temperatura do Injetor: 280°
- Volume Injetado: 2μL
- Temperatura do Forno:
- Rampa 1 começando em 50°C por 2 minutos, aumentando 10°C por minuto até 100°C.
- Rampa 2 aumentando 30°C por minuto até 310°C, permanecendo por 5 minutos.
- Tempo Total da Corrida: 19 minutos
- Temperatura do Detector: 300°C

Já as condições espectrométricas, em relação às maiores contagens de abundâncias observadas nas etapas de otimização estão descritas na tabela 8.

Tabela 8: Transições de Monitoramento Seletivo de Reação dos PBDEs.

Congêneres	Tempo de retenção	Íon precursor	Íon produto	Energia de colisão
PBDE 47	14,27	326	217	30
		328	219	30
		484	326	30
PBDE 99	15,10	563,6	403,7	20
		564	404	20
		565,6	405,6	20
PBDE 100	14,88	406	297	30
		564	404	25
		565,6	405,6	25

O cromatograma apresentado na figura 5 define o perfil dos congêneres de PBDEs numa mistura de padrões a  $5000 \text{ ng mL}^{-1}$  preparada em hexano com seus tempos de retenção relacionados. Os cinco picos do teste inicial são dos congêneres PBDEs 47, 99, 100, 153 e 154. Foi decidido trabalhar apenas com os congêneres PBDEs 47, 99 e 100 por causa da resposta analítica. Foi observado que os congêneres 153, 154 e 209, o octa e deca PBDEs, sofrem degradação por debromação e além de possuírem um tempo de meia vida muito menor que o tetra e penta PBDE (em torno de duas semanas em plasma) (ANNUNCIÃO *et al.*, 2018).

A separação cromatográfica e as transições que forneciam as maiores abundâncias estão demonstradas nas figuras 6, 7 e 8, sendo possível identificar a boa especificidade das transições para caracterização destes compostos.

Figura 5 –Cromatograma de íons totais dos PBDE 47, 99 e 100 (os três primeiros)

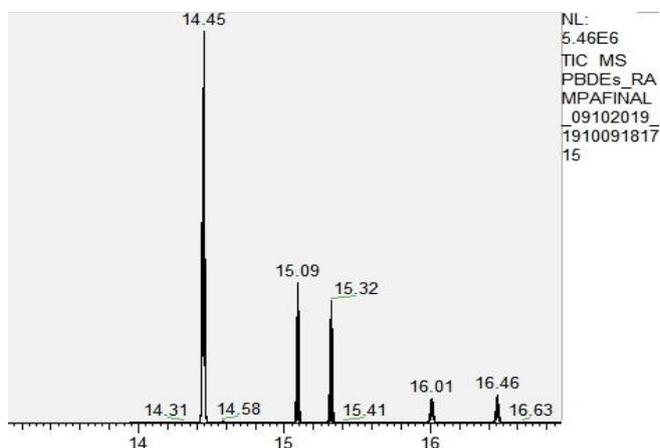


Figura 6: Transição de quantificação e as duas qualificadoras do PBDE 47.

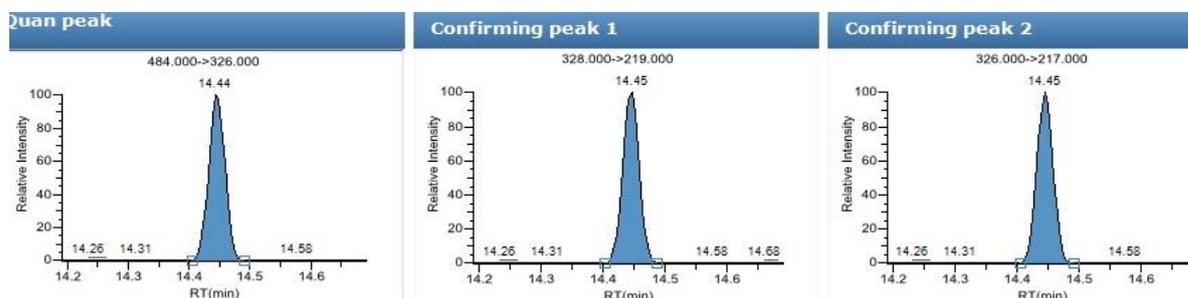


Figura 7: Transição de quantificação e as duas qualificadoras do PBDE 99.

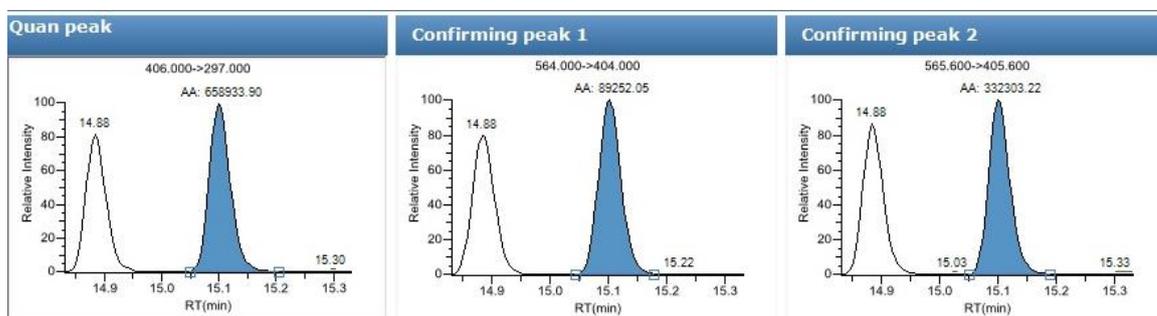
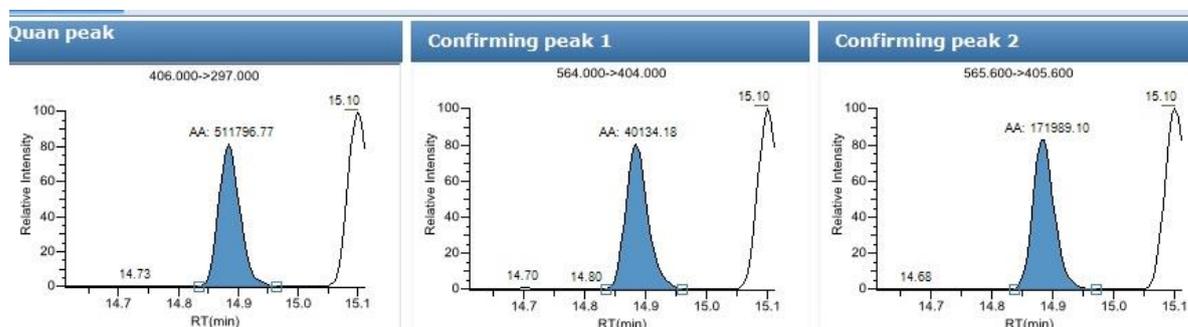


Figura 8: Transição de quantificação e as duas qualificadoras do PBDE 100.



#### 6.4 – OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA

Os resultados dos experimentos de otimização evidenciaram que o método do experimento 4 foi o que apresentou melhores resultados de recuperação, tendo sido aquele adotado para prosseguir a validação, bem como ser utilizado para análise das amostras. A tabela 9 demonstra os resultados alcançados.

Tabela 9 – Resultados de recuperação percentual dos experimentos realizados na etapa de otimização.

Congêneres	Experimento 1 Eluição HX Com florissil	Experimento 2 Eluição HX Sem florissil	Experimento 3 Eluição HX + DCM Com florissil	Experimento 4 Eluição HX + DCM Sem florissil
PBDE 47	37,8	59,9	33,9	89,4
PBDE 99	23,8	51,6	37,9	70,5
PBDE 100	11,5	29,8	37,9	66,8

A recuperação mais eficiente foi a do quarto experimento. Foram obtidas recuperações do PBDE 47, 99 e 100 satisfatórias, com percentuais compatíveis com outros métodos citados na literatura (COWELL *et al.*, 2019; HERBSTMAN *et al.*, 2010; PERSSON; WANG; HAGBERG, 2019; WANG *et al.*, 2017).

A etapa de *clean up*, apesar de garantir maior limpeza do extrato, reduziu os valores de recuperação, além de introduzir maior custo com os cartuchos de florissil.

Dessa forma, o método otimizado consistiu no preparo das amostras com 1 mL de plasma, 2 mL de água e 1 mL de metanol, seguidas de homogeneização por 30 segundos. Após o preparo, foi realizado o condicionamento dos cartuchos C<sub>18</sub> com 3 mL de hexano, 3 mL de metanol e 3 mL de água ultrapura. As amostras foram adicionadas e permaneceram em contato com a coluna por 2 minutos e depois foram eluídas sob vácuo baixo. Foi feita a secagem do cartucho com alto vácuo (-20 pol mmHg) por 40 minutos e, após este tempo, os PBDEs foram eluídos com 6 mL de uma mistura de hexano e diclorometano (1:1), seguida da adição de 1 mL de diclorometano e 1 mL de isooctano direto no eluato, sem passar pelo cartucho florissil.

A evaporação foi feita sob atmosfera de nitrogênio de forma bem lenta, com rinsagem das paredes dos tubos com hexano em 5, 2 e 1 mL sucessivamente. A evaporação foi feita até a secura. O extrato seco foi ressuspendido com 50 µL de hexano, agitado por vórtex por 3 segundos e transferidos para vial com inserte. Todos os vials foram devidamente lacrados e armazenados para posterior análise em GC-MS/MS. O fator de concentração de 1 mL para 50 µL foi de 20 vezes, a fim de aumentar a sensibilidade do método.

## 6.5 – PARÂMETROS DE VALIDAÇÃO DO MÉTODO

### 6.5.1 – Seletividade / Efeito Matriz

A seletividade foi avaliada analisando-se em experimentos diferentes as seguintes matrizes: pool de plasma + analito, plasma sozinho + analito e água + analito. A concentração avaliada foi de 1 ng mL<sup>-1</sup>. Foram submetidos ao teste F e ao teste t comparando a razão do desvio padrão para o teste t. O resultado do teste t calculado foi maior para os três congêneres do que o t tabelado indicando que há efeito da matriz. Embora as razões indiquem que os valores de t calculado sejam maiores que o t tabelado ao realizar análise da inclinação da reta podemos verificar que é um efeito esperado.

A tabela 10 indicam os resultados do teste estatístico de F. A interpretação desse teste para critério de seletividade é que o F calculado tem que ser menor que o F tabelado para comprovar que não há diferença significativa entre os grupos analisados.

Tabela 10: Resultados do teste F para os Congêneres PBDE 47, 99 e 100.

Congêneres	F calculado	F tabelado
PBDE 47	3,936	19
PBDE 99	0,167	19
PBDE 100	0,467	19

### 6.5.2 – Linearidade e Faixa de Trabalho

A linearidade do método foi avaliada através da curva de calibração nas concentrações 0,2; 0,5; 1,0; 2,0 e 6,0 ng mL<sup>-1</sup>, tendo sido obtidos valores de r e r<sup>2</sup> acima de 0,99 para o todos os congêneres, demonstrando uma boa correlação (r<sup>2</sup>) como mostram os gráficos das figuras 9, 10 e 11.

A avaliação dos valores aberrantes de todos os pontos da curva de calibração foi realizada através do teste de Grubbs. Todos os valores calculados permaneceram abaixo do tabelado evidenciando que o experimento não possuiu valores aberrantes.

A homocedasticidade, que explica a homogeneidade da variância dos resíduos, foi testada através do teste estatístico de Cochran, comparando o valor tabelado com o valor calculado. Todos os PBDEs apresentaram resultados heterocedásticos. Quando o método é

considerado heterocedástico pela estatística, normalmente se usa o modelo de regressão ponderada. Entretanto, o modelo de regressão ponderada apresentou r menor que 0,99 e, por essa razão, como os desvios observados foram maiores nas concentrações mais altas, conforme observado no gráfico de resíduos das figuras 9, 10 e 11, foi escolhido o modelo de regressão linear simples, para calcular as concentrações das amostras reais.

Tabela 11: Resultado da homocedasticidade.

Congêneres	Teste de Cochran $C_{calc}^*$	Condição de Homocedasticidade
PBDE 47	0,956	Heterocedástico
PBDE 99	0,949	Heterocedástico
PBDE 100	0,972	Heterocedástico

\* $C_{tab}$  para  $l=2$ , 5 níveis é 0,684.  $C_{calc} < C_{tab}$  para ser homocedástico.

A sensibilidade, parâmetro que traduz a resposta do espectrômetro frente ao incremento da concentração, foi expressa pelo coeficiente angular da reta de calibração em unidades arbitrárias, e também está demonstrada na tabela 12.

Tabela 12: Equação da reta em plasma.

Congêneres	Equação da reta	Coefficiente de correlação linear da reta
PBDE 47	0,9982	$Y=11087X+1637,2$
PBDE 99	0,9951	$Y=3664,2X+189,76$
PBDE 100	0,9964	$Y=3605,9X+535,58$

Figura 9: Equação da reta do PBDE 47.

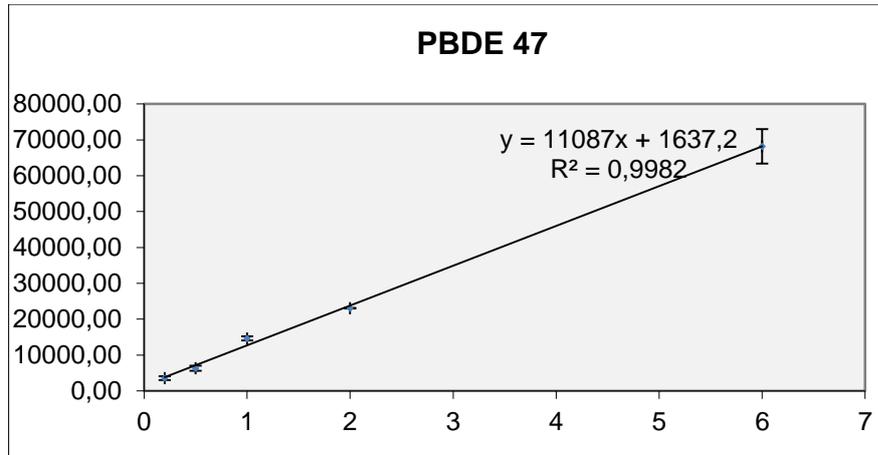


Figura 10: Equação da reta do PBDE 99.

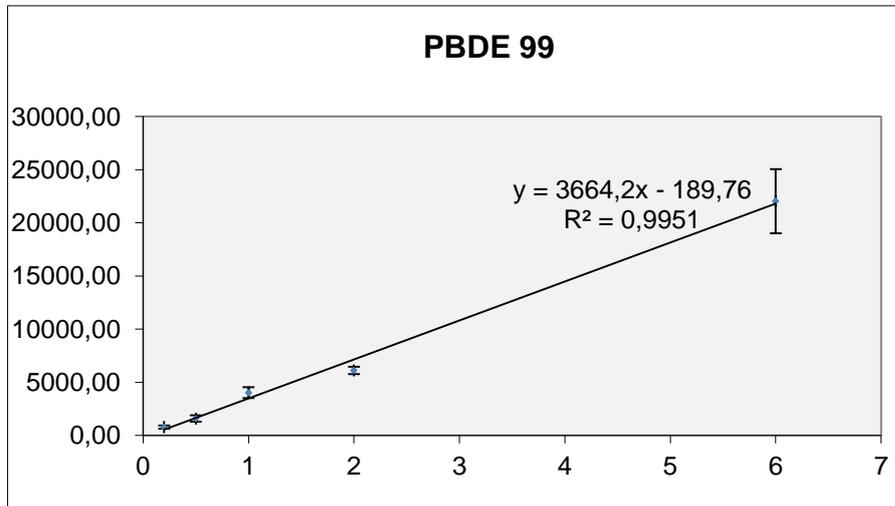
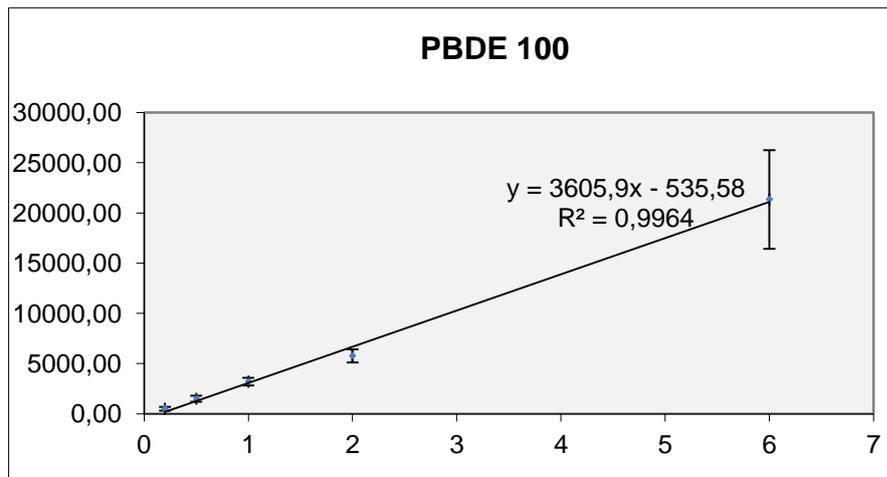


Figura 11: Equação da reta do PBDE 100.



A linearidade também foi confirmada pelo  $r^2$  aplicando o teste estatístico para análise de resíduos (teste de dispersão). Demonstrada pelos gráficos das figuras 12, 13 e 14 dos congêneres PBDEs 47, 99 e 100 nas concentrações 0,2; 0,5; 1,0; 2,0 e 6,0 ng mL<sup>-1</sup>:

Figura 12: Valores dos testes de resíduo para o congêner PBDE 47 nas concentrações de 0,2; 0,5; 1,0; 2,0 e 6,0 ng mL<sup>-1</sup>.

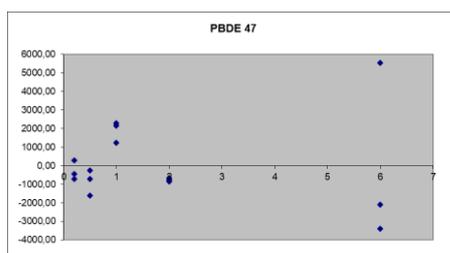


Figura 13: Valores dos testes de resíduo para o congêner PBDE 99 nas concentrações de 0,2; 0,5; 1,0; 2,0 e 6,0 ng mL<sup>-1</sup>.

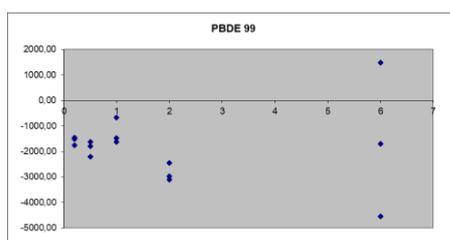
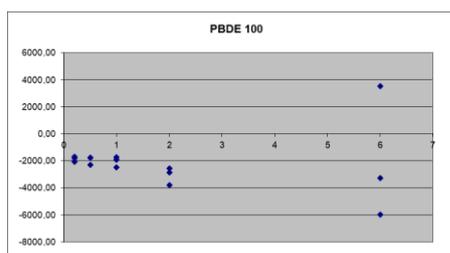


Figura 14: Valores dos testes de resíduo para o congêner PBDE 100 nas concentrações de 0,2; 0,5; 1,0; 2,0 e 6,0 ng mL<sup>-1</sup>.



### 6.5.3 – Limites de Detecção e de Quantificação do Método

Os limites de detecção e de quantificação do método analítico desenvolvido foram avaliados a partir de 6 replicatas no menor ponto da curva de calibração.

O limite de detecção do método foi calculado pela equação  $LDM = 3,3 * s/d$ , onde  $s$  é o desvio padrão das análises em sextuplicata no ponto 0,2 ng mL<sup>-1</sup>, e  $d$  é o coeficiente angular da reta obtida pela curva analítica.

O limite de quantificação do método calculado pela equação  $LQM = 10 \cdot s/d$ , onde  $s$  é o desvio padrão das análises em sextuplicata no ponto  $0,2 \text{ ng mL}^{-1}$ , e  $d$  é o coeficiente angular da reta obtida pela curva analítica. Os resultados foram calculados e apresentados na tabela 13.

Tabela 13: Limites de detecção do método (LDM) e limites de quantificação do método (LQM) para os congêneres PBDE 47, 99 e 100.

Congêneres	LDM em $\text{ng mL}^{-1}$	LQM em $\text{ng mL}^{-1}$
PBDE 47	0,097	0,295
PBDE 99	0,157	0,475
PBDE 100	0,180	0,545

#### 6.5.4 – Recuperação

A recuperação média do método variou de 74 a 81 % podendo ser demonstrada pela tabela 14.

Tabela 14: Percentual de recuperação nas concentrações 0,2; 1,0 e 6,0  $\text{ng mL}^{-1}$ .

Congêneres	%rec $0,2 \text{ ng mL}^{-1}$ N=3	%rec $1 \text{ ng mL}^{-1}$ N=3	%rec $6 \text{ ng mL}^{-1}$ N=3
PBDE 47	56	68	97
PBDE 99	76	65	103
PBDE 100	60	58	113

#### 6.5.5 – Precisão / Repetibilidade

O critério de repetibilidade foi avaliado pelo mesmo analista através de um ponto de baixa concentração ( $2 \text{ ng mL}^{-1}$ ) em triplicata em dois dias diferentes. Espera-se que o desvio padrão relativo como critério de aceitação nessa faixa de concentração seja menor que 30%. Os resultados são mostrados na tabela 15, evidenciado que o método atende a esse parâmetro avaliado.

Tabela 15: Avaliação do critério de repetibilidade através do desvio padrão relativo.

Congêneres	Desvio padrão relativo %
PBDE 47	13%
PBDE 99	18%
PBDE 100	9%

A precisão intermediária, a reprodutibilidade e a robustez não foram avaliadas nem foram feitas comparações interlaboratoriais.

A performance do método analítico está compatível com os estudos de referência publicados nos países onde são pesquisadas essas substâncias como podemos observar na tabela 16 após revisão da literatura.

Tabela 16: Compostos pesquisados, matriz, preparação de amostras, técnica analítica, limite de detecção do método (LDM), valores medianos e recuperação.

Compostos	Matriz	Preparação de amostras	Técnica analítica	LDM	Valores medianos	Rec %	Referência País Estudo
PBDE 47, 99, 100	Plasma	SPE	GC MSMS	0,097 0,157 0,180 ng mL <sup>-1</sup>	0,15 0,23 ng mL <sup>-1</sup>	54 a 97 76 a 103 60 a 113	PIPA Brasil
PBDE 47	Sangue e urina	SPE	GC MSMS	0,5 ng mL <sup>-1</sup>	NA	NA	Kaloo <i>et al.</i> , 2019
PBDE 47, 99, 100, 153, 154, 183, 209	Urina e poeira das mãos	Troca iônica de modo misto e extração hex: acetona 1:1	HPLC MS e GC MSMS	0,08 a 0,64 ng mL <sup>-1</sup>	NA	69 a 107	Herbstman <i>et al.</i> , 2019 Estados Unidos
PBDE 47, 99, 100, 153	Sangue	SPE	GCMSMS	1,2; 0,7; 0,5; 0,5 ng mL <sup>-1</sup>	NA	84 a 100	Margollis <i>et al.</i> , 2020
PBDE 47, 99, 100, 153, 154, 209	Sangue	SPE	GC IDD HRMS	1,07 ng mL <sup>-1</sup>	NA	90	Fry & Power, 2017
PBDE 47, 99, 100, 153, 154, 209	Sangue	SPE	NHANES GC IDD e CHNS GC MS ENCI	De 1 a 30 pg mL <sup>-1</sup>	20,9 ng g <sup>-1</sup> de lipídeos no NHANES e 11,4 ng g <sup>-1</sup> de lipídeos no CHMS	80 a 105	Cascalho <i>et al.</i> , 2018 Sjodin <i>et al.</i> , 2019 Estados unidos e Canadá
PBDE 47 e 153	Sangue	Extração liq/liq	GC IDHRMS	3,6 e 2,3 ng g <sup>-1</sup> de lipídeos NA	NA	80	Watkins <i>et al.</i> , 2019 Porto Rico
PBDE 47, 99, 100 153 E 154	Sangue	SPE/Florisil	GC ID HRMS	NA	21,9 ng g <sup>-1</sup> de lipídeos	NA	Sjodin <i>et al.</i> , 2018 Estados Unidos Chamacos
PBDE 47, 99, 100, 153	Sangue	SPE/Florisil	GC MS ENCI	0,03 ng mL <sup>-1</sup>	5,33 ng g <sup>-1</sup> de lipídeos	NA	Forde <i>et al.</i> , 2014 10 países caribenhos
PBDE 47, 99, 100, 153, 209	Sangue	SPE	GC MS ENCI	0,1 ng g <sup>-1</sup> de lipídeos	1,07 ng g <sup>-1</sup> de lipídeos	NA	Kalantzi <i>et al.</i> , 2011 Grécia
PBDE 47, 99, 100, 153, 154, 209	Sangue	SPE	GC HRMS	0,2 ng g <sup>-1</sup> de lipídeos	0,82 ng g <sup>-1</sup> de lipídeos	NA	Thomas <i>et al.</i> , 2006 Inglaterra
PBDE 47, 99, 100, 153, 154, 209	Sangue	SPE/florisil	GC MS ENCI	0,003 ng mL <sup>-1</sup>	2,4 ng g <sup>-1</sup> de lipídeos	NA	Vizcaino <i>et al.</i> , 2011 Espanha
PBDE 47, 99, 100, 153, 154, 209	Sangue	SPE/florisil	GC HRMS	NA	1,8-17,66 ng g <sup>-1</sup> de lipídeos	NA	Kim <i>et al.</i> , 2012 Coréia do Sul
PBDE 47, 99, 100, 153, 154, 209	Sangue	SPE/florisil	GC HRMS	0,02 ng g <sup>-1</sup> de lipídeos	1,08 – 180 ng g <sup>-1</sup> de lipídeos	NA	Jiang <i>et al.</i> , 2019 China
PBDE 47, 99, 100, 153, 154	Sangue	SPE/florisil	GC ID HRMS	0,1 ng g <sup>-1</sup> de lipídeos	0,72 ng g <sup>-1</sup> de lipídeos	29 a 109	Dróbna <i>et al.</i> , 2019 Eslováquia

NA – Não se aplica.

Nos controles de qualidade diários feitos durante a realização das análises, os valores dos coeficientes angulares das curvas observadas a partir dos pontos de controle 0,2; 0,5 e 1 ng mL<sup>-1</sup>, assim como os coeficientes de variação calculados pela contagem da abundância entre os dias de análise (CV<25%).

De 142 mães que aceitaram participar do estudo, 6 não coletaram o sangue e 16 amostras estavam hemolisadas e não puderam ser analisadas. Das 120 amostras analisadas apenas 9 amostras apresentaram resultados acima do limite de detecção do método. O que representa 7,5 % das mães. A concentração média do PBDE 47 nessas amostras foi de 0,15 ng mL<sup>-1</sup> e do PBDE 99, de 0,23 ng mL<sup>-1</sup> e o PBDE 100 não foi detectado. Nenhuma amostra apresentou resultado acima do limite de quantificação do método.

As concentrações estão expressas em ng mL<sup>-1</sup> de plasma, por não ter sido inicialmente incluído no estudo a avaliação da concentração dos lipídicos. Para viabilizar a comparação dos resultados obtidos nesse trabalho com aqueles obtidos em outros países, ajustou-se esses valores tomando como base o valor de referência de triglicerídeos (abaixo de 150 mg dL<sup>-1</sup> para adultos), e colesterol total em jejum (abaixo de 190 mg dL<sup>-1</sup> para adultos), sendo os lipídeos totais calculados pela fórmula:  $Lipídeos\ totais = 2,27 \times colesterol\ total + triglicerídeos + 0,623$  (PHILLIPS *et al.*, 1989).

Dessa forma, a concentração de lipídeos totais calculado foi de 582 mg dL<sup>-1</sup>, ou 0,00582 g mL<sup>-1</sup>. Dividindo-se o valor da concentração em ng mL<sup>-1</sup> pelo de teor de lipídeos em g mL<sup>-1</sup> obtém-se a concentração de PBDE corrigida pelo teor de lipídeos em ng g<sup>-1</sup>. Os valores de PBDE 47 e 99, foram de 26 ng g<sup>-1</sup> para o PBDE 47 e 40 ng g<sup>-1</sup> para o PBDE 99 (PHILLIPS *et al.*, 1989).

Nossos resultados, em termos concentração média de PBDE 47 em gestantes foram maiores que os do NHANES que sugeriu uma concentração média de 20,8 ng g<sup>-1</sup> de lipídeos para a população de 2013/2014 (SJÖDIN *et al.*, 2018). Quando comparados com outros estudos, essa diferença foi ainda maior. Na Espanha, as concentrações médias do PBDE 47 ficaram abaixo do nível de detecção, enquanto as concentrações do congêneres 99 foi de 1,14 ng g<sup>-1</sup> de lipídeos (M.-J. *et al.*, 2015). No Canadá, as concentrações desses congêneres foi de 24,20 e 8,73 ng g<sup>-1</sup> de lipídeos, respectivamente (FOSTER *et al.*, 2011). Nossos resultados para esses congêneres também foram maiores do que os relatados na Austrália (3,96 e 088 ng g<sup>-1</sup> de lipídeos), China (2,26 e 3,58 ng g<sup>-1</sup> de lipídeos) e Coreia (1,72 e 0,49 ng g<sup>-1</sup> de lipídeos) (CHEN *et al.*, 2015; CHOI *et al.*, 2014; STASINSKA *et al.*, 2014). É importante ressaltar que todos os estudos comparados foram conduzidos entre 2010 a 2019 e como a substituição ou banimento dos PBDEs ocorreram gradativamente nos países desenvolvidos a partir do final da década de 90 é possível que essa redução no uso tenha tido algum impacto nos níveis séricos desses compostos quando comparados ao nosso país, que embora faça parte da Convenção de Estocolmo, não apresenta um programa específico de eliminação e

monitoramento. Nos Estados Unidos em 2019, Sjödin e colaboradores publicaram os dados da Pesquisa Nacional de Saúde e Nutrição (NHANES) avaliando a tendência temporal das concentrações de PBDEs nos anos de 2005/06 a 2013/14. As análises foram realizadas com preparo de pool de amostras como estratégia de amostragem estratificadas por idade, etnia e por ano. Os resultados obtidos comprovam a estabilidade desses compostos no plasma, quando armazenados adequadamente (ROSEN *et al.*, 1995; SJÖDIN *et al.*, 2019). A frequência média de detecção dos PBDEs 47, 99 e 100 foi de 77%. Mesmo com o banimento e a eliminação gradual desses compostos, eles ainda estão presentes nas residências em estofados e almofadas com poliuretano recicláveis. A meia vida biológica foi estimada em 11 anos para o Hexa BDE (ROSEN *et al.*, 1995). Com a melhoria da tecnologia analítica, a capacidade de detecção aumentou cerca de 3 vezes, ou seja, diminuiu-se o limite de detecção para 0,8 ng. g<sup>-1</sup> de lipídeo nesse inquérito ou 3 vezes menor do que nas pesquisas de 2005/06. A meia vida dos PBDEs de menor grau de bromação, PBDEs 47, 99 e 100 no caso, é muito mais longa e medida em anos quando comparada ao deca BDE por exemplo (PBDE 209) que chega a duas semanas em humanos. A questão da degradação dos congêneres por debromação foi relatada em todos os estudos, e também o aumento das concentrações entre indivíduos obesos, com um aumento na meia-vida dos PBDEs foi relatadas em todos os estudos (SJÖDIN *et al.*, 2019).

A Pesquisa Canadense sobre Medidas de Saúde (CHMS) publicada em 2018 com grupo populacional de trabalhadores, comparados à pesquisa estadunidense NHANES da população geral, as concentrações médias do PBDE 47(20 ng g<sup>-1</sup> de lipídeos no NHANES e 11 ng. g<sup>-1</sup> lipídeos no CHMS) são muito superiores àquelas encontradas em outros países como na Suécia (PBDE 47= 0,49 ng g<sup>-1</sup> lipídeos em 2011/12), na França (BDE 47 = 1,56 ng g<sup>-1</sup> em 2003/05 e na Alemanha(BDE 47= 0,38 ng g<sup>-1</sup> em 2013). Essas altas concentrações de PBDE 47, assim como as relações entre as concentrações encontradas de PBDEs 47, 99 e 100, são explicadas por causa do amplo uso da mistura de PentaBDE na América do Norte (COVACI *et al.*, 2011).

A principal fonte de contaminação dessas substâncias nos países estudados são a ingestão de peixes, carne, poeira e ar (FROMME *et al.*, 2009; SJÖDIN *et al.*, 2008)

A diferença entre a sensibilidade analítica da metodologia utilizada neste trabalho e daquela utilizada pelos NHANES e CHMS pode explicar o baixo percentual de amostras positivas identificadas. Outro fator que explica esta diferença seria a maior magnitude da exposição ambiental na América do Norte em relação a europeia ou a sulamericana, devido

ao hábito de consumo e meios de produção (FROMME *et al.*, 2014).

WATKINS e colaboradores em pesquisa de contaminação numa coorte (PROTECT STUDY) de nascidos em Porto Rico, iniciada em 2011 e publicado em 2019, usaram a técnica de cromatografia gasosa e espectrometria de massas de alta resolução com diluição de isótopos para analisar as amostras biológicas obtiveram em 68,8 % das gestantes resultado de exposição acima do limite de detecção e valores medianos de 3,6 ng g<sup>-1</sup> de lipídeos. Esses valores são inferiores àqueles encontrados pelo NHANES (SJÖDIN *et al.*, 2018).

Comparando os valores obtidos em Porto Rico com aqueles de outras coortes de nascimento, como as de Salinas (CHAMACOS, 2011) e de Cincinnati (HOME, 2003/06) verifica-se que as mulheres porto-riquenhas não são tão expostas ambientalmente a essas substâncias comparadas as estadunidenses (WATKINS *et al.*, 2019). Em nosso estudo, aproximadamente 92,5% das amostras de gestantes estavam abaixo do limite de detecção para os congêneres estudados. Embora esse baixo percentual de PBDEs em gestantes do Rio de Janeiro possam indicar uma menor exposição nessa população em particular, é possível que a amostra não tenha refletido a exposição na população de estudo.

FORDE e colaboradores em 2014 avaliaram os níveis de exposição prenatal em dez países caribenhos, usando a como metodologia instrumental a cromatografia em fase gasosa hifenada a espectrometria de massas e como resultado mediano para o PBDE 47 o valor foi de 5,33 ng g<sup>-1</sup> de lipídeos, sendo menores quando comparados aos americanos (PBDE 47=23,90 ng g<sup>-1</sup>) e canadenses (PBDE 47= 10,83ng g<sup>-1</sup>)(FORDE *et al.*, 2014).

Em um estudo de revisão, FROMME e colaboradores (2015) avaliaram os níveis de exposição aos éteres difenílicos polibromados nos continentes europeu, asiático e americano demonstraram que no continente norte americano as concentrações dos PBDEs encontrados no sangue (média 20 ng g<sup>-1</sup>) foram aproximadamente 4 vezes maiores quando comparados aos países estudados europeus, asiáticos e Oceania (SCHECTER *et al.*, 2010; SJÖDIN *et al.*, 2008; CEQUIER *et al.*, 2015; LU *et al.*, 2017; LUO *et al.*, 2013; PERSSON; WANG; HAGBERG, 2019; ESKENAZI *et al.*, 2013; CHEN *et al.*, 2019; FROMME *et al.*, 2016). As concentrações mais baixas encontradas foram de 0,9 ng g<sup>-1</sup> de lipídeos na Grécia.(KALANTZI *et al.*, 2011). O PBDE 47 sempre foi o congêner mais abundante estando presente em 57% das amostras na América do Norte, 35% na Ásia / Austrália e 31% em estudos europeus. Na Europa, a participação do PBDE 47 difere muito em cada país. Na Grécia em 2007, o PBDE 47 representava apenas 17% dos PBDEs nas amostras de soro de 61 indivíduos (KALANTZI *et al.*, 2011). Na Noruega houve um decaimento de 52% em

1988 para 40% em 2003. No mesmo período, o PBDE 153 aumentou de 18% para 37%. Não foram detectadas diferenças significativas entre homens e mulheres da Austrália, Nova Zelândia (WEMKEN *et al.*, 2020), EUA (SCHECTER *et al.*, 2006) e da Espanha e na população do mediterrâneo (GÓMARA *et al.*, 2011; VIZCAINO *et al.*, 2011).

Na Inglaterra, THOMAS e colaboradores, usando a metodologia analítica de cromatografia em fase gasosa hifenada com espectrometria de massas, detectaram valores medianos para o PBDE 47 de 0,82 ng g<sup>-1</sup> de lipídeos (THOMAS *et al.*, 2006).

Em estudo de biomonitoramento na Alemanha, FROMME e colaboradores encontraram níveis medianos do PBDEs 47, 99 e 100 respectivamente 1,8; 0,8; 0,6 ng g<sup>-1</sup> de lipídeos (FROMME *et al.*, 2009).

Uma observação muito importante feita por CEQUIER e colaboradores na Noruega, em 2015, foi a relação percentual em plasma dos congêneres PBDE 47 e 153. Em 1988 a relação percentual era de 3:1; em 2003 era de 1:1. E em 2012 de 1:2. A explicação mais provável é o grande tempo de meia vida do congênere BDE 153, hexa BDE comparado ao tetra BDE e como o Penta e Octa BDE foram proibidos, estes substituídos nas formulações de retardantes de chama pelo hexa BDE (CEQUIER *et al.*, 2015).

DROBNÁ e colaboradores em estudo de coorte na Eslováquia em 2010 analisaram amostras de plasma de crianças de 7 anos por cromatografia gasosa hifenada ao espectrômetro de massas de alta resolução e diluição isotópica, obtendo com valores médios em crianças para os congêneres PBDEs 47, 99 e 100 respectivamente 0,184; 0,079; 0,046 ng g<sup>-1</sup> de lipídeos (DROBNÁ *et al.*, 2019).

Na coorte PELAGIE, CHEVRIER e colaboradores avaliaram o neurodesenvolvimento de crianças na França em 2016, usando a mesma técnica analítica CG-MS/MS, com limite de detecção na ordem 0,01 µg L<sup>-1</sup> e descreveram a dificuldade analítica para confirmação os congêneres que possuem maior bromação como o penta, octa e deca BDE nas matrizes estudadas (biológicas e poeira doméstica)(CEQUIER *et al.*, 2015).

O limite de detecção da metodologia utilizada na coorte PELAGIE é 20 vezes inferior ao alcançado neste trabalho. Uma alternativa para o alcance deste limite seria a realização das análises com pool de amostras, caso os resultados não precisassem ser entregues individualmente para cada participante do estudo.(CEQUIER *et al.*, 2015).

As concentrações encontradas no estudo de coorte CHAMACOS em gestantes e crianças realizado na Califórnia são mais altos do que na França sendo a exposição infantil a PBDEs (principalmente BDE 47, 99, 100 e 153) a maior (ATTFIELD *et al.*, 2019).

Na coorte espanhola de nascimentos INMA-Menorca as concentrações de exposição constatadas foram muito mais baixos (GASCON *et al.*, 2011) e a concentração sérica mediana de PBDE 47 nesta coorte (0,12 ng g<sup>-1</sup> de lipídeos) foi menor que a da coorte CHAMACOS, por um fator de quase 400 (47 ng g<sup>-1</sup> de lipídeos). A concentração mediana de PBDE 99 foi 100 vezes menor: 0,12 ng g<sup>-1</sup> de lipídeos em INMA em relação à 10,6 ng g<sup>-1</sup> de lipídeos em CHAMACOS (ATTFIELD *et al.*, 2019).

A determinação das concentrações maternas de PBDEs pode indicar uma potencial exposição fetal. As evidências dessa exposição são importantes porque estudos têm indicado que essas substâncias atravessam a placenta e estão associadas com desfechos ao nascer (ZHAO *et al.*, 2019). Poucos estudos avaliaram a exposição ao BDE 209 (CHEVRIER *et al.*, 2016). A exposição a resíduos da mistura penta PBDE durante a infância no desenvolvimento cognitivo infantil, conforme relatado anteriormente por ESKENAZI e colaboradores em 2013 sugerem que a exposição infantil a resíduos da mistura deca BDE que ainda é usado na Europa também pode ser prejudicial a saúde (ESKENAZI *et al.*, 2013).

KIM e colaboradores pesquisaram os níveis de exposição médios na Coreia do Sul em 2012 utilizando a técnica analítica Cromatografia gasosa com espectrometria de massas de alta resolução e como resultado 100% das amostras foram positivas para o congêner PBDE 47, 74% para o PBDE 99 e 46 % para o PBDE 100. As concentrações encontradas no sangue das mães para os PBDEs 47, 99 e 100 foram 3,5; 1,8; 0,42 ng g<sup>-1</sup> de lipídeos respectivamente. (KIM *et al.*, 2012a). Nesse estudo o valor médio do somatório dos PBDEs foram de 12 ng g<sup>-1</sup> de lipídeos, sendo que da coorte americana em 2003 NHANES (39 ng g<sup>-1</sup> de lipídeos) (MAZDAI *et al.*, 2003b), mas superiores ao estudo sueco (1,7 ng g<sup>-1</sup> de lipídeos) (ALAEI *et al.*, 2003b), ao espanhol (4,3 ng g<sup>-1</sup> de lipídeos) (GÓMARA *et al.*, 2011) e ao belga (1,6 – 6,5 ng g<sup>-1</sup> de lipídeos) (ROOSENS *et al.*, 2010).

JIANG e colaboradores em artigo de revisão sistemática avaliando os níveis de exposição aos PBDEs em várias regiões da China e correlacionando com os tipos atividades industriais em cada área, constataram valores medianos de 13 ng g<sup>-1</sup> de lipídeos para concentração, valor bem próximo ao encontrado na Coorte americana NHANES (20 ng g<sup>-1</sup> de lipídeos), maior que os valores medianos canadenses e europeus (JIANG *et al.*, 2019). Há uma variação das concentrações encontradas nas províncias Chinesas de 1,1 até 180 ng g<sup>-1</sup> de lipídeos e os resultados mais altos foram encontrados principalmente nas províncias onde a principal atividade industrial são *e-waste* e indústria de eletroeletrônicos e plastificantes e espumas (COWELL *et al.*, 2019; PERSSON; WANG; HAGBERG, 2019)

Apesar de um número de amostras positivas tão pequeno, os níveis se apresentam compatíveis com os encontrados na revisão chinesa.

#### 6.6- AVALIAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS SOCIOECONÔMICAS NOS RESULTADOS ENCONTRADOS

As variáveis disponibilizadas para caracterização do perfil de exposição das gestantes participantes do estudo consistiram em: idade, bairro de moradia, renda, ocupação, período de ocupação durante a gestação, escolaridade e tipo de fornecimento de água. Como a incidência de resultados positivos foi muito baixa (n=9; 7,5% da população), não houve como estabelecer nenhuma correlação entre estes valores e as variáveis avaliadas.

Observando-se isoladamente o perfil das mães que deram resultado positivo verificou-se que elas são moradoras de diferentes bairros da cidade (tanto da zona sul quanto da zona norte), bem como duas de duas cidades da região do Grande Rio: Nova Iguaçu e Belford Roxo. Cinco não trabalhavam, 7 apresentavam renda familiar acima de R\$ 1.000,00, escolaridade entre ensino médio e superior e todas tinham água tratadas em suas residências.

## 7 CONCLUSÃO

A metodologia analítica validada foi sensível e eficaz para avaliar os PBDEs. O L.D.M e o L.Q.M. foram satisfatórios quando comparadas a outros estudos no mundo. As concentrações detectadas de PBDEs na população de estudo foram relativamente baixas, e é importante investigar se de fato esse é o perfil de exposição em gestantes na cidade do Rio de Janeiro. Além disso deve-se investigar tanto esse grupo de contaminantes retardantes de chama quanto as alternativas aos proibidos, que são halogenados ou fosforados e possuem também potencial toxicológico à saúde.

Alguns recursos analíticos devem ser desenvolvidos para aumentar a sensibilidade do método, como aumentar o volume de amostra inicial, para ser possível aumentar a concentração da amostra para 100 vezes, e tornar o método pelo menos 5 vezes mais sensível do apresentado neste trabalho. Pode-se utilizar para esta finalidade um pool de amostras, e este foi um recurso bastante empregado nas diversas coortes estudadas para discussão desses resultados, sendo uma possibilidade introduzi-la na preparação das amostras para continuidade do estudo destes contaminantes.

Deve-se ressaltar a importância do estudo da exposição aos PBDEs na fase que foi estudada, a gestação, já que é fundamental para o desenvolvimento normal, posto que durante estes períodos muitos sistemas biológicos ainda se encontram em formação e podem sofrer influências da exposição a xenobióticos, principalmente daqueles mais persistentes e capazes de serem bioconcentrados.

Pode-se concluir que esse tipo de avaliação de níveis de exposição a éteres difenílicos polibromados são pioneiros no Brasil e de grande relevância para a saúde pública.

O conhecimento dos níveis de concentração de uma substância química é o mais simples e direto método para se estabelecer valores orientadores para a Saúde Pública. Estes valores poderão ser usados como ferramenta interpretativa que podem fornecer um significado aos valores encontrados na população do estudo.

Deve-se continuar a avaliação dessas substâncias tanto com estudos em matrizes biológicas humanas, quanto ambientais, para se conhecer a dimensão do problema e propor uma forma de vigilância no Brasil. Novos padrões de consumo deveriam ser avaliados antes de implantar certos segmentos industriais. Principalmente, o padrão de consumo por automóveis e eletroeletrônicos para diminuir o volume de inserção desses contaminantes no meio ambiente.

## REFERÊNCIAS

- ALAE, 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** Pergamon, , 1 set. 2003a. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0160412003001211?via%3Dihub>>. Acesso em: 6 fev. 2019
- ALAE, 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, n. 6, p. 683–689, 1 set. 2003b.
- ALBANO, G. D. et al. Can PBDEs affect the pathophysiologic complex of epithelium in lung diseases? **Chemosphere**, 2020.
- ANALÍTICOS, M. DOQ-CGCRE-008. **INMETRO**, 2020.
- ANNUNCIÇÃO, D. et al. ÉTERES DIFENÍLICOS POLIBROMADOS (PBDE) COMO CONTAMINANTES PERSISTENTES: OCORRÊNCIA, COMPORTAMENTO NO AMBIENTE E ESTRATÉGIAS ANALÍTICAS. **Química Nova**, 2018.
- AOAC. AOAC international methods committee guidelines for validation of microbiological methods for food and environmental surfaces. **Aoac Official Methods of Analysis**, 2012.
- ATSDR. Agency for Toxic Substances and Disease Registry Case Studies in Environmental Medicine (CSEM): Lead Toxicity. **Agency for Toxic Substances and Disease Registry**, 2015.
- ATSDR. Toxicological profile for polybrominated biphenyl and polybrominated diphenyl ethers. **U.S. Department of Health and Human Services**, 2017a.
- ATSDR. PUBLIC HEALTH STATEMENT Polybrominated Diphenyl Ethers (PBDEs). 2017. Disponível em: <[www.atsdr.cdc.gov/](http://www.atsdr.cdc.gov/)>. Acesso em: 2 abr. 2020b.
- ATTFIELD, K. R. et al. Longitudinal study of age of menarche in association with childhood concentrations of persistent organic pollutants. **Environmental Research**, v. 176, 1 set. 2019.
- BELY, A. E. et al. Evaluating conceptual models for landscape change. **Molecular Ecology**, 2014.
- BJÖRKLUND, A. Life cycle assessment as an analytical tool in strategic environmental assessment. Lessons learned from a case study on municipal energy planning in Sweden.

**Environmental Impact Assessment Review**, 2012.

**BSEF - Bromine: Powering Science and Technologies**. Disponível em: <<http://www.bsef.com/>>. Acesso em: 7 fev. 2019.

CALDAS, S. S. et al. Principais técnicas de preparo de amostra para a determinação de resíduos de agrotóxicos em água por cromatografia líquida com detecção por arranjo de diodos e por espectrometria de massas. **Química Nova**, v. 34, n. 9, p. 1604–1617, set. 2011.

CEQUIER, E. et al. Comparing human exposure to emerging and legacy flame retardants from the indoor environment and diet with concentrations measured in serum. **Environment International**, 2015.

CHEN, L. et al. Prenatal exposure to polybrominated diphenyl ethers and birth outcomes. **Environmental Pollution**, 2015.

CHEN, T. et al. Polybrominated diphenyl ethers and novel brominated flame retardants in human milk from the general population in Beijing, China: Occurrence, temporal trends, nursing infants' exposure and risk assessment. **Science of The Total Environment**, v. 689, p. 278–286, 27 nov. 2019.

CHEN, Z. J. et al. Polybrominated Diphenylethers (PBDEs) and Their Hydroxylated Metabolites (OH-PBDEs) in Female Serum from Dalian, China. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, 2014a.

CHEN, Z. J. et al. Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in human samples of mother-newborn pairs in South China and their placental transfer characteristics. **Environment International**, 2014b.

CHEVRIER, C. et al. Childhood exposure to polybrominated diphenyl ethers and neurodevelopment at six years of age. **NeuroToxicology**, v. 54, p. 81–88, 1 maio 2016.

CHOI, G. et al. Occurrences of major polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in maternal and fetal cord blood sera in Korea. **Science of The Total Environment**, v. 491–492, p. 219–226, set. 2014.

Coordenação Geral de Acreditação ORIENTAÇÃO SOBRE VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS. INMETRO 2020. Disponível em: <[http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8\\_05.pdf](http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8_05.pdf)>.

COVACI, A. et al. Novel brominated flame retardants: A review of their analysis, environmental fate and behaviour **Environment International**, fev. 2011. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0160412010002370>>. Acesso em: 19 set. 2019

- COWELL, W. J. et al. Pre- and Postnatal Polybrominated Diphenyl Ether Concentrations in Relation to Thyroid Parameters Measured during Early Childhood. **Thyroid**, v. 29, n. 5, p. 631–641, 1 maio 2019.
- CURRIER, H. A. et al. Bioaccumulation and biomagnification of PBDEs in a terrestrial food chain at an urban landfill. **Chemosphere**, v. 238, 1 jan. 2020.
- DANIEL LUIZ RODRIGUES DA ANNUNCIACÃO. Química e Biológica Éteres difenílicos polibromados ( PBDE ) em sedimentos do Lago Paranoá , DF Instituto de Química Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Química e Biológica Éteres difenílicos polibromados ( PBDE ) em sedimentos do Lago Paranoá , DF. 2016.
- DARNERUD, P. O. Toxic effects of brominated flame retardants in man and in wildlife. **Environment International**, v. 29, n. 6, p. 841–853, 1 set. 2003.
- DE LA TORRE, A. et al. Organophosphate compounds, polybrominated diphenyl ethers and novel brominated flame retardants in European indoor house dust: Use, evidence for replacements and assessment of human exposure. **Journal of Hazardous Materials**, v. 382, 15 jan. 2020.
- DENG, W. J. et al. Distribution of PBDEs in air particles from an electronic waste recycling site compared with Guangzhou and Hong Kong, South China. **Environment International**, 2007.
- DROBNÁ, B. et al. PBDE serum concentration and preschool maturity of children from Slovakia. **Chemosphere**, v. 233, p. 387–395, 1 out. 2019.
- EPA. 2009 Edition of the Drinking Water Standards and Health Advisories 2009 Edition of the Drinking Water. **Environmental Protection**, 2009.
- EPA, U. Drinking Water Contaminants. **America's Children and the Environment**, 2015.
- ERDOĞRUL, Ö.; AZIRAK, S. REVIEW of THE STUDIES on THE RED YEAST RICE (Monascus purpureus). **Turkish Electronic Journal of Biotechnology**, 2004.
- ESKENAZI, B. et al. In utero and childhood polybrominated diphenyl ether (PBDE) exposures and neurodevelopment in the CHAMACOS study **Environmental Health Perspectives**, 2013.
- ESTILL, C. F. et al. Worker exposure to flame retardants in manufacturing, construction and service industries. **Environment International**, v. 135, 1 fev. 2020.
- EURACHEM GUIDE. Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics. 2014.
- FÄNGSTRÖM, B. et al. Temporal trends of polybrominated diphenyl ethers and

hexabromocyclododecane in milk from Stockholm mothers, 1980-2004. **Molecular Nutrition and Food Research**, 2008.

FILHO, J. J. Treatment of end of life vehicles in Brazil: Challenges and opportunities. SAE Technical Papers. **Anais...**2012

FORDE, M. S. et al. Prenatal exposure to persistent organic pollutants and polybrominated diphenyl ethers in 10 Caribbean countries. **Environmental Research**, 2014.

FOSTER, W. G. et al. Human maternal and umbilical cord blood concentrations of polybrominated diphenyl ethers. **Chemosphere**, 2011.

FREDERIKSEN, M. et al. Human internal and external exposure to PBDEs - A review of levels and sources **International Journal of Hygiene and Environmental Health** Urban & Fischer, 1 mar. 2009.

FREIRE, Paulo. Pedagogia do Oprimido. Rio de Janeiro: **Paz e Terra**, 1987

FROES ASMUS, C. I. R. et al. A Systematic Review of Children's Environmental Health in Brazil **Annals of Global Health**, 2016.

FROMME, H. et al. Human exposure to polybrominated diphenyl ethers (PBDE), as evidenced by data from a duplicate diet study, indoor air, house dust, and biomonitoring in Germany. **Environment International**, 2009.

FROMME, H. et al. Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs), hexabromocyclododecane (HBCD) and "novel" brominated flame retardants in house dust in Germany. **Environment International**, 2014.

FROMME, H. et al. Brominated flame retardants - Exposure and risk assessment for the general population **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, 2016.

**Fundamentos de química analítica - 9788522116607 - Livros na Amazon Brasil**. 2014.

GEENS, T. et al. Analytical characteristics of several new brominated flame retardants. **Talanta**, 2010.

GIBSON, E. A. et al. Flame retardant exposure assessment: findings from a behavioral intervention study. **Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology**, v. 29, n. 1, p. 33–48, 1 jan. 2019.

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, abr. 2011.

GONÇALVES, E. S. Ocorrência e distribuição de fármacos, cafeína e bisfenol-a em alguns corpos hídricos no Estado do Rio de Janeiro. UFF. Niterói, RJ, 3 maio 2016.

HALE, R. C. et al. Polybrominated diphenyl ether flame retardants in the North American environment. **Environment International**, 2003.

HAN, X. et al. Associations between the exposure to persistent organic pollutants and type 2 diabetes in East China: A case-control study. **Chemosphere**, v. 241, 1 fev. 2020.

HARAGUCHI, K.; HISAMICHI, Y.; ENDO, T. Accumulation and mother-to-calf transfer of anthropogenic and natural organohalogens in killer whales (*Orcinus orca*) stranded on the Pacific coast of Japan. **Science of the Total Environment**, 2009.

HARRAD, S.; DIAMOND, M. New Directions: Exposure to polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) and polychlorinated biphenyls (PCBs): Current and future scenarios. **Atmospheric Environment**, 2006.

HERBSTMAN, J. B. et al. Prenatal PBDEs and neurodevelopment. **Environmental Health Perspectives**, 2010.

HITES, R. A. Polybrominated Diphenyl Ethers in the Environment and in People: A Meta-Analysis of Concentrations. **Environmental Science & Technology**, v. 38, n. 4, p. 945–956, fev. 2004.

HUNG, H. et al. Temporal trends of Persistent Organic Pollutants (POPs) in arctic air: 20 years of monitoring under the Arctic Monitoring and Assessment Programme (AMAP). **Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)**, v. 217, p. 52–61, out. 2016.

ICH. ICH harmonised tripartite guideline validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1). **The**, 2005.

JIANG, Y. et al. Polybrominated diphenyl ethers in the environment and human external and internal exposure in China: A review **Science of the Total Environment** Elsevier B.V., , 15 dez. 2019.

JING, T.; JINXIA, Z. Distribution of polybrominated diphenyl ethers in breast milk, cord blood and placentas: a systematic review. **Environmental Science and Pollution Research**, 2017.

KALANTZI, O. I. et al. Distribution of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) and other persistent organic pollutants in human serum from Greece. **Environment International**, 2011.

KALLOO, G. et al. Exposures to chemical mixtures during pregnancy and neonatal outcomes: The HOME study. **Environment International**, v. 134, 1 jan. 2020.

KIM, T. H. et al. Comparisons of polybrominated diphenyl ethers levels in paired South Korean cord blood, maternal blood, and breast milk samples. **Chemosphere**, 2012a.

KIM, T. H. et al. Comparisons of polybrominated diphenyl ethers levels in paired South Korean cord blood, maternal blood, and breast milk samples. **Chemosphere**, v. 87, n. 1, p. 97–104, mar. 2012b.

LACORTE, S.; IKONOMOU, M. G. Occurrence and congener specific profiles of polybrominated diphenyl ethers and their hydroxylated and methoxylated derivatives in breast milk from Catalonia. **Chemosphere**, 2009.

LANÇAS, F. M. CROMATOGRAFIA LIQUIDA MODERNA - HPLC/CLAE - LANÇAS, FERNANDO MAURO. primeira ed. 2009.

LANDRIGAN, P. J.; BAKER, D. B. The National Children's Study — End or New Beginning? **New England Journal of Medicine**, v. 372, n. 16, p. 1486–1487, 16 abr. 2015.

LINDSTRÖM, G. et al. Identification of 19 polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in long-finned pilot whale (*Globicephala melas*) from the Atlantic. **Archives of environmental contamination and toxicology**, v. 36, n. 3, p. 355–63, abr. 1999.

LU, D. et al. Multi-analyte method development for analysis of brominated flame retardants (BFRs) and PBDE metabolites in human serum. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 409, n. 22, p. 5307–5317, 24 set. 2017.

LUO, Q. et al. Polybrominated diphenyl ethers in combusted residues and soils from an open burning site of electronic wastes. **Environmental Earth Sciences**, v. 69, n. 8, p. 2633–2641, 2013.

M.-J., L.-E. et al. Prenatal Exposure to Polybrominated Flame Retardants and Fetal Growth in the INMA Cohort (Spain) **Environmental Science and Technology**, 2015.

MARGOLIS, A. E. et al. Functional connectivity of the reading network is associated with prenatal polybrominated diphenyl ether concentrations in a community sample of 5 year-old children: A preliminary study. **Environment International**, v. 134, 1 jan. 2020.

MAZDAI, A. et al. Polybrominated diphenyl ethers in maternal and fetal blood samples. **Environmental health perspectives**, 2003a.

MAZDAI, A. et al. Polybrominated diphenyl ethers in maternal and fetal blood samples **Environmental Health Perspectives**, 2003b.

MCDONALD, T. A. A perspective on the potential health risks of PBDEs. **Chemosphere**, v. 46, n. 5, p. 745–755, 1 fev. 2002.

MEEKER, J. D. et al. Polybrominated diphenyl ether (PBDE) concentrations in house dust are related to hormone levels in men. **Science of the Total Environment**, v. 407, n. 10, p. 3425–3429, 1 maio 2009.

- MEERTS, I. A. et al. Potent competitive interactions of some brominated flame retardants and related compounds with human transthyretin in vitro. **Toxicological sciences: an official journal of the Society of Toxicology**, v. 56, n. 1, p. 95–104, 1 jul. 2000.
- MEIRONYTÉ, D.; NORÉN, K.; BERGMAN, Å. Analysis of polybrominated diphenyl ethers in swedish human milk. A time-related trend study, 1972–1997. **Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A**, 1999.
- MINH, T. B. et al. Persistent organic pollutants in Vietnam: Environmental contamination and human exposure. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, 2008.
- MIRANDA, M. L. et al. Associations of birth outcomes with maternal polybrominated diphenyl ethers and thyroid hormones during pregnancy. **Environment International**, 2015.
- MO, L. et al. Persistent organic pollutants (POPs) in oriental magpie-robins from e-waste, urban, and rural sites: Site-specific biomagnification of POPs. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 186, 30 dez. 2019.
- PAHO. Ultra-processed food and drink products in Latin America: Trends, impact on obesity, policy implications. 2015.
- PAROLINI, M.; BINELLI, A. Cyto-genotoxic effects induced by three brominated diphenyl ether congeners on the freshwater mussel *Dreissena polymorpha*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 2012.
- PERIAT, A. et al. Systematic evaluation of matrix effects in hydrophilic interaction chromatography versus reversed phase liquid chromatography coupled to mass spectrometry. **Journal of chromatography. A**, v. 1439, p. 42–53, 25 mar. 2016.
- PERSSON, J.; WANG, T.; HAGBERG, J. Temporal trends of decabromodiphenyl ether and emerging brominated flame retardants in dust, air and window surfaces of newly built low energy preschools. **Indoor Air**, v. 29, n. 2, p. 263–275, 15 mar. 2019.
- PHILLIPS, D. L. et al. Chlorinated hydrocarbon levels in human serum: Effects of fasting and feeding. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, 1989.
- PIETRON, W. et al. Exposure to PBDEs associated with farm animal meat consumption. **Chemosphere**, v. 224, p. 58–64, 15 jun. 2019.
- PIPA. Estudo longitudinal dos efeitos da exposição a poluentes ambientais. 2017.
- POON, S. et al. Association of In Utero Exposure to Polybrominated Diphenyl Ethers With the Risk of Hypospadias. **JAMA Pediatrics**, 2018.
- PROTECTION, U. S. E. et al. Technical Fact Sheet – Polybrominated Diphenyl Ethers (

PBDEs ). n. November, p. 1–5, 2017.

QUEIROZ, F. B. Descrição: Desenvolvimento e validação de metodologia para determinação de fármacos e perturbadores endócrinos em amostras de esgoto utilizando extração em fase sólida e cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas. Universidade Federal de Ouro Preto, 2011.

QUEIROZ, S. C. N.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 68–76, fev. 2001.

QUINÁGLIA, G. A. Caracterização dos níveis basais de concentração de metais nos sedimentos do sistema estuarino da baixada santista. São Paulo: **Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da Universidade de São Paulo**, 27 nov. 2006.

ROOSENS, L. et al. Spatial variations in the levels and isomeric patterns of PBDEs and HBCDs in the European eel in Flanders. **Environment International**, 2010.

ROSEN, D. H. et al. Half-life of polybrominated biphenyl in human sera. **Environmental Health Perspectives**, 1995.

SCHECTER, A. et al. Polybrominated diphenyl ether (PBDE) levels in an expanded market basket survey of U.S. food and estimated PBDE dietary intake by age and sex. **Environmental Health Perspectives**, 2006.

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

Scientific Opinion on Polybrominated Diphenyl Ethers (PBDEs) in Food. **EFSA Journal**, 2011.

SHELLER-MILLER, S. et al. Environmental pollutant induced cellular injury is reflected in exosomes from placental explants. **Placenta**, v. 89, p. 42–49, 1 jan. 2020.

SJÖDIN, A. et al. Serum concentrations of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) and polybrominated biphenyl (PBB) in the United States population: 2003-2004. **Environmental Science and Technology**, 2008.

SJÖDIN, A. et al. Polybrominated Diphenyl Ethers, Polychlorinated Biphenyls, and 2,2-Bis(4-chlorophenyl)-1,1-dichloroethene in 7- and 9-Year-Old Children and Their Mothers in the Center for the Health Assessment of Mothers and Children of Salinas Cohort. **Environmental Science and Technology**, v. 52, n. 4, p. 2287–2294, 2018.

SJÖDIN, A. et al. Polybrominated Diphenyl Ethers and Biphenyl in Serum: Time Trend

Study from the National Health and Nutrition Examination Survey for Years 2005/06 through 2013/14. **Environmental Science and Technology**, 2019a.

SJÖDIN, A. et al. Polybrominated Diphenyl Ethers and Biphenyl in Serum: Time Trend Study from the National Health and Nutrition Examination Survey for Years 2005/06 through 2013/14. **Environmental Science and Technology**, v. 53, n. 10, p. 6018–6024, 21 maio 2019b.

SKOOG, D. A. Fundamentals Of Analytical Chemistry. **Journal of Chemical Information and Modeling**, 2013.

STASINSKA, A. et al. Polybrominated diphenyl ether (PBDE) concentrations in plasma of pregnant women from Western Australia. **Science of the Total Environment**, 2014.

SUN, Y. et al. Responses of plants to polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) induced phytotoxicity: A hierarchical meta-analysis. **Chemosphere**, v. 240, 1 fev. 2020.

TANG, J.; ZHAI, J. X. Distribution of polybrominated diphenyl ethers in breast milk, cord blood and placentas: a systematic review. **Environmental Science and Pollution Research**, 2017.

TEMER, M. et al. Presidência da República do Brasil Presidenta Dilma Vana Rousseff Vice-Presidente Ministério do Meio Ambiente Ministra Izabella Teixeira. 2015.

THOMAS, G. O. et al. Organohalogen chemicals in human blood from the United Kingdom. **Environmental Pollution**, 2006.

THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**, 2002.

UNEP Year Book 2012. **Environmental Development**, 2012.

USEPA. 2018 Edition of the drinking water standards and health advisories. **Office of Water U.S. Environmental Protection Agency Washington, DC**, n. March, p. 1–20, 2018.

VIZCAINO, E. et al. Assessment of prenatal exposure to persistent organohalogen compounds from cord blood serum analysis in two Mediterranean populations (Valencia and Menorca). **Journal of Environmental Monitoring**, 2011.

WANG, D. G. et al. Concentration, distribution, and human health risk assessment of endosulfan from a manufacturing facility in Huai'an, China. **Science of the Total Environment**, v. 491–492, p. 163–169, set. 2014.

WANG, Y. et al. Quantification of Urinary Mono-hydroxylated Metabolites of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by on-line Solid Phase Extraction-High Performance Liquid

- Chromatography-Tandem Mass Spectrometry HHS Public Access. **Anal Bioanal Chem**, v. 409, n. 4, p. 931–937, 2017.
- WATKINS, D. J. et al. Preliminary assessment of exposure to persistent organic pollutants among pregnant women in Puerto Rico. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, 2019.
- WEMKEN, N. et al. Emerging and legacy brominated flame retardants in the breast milk of first time Irish mothers suggest positive response to restrictions on use of HBCDD and Penta- and Octa-BDE formulations. **Environmental Research**, v. 180, 1 jan. 2020.
- XIE, Z. et al. Transport and fate of hexachlorocyclohexanes in the oceanic air and surface seawater. **Biogeosciences**, 2011.
- ZHANG, H. et al. Oxidative and nitrosative stress in the neurotoxicity of polybrominated diphenyl ether-153: possible mechanism and potential targeted intervention. **Chemosphere**, v. 238, 1 jan. 2020a.
- ZHANG, M. et al. Determination of newly synthesized dihydroxylated polybrominated diphenyl ethers in sea fish by gas chromatography-tandem mass spectrometry. **Chemosphere**, v. 240, 1 fev. 2020b.
- ZHANG, X. et al. Polybrominated biphenyl ethers in breast milk and infant formula from Shanghai, China: Temporal trends, daily intake, and risk assessment. **Science of the Total Environment**, 2014.
- ZHAO, Y. et al. Associations between in utero exposure to polybrominated diphenyl ethers, pathophysiological state of fetal growth and placental DNA methylation changes. **Environment International**, 2019.
- ZOTA, A. R. et al. Polybrominated diphenyl ethers, hydroxylated polybrominated diphenyl ethers, and measures of thyroid function in second trimester pregnant women in California. **Environmental Science and Technology**, 2011.